

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE – LILLE 2
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTÉ

Année: 2016

N°

THÈSE POUR L'OBTENTION
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

CARACTÉRISATION DE LA DIAGÉNÈSE OSSEUSE EN
ANTHROPOLOGIE MÉDICO-LÉGALE :

ÉTUDE MACROSCOPIQUE, SPECTROMÉTRIQUE ET HISTOMORPHOLOGIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2016

Par Yann DELANNOY

Jury

Madame le Professeur Pauline SAINT-MARTIN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Gérard QUATREHOMME	Rapporteur
Monsieur le Professeur Bertrand LUDÉS	Examineur
Monsieur le Professeur Norbert TELMON	Examineur
Monsieur le Professeur Xavier DEMONDION	Examineur
Monsieur le Professeur Guillaume PENEL	Directeur
Monsieur le Professeur Thomas COLARD	Co-Directeur

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

- Madame le Professeur Pauline SAINT-MARTIN, Professeur de Médecine Légale et de Droit de la Santé à l'Université François Rabelais de Tours, expert près la Cour d'Appel d'Orléans. Laboratoire AMIS UMR CNRS 5288

Vous me faites le plaisir de juger ce travail et d'en être rapporteur. Vous savez le respect que j'ai pour vous. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon soutien dans l'avenir.

- Monsieur le Professeur Gérard QUATREHOMME, Professeur de Médecine Légale et de Droit de la Santé à l'Université Nice Sophia Antipolis, expert près la Cour d'Appel d'Aix en Provence. Laboratoire CEPAM UMR CNRS 7264.

Vous me faites le plaisir d'être rapporteur de cette thèse. Outre votre expertise dans le domaine de l'anthropologie, j'ai pu mesurer à votre contact, l'étendue de votre humanité et suis honoré que vous ayez accepté de juger ce travail.

- Monsieur le Professeur Bertrand LUDES, Professeur de Médecine Légale et de Droit de la Santé à l'Université Paris Descartes Sorbonne Cité, expert agréé par la Cour de Cassation. Laboratoire AMIS UMR CNRS 5288.

Vous me faites l'honneur de juger ce travail auquel vous avez apporté votre expertise et votre rigueur scientifique. J'ai eu le privilège de travailler sous votre direction et vous savez toute l'estime que je vous porte. Soyez assuré de toute ma gratitude et de ma confiance.

- Monsieur le Professeur Norbert TELMON, Professeur de Médecine Légale et de Droit de la Santé à l'Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, expert agréé par la Cour de Cassation. Laboratoire AMIS UMR CNRS 5288.

Vous me faites le privilège de juger ce travail. Je suis honoré de l'analyse que votre expertise scientifique en anthropologie apportera à cette thèse.

- Monsieur le Professeur Xavier DEMONDION, Professeur d'Anatomie à l'Université de Lille. Unité de Taphonomie Médico-Légale EA 7367.

Vous m'avez fait l'honneur de participer aux réflexions menées tout au long de ce travail en apportant votre expérience scientifique et votre point de vue toujours éclairé. Je vous remercie chaleureusement pour les conseils que vous m'avez apportés et pour votre enseignement.

- Monsieur le Professeur Guillaume PENEL, Professeur d'Odontologie - Sciences Biologiques, de l'Université de Lille. Directeur de l'EA 4490 Physiopathologie des maladies osseuses et inflammatoires.

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. J'ai pu mesurer tout au long de ce travail vos qualités de management, de rigueur, de travail, et vos connaissances scientifiques sur la physiopathologie osseuse. Je vous remercie de votre bienveillance à mon égard et de tous les conseils que vous m'avez prodigués tant sur le plan scientifique que personnel. Soyez assuré de toute mon estime.

- Monsieur le Professeur Thomas COLARD, Professeur d'Odontologie - Sciences Anatomiques et Imagerie. Unité de Taphonomie Médico-Légale EA 7367.

Vous m'avez fait l'honneur de votre confiance sur ce projet de thèse que vous avez initié et dirigé. Vos qualités scientifiques et humaines sont innombrables. Je vous remercie de votre soutien personnel et professionnel constant, et de vos conseils scientifiques toujours justes. Soyez assuré de toute mon amitié.

Aux membres des laboratoires de recherche,

- Monsieur Guillaume FALGAYRAC, Ingénieur de Recherche de l'EA 4490 Physiopathologie des maladies osseuses et inflammatoires.
Vous m'avez apporté tout votre savoir et votre expertise dans le domaine de la spectrométrie Raman. Je vous remercie de votre disponibilité permanente, de vos conseils et de votre gentillesse. Sans votre apport, ce travail n'aurait pu être réalisé. Soyez assuré de toute mon amitié.
- Madame Catherine CANNET, chargée du laboratoire d'histomorphométrie de médecine légale, Faculté de médecine, Université de Strasbourg.
Vous m'avez fait partager votre connaissance considérable dans le domaine de l'histologie. Je vous remercie de votre disponibilité et de votre apport scientifique dans ce projet. Soyez assurée de tout mon respect.
- Aux membres et doctorants des EA 4490 et 7367 qui m'ont toujours apporté leur aide et leurs yeux experts dans différents domaines de la recherche. Soyez tous assurés de ma profonde gratitude.
- Monsieur le Professeur Christian FONTAINE, Professeur d'Anatomie à l'Université de Lille, directeur du Laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Lille, ainsi qu'à Messieurs Maurice DE MEULAERE et Franck STEVENDART pour leur aide et leur soutien à ce projet.
- Monsieur le Professeur Alain DUHAMEL et Mme Hélène BEHAL, biostatisticienne de l'unité de Méthodologie, Biostatistiques et Datamanagement du CHRU de Lille pour leur aide dans la conception méthodologique statistique de ce projet.
- Monsieur Olivier DEVOS, du LASIR, UMR 8516 de L'université de Lille, pour son expertise dans le domaine des analyses statistiques multivariées.
- A la Société Française de Médecine Légale pour l'utilisation de sa station de vidéo-microscopie.

Aux professionnels de la discipline de Médecine Légale et Droit de la Santé,

- A mes maîtres du service de Médecine Légale de la Faculté de Médecine et du CHRU de Lille, les Professeurs Didier GOSSET, Valéry HEDOUIN et Gilles TOURNEL.

Vous m'avez apporté votre enseignement et votre soutien depuis tant d'années. Soyez assurés de mon profond respect, de toute ma gratitude, et de la confiance que vous avez placée en moi pour les projets à venir.
- A mes confrères du service de Médecine Légale du CHRU de Lille, qui m'ont souvent témoigné leur confiance, leur amitié et m'ont permis de me mener à bien cette activité de recherche en compensant mes absences parfois longues. Soyez assurés de toute mon estime, de ma gratitude et de ma volonté de poursuivre ensemble les projets initiés.
- A mes confrères de l'Institut Médico-Légal de Paris, pour l'accueil et la confiance sans réserve qu'ils m'ont immédiatement témoignés pendant cette année de mobilité. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de toute mon amitié.
- Aux personnels de l'Unité Médico-Judiciaire du CHRU de Lille qui eux aussi m'ont témoigné leur confiance et participent sans restriction aux projets que je leurs sou mets. Soyez assurés de toute ma confiance et de tout mon soutien.
- Aux personnels de l'Institut Médico-Légal du CHRU de Lille. Soyez assurés de toute ma reconnaissance pour votre aide si précieuse au quotidien.
- Aux personnels de l'Institut Médico-Légal de Paris. Soyez remerciés de votre accueil et assurés de toute ma reconnaissance.

RESUMÉ

Caractérisation de la diagénèse osseuse en anthropologie médico-légale : étude macroscopique, spectrométrique et histomorphologique

Introduction : La détermination du délai postmortem dans les cas de découvertes de restes squelettisés est un élément clé de l'enquête judiciaire. Pour autant, face à la découverte de restes osseux, peu de méthodes sont applicables pour une estimation précise de ce délai. Cette étude taphonomique souhaitait s'inscrire dans une temporalité rejoignant les impératifs judiciaires appliqués en médecine légale. Ainsi, l'hypothèse principale de ce travail était constituée par une dégradation organique précoce de l'os en période *postmortem*, notamment sous la forme d'une dégradation collagénique. Celle-ci a donc fait l'objet d'une évaluation prospective.

Matériels et Méthodes : 6 dons de corps humains, sans pathologie osseuse connue ont été inclus avec pour chaque sujet l'étude des côtes. Ces os ont été inclus dans un environnement de diagénèse et étudiés sur 2 ans. Une analyse macroscopique de perte de poids de l'os a été réalisée, et complétée par deux méthodes : l'une moléculaire (microspectrométrie Raman) et l'autre morphologique (histologie).

Résultats : Ce travail, a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques de l'altération temporelle des différentes phases osseuses via : une dessiccation mise en évidence par une perte de poids osseuse ; une diagénèse des fractions organiques et minérales. Ainsi, l'étude des paramètres physico-chimiques en microspectrométrie Raman a montré une tendance temporelle à la diminution des rapports phase minérale/phase organique ; la diminution de la carbonatation minérale ; l'augmentation de la cristallinité. L'analyse statistique multivariée des spectres Raman a permis : de distinguer des groupes temporels en les discriminant via leurs contributions organiques ; de construire l'ébauche d'un modèle statistique d'utilisation pratique. L'étude microscopique des prélèvements a montré l'absence de toute attaque microbienne en période *postmortem* précoce, mais un mécanisme d'altération organique collagénique de type hydrolyse chimique.

Discussion : Notre travail, a permis d'identifier 3 paramètres fondamentaux du vieillissement osseux qui doivent être connus du praticien qualifié en anthropologie médico-légale, et cela même sur une période d'étude de 2 ans « courte » à l'échelle de l'anthropologie :

- L'environnement influence fortement la diagénèse osseuse et doit être aussi bien étudié que l'os en lui-même. En effet, l'étude de la perte de poids de l'os, a montré une altération de composition osseuse très précoce avec phénomène de dessiccation osseuse, comparable à la déshydratation globale du corps en période *postmortem* ;
- La diagénèse osseuse est un phénomène global dans lequel les différentes altérations de phases minérales et organiques sont interdépendantes et peuvent être appréciées par la microspectrométrie Raman, qui outre son apport dans l'analyse de la dégradation chimique de l'os, permet par les outils statistiques qui y sont associés, d'identifier des classes temporelles de diagénèse. Ces classes, qui devront faire l'objet d'études supplémentaires, pourraient à terme être une aide pratique et servir de référence dans la datation précise d'un os ;
- L'altération organique de l'os peut s'opérer selon des modes de dégradations chimiques ou bactériens en fonction de l'environnement et du délai *postmortem*. L'histologie peut permettre de faire ce distinguo. Sur ce délai d'étude, la dégradation collagénique de type chimique par hydrolyse est prédominante.

Conclusion : Ces paramètres forment une unité structurelle indissociable qui est connue de longue date en anthropologie archéologique, et qui est parfaitement transposable en pratique médico-légale si des méthodologies adaptées sont développées. Les voies de recherche sur cette thématique ont un rôle essentiel à jouer pour que la médecine légale puisse répondre aux légitimes demandes exprimées par les victimes et leurs ayants-droits auprès de la justice.

Mots-clés : médecine légale ; anthropologie ; délai postmortem ; diagénèse ; os ; matrice organique et minérale

ABSTRACT

Characterization of bone diagenesis in forensic anthropology: A macroscopic, spectrometric and histomorphological study

Introduction: Determining the postmortem interval in cases of skeletonized remains is a key element of the judicial investigation. However, few methods are applicable for an accurate estimate of this period. This taphonomic study wanted to be performed in a temporality joining the legal requirements applied in forensics. Thus, the main hypothesis of this study was an early organic postmortem bone degradation, particularly a collagen degradation. The latter has been studied prospectively.

Materials and Methods: 6 human bodies without known bone disease were included, and for each subject, the ribs were chosen. The bones were included in a diagenetic environment and studied over 2 years. Macroscopic analysis of bone weight loss was performed, and completed by two methods: one molecular (Raman microspectrometry) and the other morphological (histology).

Results: This work has highlighted certain features of the temporary bone alteration on its different phases via: a desiccation highlighted by bone mass loss; a diagenesis of organic and mineral phases. Thus, the study of physicochemical parameters by Raman microspectrometry revealed a temporary trend of declining mineral / organic ratios; decreasing carbonation; increasing crystallinity. Multivariate analysis of Raman spectra allowed: to distinguish temporal groups by discriminating via their organic contributions; to design a statistical model of practical use. The microscopic study of the samples revealed no microbial attack in the early postmortem period, but an alteration of collagen by chemical hydrolysis.

Discussion: Our study identified three basic parameters of bone diagenesis that must be known to the forensic anthropologist, even over a period of 2 years which is "short" on the scale of anthropology:

- The environment strongly influences bone diagenesis and should be studied as well as the bone itself. Indeed, the study of bone weight loss, revealed a bone drying phenomenon, similar to the overall dehydration of the body in the postmortem period;
- Bone diagenesis is a global phenomenon in which the various alterations of inorganic and organic phases are interdependent and can be evaluated by Raman microspectrometry. Furthermore, its contribution and statistical tools associated with it, in the analysis of the chemical degradation of the bone, allows the identification of diagenesis classes. These classes will require additional studies, eventually to be a practical support in dating a bone;
- The organic alteration of the bone may be due to chemical or bacterial degradation, according to the environment and the postmortem period. Histology can make this distinction. On this period of study, the collagen degradation by chemical hydrolysis is predominant.

Conclusion: These parameters form a structural unit, which is well known in archaeological anthropology, and is absolutely transposable in forensic practice if appropriate methodologies are developed. Research on this topic has an essential role as forensics have to respond to legitimate requests from victims and their relatives towards justice.

Keywords: Forensic science; Forensic anthropology; Postmortem interval; Diagenesis; Bone; organic and mineral matrix

LISTE DES FIGURES ET LÉGENDES

Figure 1 : Organisation du tissu osseux à différentes échelles d'études (adapté de Chappard, D *et al.* 2011)

Figure 2 : Étapes de synthèse du collagène et modifications post-traductionnelles, adapté de Viguet-Carrin *et al.*, 2006

Figure 3 : Coupes histologiques des stades 5 (bonne préservation histologique : figure de gauche) et 0 (altération histologique : figure de droite) illustrant l'index de préservation histologique dit « d'Oxford », issues de Hedges et Millard, 1995

Figure 4 : Coupe transversale de côte (x 10) observée sous l'optique du microspectromètre Raman après section au disque diamanté

Figure 5 : Coupe transversale de côte observée sous station de vidéo microscopie et après coloration au rouge Picro-Sirius

Figure 6 : Schématisation du fonctionnement du spectromètre Raman

Figure 7 : Typographie d'une bande spectrale obtenue en spectrométrie Raman

Figure 8 : Spectre Raman représentatif du tissu osseux sur différentes fenêtres spectrales : phases organiques et minérales de l'os

Figure 9 : Zones d'étude choisies pour les acquisitions spectrales

Figure 10 : Exemple de modèle PCA et PLS-DA sur les mêmes données illustrant l'intérêt d'une méthode d'analyse multivariée supervisée (figure issue de Savorani *et al.*, 2013)

Figure 11 : Évolution de la température sur les 90 premiers jours d'étude en environnement extérieur

Figure 12 : Aspect macroscopique des côtes 1 et 4 à un mois (gauche) et 3 mois (droite) de diagénèse

Figure 13 : Décroissance de la perte de poids (pourcentage de poids restant) des côtes en fonction du temps

Figure 14 : Analyse PCA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois

Figure 15 : Composante principale PC2 (3,23%) : contributions notables

Figure 16 : Analyse PLS-DA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois : discrimination des groupes M0 (supra) et M24 (infra)

Figure 17 : VIP scores analyse PLS-DA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois

Figure 18 : Analyse PLS-DA sur 12 mois : modèle de prédiction à T0 mois, T6 mois et T12 mois

Figure 19 : Analyse PLS-DA sur 24 mois : modèle de prédiction à T0 mois, T12 mois et T24 mois

Figure 20 : VIP scores modèle prédictif : bandes d'intérêts positives correspondent à la proline, l'hydroxyproline, l'amide III, et $\delta(\text{CH}_2)$ collagène

Figure 21 : Cartographie des coupes histologiques d'une côte C4 de 0 à 12 mois postmortem, colorée au rouge Picro-Sirius

Figure 22 : Aspect microscopique des ostéons : aspect continu des lamelles concentriques parallèles autour du canal de Havers à 0 mois DPM et forte intensité de la biréfringence (*coloration au rouge Picro-Sirius - visualisation en lumière polarisée pour les deux illustrations*)

Figure 23 : Aspect microscopique de la dégradation architecturale : dégradation des lamelles osseuses autour du canal de Havers à 12 mois DPM (illustrations du haut). Désorganisation des fibres de collagène sur toute l'épaisseur de la flèche. A 24 mois, la perte de l'architecture lamellaire se poursuit et apparaît en périphérie de l'os cortical (illustrations du bas). Absence de tunnels ou de lacunes de types bactériens. Perte de l'intensité de la biréfringence.
(*coloration au rouge Picro-Sirius - visualisation en lumière polarisée et sans polarisation en haut à droite*).

Figure 24 : Aspect microscopique de la bioérosion des ostéons à 12 DPM : l'ostéon dégradé est indiqué par une flèche. (*A gauche : coloration au rouge Picro-Sirius et visualisation en lumière NIC ; A droite : coloration au rouge Picro-Sirius*).

Figure 25 : Théorie de l'exclusion enzymatique (adapté de Nielsen-Marsh *et al.*, 2000)

Figure 26 : Schématisation des types de tunnels individualisables dans l'os

Figure 27 : Types de tunnels individualisables dans l'os en coupe transversale : 1 (tunnels de Wedl) ; 2 (tunnels linéaires) ; 3 (tunnels en bourgeons) ; 4 (tunnels en lamelles). Issu de Jans *et al.*, 2004

Figure 28 : Modèle du clivage hydrolytique du collagène. Adapté de Collins *et al.*, 1995

Figure 29 : Trajectoires diagénétiques. Adapté de (Smith *et al.*, 2007) (Nielsen-Marsh *et al.*, 2007). Notre étude a porté sur un sol neutre et a relevé des échantillons ayant subi une diagénèse de classe 2

LISTE DES TABLEAUX ET LÉGENDES

Tableau 1 : Paramètres qualitatifs et quantitatifs de l'index de préservation histologique selon Hedges et Millard, 1995

Tableau 2 : Caractéristiques des milieux d'environnement intérieurs et extérieurs pour chaque côte étudiée

Tableau 3 : Position des bandes d'intérêt étudiées en microspectrométrie Raman pour l'étude du tissu osseux

Tableau 4 : Paramètres météorologiques environnementaux des côtes étudiées macroscopiquement

Tableau 5 : Pesées (en gramme) et pourcentages de poids restant sur 90 jours d'étude

Tableau 6 : Paramètres évalués et longueurs d'ondes correspondantes par l'étude microspectrométrique Raman

Tableau 7 : ratios phase minérale / phase organique, études des aires et intensités spectrales sur les 12 premiers mois

Tableau 8 : Scores de fiabilité (sensibilité et spécificité) et de robustesse (Root Mean Square Error Calibration, RMSEC et Root Mean Square Error Cross Validation, RMSECV) de l'analyse PLS-DA retenue. La fiabilité de l'analyse PLS-DA correspond à une sensibilité et une spécificité proche de 100 % ; la robustesse correspond à des valeurs de RMSEC et RMSECV voisines et se rapprochant au maximum de zéro. Ici, les temps T0M et T24M ont montré des discriminations très significatives alors que les temps T6M et T12M montraient des discriminations intermédiaires.

Tableau 9 : Scores de fiabilité et de robustesse du modèle de prédiction PLS-DA à T0M, T6M et T12M

Tableau 10 : Scores de fiabilité et de robustesse du modèle de prédiction PLS-DA à T0M, T12M et T24M

Tableau 11 : Dénombrement des ostéons dégradés en fonction des temps d'étude (exemple de la côte C4)

Tableau 12 : Intensité de la biréfringence en lumière polarisée en fonction du délai *postmortem*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. LE TISSU OSSEUX.....	2
A. Organisation architecturale du tissu osseux.....	2
1. Echelle macroscopique.....	3
2. Echelle microscopique.....	4
B. Composition du tissu osseux.....	5
1. Phase organique.....	6
a) Le collagène.....	6
b) Protéines non collagéniques.....	7
c) Lipides.....	9
2. Phase minérale ou inorganique.....	9
II. DELAI POSTMORTEM SUR RESTES OSSEUX.....	10
A. Principes généraux.....	10
B. Méthodes de détermination du délai postmortem sur restes osseux.....	13
1. Méthodes colorimétriques.....	13
a) Réaction de coloration au bleu de Nil et à l'indophénol.....	13
b) Fluorescence au UV.....	14
c) Réactivité de l'hémoglobine.....	15
2. Méthodes radio-isotopiques.....	16
a) Datation au ¹⁴ C.....	17
b) Autres méthodes radio-isotopiques.....	18
3. Méthodes chimiques.....	20
a) Diagenèse de phase organique.....	20
b) Diagenèse de phase minérale.....	21
c) Diagenèse organo-minérale par méthodes spectroscopiques.....	22
III. DIAGÉNÈSE OSSEUSE.....	23
A. Principes généraux.....	23
B. Paramètres de mesure de la diagenèse.....	25
1. Index de préservation histologique.....	25
2. Teneur en protéines.....	27
3. Mesure de la cristallinité.....	28
4. Mesure de la porosité.....	29
5. Evaluation de la carbonatation.....	30
C. Trajectoires diagenétiques.....	31
OBJECTIFS.....	33
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	36
I. MATÉRIELS.....	37
A. Pièces osseuses.....	37
B. Préparation des échantillons.....	38
C. Inclusion dans le milieu de diagenèse.....	39
1. Côtes destinées à une analyse macroscopique.....	39
2. Côtes destinées à l'analyse spectroscopique.....	40
3. Côtes destinées à l'analyse histo-morphologique.....	42

II. MÉTHODES.....	43
A. Analyse macroscopique : la perte de poids de l'os	43
B. Analyse spectrométrique Raman.....	44
1. Principes de la spectrométrie Raman.....	44
2. Méthodologie de l'étude.....	47
3. Traitement des spectres Raman.....	49
C. Analyse histo-morphologique.....	55
1. Préparation des échantillons.....	55
2. Analyse histo-morphologique Raman.....	56
RÉSULTATS.....	58
I. ANALYSE MACROSCOPIQUE : LA PERTE DE POIDS DE L'OS	59
A. Mesure des paramètres météorologiques.....	59
B. Evolution de la perte de poids.....	60
II. ANALYSE SPECTROSCOPIQUE.....	64
A. Etude des paramètres physico-chimiques.....	64
1. Ratio de phase minérale/phase organique.....	64
2. Carbonatation.....	66
2. Cristallinité.....	66
B. Analyses spectrales multivariées.....	67
III. ANALYSES HISTO-MORPHOLOGIQUES.....	78
DISCUSSION.....	84
I. PERTE DE POIDS DE L'OS EN PÉRIODE POSTMORTEM.....	86
A. Dessiccation et perte de poids de l'os.....	86
B. Autres facteurs influents sur la perte de poids de l'os.....	88
II. LA SPECTROMÉTRIE RAMAN : APPORTS DANS L'ÉVALUATION DE LA DIAGÉNÈSE.....	91
A. Diagénèse minérale mesurée en spectrométrie Raman.....	91
B. Diagénèse organique mesurée en spectrométrie Raman.....	94
III. CARACTÉRISATION DE LA DIAGÉNÈSE ORGANIQUE : ALTERATION COLLAGÉNIQUE.....	97
A. Mécanisme d'altération du collagène via des attaques microbiennes.....	98
1. Altération collagénique microbienne et spectrométrie Raman.....	98
2. Altération collagénique microbienne en histomorphologie.....	101
a) Détérioration histologique architecturale tunnelaire.....	101
b) Modification histologique architecturale non tunnelaire.....	105
B. Mécanisme d'altération du collagène par hydrolyse chimique.....	108
C. Synthèse:identification d'une trajectoire diagénétique <i>postmortem</i> précoce.....	112
CONCLUSION.....	113
RÉFÉRENCES.....	117
ANNEXES.....	124
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	125
ENCADREMENTS.....	126

INTRODUCTION

I. LE TISSU OSSEUX

A. Organisation architecturale du tissu osseux

Les différentes sollicitations imposées au squelette sont à l'origine d'un remodelage permanent de celui-ci à différentes échelles. Ce remodelage joue un rôle crucial dans l'adaptation du squelette par la résorption de l'os primaire (ou jeune) et la configuration de nouveaux tissus osseux secondaires (en réponse à l'histoire de vie, aux signaux phylogénétiques, à l'environnement et aux contraintes biomécaniques) (Cambra-Moo *et al.*, 2012). L'organisation architecturale du tissu osseux qui lui confère ses propriétés doit ainsi s'envisager à plusieurs échelles : macro et microscopique. Il doit aussi être étudié à l'échelle de sa nature moléculaire (figure 1).

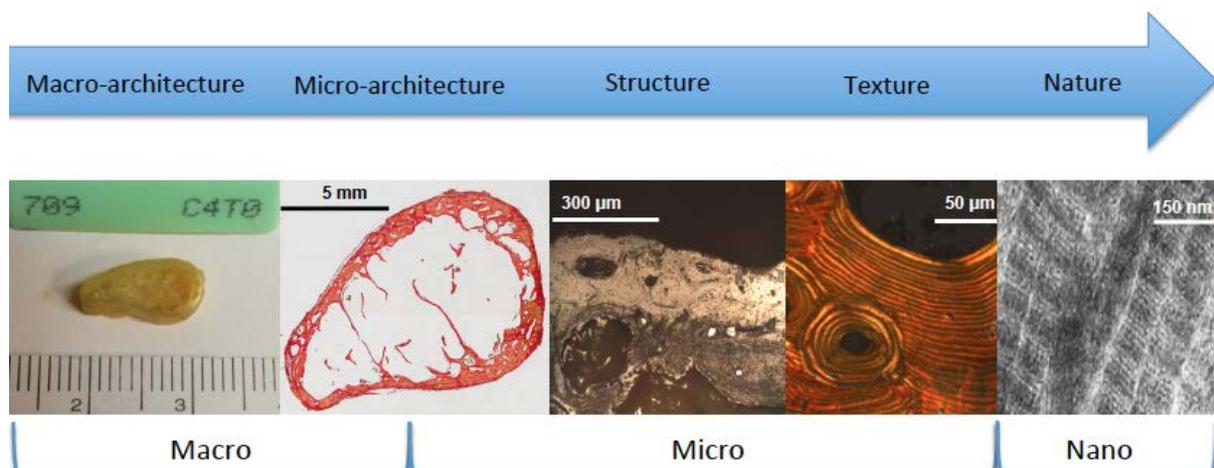


Figure 1 : Organisation du tissu osseux à différentes échelles d'études (adapté de Chappard, D *et al.* 2011)

1. Echelle macroscopique

A l'échelle macroscopique, on distingue :

- **Le tissu osseux haversien compact ou os cortical**, qui est le tissu le plus dense que l'on trouve habituellement à la surface des os. Il constitue une enveloppe résistante composée par la juxtaposition d'unités structurales élémentaires (les ostéons).
- **Le tissu osseux trabéculaire ou os spongieux**, qui constitue l'intérieur des os plats et longs. Il possède une structure cellulaire fortement orientée, à porosité variable, remplie par la moelle. Il est agencé en travées (ou trabécules), et l'organisation en trois dimensions de ces travées osseuses constitue l'architecture trabéculaire dont l'orientation dépend des lignes de forces mécaniques auxquelles est soumis l'os.
- **Le tissu osseux périosté** fait de lamelles circonférentielles déposées en périphérie de l'os cortical.
- **Le périoste** qui est une membrane conjonctive richement vascularisée entourant les os.

L'os cortical et l'os spongieux sont microporeux mais, ils se distinguent architecturalement par la taille et la forme des pores. L'os spongieux présente des espaces ouverts correspondant à de larges cavités. L'os cortical présente des porosités de petite taille et régulières (Zioupou *et al.*, 2008).

Malgré un nombre considérable de travaux entrepris depuis plus d'un siècle pour délimiter avec précision os cortical et os spongieux, il n'existe pas d'unanimité physique

ou numérique pour les distinguer. Cette distinction os cortical/os spongieux a surtout été définie selon la porosité des tissus. Carter et Hayes définissaient la porosité comme la proportion occupée en volume par du tissu non minéral. L'os cortical serait donc défini comme ayant une porosité de 5 à 30% et, l'os spongieux comme ayant une porosité entre 30 et 90% (Bonucci, 2000) (Gibson, 1985) (Schaffler et Burr, 1988). Il existe une corrélation entre porosité et densité minérale (Carter et Hayes, 1977). S'agissant du degré de minéralisation, tous les travaux s'accordent à dire que l'os cortical est le plus minéralisé, jusqu'à 90 % de la partie minérale totale de l'os y est présente (Van Ruijven *et al.*, 2007) (Goodyear *et al.*, 2009). Torres-Lagares *et al.*, estiment histologiquement, que le volume osseux global (BV/TV) est 1.8 fois plus élevé dans l'os cortical que dans l'os spongieux (Torres-Lagares *et al.*, 2010).

Ainsi, l'échelle macroscopique ne permet qu'une différenciation des structures en terme d'architecture et de porosité des tissus et doit être précisée via la microscopie.

2. Echelle microscopique

Sur le plan structurel, l'os cortical et l'os spongieux présentent deux types de tissu osseux : l'os non lamellaire (woven bone) et l'os lamellaire (Cambra-Moo *et al.*, 2012) (Hillier et Bell, 2007).

L'os non lamellaire est un tissu osseux immature, produit au cours du développement fœtal et périnatal et pendant les périodes de nécessité immédiate (fractures, tumeurs...). Il est très rapidement déposé ($> 4 \mu\text{m}/\text{jour}$) et généralement temporaire. En apparence, il est mal organisé, constitué de fibres de collagène orientées de façon aléatoire et sa minéralisation constitue une ébauche dans laquelle l'os lamellaire sera déposé. L'os lamellaire mature est plus lentement déposé ($< 1 \mu\text{m}/\text{jour}$).

Il se compose de couches parallèles de tissu osseux, appelées lamelles, composées de fibres de collagène et de biominéral.

Les ostéons primaires existent dans l'os lamellaire et sont créés au cours du processus de transformation de l'os non lamellaire en os lamellaire. Ils sont orientés longitudinalement et composés de canaux vasculaires, entourés par des couches osseuses concentriques, qui fournissent le sang et les nutriments.

Le système ostéonique secondaire se réfère à un nouvel os lamellaire qui a été déposé là où auparavant l'os existant a été résorbé. Cet os est également appelé os haversien composé d'un canal haversien central qui contient des vaisseaux sanguins et des nerfs et qui est entouré par plusieurs couches de lamelles (apposition circonférentielle de fibres minéralisées de collagène autour du canal de Havers, avec les parties les plus récemment minéralisées qui sont proches du centre de l'ostéon). Des canaux de Volkmann, sont perpendiculaires aux systèmes de Havers, et relient les canaux de Havers un à l'autre.

B. Composition du tissu osseux

Une matrice extracellulaire représente 92 à 95 % du volume osseux. Elle est constituée d'une phase organique (22 %) majoritairement collagénique, d'une phase minérale ou inorganique (69 %), et d'une fraction aqueuse (9 %). Les cellules (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) remplissent le reste de ce volume osseux. (Warner *et al.*, 2006) (Ducher *et al.*, 2006) (Michalsky *et al.*, 1993) (Morko *et al.*, 2005).

1. Phase organique

La matrice organique comprend : une substance fibrillaire majoritairement composée de collagène de type I, une substance interfibrillaire de protéines non collagéniques et, des lipides. Elle est synthétisée par les ostéoblastes.

a) Le collagène (Viguet-Carrin *et al.*, 2006)

Les protéines collagéniques sont des molécules de la matrice extracellulaire. Il en existe 28 types recensés à ce jour. De sa nature, de sa configuration et de ses modifications post-traductionnelles dépendent certaines propriétés de résistance osseuse. Les collagènes qui s'organisent en fibrilles sont la majorité de l'ensemble des collagènes. Dans ce groupe on peut citer les plus importants que sont les collagènes I, II, III, V et XI. Dans l'os, le collagène de type I représente 90 % de la matrice organique.

Le collagène est constitué de trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) qui forment une triple hélice de 300 nm de longueur et 1,5 nm de diamètre.

La configuration en triple hélice est caractérisée par la répétition d'un triplet Gly-X-Y où X peut être un autre acide aminé mais est habituellement une proline et Y une hydroxyproline. La Glycine se répète en 3^{ème} position car c'est le seul acide aminé dont la petite taille peut occuper l'espace restreint du centre de la triple hélice. La glycine représente donc un tiers des acides aminés du collagène, les prolines 10 %, et l'hydroxylysine avec l'hydroxyproline représentent 21 %. Les autres acides aminés sont majoritairement de l'arginine, de la lysine. Au sein du réticulum endoplasmique, l'hydroxylysine et

l'hydroxyproline sont formées à partir de la synthèse polypeptidique par hydroxylation des acides aminés (L-proline et la L-lysine) présents dans les chaînes α . Ces modifications post-traductionnelles sont nécessaires à l'organisation du collagène en tropocollagène, en fibrilles, puis en fibres (figure 2). En effet, l'hydroxylation de la proline contribue à la stabilité du collagène en induisant la formation de ponts hydrogènes ; l'hydroxylation de la lysine permet la stabilisation et la liaison des molécules aux seins des fibres.

Les triples hélices sont flanquées à leurs extrémités de N et C propeptides empêchant une nouvelle répétition Gly-X-Y. La triple hélice ainsi synthétisée dans le réticulum endoplasmique est appelée pro-collagène qui est soluble. Celui-ci est ensuite sécrété dans la matrice extra cellulaire. Les propeptides y subissent un clivage protéolytique pour former le tropocollagène et s'assemblent par trimères en fibrilles. Les fibrilles de collagène sont caractérisées par une périodicité d'espacement de 67 nm entre les triples hélices (périodicité axiale), espaces au sein desquels pour l'os, s'organisent les cristaux apatitiques nouvellement formés.

b) Protéines non collagéniques

Elles constituent moins de 10 % de la matrice organique (Huang *et al.* 2009). Elle peuvent être classées en quatre groupes : les glycoprotéines (ostéonectine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, SAC-75, la thrombospondine, la fibronectine et la vitronectine), les protéoglycanes (versicane, la décorine, le biglycane et hyaluronate), les protéines contenant de l'acide gamma carboxyglutamique (ostéocalcine, matrice de protéine gla et de la

protéine S) et les protéines associées au sérum. (albumine et les facteurs de croissance) (Donley et Fitzpatrick, 1998).

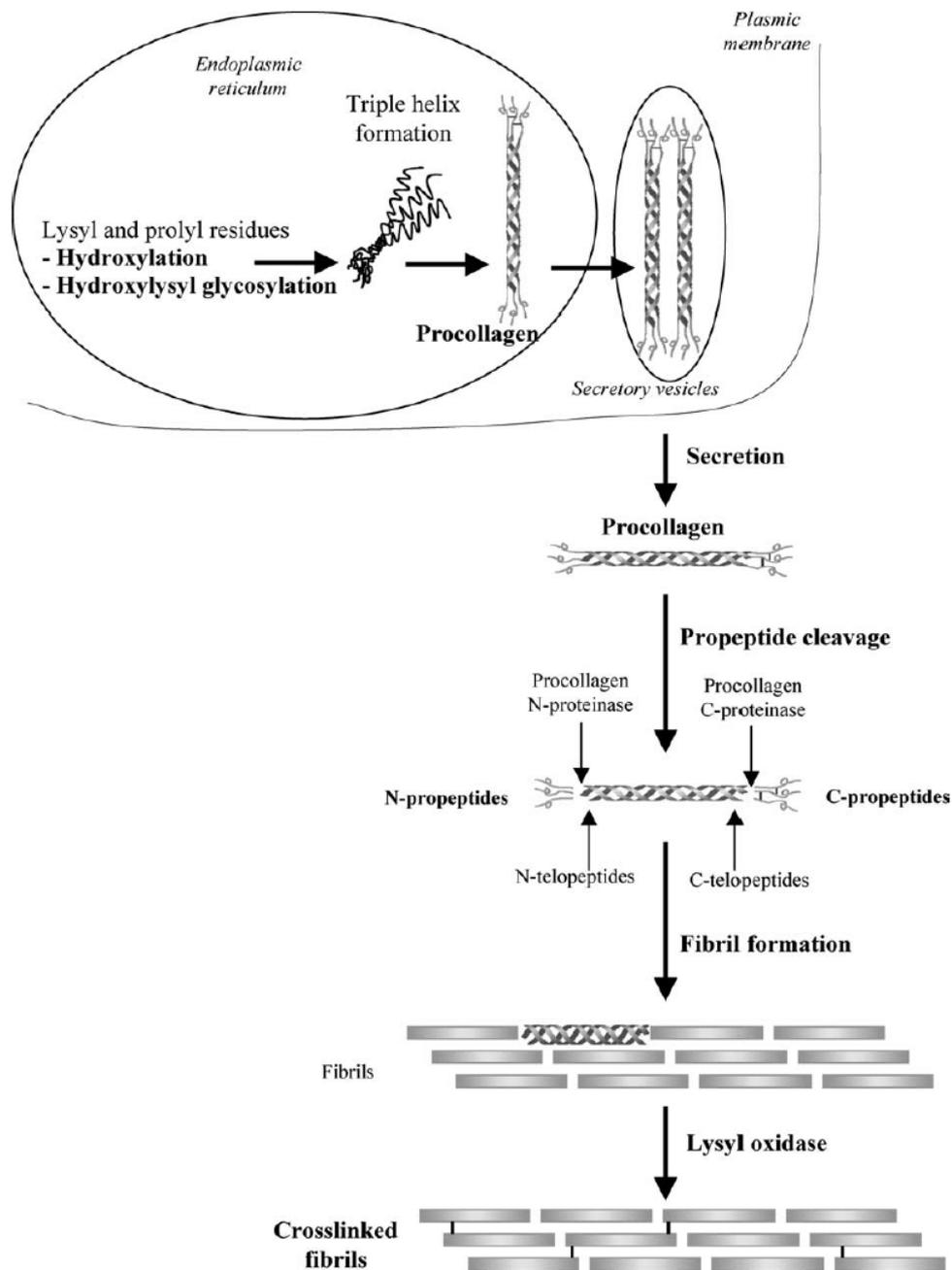


Figure 2 : Étapes de synthèse du collagène et modifications post-traductionnelles, adapté de Viguet-Carrin *et al.*, 2006

c) Lipides

Les lipides osseux sont considérés dans deux compartiments distincts : la moelle osseuse et le tissu osseux minéralisé qui comprend des cellules osseuses majoritairement représentées par des ostéocytes à 90-95%. Dans ces deux compartiments, les lipides sont présents, même si ils sont moins étudiés dans le tissu minéralisé et nombre des travaux se concentrent sur l'adiposité médullaire.

S'agissant donc de la partie minéralisée de l'os, coexistent des acides gras, du cholestérol et des phospholipides. Des recherches sur ce sujet sont développées afin d'affiner la compréhension du rôle des lipides, qui dans les os est essentiel étant donné que des déséquilibres dans leurs voies de signalisation pourraient contribuer à des pathologies osseuses telles que l'ostéoporose (During *et al.*, 2015).

2. Phase minérale ou inorganique

L'os est composé de 70% matière inorganique représentée par un biominéral de type apatitique. C'est une apatite carbonatée nano cristalline présentant une couche hydratée (Rey *et al.*, 2009). Cette phase minérale contient également de nombreuses substitutions ioniques (Mg, Sr, F...). La minéralisation osseuse correspond à un dépôt de cristaux d'apatite dans la matrice extra cellulaire organique.

II. DELAI POST MORTEM SUR RESTES OSSEUX (Delannoy et Colard, 2014)

A. Principes généraux

La découverte d'un cadavre a des implications judiciaires multi factorielles. En France, l'action publique est notamment mise en jeu via l'article 74 du code de procédure pénale. Celui-ci précise qu' « *en cas de découverte d'un cadavre, qu'il s'agisse ou non d'une mort violente, mais si la cause en est inconnue ou suspecte, l'officier de police judiciaire qui en est avisé informe immédiatement le procureur de la République, se transporte sans délai sur les lieux et procède aux premières constatations* ». Ces premières constatations ont pour objet selon les termes de ce même article, d'apprécier la nature des circonstances du décès. Ainsi, sur instruction du magistrat, une enquête aux fins de rechercher les causes de la mort, peut impliquer la réalisation d'actes de procédure prévus aux articles 56 à 62 de ce code de procédure pénale. Des perquisitions peuvent être effectuées pour placement sous scellés ; des auditions de personnes susceptibles de fournir des renseignements sur les faits peuvent être réalisées ; surtout, s'il y a lieu de procéder à des constatations ou à des examens techniques ou scientifiques, l'officier de police judiciaire a recours à toutes personnes qualifiées. Lors de la découverte d'une personne décédée dont ne persistent que des restes osseux, il revient donc au médecin légiste qualifié en anthropologie médico-légale, de procéder à ces constatations.

Le rôle de cet expert en anthropologie médico-légale est multi factoriel car il devra déterminer les causes de la mort, identifier la personne décédée notamment par mesures anthropologiques de stature et de sexe et apprécier le délai *post mortem* (DPM). La détermination de ce délai joue un rôle capital dans la poursuite de l'action publique. En effet, en France dans la majorité des cas, le délai de prescription criminel

est établi à 10 ans. Cela signifie qu'au-delà d'une période de 10 ans suivant le décès, plus aucune investigation judiciaire ne pourra être menée à son terme et les criminels potentiels ne pourront être traduits devant une cour. Néanmoins, son point de départ est variable et démarre le lendemain de la réalisation de l'infraction à 0h pour un acte d'infraction instantané (homicide...); à partir du dernier jour de l'acte pour un acte d'infraction continu (enlèvement avec séquestration...). De plus, en cas de crime contre l'humanité (découverte de charnier de guerre ou de génocide) les faits sont dits imprescriptibles.

La détermination du DPM est donc un élément clé de l'enquête judiciaire. Pour autant, face à la découverte de restes osseux, peu de méthodes sont applicables pour une estimation précise du DPM. De façon empirique, des estimations visuelles et microscopiques peuvent être tentées en fonction de la persistance ou non de parties molles associées à l'os, voire en fonction de l'altération structurelle de l'os en lui-même et de son poids (Knight et Lauder, 1969) (Yoshino *et al.* 1991). Plus scientifiquement, la majorité des travaux réalisés ne permet d'appréhender le DPM que dans une fourchette qui est souvent bien éloignée du délai de prescription criminel.

Les travaux en ce sens ne permettent donc pas à l'heure actuelle une précision fiable, ce d'autant que les méthodes proposées sont influencées par les altérations taphonomiques que l'os subit dans le milieu où il se situe.

La détermination d'un délai post-mortem sur restes humains est en effet soumise à de nombreuses variables, qu'elles soient extrinsèques liées au milieu d'environnement où se situe le corps ou, intrinsèques liées au corps lui-même. Ainsi, cette détermination du délai post mortem est influencée par l'habillement d'un corps et les épaisseurs de vêtements ; les pathologies médicales pré existantes ; le poids du corps ; la température ambiante...Surtout, plus l'état de dégradation du corps sera élevé, plus cette

détermination sera rendue difficile, car influencée plus encore par des facteurs extrinsèques comme le taux d'hygrométrie, la ventilation, l'activité de charognards...Enfin, en cas de découverte de restes squelettisés enterrés, l'analyse du sol (humidité, pH, température) sera cruciale pour la détermination du délai postmortem (Hedges, 2002) (Dent *et al.*, 2004) (Wilson *et al.*, 2007) (Rodriguez et Bass, 1985).

La période péri mortem est également prépondérante et doit être prise en compte. En effet, Bell *et al.*, (Bell *et al.*, 1996) ont soutenu que la période entre la mort et l'inhumation est probablement la phase la plus critique de l'histoire diagénétique de l'os : les ossements humains peuvent être soumis à des pratiques funéraires diverses avec évacuation du sang, élimination des parties molles, cuisson...qui modifieront et accéléreront la détérioration.

Les recherches existantes ont concerné des méthodes de réactivité physique ou chimique entre l'os et des substrats ; des méthodes de mesures radio-isotopiques ; des méthodes d'analyses physico-chimiques de composition osseuse. Certaines de ces méthodes diverses mais complémentaires (Knight et Lauder, 1969) seront présentées ici.

B. Méthodes de détermination du délai postmortem sur restes osseux

1. Méthodes colorimétriques

a) Réaction de coloration au bleu de Nil et à l'indophénol

Les travaux de Berg et Specht ont mis en évidence une affinité de l'os avec deux colorants : le bleu de Nil et l'indophénol (Berg et Specht, 1958) (Berg, 1963). Cette affinité fonction du pH de l'os avait pour postulat que ces deux colorants présentaient une affinité inverse en fonction du DPM. Ainsi, plus l'os est ancien, plus la corticale est fortement colorée au bleu de Nil et faiblement colorée à l'indophénol. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer de corticale osseuse, au mieux d'un os long, de le soumettre à ces colorations après coupe et, d'apprécier quantitativement visuellement la coloration. Les résultats de cette méthode dite de « Berg » sont en demi-teinte car, peu de conclusions peuvent être tirées de la coloration d'un os datant de moins de 100 ans et il ne semble possible d'affirmer des conclusions que pour une fourchette située entre 200 et 500 ans. De plus, cette méthode est soumise à l'interprétation visuelle de l'opérateur. Cependant, reprenant les travaux de Berg, plusieurs auteurs ont tenté de s'affranchir de cette subjectivité d'interprétation inter-individuelle. Ainsi, Vignal a présenté une méthode automatisée de mesure de coloration via l'utilisation d'un colorimètre permettant de limiter les variations inter-opérateurs (Vignal, 2007). Le principe était d'immerger une coupe corticale d'os long dans du bleu de Nil pendant 10 minutes, de la différencier dans une solution d'acide acétique à 1% durant 12 heures et de la faire sécher à l'air libre. La coupe était ensuite analysée au

colorimètre 30 fois selon des localisations aléatoires (afin d'homogénéiser la teinte bleue qui peut varier au sein d'un même os) et comparée à un échantillon du même os non coloré. La soustraction de valeurs mesurées au colorimètre entre ces deux coupes (colorée et non colorée) permettait leur intégration dans une équation permettant d'estimer le DPM. Cette méthode permettait d'apprécier un DPM calculé en années, à interpréter selon un écart type. Les résultats ont montré un intervalle de temps très large pour une estimation archéologique, mais plus précis pour des datations jusque 60 ans.

b) Fluorescence aux UV

Cette méthode se base sur la réflexion d'une section osseuse soumise à UV pour des grandes longueurs d'ondes dans une chambre noire. L'évaluation permet d'estimer une modification colorimétrique passant par le bleu pour les os à DPM court puis, le brun, le jaune, le gris pour des DPM plus long (Hoke *et al.*, 2013). Cette modification colorimétrique s'explique par les altérations de phases organiques et minérales de l'os au cours de sa diagenèse : la coloration bleue liée au collagène qui est le composant majeur de la phase organique de l'os, diminue avec la perte de phase organique dans le temps (Very *et al.*, 1997). Cette méthode a montré un intérêt pour distinguer des échantillons osseux archéologiques et des échantillons médico-légaux (Ramsthaler *et al.*, 2011). Cependant cette technique montre de nombreuses limites dans l'interprétation de la fluorescence et ne peut être utilisée seule dans la détermination d'un DPM court (Hoke *et al.*, 2013).

c) Réactivité de l'hémoglobine

Fluorescence au Luminol

Cette méthode est basée sur la réactivité de l'hémoglobine avec des réactifs, via l'activité peroxydase de l'hème (Proescher et Nolan, 1954), comme cela est employé pour la détection de taches de sang effacées sur une scène de crime (Thornton *et al.*, 1986) : le Luminol est une solution alcaline qui avec l'addition de peroxyde d'hydrogène, produit par fluorescence une lumière bleutée visible dans le noir. Cette réactivité a une haute sensibilité (1/100 000 à 1/ 5 000 000) qui persiste même pour des traces de sang très anciennes (Lytle, et Hedgecock, 1978). Ainsi, plusieurs auteurs ont voulu corréler cette fluorescence à la datation de restes osseux par l'hémoglobine persistante dans l'os. Introna *et al.* ont ainsi soumis au Luminol, des échantillons mis en poudre d'os cortical fémoral répartis en fonction du DPM (Introna *et al.*, 1999). Les mesures de luminescence étaient effectuées à l'œil nu et automatiquement par échelles de gris. Les résultats montraient une luminescence intense pour des DPM récents et, une décroissance progressive pour des DPM plus long avec disparition complète pour des DPM de plus de 80 ans. Cependant, ces résultats doivent être pondérés par l'existence de nombreux faux négatifs. Ramsthaler *et al.* l'ont d'ailleurs montré via une étude en simple aveugle par deux observateurs (Ramsthaler *et al.*, 2009) en affirmant qu'il est nécessaire de disposer d'un faisceau d'argument pour déterminer le DPM et que l'analyse au Luminol n'est pas seule concluante.

Tests pharmaceutiques de détection sanguine

En raison de la lourde morbidité liée aux pathologies cancéreuses notamment intestinales, plusieurs tests de dépistage rapide visant à rechercher des signes de cancer colo-rectal ont été développés. Le principe est lui aussi lié à la recherche de sang par réactivité à l'hémoglobine. Différents tests pharmaceutiques ont ainsi été testés dans le but d'identifier la persistance de sang sur échantillons osseux à DPM variables. Ramsthaler *et al.* ont soumis plusieurs échantillons osseux avec DPM très variables à ces tests de l'industrie pharmaceutique, sans résultat positif (Ramsthaler *et al.*, 2011).

2. Méthodes radio-isotopiques

Ces méthodes reposent sur l'incorporation dans l'homme de radio isotopes essentiellement par l'alimentation et, par la mesure d'activité résiduelle radio-isotopique d'échantillons osseux en suivant le postulat que ces radio-isotopes seraient moins affectés par la diagenèse que les autres mesures physiques ou chimiques dans l'identification du DPM. En contexte médico-légal, la détermination d'un DPM par l'utilisation des radionucléides repose sur deux hypothèses : soit il existe un critère temporel identifiable en termes de concentrations de ces radionucléides qui est utilisable pour estimer une frontière nette de DPM selon ces valeurs de concentrations ; soit il existe un radionucléide ayant une demi-vie assez proche d'une cinquantaine d'années (critère temporel usuel pour correspondre aux lois des différents états dans le monde).

On distingue les radio-isotopes artificiels liés à l'activité nucléaire humaine (ex. strontium) et les radio-isotopes naturels dont la valeur atmosphérique :

- n'est pas influencée par l'activité nucléaire humaine (ex. plomb) ;
- peut être influencée par l'activité nucléaire humaine (ex. carbone).

a) Datation au ^{14}C

La plus connue et documentée de ces méthodes radio isotopiques, concerne l'utilisation du radio carbone ^{14}C (demi vie de 5730 ans) et de ses modifications temporelles (Taylor, 1987). Il se retrouve au sein des organismes vivants via la chaîne alimentaire et sa quantité est relativement constante tout au long de la vie. A la mort, le métabolisme s'arrête et la décroissance du ^{14}C peut se mesurer sur les restes humains. Ses concentrations atmosphériques géographiques et temporelles sont bien connues : en fonction des concentrations de ^{14}C mesurées sur un individu vs. les variations atmosphériques géographiques de l'endroit de découverte du corps, il est possible d'estimer une période de décès, si tant est que des fractions collagéniques persistent.

La période précédant le 20^{ème} siècle est marquée par des variations périodiques relativement rapides de l'activité du ^{14}C , liées à des modifications rapides du rayonnement cosmique, qui se superposent à une variation séculaire de l'activité du ^{14}C : le *de Vries effect*, du nom de Hessel de Vries qui documenta ce phénomène (Damon et al., 1978). Le 20^{ème} siècle a lui été marqué par deux perturbations modernes dans l'activité du ^{14}C qui sont liées à l'activité humaine : la période s'étendant de 1910 à 1950 a vu une diminution des concentrations en ^{14}C de tous les composés organiques, en raison de l'activité humaine de combustion des énergies fossiles (pétrole, charbon, gaz...) notamment par la production de CO_2 engendrée : le *fossil fuel effect* ou *Suess effect* du nom

de Hans Suess qui documenta ce phénomène (Suess, 1955) ; la période postérieure à 1950 a elle vu une augmentation brutale des concentrations en ^{14}C en raison de l'utilisation des armes atomiques : le *atomic bomb effect* ou *bomb peak* ou *Libby effect* (du nom de Williard F. Libby qui découvrit la méthode de datation au ^{14}C). A partir de la signature du traité d'interdiction partielle des essais nucléaires signé le 5 aout 1963 à Moscou (peu de temps après la crise des missiles de Cuba d'octobre 1962), une diminution de la teneur atmosphérique en ^{14}C fut par la suite observée.

Taylor *et al.*, pour cette datation au ^{14}C estimaient ainsi qu'il était possible de classer les restes osseux via cette méthode selon trois périodes : une période dite « non moderne » antérieure à 1650 ; une période dite « pré moderne » de 1650 à 1950 ; une période « moderne » postérieure à 1950 (Taylor *et al.*, 1989). Cette dernière période serait donc potentiellement utilisable en pratique anthropologique médico-légale, en se servant du *bomb peak* comme d'une calibration et en mesurant des composés organiques osseux à renouvellement rapide comme les lipides et la moelle osseuse (Wild *et al.*, 2000). Les résultats sont cependant à interpréter avec prudence et sont onéreux donc difficiles à utiliser en pratique quotidienne.

b) Autres méthodes radio-isotopiques

Etude des radionucléides liés à l'activité nucléaire humaine

Les métaux alcalino-terreux et notamment le strontium (Sr) peuvent présenter un intérêt dans la détermination d'un DPM. A la différence du calcium (Ca) qui est un nutriment essentiel, le Sr n'a pas de fonction métabolique spécifique et il est peu métabolisé, au profit du Ca. Le Sr absorbé est ainsi pour

majorité incorporé dans la matrice osseuse minérale (Sillen, 1981). Le ^{90}Sr est un radionucléide qui fut relargué dans l'atmosphère suite à l'utilisation des armes et tests nucléaires. Il fut donc susceptible de contaminer les végétaux pouvant faire partie de la chaîne alimentaire. La détermination d'un DPM selon cette méthode se base donc sur la théorique absence de ce radionucléide dans le squelette des personnes décédées avant les années 1950 et, sa présence après cette date.

Malgré une demi-vie de 29,5 ans, s'approchant des nécessités temporelles médico-légales, de nombreuses réserves sont émises dans l'interprétation cette analyse étant donné la présence de ^{90}Sr dans des prélèvements archéologiques (possibilité d'une contamination par le ^{90}Sr de la terre où serait enfoui un squelette même très ancien) (Maclaughlin-Black et al., 1992). D'autres travaux mesurant le plutonium 238 (^{238}Pu) ou le césium 137 (^{137}Cs) ont également montré un intérêt en relation avec l'activité nucléaire humaine, cependant des difficultés d'interprétation imposent d'émettre des réserves (Swift et al., 2001) quant à l'affirmation précise d'un DPM.

Etude des radionucléides naturels

Une exposition aux radiations peut également survenir par inhalation et ingestion de radionucléides naturels. Ainsi, de la même manière que le ^{90}Sr , le ^{210}Pb absorbé est pour majorité incorporé dans la matrice osseuse (Gross et al., 1975). De par sa demi-vie de 22,5 ans, ce radionucléide pourrait être intéressant à étudier en contexte médico-légal. Cependant de nombreuses variations liées aux habitudes (consommation de fruits de mer, tabagisme...) ont été relevées chez l'homme et il semble difficile de pouvoir identifier des résultats précis pour le

DPM malgré plusieurs travaux étudiant notamment sa dégradation en ^{210}Po (demi-vie de 138.4 jours) (Swift, 1998). L'uranium (^{234}U et ^{238}U) a aussi montré une décroissance progressive des concentrations retrouvées sur l'os dans les 100 dernières années mais, là encore de nombreuses difficultés d'interprétation sont émises (Swift *et al.*, 2001).

3. Méthodes chimiques

L'os est un composé organo-minéral. Lors de sa diagénèse, chaque composante de l'os subi des modifications. De nombreux travaux ont ainsi voulu mesurer les effets de la diagénèse sur la composition osseuse des deux phases organiques et minérales afin d'estimer un DPM sur restes osseux.

a) Diagénèse de phase organique

Des mesures quantitatives protéiniques ont été réalisées et montrent une diminution des composés organiques avec la diagénèse. Castellano *et al.*, ont ainsi mené des travaux sur les rapports entre dosages protéiniques et dosage du zinc en prenant pour postulat que la destruction de leurs liaisons ioniques provoquerait, lors d'une diminution des concentrations protéiniques (diagénèse), une augmentation des concentrations en zinc (Castellano *et al.*, 1984). Ces auteurs, dans une étude multivariée, ont également tenté d'analyser une modification des concentrations lipidiques, mais sans parvenir à un résultat permettant d'identifier une corrélation pour la détermination d'un DPM, même si l'étude des triglycérides semble plus adaptée que celle du cholestérol. Une prudence dans l'utilisation de

ces méthodes doit donc être respectée. L'étude des acides aminés a pu également apporter certaines données mais sans précision d'un réel DPM, les études plus fiables de ces méthodes notamment de racémisation de l'acide aspartique ayant surtout trait à l'estimation de l'âge au décès ([Ritz-Timme et al., 2000](#)).

b) Diagenèse de phase minérale

Si la diagenèse minérale semble moins marquée que les effets produits sur la phase organique, certaines molécules en rapport avec la phase minérale ont été étudiées dans le but d'une détermination du DPM. C'est le cas du fluor, du sodium, du magnésium, du calcium, du phosphate...mais, les résultats semblent difficilement interprétables ([Johnsson, 1997](#)). Pour exemple, le citrate est une molécule absorbée par l'hydroxyapatite, qui régule la croissance des cristaux. Le citrate est présent à taux relativement stables au cours de la vie et n'est que peu influencé par l'âge et le sexe des individus, il disparaît progressivement en période *postmortem*. Des travaux menés en ce sens ont montré que le taux de citrate contenu dans des échantillons osseux, diminuait de façon régulière après le décès, en étant peu dépendant des conditions climatiques. Les résultats sont encourageant mais ne permettent actuellement qu'une précision fiable pour des DPM de plus de 100 ans et d'autres travaux sont en cours pour affiner cette méthode ([Schwarcz et al., 2010](#)).

c) Diagenèse organo-minérale mesurée par méthodes spectroscopiques

La spectrométrie infra-rouge (IR) et la spectrométrie Raman permettent par l'analyse des spectres, l'identification des paramètres physico-chimiques de l'os, tant pour sa partie organique que pour sa partie minérale. Dans le but d'une détermination de DPM, l'altération de la phase organique étant réputée plus rapide, ces techniques permettent la mesure d'un ratio organo-minéral. Elles permettent également des mesures de cristallinité et de carbonatation. Patonai *et al.*, dans leur étude en spectrométrie IR, ont présenté la possibilité de différencier os récents et os archéologiques en identifiant pour la phase organique, des bandes intenses sur échantillons osseux récents ; pour la cristallinité, des valeurs significativement plus basses sur échantillons osseux ; pour la carbonatation, des valeurs significativement plus élevées sur échantillons osseux récents (Patonai *et al.*, 2013). En spectrométrie Raman, Bertoluzza *et al.*, ont également montré sur la dent (notamment pour l'émail), une diminution du ratio organo-minéral mais sans pouvoir en extrapoler une limite temporelle entre échantillons récents et archéologiques (Bertoluzza *et al.*, 1997). Des travaux permettant d'estimer cette limite temporelle sont en cours et des résultats montrant une décroissance progressive de ce ratio sur des périodes très courtes, sont encourageants sur des modèles animaux (McLaughlin et Lednev, 2011).

C'est sur la base de ces derniers développements qu'a été construit le projet de ce travail réalisé sur échantillons humains visant à déterminer un DPM en fonction du niveau de diagenèse osseuse.

III. DIAGÉNÈSE OSSEUSE

A. Principes généraux

La diagénèse d'un os est influencée par son milieu d'environnement en ce sens notamment, que du matériel exogène venant de ce milieu va être incorporé dans l'os et ce dernier va re-larguer ses composants endogènes vers le milieu extérieur (Hedges et Millard, 1995) :

- **Différents exemples d'incorporation de matériel exogène :**

- *Matériel minéral* : l'absorption de cations et d'anions par l'hydroxyapatite est notamment impliquée dans les méthodes de dosages des radioéléments en vue d'une datation osseuse (cf. supra) (Swift *et al.*, 2001). Elle provoque également des biais de contamination du milieu, particulièrement mis en évidence s'agissant du Sr (Maclaughlin-Black *et al.*, 1992). A terme, au fur et à mesure de la diagénèse, des phénomènes de *recristallisation* limiteront cette possibilité d'absorption de cations et d'anions par l'hydroxyapatite. Cette recristallisation étant notamment mesurée par l'augmentation de la cristallinité ;
- *Matériel organique* : il est possible que du matériel organique environnemental incorporé dans l'os, inhibe les attaques microbiennes et donc modifie le mode de diagénèse. L'exemple de l'humus du sol qui contient en fraction élevée d'acide humique (polymère riche en carbone de haut poids moléculaire), pourra être à l'origine de cross linking avec le collagène de l'os, retardant sa dégradation (Hedges et Law, 1989) ;

- ***Différents exemples de relargage de matériel endogène :***
 - *Matériel minéral* : l'os dans son milieu y provoque un déséquilibre chimique à l'origine de phénomènes de dissolution et de lessivage minéral. La dissolution (*i.e.* perte de l'hydroxyapatite) peut s'envisager sous 3 mécanismes : la solubilité de l'hydroxyapatite à pH neutre ; un relargage vers l'extérieur d'une solution d'hydroxyapatite créée par l'infiltration aqueuse des pores de l'os ; et en corollaire, la formation de pores élargis créés par l'infiltration répétée d'eau puis son relargage. Dans tous les cas, cette dissolution provoque une perte osseuse interne sans restriction de dimension extérieure (Hedges et Millard, 1995) ;

Matériel organique : les molécules organiques osseuses solubles dans l'eau sont rarement retrouvées dans les os enterrés, elles subissent également un phénomène de lessivage. D'autres molécules organiques osseuses, notamment des peptides et des acides nucléiques qui sont insolubles, peuvent être adsorbées par l'hydroxyapatite, modifiant ainsi la composition osseuse.

B. Paramètres de mesure de la diagénèse

Pour illustrer les phénomènes d'incorporation ou de relargage entre l'os et son milieu d'environnement, 5 types de mesures reconnues dans la littérature ont été définies et permettent de couvrir l'ensemble du processus de la diagénèse (Hedges et Millard, 1995) (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000) :

- L'index de préservation histologique ;
- la perte de collagène ;
- la modification de la cristallinité ;
- les modifications de porosité ;
- la teneur en carbonates.

1. Index de préservation histologique

Etabli à la suite de coupes histologiques examinées au microscope optique ou en microscopie électronique à balayage (Hackett, 1981) (Garland, 1985) (Bell, 1990). Une bonne préservation histologique (figure 3) permet l'identification des ostéons, de l'os lamellaire...alors qu'une mauvaise préservation montrera des lacunes osseuses associées à des remplacements de structures par de la matière minérale appelée « nodules hyperminéralisés » qui à terme disparaissent pour faire place à des porosités. Cette altération structurelle est en partie à mettre en relation avec des attaques microbiennes (Hackett, 1981). L'index de préservation histologique peut être classé selon 6 stades numérotés de 0 à 5 (tableau 1).

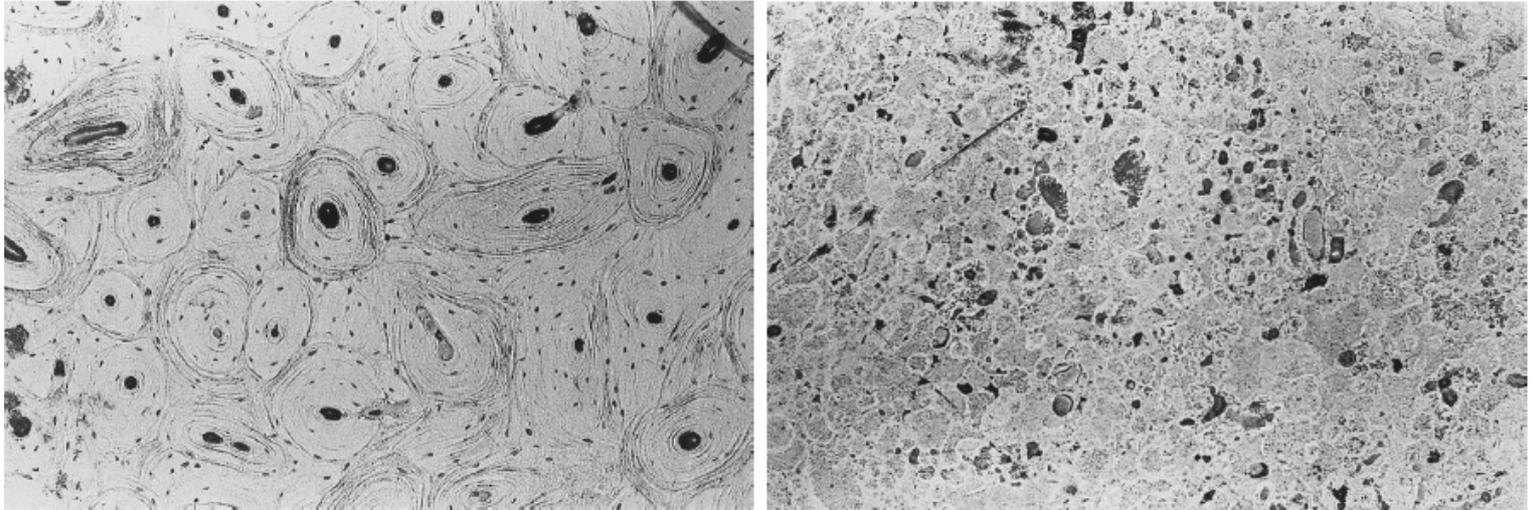


Figure 3 : Coupes histologiques des stades 5 (bonne préservation histologique : figure de gauche) et 0 (altération histologique : figure de droite) illustrant l'index de préservation histologique dit « d'Oxford », issues de Hedges et Millard, 1995

Index	% d'os resté intact	Description
0	<5	Pas de structure identifiable autre que les canaux de Havers
1	<15	Petites surfaces d'os préservé
2	<33	Os lamellaire présent entre les lacunes osseuses
3	>67	Préservation d'os ostéonique
4	>85	Quelques lacunes présentes entre les structures ostéoniques et lamellaires
5	>95	Pas de différence structurelle avec un os frais

Tableau 1 : Paramètres qualitatifs et quantitatifs de l'index de préservation histologique selon Hedges et Millard, 1995

Sur des coupes plus fines (de l'ordre de 30 μm), un autre index de préservation histologique a été défini par Garland *et al.*, et adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques identifiables (Garland *et al.*, 1988) (Jans *et al.*, 2002) caractérisés par :

- **Des destructions focales microscopiques (MFD) ou tunnels** (Hackett, 1981), caractérisés par des pertes focales de collagène et d'hydroxyapatite avec des

zones hyperminéralisées entourant les tunnels qui sont décrits en 4 catégories (cf Chap. Discussion) ;

- **Des inclusions** correspondant à la présence de matériel exogène inclus dans les espaces osseux vides et en rapport majoritairement avec des dépôts fongiques, du sable, de la pyrite... ;
- **Des infiltrations** correspondant à la présence de matériel exogène ferreux (colorés par la réaction de Perl) et/ou à des cristaux d'hydroxyapatite altérés ;
- **Des fissures** envahissant le système Harversien (fissures larges) ou restreintes aux ostéons (microfissures). Leurs différences de tailles sont liées à leurs causes, à savoir l'influence de l'environnement (humidité, température) pour les fissures larges et, le remodelage lié aux altérations organo-minérales pour les microfissures ;
- L'intensité de la **biréfringence** examinée en lumière polarisée sur les ostéons sous la forme d'une alternance de bandes lumineuses et de bandes sombres.

2. Teneur en protéines

L'os frais a une teneur protéique de l'ordre de 20% en masse, qui est composée de 90% de collagène de type I. Le collagène non dégradé et donc de qualité, est composé de 31-37% de glycine, 8-14% de proline, 7-11% d'hydroxyproline, 11-16% d'azote (N), 30-45% de carbone (France *et al.*, 2014). A mesure que l'os se dégrade, il perd de sa teneur en protéines quantitativement et qualitativement. La perte protéinique peut donc être mesurée par :

- **la teneur en N** (Hedges et Millard, 1995). Cette méthode est basée sur la mesure de la teneur en azote dans de la poudre d'os. Elle reflète donc en partie la qualité du collagène dans l'os ;
- **l'analyse de la phase minérale d'un os**. En effet, la matrice organique faite principalement de collagène est incorporée dans une matrice d'hydroxyapatite. Donc l'étude de la diagénèse d'une phase renseigne nécessairement sur la diagénèse de l'autre. L'étude des ratios de phases notamment par méthodes spectroscopiques trouve ainsi tout son intérêt (McLaughlin et Lednev, 2011) (France *et al.*, 2014) ;
- **l'analyse radio-isotopique du ^{14}C** ;
- **les mesures de porosité de l'os** (cf. infra) ;

Cette altération du collagène est essentiellement le fait des attaques microbiennes par tunnelling (cf infra). De ce fait, comme évoqué plus haut, une corrélation est observée entre la dégradation histologique et la teneur protéique de l'os (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000). Cependant, cette corrélation est faible car l'os peut maintenir sa structure malgré une altération protéinique majeure. Dans ce cas, la perte collagénique se fait plutôt par un mécanisme d'hydrolyse chimique ou peptide bond hydrolysis (passage d'un collagène insoluble à soluble et gélatineux), que par une altération microbienne (Collins *et al.*, 1995) (Collins *et al.*, 2002).

3. *Mesure de la cristallinité*

Cette mesure de la largeur et de la profondeur du pic d'hydroxyapatite mesurée par diffraction des rayons X est utilisée de longue date dans l'évaluation de la

diagénèse (Bartsiokas et Middleton, 1992) (Person *et al.*, 1995). La mesure de la cristallinité étant l'inverse de la mesure de ce pic d'hydroxyapatite à mi-hauteur, il a été mis en évidence au fur et à mesure de la diagénèse osseuse, une réduction de ce pic et donc une augmentation de la cristallinité. Différentes autres mesures de cette cristallinité sont possibles par : la spectrométrie infra rouge (Weiner et Bar-Yosef, 1990) (King *et al.*, 2011) et la spectrométrie Raman (Morris et Mandair, 2011). Cette augmentation de cristallinité est majoritairement le fait de phénomènes de recristallisation de l'hydroxyapatite. Néanmoins, elle est également la conséquence de l'altération collagénique qui provoque d'une part, une réorganisation de la microporosité, et d'autre part, une perte de la stabilité de la matrice minérale (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000) (Hedges, 2002). Elle est également en partie le fait de phénomène de dissolution des petits cristaux.

4. *Mesure de la porosité*

Comme expliqué plus haut, la distribution des pores dans l'os va déterminer les bases physiques de son interaction avec l'eau du milieu d'environnement. A mesure de la diagénèse, la porosité va augmenter et sera due à des modifications tant minérales qu'organiques. Cette mesure de la porosité peut être effectuée au moyen de la mesure de teneur en humidité de l'os (méthode dérivée de la géotechnique) : l'os est placé en équilibre avec un milieu connu à teneur en humidité constante et la teneur en eau est ainsi mesurée pour extrapoler la porosité osseuse (Hedges et Millard, 1995). Cette porosité peut également être mesurée par des méthodes d'infiltration au mercure ou à l'azote (intrusion porosimetry) (Nielsen-Marsh et Hedges, 1999) et par microtomographie (Tripp *et al.*, 2010).

On distingue les microporosités (rayon < 4nm) qui représentent la plus grande surface de l'os, des macroporosités (rayon > 4nm). La complexité de l'interprétation d'évolution de cette porosité dans la diagenèse est liée au fait que le collagène occupe une grande partie des porosités. Sa dégradation provoque donc une augmentation de la porosité. Dans le temps, la diagenèse montre une diminution de la microporosité et une augmentation des macroporosités. L'augmentation des macroporosités n'est pas étonnante, dans le sens que le collagène (ou les protéines plus généralement) représente environ 20% du poids de l'os et 30 à 50 % de son volume (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000). Donc quand le collagène est perdu via le tunnelling provoqué par des micro-organismes, la porosité augmente. S'agissant de la diminution des microporosités, le processus est plus difficile à appréhender mais il semble que la perte collagénique provoque une réorganisation grossière de la matière minérale montrant plus de macroporosités que de microporosités.

5. Evaluation de la carbonatation

La carbonatation est évaluée par la mesure du ratio carbonate/phosphate. Cette mesure peut s'effectuer par la spectrométrie infra rouge et la spectrométrie Raman (Wright et Schwarcz, 1996) (Awonusi *et al.*, 2007). A mesure de la diagenèse, une baisse de la carbonatation est observée et reliée surtout à des phénomènes de dissolution de phase minérale.

C. Trajectoires diagénétiques

Toutes ces mesures montrent des inter relations qui rentrent dans le cadre du processus complexe qu'est la diagénèse osseuse. Afin d'évaluer ces inter relations, différentes études de corrélation de ces paramètres ont été réalisées (Hedges, 2002) (Tuner-Walker *et al.*, 2002) (Smith *et al.*, 2007) (Nielsen-Marsh *et al.*, 2007). Il a ainsi été possible d'identifier 4 classes de diagénèses osseuses :

- **Classe 1 : well preserved** : teneurs élevées en collagène, un index histologique élevé, carbonatation élevée, cristallinité basse et porosité basse.
- **Classe 2 : accelerated collagen hydrolysis** : mauvaise préservation du collagène mais un index histologique qui reste élevé, ce qui indique que ce type de préservation/destruction n'est pas provoqué par des bactéries, mais plutôt en rapport avec une hydrolyse. La porosité osseuse augmente mais les pores sont de volume inférieur à 0,1 μ m. Associé à cela, la cristallinité augmente également et la carbonatation reste stable ou en très légère baisse.
- **Classe 3 : microbially attacked bone** : index histologique abaissé, une teneur collagénique basse, une augmentation significative de la porosité typique de l'altération microbienne, une augmentation de cristallinité et, une baisse de carbonatation.
- **Classe 4 : catastrophic mineral dissolution** : index histologique effondré, teneur en collagène très faible, haute cristallinité, basse de carbonatation et surtout augmentation majeure de porosité liée à la dissolution.

Notre travail par différentes techniques moléculaires (microspectrométrie Raman) et histologiques (histomorphologie), avait pour objectif d'appréhender au mieux ces trajectoires diagénétiques sur des prélèvements osseux humains avec délai *postmortem* court permettant une application médico-légale potentielle.

OBJECTIFS

Dans une volonté de recherche en anthropologie sur restes osseux, cette étude taphonomique souhaitait s'inscrire dans une temporalité rejoignant les impératifs judiciaires appliqués en médecine légale. Prospectivement, le délai *postmortem* étudié se devait donc d'être « court » à l'échelle de l'anthropologie. En effet, ce travail avait cet objectif d'identifier au mieux la diagénèse osseuse au travers de l'altération temporelle précoce de ses phases minérales et organiques.

Pour ce faire, le tissu osseux devait être étudié d'une manière la plus exhaustive possible. Son versant architectural a donc été pris en compte et les mesures réalisées ont intéressé l'os périosté, l'os interstitiel, les ostéons, l'os trabéculaire, afin de pouvoir être le plus représentatif possible. Surtout, son versant moléculaire devait être évalué finement pour que l'altération temporelle des phases organiques et minérales de l'os soit mise en lumière.

La spectroscopie Raman est devenue un outil méthodologique de plus en plus usité, qu'il s'agisse de l'évaluation de la qualité de l'os, des changements dans la composition des os, et de la structure des tissus osseux qui déterminent ses propriétés mécaniques. La pertinence de cette méthode d'évaluation de la qualité de l'os dans des conditions physiologiques ou pathologiques est maintenant bien admise et renseigne plus particulièrement sur la composition moléculaire et la structure de la matière minérale, la teneur en matière organique, et leurs corrélations avec les propriétés biomécaniques. Les variables physico-chimiques ainsi évaluées sont obtenues à partir des spectres Raman qui donnent des informations semi-quantitatives de la variation de la composition et de la structure osseuse (Morris et Mandair, 2011).

Ainsi, la microspectrométrie Raman a été choisie comme méthode d'étude, car elle permettait de répondre à ces deux impératifs d'exhaustivité dans l'évaluation d'une dégradation *postmortem* du tissu osseux. Il s'agit en effet, d'une méthodologie

permettant une analyse de composition osseuse qui est couplée via une résolution micrométrique à une possibilité d'évaluation non destructrice de chaque partie de l'os.

Des os humains ont constitué le matériel de cette étude, dans l'optique d'une utilisation qui soit la plus proche de la pratique médico-légale quotidienne. Leur étude sur ce laps de temps annuel très court a donc, toujours dans cette volonté applicative, été réalisée dans un environnement pouvant constituer un écosystème habituel de découverte de restes osseux squelettisés.

L'hypothèse principale de ce travail était constituée par une dégradation organique précoce de l'os en période *postmortem*, notamment sous la forme d'une dégradation collagénique. L'identification de celle-ci sur un court laps de temps n'a été explorée que dans quelques études utilisant des méthodes spectrométriques. Ces études montraient une altération organique identifiable en spectrométrie Raman mais n'avaient concerné que des os animaux ou s'agissant de l'humain, des dents (Bertoluzza *et al.*, 1997) (McLaughlin et Lednev, 2011) (Patonai *et al.*, 2013).

La dégradation collagénique une fois identifiée temporellement, une méthodologie permettant la mise en évidence du mode d'altération organique devait être appliquée, afin de pouvoir identifier le rôle de possibles micro-organismes ou celui de mécanismes de type chimique, comme possiblement décrits dans la littérature. L'histomorphologie a constitué cette seconde méthodologie via des techniques microscopiques et de colorations.

Nous émettons donc l'hypothèse d'une dégradation organique précoce mesurable dans un court laps de temps, dans la perspective d'une application utilisable par le médecin légiste qualifié en anthropologie pour son expertise.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. MATÉRIELS

A. Pièces osseuses

Dans le but de pouvoir extrapoler une méthode de détermination d'un DPM à un usage médico-légal pratique, choix a été fait de travailler sur l'os humain. Ces prélèvements humains ont été réalisés à partir de cadavres issus du don de corps testamentaires à la science, en partenariat avec le laboratoire d'anatomie de la Faculté de Médecine de L'Université de LILLE.

Le don des corps aux facultés de médecine en vue de la recherche scientifique et de l'enseignement médical se fonde sur l'article 3 de la loi du 15 novembre 1887 sur la liberté des funérailles¹. Celui-ci dispose que « *Tout majeur ou mineur émancipé, en état de tester, peut régler les conditions de ses funérailles...Il peut charger une ou plusieurs personnes de veiller à l'exécution de ses dispositions...Sa volonté, exprimée dans un testament ou dans une déclaration faite en forme testamentaire, soit par devant notaire, soit sous signature privée...* ». Ainsi, ce don est testamentaire, donc *antemortem*. Il est explicite quant au consentement au don et quant au devenir du don, à visée de recherche par le biais de :

- L'article R. 2213-13 du code général des collectivités territoriales (confirmé par le décret n°2011-121 du 28 janvier 2011)², qui dispose que ce don a pour destination un établissement de santé, de formation ou de **recherche** ;
- L'article R. 363-10 du code des communes (abrogé par le décret n°2000-318 du 7 avril 2000)³, qui disposait lui aussi que ce don avait pour destination un établissement d'hospitalisation, d'enseignement ou de **recherche**.

1. Loi du 15 novembre 1887 sur la liberté des funérailles

2. Décret n° 2011-121 du 28 janvier 2011 relatif aux opérations funéraires. JORF n°0025 du 30 janvier 2011

3. Décret n°2000-318 du 7 avril 2000 relatif à la partie Réglementaire du code général des collectivités territoriales

La difficulté à pouvoir travailler sur des corps frais non embaumés, a nécessité une mutualisation des corps avec d'autres travaux de recherche et une limitation du nombre de corps disponibles. Ainsi, notre travail a été réalisé sur 6 corps frais (4 hommes âgés de 72, 82 87 et 88 ans et 2 femmes âgées de 80 et 92 ans), sans pathologie osseuse connue.

Pour chaque sujet, le choix des os étudiés s'est surtout orienté vers les côtes n°1 et 4, étant donné que celles-ci ont un intérêt médico-légal reconnu, notamment en vue de la détermination de l'âge au décès (Kunos *et al.*, 1999) (Işcan *et al.*, 1984) et que leur large surface d'échange associée à la finesse de leur corticale leur confère la particularité d'être très sujettes à la diagénèse (King *et al.*, 2011). Ainsi, sur chaque sujet, les côtes étaient prélevées le jour de l'admission au laboratoire d'anatomie (qui correspondait au jour du décès dans notre étude, faute de quoi le sujet n'était pas inclus).

B. Préparation des échantillons

Les côtes explantées du corps étaient séparées manuellement de leurs parties molles immédiatement sans qu'aucun traitement chimique ne leur soit appliqué, afin d'éliminer de potentiels biais de traitement. Une fois préparées, ces côtes étaient séparées en deux groupes :

- les côtes 1 et 4 gauches (soit 12 côtes pour les 6 sujets) étaient destinées à une analyse spectroscopique puis à une analyse histo-morphologique ;
- les côtes 1 à 4 droites (soit 24 côtes pour les 6 sujets) servaient de contrôle afin d'évaluer macroscopiquement la diagénèse dans le temps et pouvoir évaluer l'influence taphonomique du milieu dans lequel elles étaient placées.

C. Inclusion dans le milieu de diagénèse

Pour évaluer cette influence des facteurs extrinsèques, les côtes ont été placées dès le jour du prélèvement initial (jour du décès), dans un milieu d'environnement identifié.

1. Côtes destinées à une analyse macroscopique

Pour chaque sujet, les côtes 1 à 4 prélevées du côté droit étaient destinées à évaluer l'influence du milieu sur la diagénèse pour pouvoir en cas de dégradation et/ou de conservation osseuse non attendue, préciser notamment l'impact de l'humidité et de la température.

Les milieux d'environnement étaient définis comme tel (tableau 2) : 1. un milieu intérieur et un milieu extérieur ; 2. avec ou sans inhumation de l'os :

- Dans le milieu intérieur, les conditions étaient contrôlées et fixes : les os étaient placés sous une hotte dans une étuve à température constante de 20°C et hygrométrie de 60% ;
- Dans le milieu extérieur, les conditions étaient variables mais les relevés d'hygrométrie et de température étaient obtenus quotidiennement via MétéoFrance© ;
- Les côtes inhumées en extérieur (C1 et C4) étaient placées dans un bac rempli de terre protégé des pluies et couvert par une grille à fine maille pour éviter l'action de prédateur animaux et l'action de la faune entomologique. Elles étaient inhumées sous une fine épaisseur de terre de pH 6,8. Une seule côte (la côte C3) était destinée à une inhumation en

milieu intérieur. La côte C2 n'était pas inhumée et était placée en milieu intérieur.

	C1	C2	C3	C4
Type d'os	1 ^{ère} côte droite	2 ^{ème} côte droite	3 ^{ème} côte droite	4 ^{ème} côte droite
Environnement	Extérieur	Intérieur	Intérieur	Extérieur
Conditions environnementales	Protégé des intempéries	Sous hotte	Sous hotte	Protégé des intempéries
Sol	Terre argileuse	-	Terre argileuse	Terre argileuse

Tableau 2 : Caractéristiques des milieux d'environnement intérieurs et extérieurs pour chaque côte étudiée

2. Côtes destinées à l'analyse spectroscopique

Les côtes 1 et 4 gauches, ont été placées (comme leurs homologues du côté droit) dans le milieu d'environnement extérieur (cf. tableau 2). En effet, dans un projet de détermination d'une méthode qui puisse être extrapolée à un contexte pratique, c'est naturellement le milieu extérieur qui a été choisi étant donné que les squelettes découverts dans ces contextes médico-légaux, sont habituellement retrouvés en milieux naturels (forêts, champs, fossés, puits...).

Le jour initial du prélèvement, puis chaque mois pendant la période d'une année, les côtes étaient extraites de leur milieu d'environnement, sectionnées transversalement sur une épaisseur de 5 mm au disque diamanté (figure 4) (cf. supra), puis la section était protégée au moyen d'une cire neutre, et enfin, les côtes étaient replacées dans leur milieu de diagénèse. Cet échantillonnage malgré

des recoupes n'a pas montré de modification diagénétique à long terme dans la littérature (Adlam et Simmons, 2007).

Ces côtes 1 et 4 gauches ont été analysées par la méthode de spectrométrie Raman mensuellement durant une année, puis ponctuellement au bout de 24 mois. Ainsi, 14 échantillons ont été prélevés pour chaque côte durant l'étude (mois 0 au mois 12 mensuellement, puis mois 24), soit 28 échantillons pour chaque sujet (côtes 1 et 4), soit 168 échantillons pour l'étude (6 sujets).

L'analyse en spectrométrie Raman a cet avantage d'être non destructrice et donc, de ne nécessiter que très peu de préparation de l'échantillon. Chaque coupe transversale de 5 mm n'avait pour préparation qu'un polissage de sa surface au disque abrasif de grain décroissant 30 μ m, 3 μ m et 0,3 μ m. A l'issue de ce polissage, l'échantillon pouvait être analysée en spectrométrie Raman sans autre préparation.



Figure 4 : Coupe transversale de côte (x 10) observée sous l'optique du microspectromètre Raman après section au disque diamanté

3. Côtes destinées à l'analyse histo-morphologique

Les mêmes côtes 1 et 4 du coté gauche, à l'issue de leur analyse spectroscopique, ont été fixées, incluses et colorées pour bénéficier d'une évaluation histologique (figure 5).

L'analyse histo-morphologique a donc été effectuée sur les mêmes échantillons à l'issue de leur analyse en spectrométrie Raman, mais à des intervalles de temps trimestriels : 0,3,6,9,12 mois et ponctuellement à 24 mois *postmortem*. A la différence de l'analyse spectrométrique, cette étude histo-morphologique nécessitait des méthodes de fixation, d'inclusion et de coloration, à caractère destructeur.

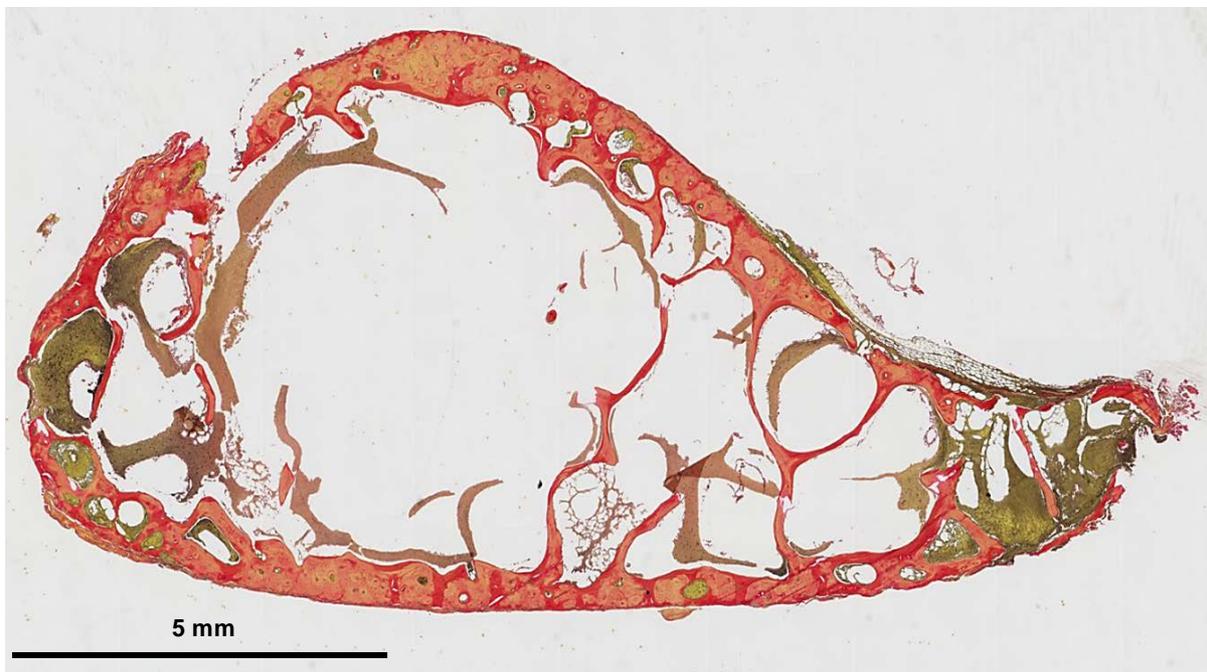


Figure 5 : Coupe transversale de côte observée sous station de vidéo microscopie et après coloration au rouge Pricro-Sirius

II. METHODES

A. Analyse macroscopique : la perte de poids de l'os comme critère d'évaluation de la diagénèse

Malgré certaines limites liées à un caractère subjectif dans l'interprétation de critères macroscopiques pour l'évaluation d'un DPM, leur simplicité de réalisation et leurs caractères non destructeurs, sont des arguments à retenir. Plusieurs travaux ont récemment été menés en ce sens (Jaggers et Rogers, 2009) et se sont intéressés prospectivement à l'évolution de la texture, de la couleur, du nombre et de la taille des craquelures mais aussi, au poids de l'os. C'est ce paramètre du poids que nous avons étudié, en fonction de différents milieux d'environnement (variations d'humidité et de température) d'un os en fonction du temps.

Les côtes ont ainsi été pesées quotidiennement en utilisant une balance de précision (Kern© ALT310-4, $d=0.1$ mg). La perte de poids a été évaluée quotidiennement durant les 90 premiers jours d'inhumation. La pesée quotidienne de chaque os a été évaluée quantitativement mais, étant donné que les poids initiaux de chaque os étaient différents en fonction des corpulences initiales des sujets et de leur état de densité osseuse, ces résultats ont surtout été évalués en termes de pourcentage de poids restant.

Les milieux d'environnement ont été comparés en étudiant les distributions de perte de poids en utilisant un test de Kolmogorov-Smirnov. Par la suite, des tests de comparaisons combinées ont été réalisés jour par jour et environnement par environnement par un test du Chi2 assorti d'une procédure de Marascuilo.

B. Analyse spectrométrique Raman comme nouvelle méthode d'évaluation du DPM

1. Principes de la spectrométrie Raman

Il s'agit d'un phénomène de diffusion. Le principe de la diffusion Raman est basé sur l'interaction entre la lumière et la matière. Lorsqu'on illumine une molécule isolée avec une lumière monochromatique (laser de longueur d'onde λ), la molécule va diffuser la lumière dans toutes les directions de l'espace. La lumière diffusée par la molécule aura 2 contributions :

- La lumière diffusée à la même longueur d'onde (λ) que la lumière incidente, c'est la diffusion Rayleigh (diffusion élastique des photons) ;
- La lumière diffusée à une longueur d'onde différente de la lumière incidente, c'est la diffusion Raman (diffusion inélastique des photons). Une partie infime des photons incidents est diffusée avec un décalage de longueur d'onde. Ce décalage de longueur d'onde est donc appelé effet Raman. En pratique, il est d'usage de convertir cette différence de fréquence entre photon incident et photon diffusé en nombre d'onde (cm^{-1}).

Le spectromètre Raman en lui-même comprend une source de lumière monochromatique de longueur d'onde stable et connue (un laser). Un pré-monochromateur ou filtre interférentiel situé juste après le laser élimine les raies parasites plasma se trouvant au voisinage de la raie laser excitatrice. Le faisceau passe ensuite par un polariseur placé à l'entrée du microscope, fixant la

polarisation incidente. Des optiques sont donc présents pour concentrer la lumière sur l'échantillon (fonction microscope). Les photons diffusés entrent dans le monochromateur par une fente (ou trou confocal) permettant de localiser spatialement la lumière. Un miroir prismatique dirige ensuite les photons sur un réseau holographique, dispersant les photons selon leur longueur d'onde. Chaque radiation est ensuite focalisée par une lentille sur un détecteur pour recueillir le spectre (figure 6).

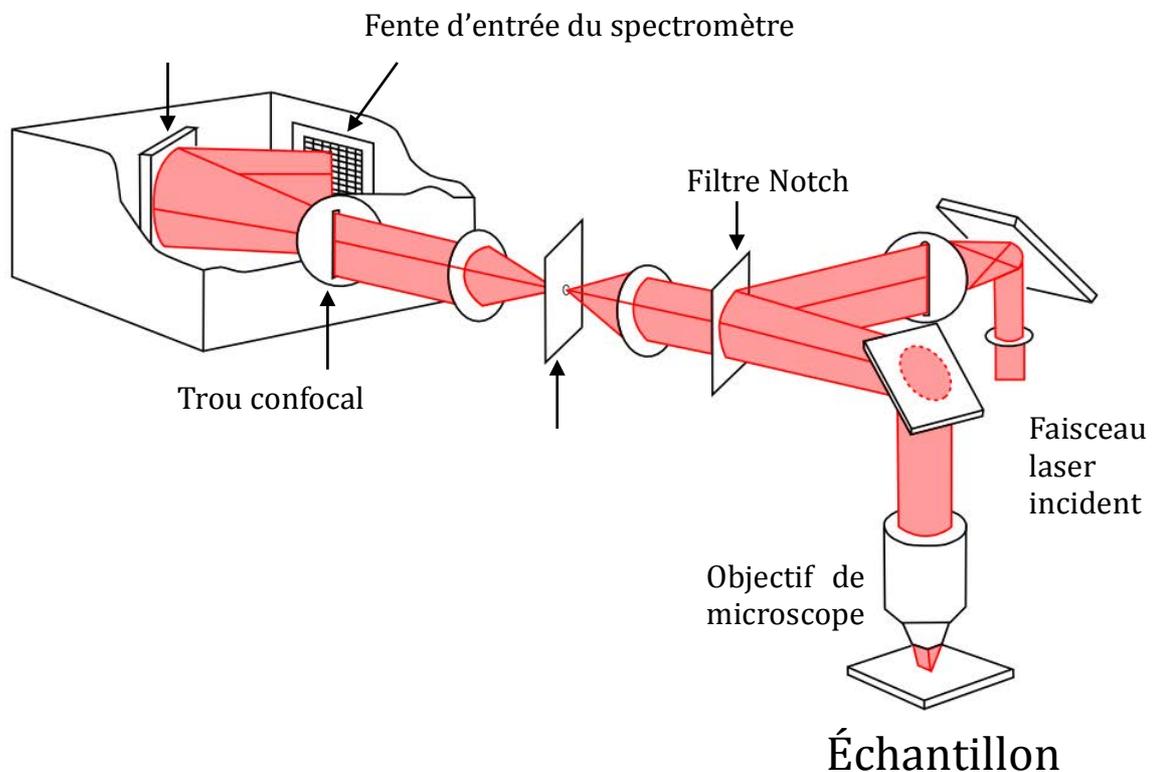


Figure 6 : Schématisation du fonctionnement du spectromètre Raman

Un plateau motorisé en XYZ permet de déplacer l'échantillon sous le faisceau laser et, une **zone d'intérêt** de taille définie est sélectionnée à la surface de l'échantillon, lequel est visualisé grâce à une caméra vidéo.

Tous les matériaux peuvent être analysés par spectroscopie Raman, quel que soit l'état sous lequel ils se présentent (solide, liquide ou gazeux) et sans préparation préalable particulière. Les informations tirées d'un spectre Raman sont multiples (figure 7) :

- la position des raies renseigne sur les molécules en présence dans l'échantillon,
- la largeur des pics (à mi-hauteur) fournit des informations sur la structure moléculaire de l'échantillon,
- l'intensité ou l'aire d'un pic sont reliées à la quantité de la molécule.

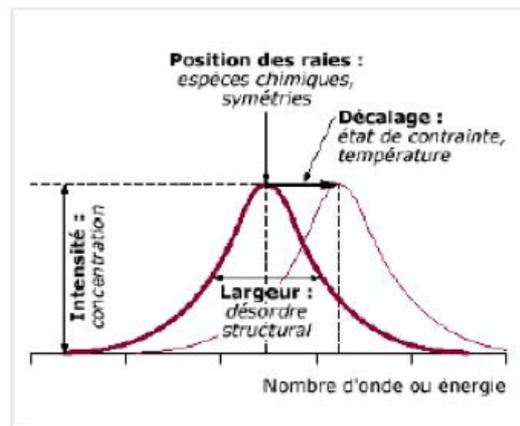


Figure 7 : Typographie d'une bande spectrale obtenue en spectrométrie Raman

Parce que pratiquement toutes les molécules présentent une signature unique Raman spectroscopique basée sur les vibrations moléculaires, cette technique est largement utilisée comme méthode de confirmation de l'identification de matériaux inconnus. Cette technique est non destructive et sans contact, et nécessite en général peu ou pas de préparation de l'échantillon. L'eau n'ayant pas de signature spectrale, la microspectrométrie Raman est un outil de choix pour l'analyse d'échantillons biologiques. Sur l'os, elle permet de caractériser la composition chimique des parties minérales (inorganiques) et

organiques simultanément (figure 8) (Carden et Morris, 2000) (Kazanci *et al.*, 2007) (Morris et Mandair, 2011). Plusieurs études ont montré l'intérêt de la microspectrométrie Raman pour l'étude de la composition osseuse en conditions physiologique et pathologique (Falgayrac *et al.*, 2010) (Olejnik *et al.*, 2014) (Paschalis *et al.*, 2016).

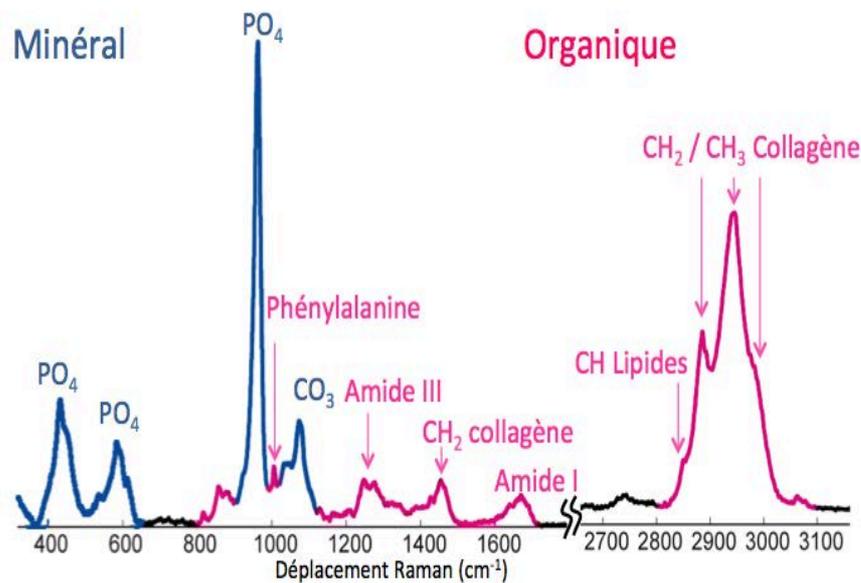


Figure 8 : Spectre Raman représentatif du tissu osseux sur différentes fenêtres spectrales : phases organiques et minérales de l'os

2. Méthodologie de l'étude

Les spectres osseux ont été acquis avec un microspectromètre Raman LabRAM HR800 (HORIBA, Jobin-Yvon, France). Cet instrument est équipé d'un plateau motorisé en XYZ, d'une diode laser à 785 nm, et de la technologie DuoScan©. Cette technologie DuoScan© a récemment montré sa capacité à déterminer un spectre moyen d'une zone de dimension définie, qui soit équivalent à la moyenne de spectres individuels micrométriques mesurés point par point sur la zone d'intérêt, ceci permettant d'étudier plus rapidement les

échantillons sur des zones plus larges, donc plus représentatives de l'échantillon.

Cette méthode DuoScan© a donc été choisie avec un objectif x50 sur une zone de $900 \mu\text{m}^2$ ($30 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$) (Falgayrac *et al.*, 2012). Un total de 40 zones (chacune sur une zone de $900 \mu\text{m}^2$) ont été analysées sur chaque échantillon pour être bien représentatives de celui-ci (Zimmerman *et al.*, 2015). Les zones d'études choisies (figure 9) ont été l'os interstitiel (10 acquisitions spectrales) ; les ostéons secondaires (10 acquisitions spectrales) ; la zone périostée (10 acquisitions spectrales) ; l'os trabéculaire (10 acquisitions spectrales). Un total de 80 acquisitions a donc été réalisé sur chaque sujet à chaque temps d'étude (côte 1 et 4), soit 6720 acquisitions pour l'étude (14 temps d'étude avec 6 sujets), ce qui correspond à 6 048 000 acquisitions ponctuelles d' $1\mu\text{m}$.

Le temps d'acquisition pour chaque spectre était de 30 secondes. La fenêtre spectrale choisie s'étendait de 300 à 1700 cm^{-1} avec une résolution de 4cm^{-1} (Morris et Mandair, 2011). Cette fenêtre spectrale est appelée la « fingerprint region » car elle contient la majorité des bandes Raman d'intérêt. Tous les spectres sont ensuite lissés et leur ligne de base est corrigée en vue de leur traitement.

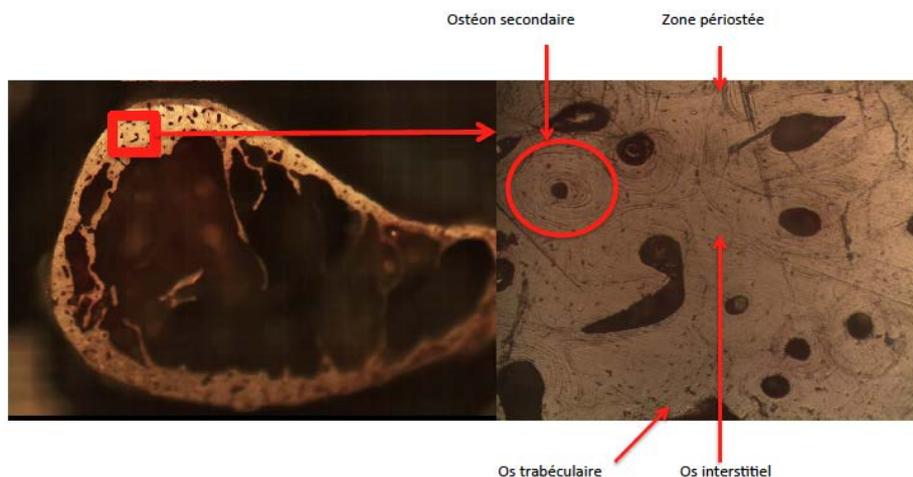


Figure 9 : Zones d'étude choisies pour les acquisitions spectrales

3. Traitement des spectres Raman

De par la composition hétérogène du tissu osseux, les données spectrales recueillies sont complexes. Afin d'extraire des spectres une information la plus exhaustive possible, les traitements des spectres ont été envisagés sous deux angles avec deux approches statistiques disjointes :

- Analyse des paramètres physico-chimiques

Les paramètres physicochimiques Raman sont liés au comportement physiopathologique du tissu osseux (Burket *et al.*, 2011) (Donnelly *et al.*, 2010) (Yerramshetty et Akkus, 2008). Ils sont extraits après un prétraitement par lissage et correction de la ligne de base via le logiciel Labspec©, avec le logiciel Matlab© R2010a (Mathworks, Inc., Natick, MA, USA) couplé au logiciel Microsoft Excel®. Sont ainsi extraites les intensités et aires des bandes spectrales d'intérêts suivantes (tableau 3) :

- Pour la phase minérale : la bande à 438 cm^{-1} correspond à la vibration ν_2 du phosphate, celle à 589 cm^{-1} , à la vibration ν_4 et la bande à 960 cm^{-1} , à la vibration ν_1 du phosphate. Celle de la vibration ν_3 du phosphate à 1040 cm^{-1} est proche de celle des carbonates $\nu_1(\text{CO}_3)$ à 1070 cm^{-1} ;
- Pour la phase organique : la bande à 853 cm^{-1} correspond à la vibration de la proline, celle à 877 cm^{-1} à celle de l'hydroxyproline,

l'amide III est à 1260 cm^{-1} , l'amide I est à 1680 cm^{-1} . Ces deux bandes correspondent principalement au collagène. La bande à 1450 cm^{-1} qui correspond au pic CH₂ est lié tant aux protéines collagéniques que non collagéniques (ostéocalcine, ostéopontine, ostéonectine...).

$\nu_2(\text{PO}_4)$	$\nu_4(\text{PO}_4)$	Proline	Hydroxyproline	$\nu_1(\text{PO}_4)$	$\nu_1(\text{CO}_3)$	Amides III	$\delta(\text{CH}_2)$	Amides I
429 cm^{-1}	580 cm^{-1}	856 cm^{-1}	877 cm^{-1}	960 cm^{-1}	1070 cm^{-1}	$1245\text{-}1269\text{ cm}^{-1}$	1453 cm^{-1}	$1667\text{-}1689\text{ cm}^{-1}$

Tableau 3 : Position des bandes d'intérêt étudiées en microspectrométrie Raman pour l'étude du tissu osseux

Secondairement, peuvent être calculés :

- Les ratios de bandes minérales/organiques ;
- Le taux de carbonatation via le ratio carbonate/phosphate (ν_1) ;
- La cristallinité minérale qui est l'inverse de la largeur à mi hauteur de la bande ν_1 (FWHM : full width at half maximum).

Ces paramètres quantitatifs ont été présentés en termes de moyenne et de déviation standard. La normalité des paramètres quantitatifs a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk. L'évolution des différents paramètres au cours du temps (sur 12 mois d'étude) a été évaluée par un modèle linéaire mixte. Ce modèle a permis de tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées au cours du temps et la corrélation pouvant exister entre les côtes d'un même individu. La normalité des résidus du modèle a été vérifiée. Le seuil de

significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS© version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC). Les résultats sont rapportés comme la moyenne \pm déviation standard pour les différents groupes.

Secondairement, une analyse ponctuelle à 24 mois a été réalisée pour vérifier les tendances observées sur 12 mois.

- **Analyse statistique multivariée**

Les paramètres physico-chimiques ne fournissent l'information qu'à partir de bandes particulières du spectre. Les spectres Raman sont complexes. Chaque partie du spectre contient des informations sur la composition osseuse qui n'est pas prise en compte par les paramètres physico-chimiques. L'utilisation d'une méthode univariées serait trop chronophage. D'où l'intérêt d'utiliser une analyse statistique multivariée qui permet de prendre en compte l'intégralité des spectres. L'autre intérêt, c'est que certaines méthodes multivariées peuvent aider à la prise de décision. Plusieurs méthodes d'analyses multivariées existent. Deux méthodes ont été utilisées dans cette étude :

- « **Principal Component Analysis** » (**PCA**) : c'est une analyse *non-supervisée*, descriptive et exploratoire. Elle est souvent utilisée en première intention pour explorer les données car la PCA ne suppose aucun modèle mathématique sous-jacent. Son utilisation est très répandue car elle est facile à mettre en œuvre. Son principe est basé

sur la présence (ou l'absence) de corrélations linéaires entre les variables étudiées (ici les nombres d'ondes). L'algorithme de calcul va tester toutes les corrélations possibles entre les différentes variables. Le but est d'identifier les variables les plus pertinentes qui décrivent le mieux la variabilité dans le jeu de données.

Dans notre cas, l'algorithme donnera les bandes Raman qui sont les plus pertinentes en fonction du temps (si elles existent). Les résultats sont présentés sous la forme de graphiques qui facilitent leur interprétation.

- « **Partial Least Square - Discriminant Analyses** » (PLS-DA) (Duraipandian *et al.*, 2011). La PLS-DA est une méthode *supervisée* et *discriminante*. La fonction *supervisée* consiste à identifier les variables caractéristiques des différences entre 2 groupes (groupes A et B, par exemple). Ces variables serviront à élaborer un modèle prédictif. La fonction *discriminante* de cette méthode consiste à utiliser le modèle prédictif pour prédire l'appartenance au groupe A ou B d'un jeu de données inconnu. Cette fonction sert d'aide à la décision.

Dans notre cas, la PLS-DA identifiera les bandes Raman caractéristiques des différences entre les spectres Raman à des temps connus (M0, M1, M2...M12...M24). Ces bandes Raman serviront à élaborer un modèle prédictif. Ce modèle prédictif permettra de prédire si un spectre (ou plusieurs) Raman pris à un temps inconnu appartient à un temps compris entre M0 et M12, voire M24.

L'utilisation de modèles PLS-DA est de plus en plus courante dans les études biologiques en raison de leurs performances de classification très forte. Ceci est illustré ci-dessous (figure 10) par une comparaison entre une classification PCA et une classification PLS-DA sur les mêmes données. Dans le cas de la PCA, le paramètre ne peut pas être différencié dans les deux premières composantes qui décrivent plus de 90% de la variation dans les données. En revanche, le scoreplot PLS-DA montre une claire distinction des données. Alors que la PCA représente une exploration de données impartiale non supervisée, la PLS-DA représente une approche différente. Il s'agit d'une méthode dite supervisée où les modèles sont extraits afin qu'ils discriminent les classes de la meilleure façon possible.

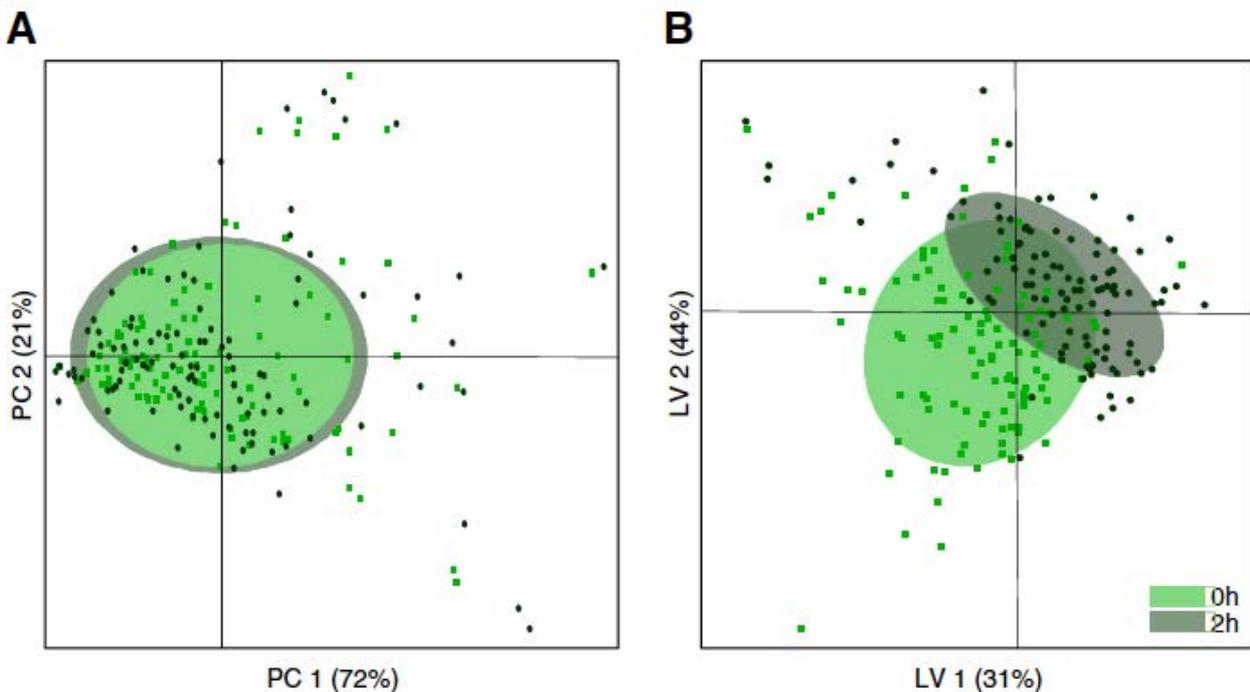


Figure 10 : Exemple de modèle PCA et PLS-DA sur les mêmes données illustrant l'intérêt d'une méthode d'analyse multivariée supervisée (figure issue de Savorani *et al.*, 2013)

Le prétraitement des spectres a consisté en une correction de la ligne de base (automated weighted least squares: order 6 and weight mode 1) et un lissage (Savitzky-Golay: filter width 5 and polynomial order 0). Le nombre optimal de variables est déterminé par une méthode de validation croisée (itérations de sous-ensembles aléatoires).

Ces analyses multivariées ont été réalisées via le logiciel PLS Toolbox© v6.7 (Eigenvector Research, Inc., West Eaglerock Drive, Wenatchee, WA, USA) dans un environnement MatLab© (Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

C. Analyse histo-morphologique : technique de référence en complément de l'évaluation spectrométrique Raman

1. Préparation des échantillons

Les fragments de côtes osseuses ont été fixés dans du formol à 10% tamponné à pH 7.2 pendant 21 jours, dans le but de stabiliser les structures tissulaires. Une fois fixés, les fragments osseux ont été décalcifiés.

La solution de décalcification employée est le liquide de Kristensen, composé d'acide formique et de formate de sodium (Kristensen, 1948). Cette méthode de décalcification utilise un acide faible, de ce fait, elle est moins agressive pour le tissu osseux. Les temps de décalcification ont été de 17 heures pour l'ensemble des côtes, à l'exception d'un des six sujets, dont le temps de décalcification nécessaire a été de 28 heures.

A l'issue de la décalcification, les fragments ont été rincés pendant 2 heures sous eau courante, puis déshydratés selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100%, puis xylène), et enfin inclus en paraffine. Des coupes de 5µm ont été faites et les colorations suivantes réalisées :

- Hématoxyline et éosine (H&E) pour l'étude de la morphologie générale;
- Rouge Picro-Sirius (PSR) pour la mise en évidence des fibres de collagène observées en lumière polarisée (Junqueira *et al.*, 1979).

De nombreux protocoles de coloration du collagène existent en pratique histologique à visée médicale. Pour exemples, on peut citer la coloration de van

Giesons, les trichromes de Masson, Mallory et Heidenchain, mais surtout, la coloration PSR (rouge Picro-Sirius) est la plus spécifique et sensible de ces méthodes (Whittaker *et al.*, 1994). Le rouge Picro-Sirius colore sélectivement les collagènes de type I et III, et est spécifique des acides aminés Lys, Arg et HydroxyLys. La coloration est donc d'autant plus marquée que son observation se fait en lumière polarisée. En effet, les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène et augmentent leur biréfringence. L'utilisation de cette coloration sur restes osseux archéologiques a récemment montré son efficacité (Stephenson, 2015).

2. Analyse histo-morphologique

Une station de vidéo microscopie a été utilisée dans le cadre de cette étude. Celle-ci, équipée d'un ordinateur se compose :

- D'un microscope Axioscope A1 (Zeiss) équipé d'un tube trinoculaire, d'une tourelle 6 positions avec les objectifs EC Plan-Neofluar (2,5X, 5X, 10X, 20X, 40X), d'un système de polarisation orientable de 0° à 90°, ainsi que d'un objectif 10X muni d'un coulisseau DIC et d'une platine encodée ;
- D'une station d'acquisition d'images, équipée d'une caméra CCD 2 millions de pixels, pour fond clair et polarisation, des logiciels Microvision Instruments : Archimed© pour la base de données d'images et l'acquisition, et Histolab© pour la cartographie de grandes coupes tissulaires et la quantification de structures tissulaires (nombre, surface, angles, longueur, couleur...);

Pour visualiser les observations microscopiques, différents éclairages ont été utilisés :

- Une observation classique des tissus en microscopie à fond clair : qui permet, entre autres, de rechercher tout élément informatif lors de l'observation de tissus putréfiés ou momifiés (présence de parasite végétal ou animal, colorabilité des structures résiduelles, lésions...);
- Une observation en lumière polarisée (Pola) : qui permet la recherche de matériaux exogènes (cristaux, végétaux), la visualisation de la structure des acides gras (adipocire), l'étude de la microstructure osseuse ;
- Une observation avec le "Nomarski Interference Contrast" (NIC) : qui permet de visualiser la bio-érosion osseuse.

Tout d'abord, chaque coupe histologique a été cartographiée sur fond clair en utilisant un grossissement x2,5 et une coloration H&E. La cartographie de grandes coupes tissulaires, réalisée par le logiciel Histolab© dans des délais très courts, permet d'obtenir une vue d'ensemble de la coupe et de localiser avec précision toute lésion, même minime présente sur le tissu. Elle nous a ainsi permis de localiser au sein de chaque coupe la position des ostéons dégradés.

Puis, chaque ostéon dégradé a été observé sur fond clair, en lumière polarisée, ou en NCI, en utilisant un grossissement x40 et une coloration PSR. Cela nous a permis une meilleure observation des caractéristiques de la dégradation collagénique, étant donnée la forte affinité du PSR aux acides aminés Lys – Hlys et Arg du collagène.

RÉSULTATS

**I. ANALYSE MACROSCOPIQUE : LA PERTE DE POIDS DE L'OS COMME
CRITERE D'EVALUATION DE LA DIAGENESE**

A. Mesure des paramètres météorologiques

L'enregistrement quotidien des températures extérieures sur les trois premiers mois de l'étude a été réalisé via Météo France®. Celles ci montraient des valeurs échelonnées entre 0,3°C et 19,5°C (tableau 4 et figure 11). Le taux d'humidité de l'environnement a été peu variable avec une moyenne de 82,47% (SD±6,86). L'humidité et la température dans le milieu intérieur (milieu contrôlé) sont restées constantes à respectivement 60% et 20°C.

	C1	C2	C3	C4
Latéralisation	1ère côte droite	2ème côte droite	3ème côte droite	4ème côte droite
Environnement	Extérieur	Intérieur	Intérieur	Extérieur
Température	$T^{\circ}max$: moyenne 10.06 ±3.02°C $T^{\circ}min$: moyenne 3.98 ±2.13°C	Constante à 20°C	Constante à 20°C	$T^{\circ}max$: moyenne 10.06 ±3.02°C $T^{\circ}min$: moyenne 3.98 ±2.13°C
Humidité	82.47 ±6.86%	Constante à 60%	Constante à 60%	82.47 ±6.86%

Tableau 4 : Paramètres météorologiques environnementaux des côtes étudiées macroscopiquement

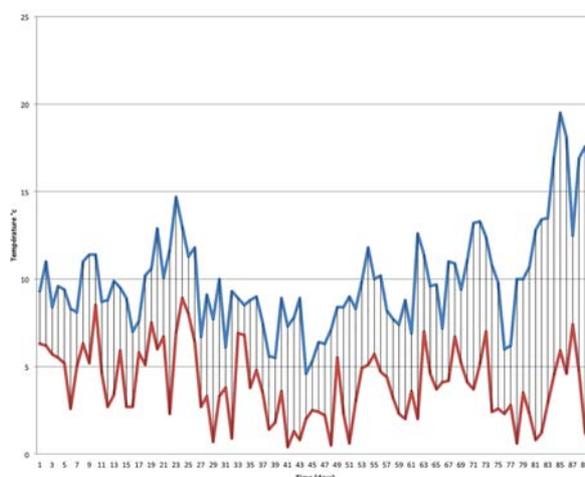


Figure 11 : Évolution de la température sur les 90 premiers jours d'étude en environnement extérieur

B. Evolution de la perte de poids

Les observations macroscopiques quotidiennes n'ont pas montré d'activité entomologique sur les côtes, ni de développement fongique ou craquelures osseuses significatives. Au cours du temps les côtes ont donc montré un aspect macroscopique comparable (figure 12).



Figure 12 : Aspect macroscopique des côtes 1 et 4 à un mois (gauche) et 3 mois (droite) de diagenèse

La perte de poids a été évaluée quantitativement (tableau 5) sur sujets. Cependant, les poids osseux initiaux étant variables, eu égard aux densités osseuses initiales des sujets, de leurs tailles, corpulences..., le résultat des pertes de poids a surtout été évalué en terme de pourcentage de poids restant.

	Femme de 80 ans (1m65 ; 60kg)				Homme de 87 ans (1m72 ; 50kg)				Homme de 88 ans (1.70m ; 45kg)			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Poids en gramme (poids restant en %)												
Jour 0	29.31 (100)	23.04 (100)	25.92 (100)	33.37 (100)	25.23 (100)	29.67 (100)	35.28 (100)	43.74 (100)	37.15 (100)	25.7 (100)	40.94 (100)	51.19 (100)
Jour 1	29.27 (99.86)	17.71 (76.86)	23.18 (89.43)	33.31 (99.82)	23.78 (94.25)	21.48 (72.4)	28.85 (81.77)	40.95 (93.62)	32.47 (87.4)	17.48 (68.02)	27.7 (67.66)	44.73 (87.38)
Jour 5	25.8 (88.02)	15.27 (66.28)	16.24 (62.65)	30.18 (90.44)	20.05 (79.47)	17.95 (60.5)	21.05 (59.66)	36.69 (83.88)	23.46 (63.15)	13.33 (51.87)	19.38 (47.34)	29.83 (58.27)
Jour 10	23.27 (79.39)	15.15 (65.75)	15.72 (60.65)	26.13 (78.3)	17.42 (69.05)	17.66 (59.52)	20.63 (58.47)	31.52 (72.06)	21.43 (57.68)	13.12 (50.98)	18.91 (46.19)	25.86 (50.52)
Jour 30	20.4 (69.61)	14.98 (65.02)	15.31 (59.07)	23.21 (69.55)	16.06 (63.65)	17.56 (59.18)	20.08 (56.92)	28.73 (65.68)	19.39 (52.19)	13.07 (50.86)	18.78 (45.87)	24.96 (48.76)
Jour 60	20.04 (68.37)	14.83 (64.37)	14.23 (54.9)	22.94 (68.74)	15.79 (62.58)	17.4 (58.64)	18.8 (53.29)	28.25 (64.58)	18.93 (50.95)	12.9 (50.19)	18.66 (45.58)	24.34 (47.56)
Jour 90	19.84 (67.69)	14.81 (64.28)	13.61 (52.51)	22.58 (67.66)	15.56 (61.67)	17.39 (58.61)	16.3 (46.2)	27.57 (63.03)	18.73 (50.42)	12.88 (50.12)	18.61 (45.45)	24.08 (47.04)

Tableau 5 : Pesées (en gramme) et pourcentages de poids restant sur 90 jours d'étude

Les résultats ont montré que :

- Le **premier jour d'étude**, en environnement intérieur, la perte de poids osseuse était significative (z test) avec une moyenne de perte de 20,38% (SD±11,04), pour les côtes 2 (non inhumées) (z test: p=0,002) et une moyenne de perte de 27,58% (SD±4,42) pour les côtes 3 (inhumées) (z test : p=0,073). A contrario, en environnement extérieur, la perte de poids le premier jour n'était pas significative, avec une moyenne de perte de 2,94% (SD±3,96) pour les côtes 1 (z test : p= 0,143) et 3,28% (SD±4,38) pour les côtes 4 (z test : p=0,073) ;
- Après **une semaine**, en environnement intérieur, la perte de poids progressait comparativement au poids relevé le premier jour d'étude avec une perte de 49,03% (SD±7,73) pour les côtes 2 (non inhumées) (z test: p=0.024) et 52,66% (SD±8,12) pour les côtes 3 (inhumées) (z test: p<0,0001).

En environnement extérieur, la perte de poids était moindre mais significative avec une moyenne de perte de 36,85% (SD±12,64) pour les côtes 1 (z test; $p < 0,0001$) et 41,73% (SD±17) pour les côtes 4 (z test; $p < 0,0001$);

- Après **un mois**, en environnement intérieur, la perte de poids stagnait comparativement au poids relevé au bout de la première semaine d'étude avec une perte de 48,81% (SD±7,47) pour les côtes 2 (non inhumées) (z test: $p=1$) et 54,42% (SD±7,25) pour les côtes 3 (inhumées) (z test: $p=0,304$). En environnement extérieur, la perte de poids se poursuivait mais n'était significative que pour les côtes 4 avec une moyenne de perte de 51,24% (SD±11,06; z test: $p=0,014$). Pour les côtes 1, la perte était de 47,81% (SD±8,85; z test: $p=0,062$).
- Secondairement, la perte de poids se poursuivait dans chacun des environnements mais très progressivement, pour stagner aux alentours de 50 à 60% de perte à 3 mois d'étude et rester stable. Au delà les mesures ont donc été stoppées.

Ces résultats montraient surtout, qu'il existait des différences significatives entre les environnements (Kolmogorov-Smirnov test: $p < 0,0001$), tant pour **environnement extérieur vs. intérieur** ($D=0,945$), que **os inhumé vs. non inhumé** ($D=0,934$). Ainsi, ces données montraient que la perte de poids était significativement plus rapide en environnement intérieur (*i.e.*, avec une teneur en humidité ambiante faible et température constante élevée) et en l'absence d'inhumation (*i.e.*, sans rétention d'humidité par la terre) (figure 13). Au jour par jour, ces différences entre environnement intérieur vs. environnement extérieur était significatives de J1 à J9 (Chi² test: $p < 0,001$), puis ne l'étaient plus à partir de J10 (Chi² test: $p=0,073$).

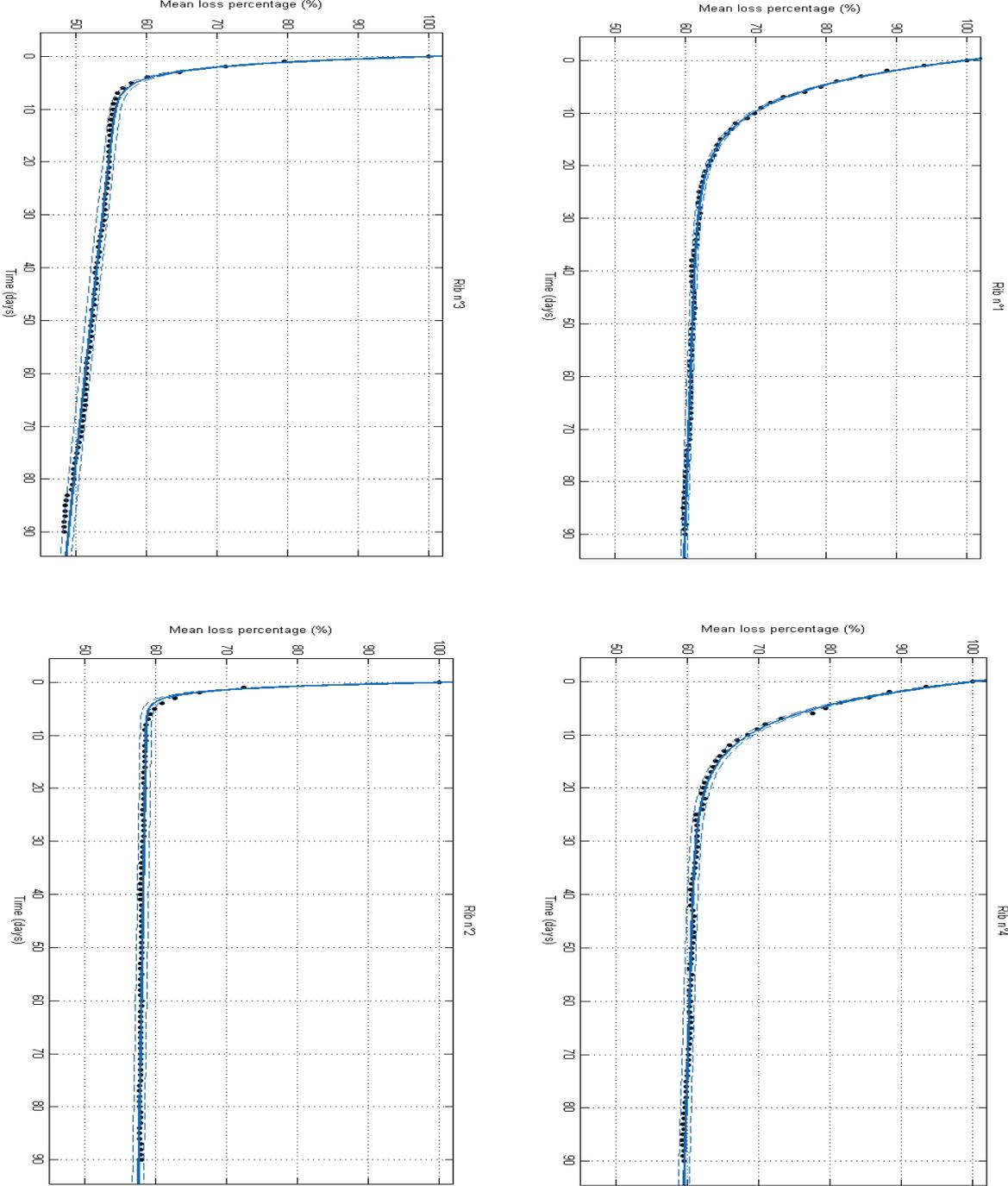


Figure 13 : Décroissance de la perte de poids (pourcentage de poids restant) des côtes en fonction du temps

II. ANALYSE SPECTROSCOPIQUE

A. Etudes des paramètres physico-chimiques

L'analyse en spectrométrie Raman étant une méthode qualifiée de semi-quantitative, les mesures spectrales quantitatives évaluées pour chaque paramètre, en termes d'intensités et/ou d'aires sous le spectre n'ont pas de signification biologique individuelle. A contrario, certains ratios relatifs à ces paramètres et représentatifs de la structure biologique osseuse, montrent des évolutions temporelles significatives.

1. *Ratio de phase minérale/phase organique*

Les paramètres intéressants évalués dans ce travail, sur la fenêtre spectrale 300-1700 cm^{-1} pour évaluer la phase organique et la phase minérale des échantillons osseux, étaient au nombre de 8 (tableau 6), et les ratios utiles correspondants, au nombre de 12 (tableau 7).

$\nu_2(\text{PO}_4)$	$\nu_4(\text{PO}_4)$	Proline	Hydroxyproline	$\nu_1(\text{PO}_4)$	Amides III	$\delta(\text{CH}_2)$	Amides I
429 cm^{-1}	580 cm^{-1}	856 cm^{-1}	877 cm^{-1}	960 cm^{-1}	1245-1269 cm^{-1}	1453 cm^{-1}	1667-1689 cm^{-1}

Tableau 6 : Paramètres évalués et longueurs d'ondes correspondantes par l'étude microspectrométrie Raman

Paramètre Minéral	/	Paramètre Organique	Evolution temporelle (aires)	Evolution temporelle (intensités)
v ₂ (PO ₄)	/	Proline-Hydroxyproline	Diminution moyenne mensuelle de 0,016	Diminution moyenne mensuelle de 0,008
v ₂ (PO ₄)	/	Amides III	Non significative	Non significative
v ₂ (PO ₄)	/	δ(CH ₂)	Diminution moyenne mensuelle de 0,011	Diminution moyenne mensuelle de 0,009
v ₂ (PO ₄)	/	Amides I	Diminution moyenne mensuelle de 0,004	Diminution moyenne mensuelle de 0,01
v ₄ (PO ₄)	/	Proline-Hydroxyproline	Diminution moyenne mensuelle de 0,013	Diminution moyenne mensuelle de 0,006
v ₄ (PO ₄)	/	Amides III	Non significative	Non significative
v ₄ (PO ₄)	/	δ(CH ₂)	Non significative	Non significative
v ₄ (PO ₄)	/	Amides I	Non significative	Diminution moyenne mensuelle de 0,0056
v ₁ (PO ₄)	/	Proline-Hydroxyproline	Diminution moyenne mensuelle de 0,047	Diminution moyenne mensuelle de 0,026
v ₁ (PO ₄)	/	Amides III	Non significative	Non significative
v ₁ (PO ₄)	/	δ(CH ₂)	Diminution moyenne mensuelle de 0,032	Diminution moyenne mensuelle de 0,02
v ₁ (PO ₄)	/	Amides I	Diminution moyenne mensuelle de 0,012	Diminution moyenne mensuelle de 0,023

Tableau 7 : ratios phase minérale / phase organique, études des aires et intensités spectrales sur les 12 premiers mois

Ces ratios ont été évalués via les aires (aires sous les bandes spectrales) et les intensités spectrales, en termes de moyenne et de déviation standard. L'évolution des différents paramètres au cours du temps (sur les 12 premiers mois d'étude) a été évaluée par un modèle linéaire mixte, permettant de tenir compte de la corrélation entre les mesures répétées au cours du temps et la corrélation pouvant exister entre les côtes d'un même individu (C1 et C4). Bien que les variations temporelles aient été très faibles, il a été mis en évidence, des **diminutions significatives dans le temps**, des ratios de phase minérale / phase organique, quasi similaires qu'il s'agisse des aires ou des intensités. Les contributions qui ont été particulièrement notables et reproductibles dans ces ratios étaient pour :

- la phase minérale : contributions ν_1 et ν_2 du phosphate ;
- la phase organique : contributions **Proline-Hydroxyproline, $\delta(\text{CH}_2)$ (et Amides I du collagène.**

Par ailleurs, l'étude ponctuelle de ces données à 24 mois a parfaitement confirmé cette tendance à la diminution des ratios de phase minérale / phase organique sur les mêmes contributions.

2. Carbonatation

Le taux de carbonatation de la phase minérale est mesuré par le ratio d'intensités $\nu_1(\text{CO}_3)$ correspondant à la bande à 1070 cm^{-1} / $\nu_1(\text{PO}_4)$ à 960 cm^{-1} . Selon la même méthodologie et bien que les variations temporelles aient été très faibles, il a été mis en évidence sur 1 an, une **diminution significative dans le temps** (seuil de significativité $<0,0001$), de $0,00035$ en baisse moyenne mensuelle. Cette baisse à 24 mois est restée stable sans s'accroître, confirmant ainsi des variations temporelles très faibles.

3. Cristallinité

L'index de cristallinité est mesuré par l'inverse de la largeur à mi hauteur du pic correspondant à la bande $\nu_1(\text{PO}_4)$ à 960 cm^{-1} ($1/\text{FWHM}$). Selon la même méthodologie et bien que les variations temporelles aient été très faibles, il a été mis en évidence sur 1 an, une **augmentation significative dans le temps** (seuil de significativité $<0,0001$), de $0,000039$ en hausse moyenne mensuelle. Cette augmentation à 24 mois est restée stable sans s'accroître, confirmant ainsi des variations temporelles très faibles.

B. Analyses spectrales multivariées

L'analyse chimiométrique est un outil d'analyse statistique multivariée, permettant d'évaluer s'il existe des similitudes ou des différences au sein de populations complexes, c'est à dire comportant de nombreuses variables (>10). A la différence des paramètres physicochimiques n'exploitant qu'une partie du spectre Raman (*i.e.* la longueur d'onde du paramètre choisi), cette analyse traite le spectre dans sa globalité. L'algorithme va maximiser la variabilité inter-groupe et minimiser la variabilité intra-groupe. Le but est de déterminer toutes les longueurs d'ondes qui sont décisives dans la séparation de classes de données (Eriksson *et al.*, 2013). Les analyses PCA et PLS-DA ont été effectuées en considérant les intervalles de temps pour un sujet (comparaison d'un mois par rapport à l'autre) ; soit treize classes définies pour chaque sujet de 0 à 12 mois. Elles ont ensuite été répétées ponctuellement à 24 mois.

Lorsque les algorithmes PCA et PLS-DA sont appliqués, un certain nombre de composants sont extraits. Le premier composant (PC1) représente la majorité de la variation des données au sein de la matrice et est généralement le plus important à des fins discriminatoires. Les composants suivants (PC2, PC3...) représentent une variation moindre des données. La forme spectrale d'un composant peut être appelé entres autres, son « loading » pour la PCA et son « VIP score » pour la PLS-DA. Chaque spectre définit se compare au « loading » ou au « VIP score » d'un composant pour obtenir un score. Plus un spectre donné a des caractéristiques communes avec un composant, plus le score est élevé et représentatif du groupe définit.

Chaque sujet a donc été analysé mensuellement et indépendamment. Les résultats des analyses PCA et PLS-DA ont été comparés. Les six sujets ont été comparés par ces analyses PCA et PLS-DA :

- **L'analyse PCA** n'a pas été suffisamment contributive en vue d'une séparation statistiquement significative des temps d'analyse tant au plan intra-individuel qu'inter-individuel .

La figure 14 représente le résultat de l'analyse PCA appliquée sur le jeu de données contenant tous les spectres de tous les sujets à M0, M6, M12 et M24. Chaque point représente un spectre Raman. La figure montre une superposition des nuages de points (=cluster) correspondant à M0, M6, M12 et M24. Ce résultat montre que les spectres Raman à M0, M6 et M12 ont une variabilité très faible en fonction du DPM. Seul le groupe M24 forme un cluster diffus mais qui se distingue des 3 précédents. En d'autres termes, les spectres Raman du cluster M24 ont des caractéristiques spectrales similaires (au sein du cluster) mais qui sont différentes des 3 autres clusters. Ces informations spectrales se retrouvent sur la composante principale PC1 qui représente la combinaison de variables qui explique 88,71% de la variabilité dans le jeu de données.

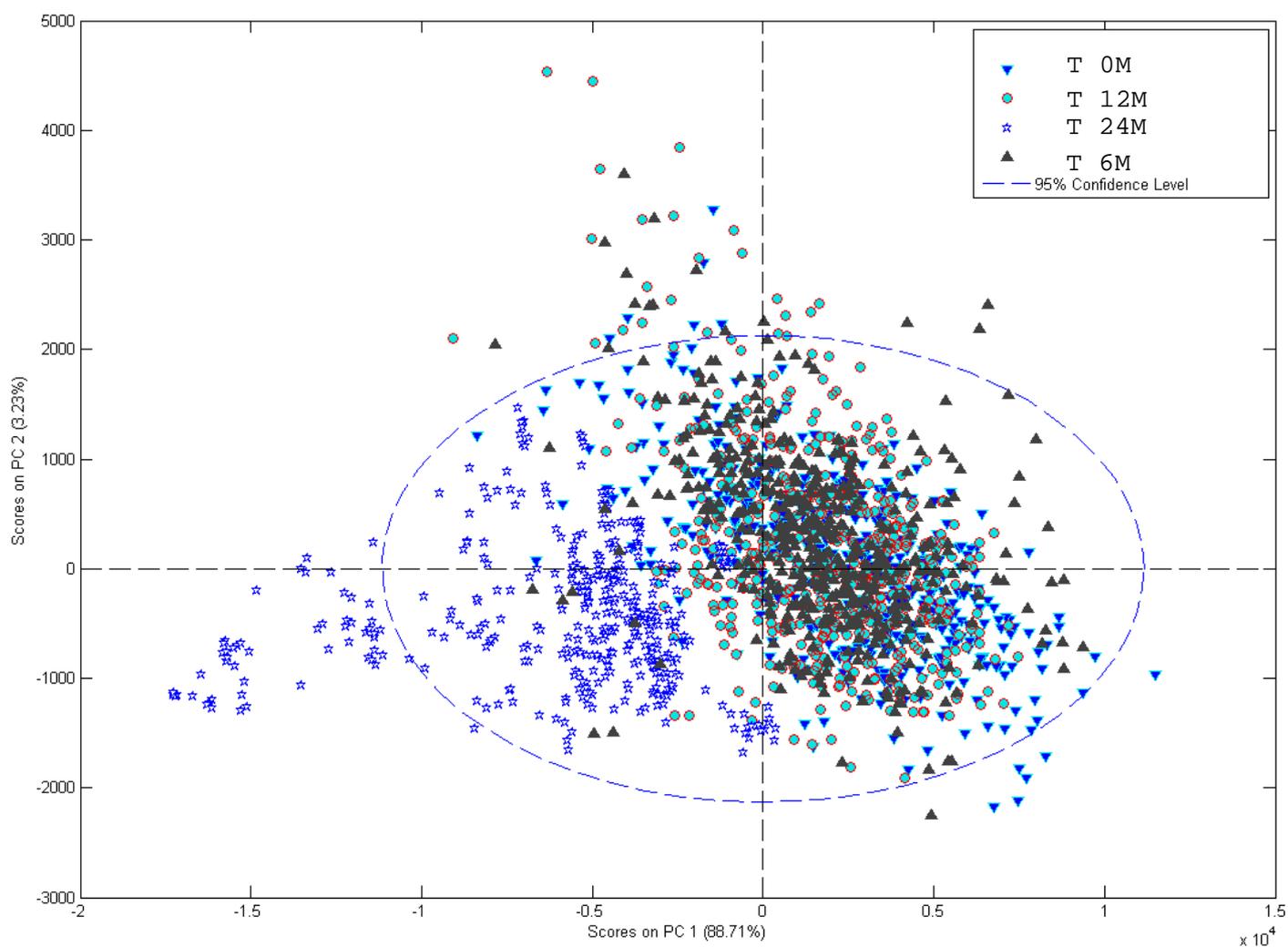


Figure 14 : Analyse PCA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois

Les « loadings » sur PC2, bien que ne représentant que 3.23 % de la variabilité dans le jeu de données, contiennent des contributions notées pour les bandes spectrales 856 cm^{-1} , 877 cm^{-1} , $1245\text{-}1269\text{ cm}^{-1}$, 1450 cm^{-1} , et $1667\text{-}1689\text{ cm}^{-1}$. Ces bandes d'intérêts correspondent à **la proline**, **l'hydroxyproline**, **amides III**, **$\delta(\text{CH}_2)$ collagène** et **amides I**, respectivement, ce qui était concordant avec les analyses statistiques des paramètres physico-chimiques (cf. supra) (figure 15) :

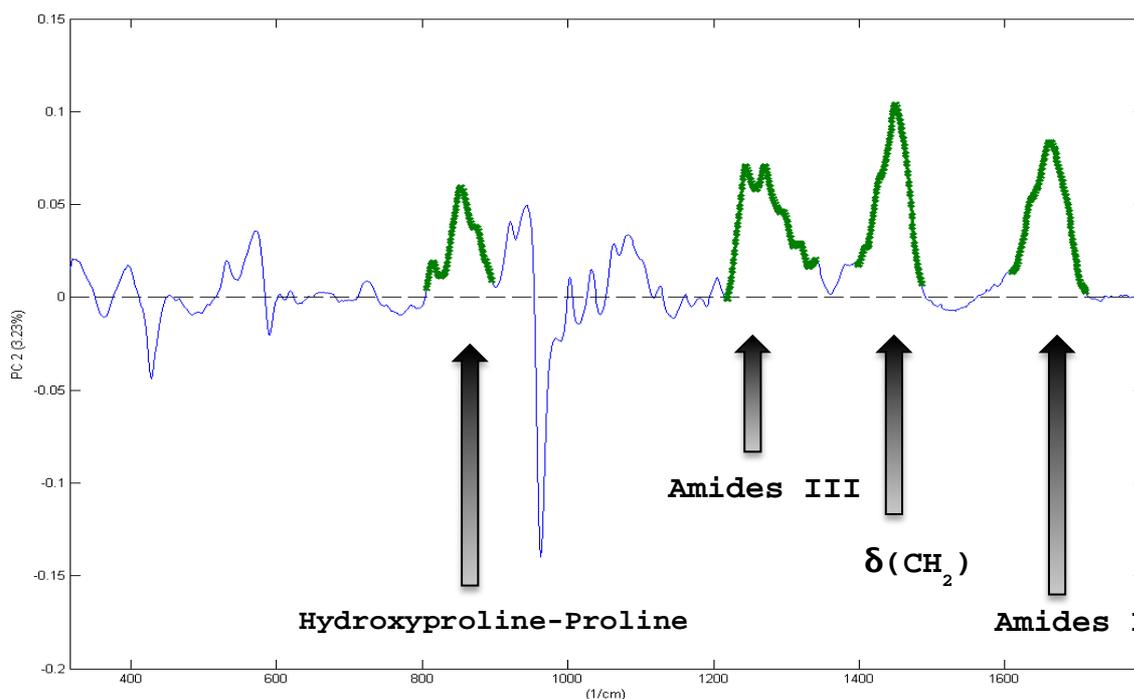


Figure 15 : Composante principale PC2 (3,23%) : contributions notables

L'analyse PCA, a montré que la variabilité liée au temps (DPM) est peut être inférieure à la variabilité intergroupe, pour les groupes M0, M6 et M12. Ainsi, pour discriminer les classes de la meilleure façon possible la PLS-DA a été utilisée.

- **L'analyse PLS-DA** a permis une discrimination significative (tableau 8) des sujets sur leurs temps d'analyses, tant sur le plan intra-individuel, qu'inter-individuel. Il a donc été possible d'objectiver des séparations progressives de groupes par temps d'analyses. Plus les temps d'analyses étaient distincts, plus cette séparation était statistiquement significative et aisée à objectiver. Plus les temps d'analyses étaient proches, moins cette séparation était significative. Ainsi, les groupes T0, T+12 et T+24 mois montraient des différences majeures et les autres temps d'analyses montraient des différences intermédiaires (figure 16).

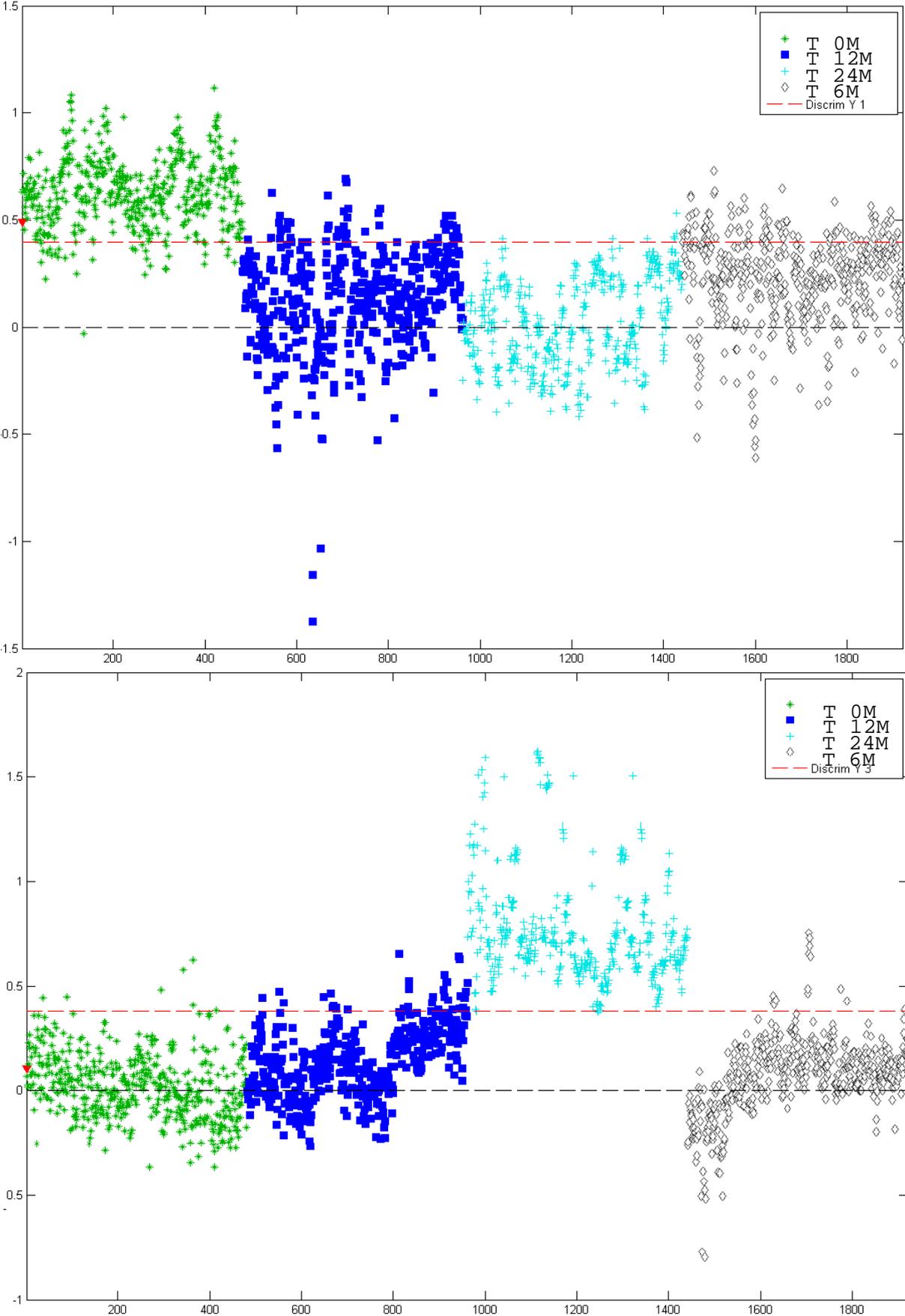


Figure 16 : Analyse PLS-DA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois : discrimination des groupes M0 (supra) et M24 (infra)

Scores	T0M	T6M	T12M	T24M
Sensibilité (%)	0.929	0.779	0.690	0.996
Spécificité (%)	0.899	0.759	0.803	0.960
RMSEC	0.304	0.381	0.372	0.240
RMSECV	0.306	0.382	0.373	0.241

Tableau 8 : Scores de fiabilité (sensibilité et spécificité) et de robustesse (Root Mean Square Error Calibration, RMSEC et Root Mean Square Error Cross Validation, RMSECV) de l'analyse PLS-DA retenue. La fiabilité de l'analyse PLS-DA correspond à une sensibilité et une spécificité proche de 100 % ; la robustesse correspond à des valeurs de RMSEC et RMSECV voisines et se rapprochant au maximum de zéro. Ici, les temps T0M et T24M ont montré des discriminations très significatives alors que les temps T6M et T12M montraient des discriminations intermédiaires.

Les « VIP scores » ont montré des contributions importantes des bandes spectrales 856 cm^{-1} , 877 cm^{-1} , $1245\text{-}1269\text{ cm}^{-1}$, et 1450 cm^{-1} . Ces bandes d'intérêts positives correspondent à **la proline, l'hydroxyproline, l'amide III, et $\delta(\text{CH}_2)$ collagène**, respectivement, ce qui est concordant avec les analyses statistiques des paramètres physico-chimiques (cf. supra) (figure 17) :

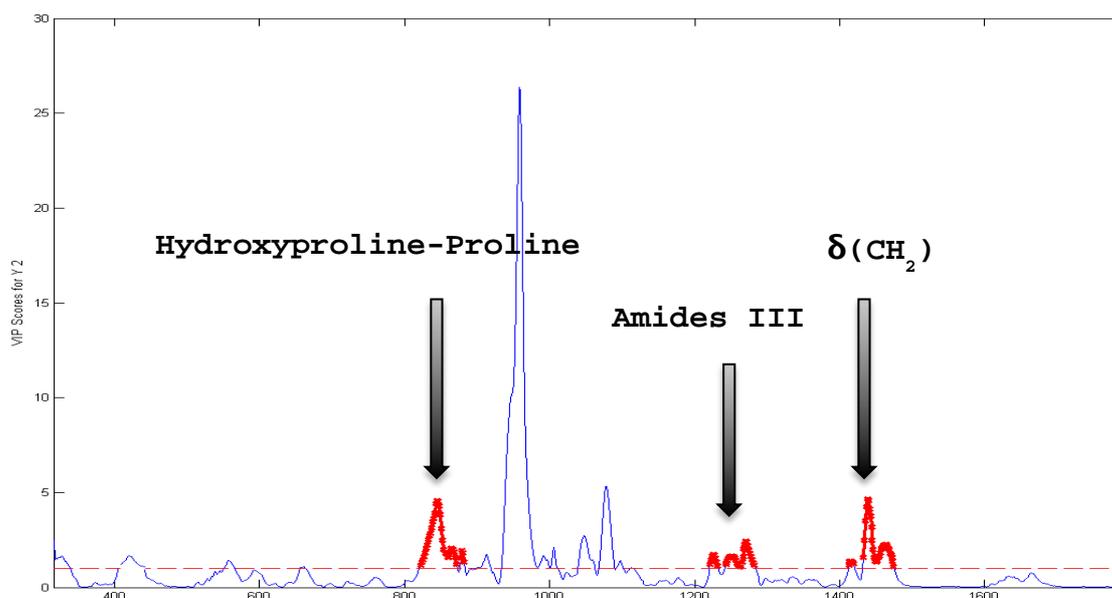


Figure 17 : VIP scores analyse PLS-DA des sujets regroupés par temps d'analyses à T0, T+6 mois, T+12 mois et T+24 mois

- **Constitution d'un modèle prédictif**: par la suite, cinq sujets ont été regroupés aléatoirement et comparés pour servir de calibration à la constitution d'un modèle prédictif sur 12 mois, puis sur 24 mois. Ces cinq sujets ont montré des caractéristiques similaires pour chaque temps d'analyse et des groupes temporels ont été discriminés. Le 6^{ème} sujet a ensuite été comparé au modèle constitué des 5 premiers sujets en vue de constituer un modèle prédictif, possible par l'analyse PLS-DA. Des jeux de données temporelles du 6^{ème} sujet ont donc été proposés au modèle pour vérifier s'il se classait correctement à l'intérieur de ce modèle en vue d'une utilisation prédictive.

Chaque temps d'analyse a permis un classement correct avec un nombre de composant très élevé (99.75%) permettant d'affirmer sa robustesse (tableau 9 et figure 18) sur 12 mois. Ce modèle prédictif s'est confirmé être utilisable sur 24 mois avec là encore un classement correct (tableau 10 et figure 19).

Scores	T0M	T12M
Sensibilité (%)	0.978	0.938
Spécificité (%)	0.938	0.978
RMSEC	0.569	0.569
RMSECV	0.571	0.571

Tableau 9 : Scores de fiabilité et de robustesse du modèle de prédiction PLS-DA à T0M, T6M et T12M.

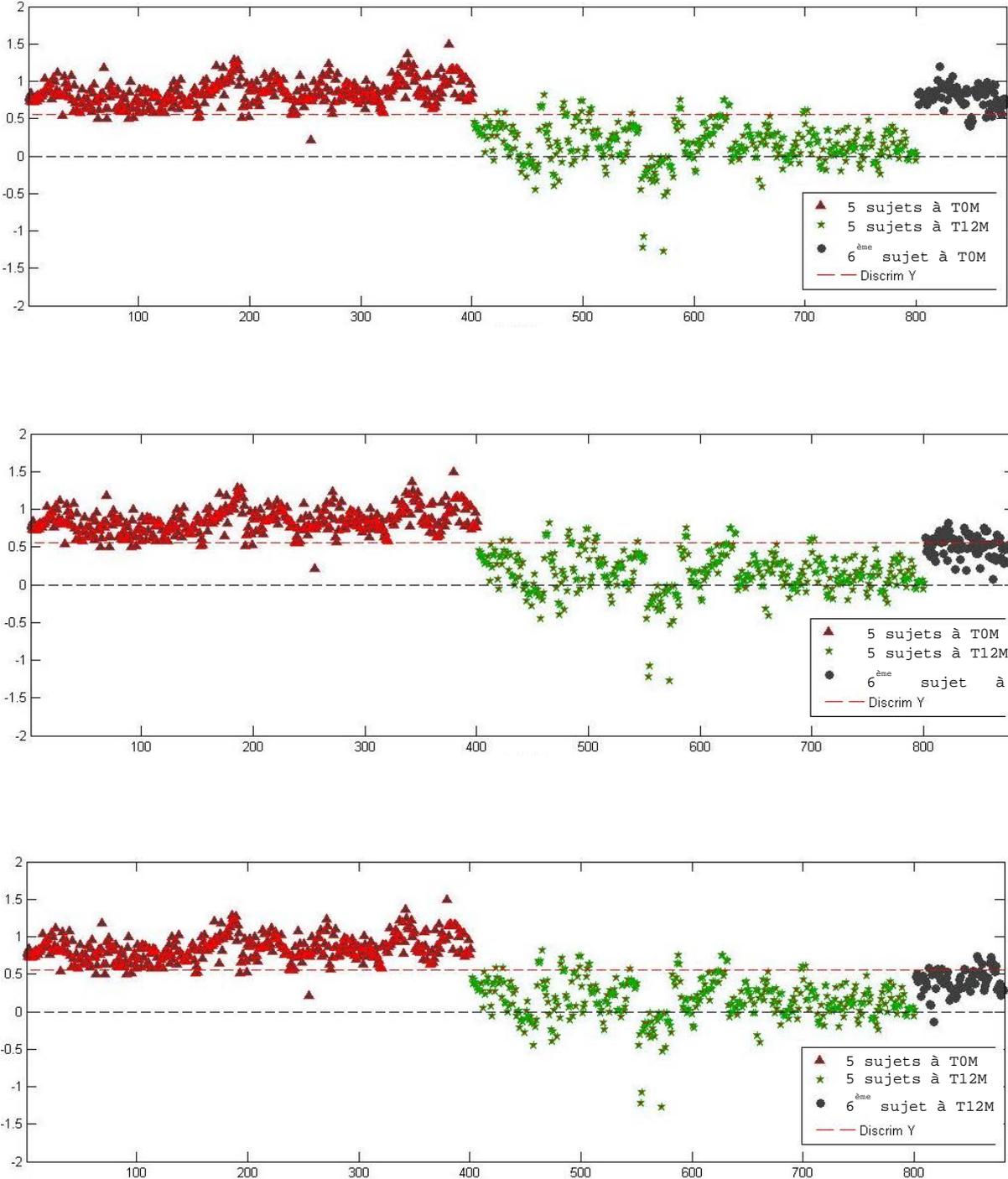


Figure 18 : Analyse PLS-DA sur 12 mois : modèle de prédiction à T0 mois, T6 mois et T12 mois

Scores	T0M	T12M	T24M
Sensibilité (%)	0.908	0.683	0.985
Spécificité (%)	0.705	0.663	0.933
RMSEC	0.394	0.428	0.277
RMSECV	0.396	0.429	0.280

Tableau 10 : Scores de fiabilité et de robustesse du modèle de prédiction PLS-DA à T0M, T12M et T24M.

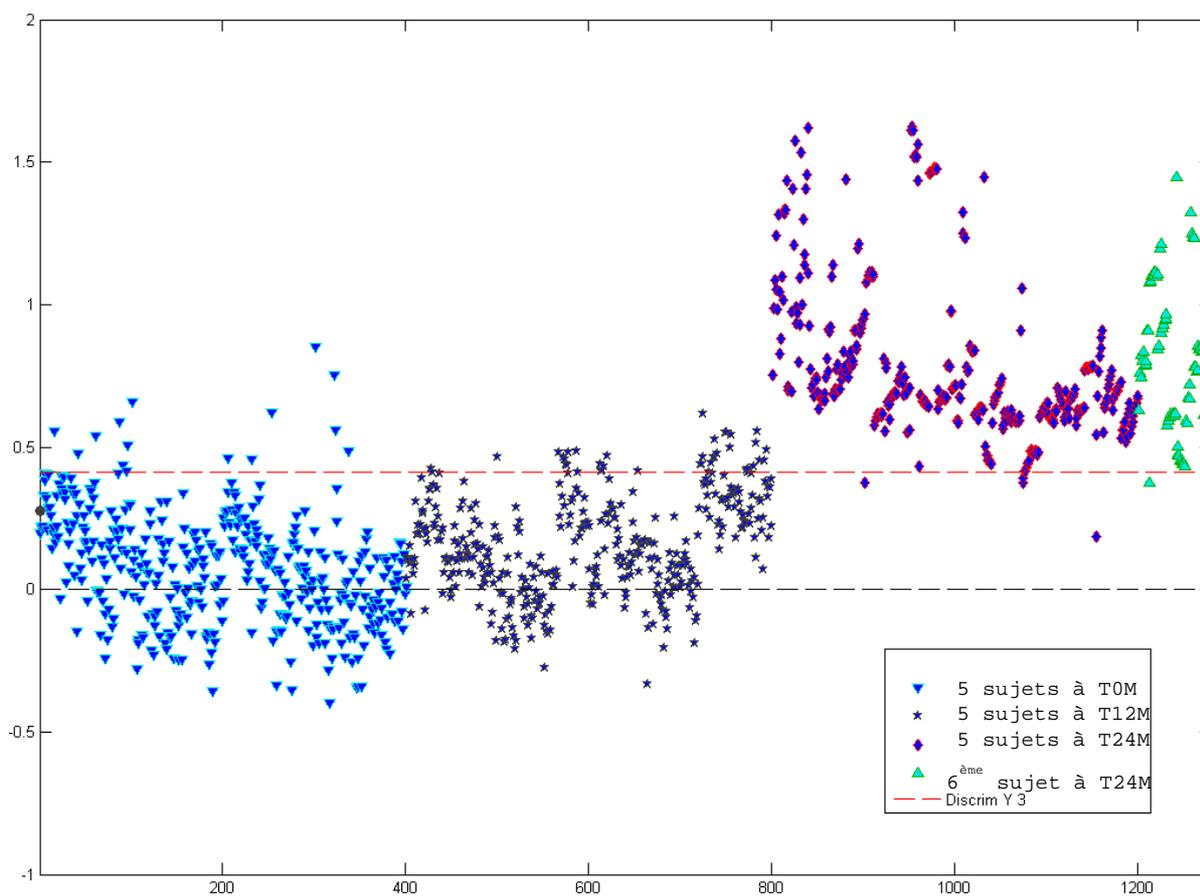


Figure 19 : Analyse PLS-DA sur 24 mois : modèle de prédiction à T0 mois, T12 mois et T24 mois

Notre but étant d'identifier les bandes Raman caractéristiques et représentatives des différents groupes, les «VIP scores» ont donc été analysés (figure 20). Ils ont montré d'importantes caractéristiques positives pour les bandes spectrales 856 cm^{-1} , 877 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} , et 1450 cm^{-1} . Ces bandes d'intérêts positives correspondent à **la proline, l'hydroxyproline, l'amide III, et $\delta(\text{CH}_2)$ collagène**, respectivement. Par conséquent, cette composante est là encore dominée par des contributions organiques collagéniques du tissu osseux et évoque ainsi une altération collagénique précoce en *postmortem*.

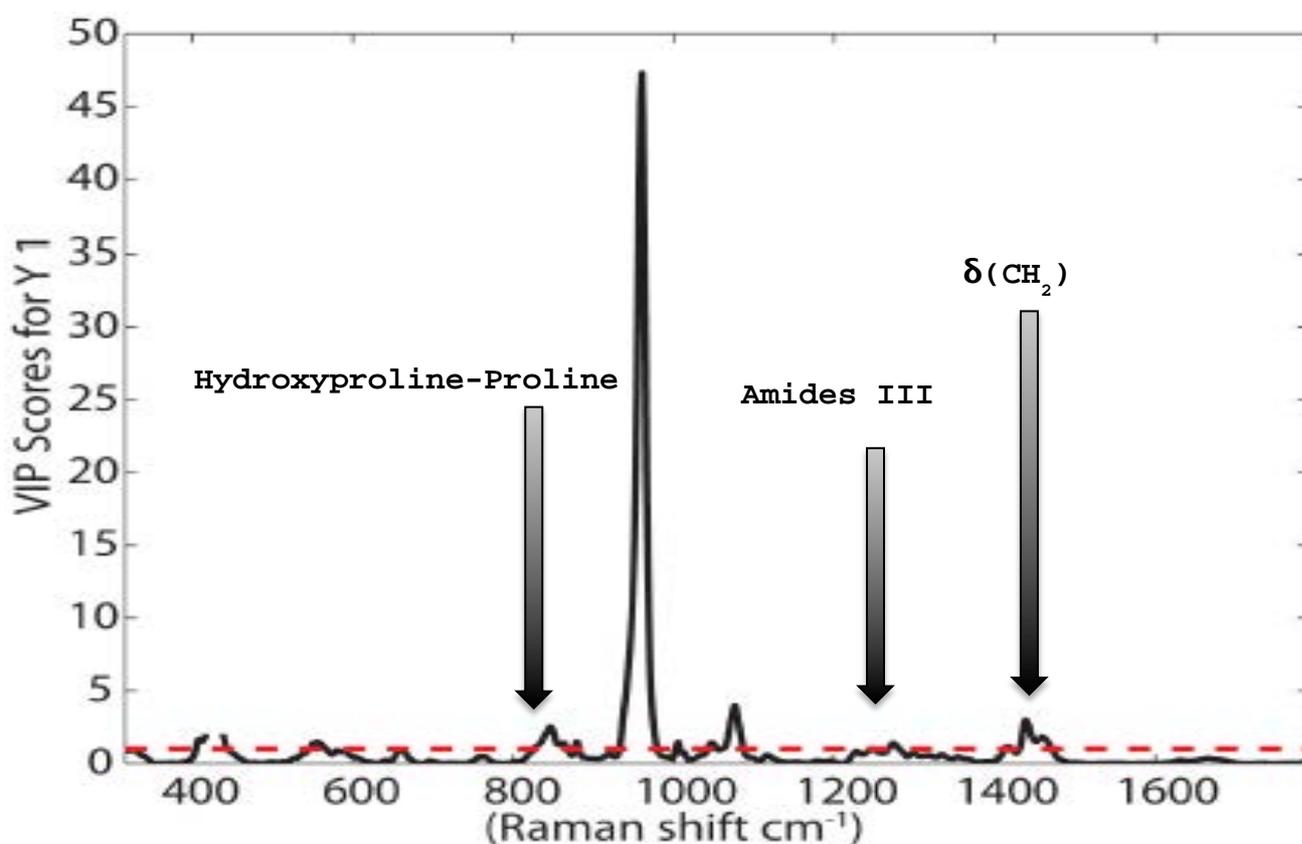


Figure 20 : VIP scores modèle prédictif : bandes d'intérêts positives correspondent à la proline, l'hydroxyproline, l'amide III, et $\delta(\text{CH}_2)$ collagène

Au total, à l'issue des analyses spectrométriques Raman, il a été possible d'identifier que, tant via les analyses statistiques multivariées, et via les analyses statistiques d'évolution temporelle des paramètres physico-chimique, **les contributions permettant la distinction des classes temporelles étaient faites sur un mode attendu de dégradation des fractions organiques collagéniques de l'os.**

Cependant, afin d'identifier quel type biologique de dégradation collagénique est survenue (microbienne par collagénases ou chimique par hydrolyse, cf. partie Introduction), l'analyse histo-morphologique des échantillons osseux était essentielle.

III. ANALYSES HISTO-MORPHOLOGIQUES

Afin de localiser la dégradation osseuse et permettre d'identifier le mode de dégradation collagénique, une cartographie de l'ensemble des coupes réalisées à partir des sections osseuses de différents DPM a été faite (figure 21). Celle-ci a permis la mise en évidence de la structure osseuse. A partir de ces cartographies, il a alors été possible de différencier les zones altérées des zones non altérées. Ces altérations ont été recherchées sur les ostéons et sur l'os lamellaire en zone corticale selon le protocole décrit par Jans *et al.*, (Jans *et al.*, 2002).



Figure 21 : Cartographie des coupes histologiques d'une côte C4 de 0 à 12 mois *postmortem*, colorée au rouge Picro-Sirius.

Au vu des images microscopiques réalisées, on observe, au niveau des ostéons non dégradés (à 0 mois post-mortem), que les lamelles osseuses concentriques

parallèles ont un aspect continu. Elles ne présentent aucune altération architecturale. De plus, la biréfringence est très visible au niveau ostéonique sous la forme d'une croix de Malte (figure 22).

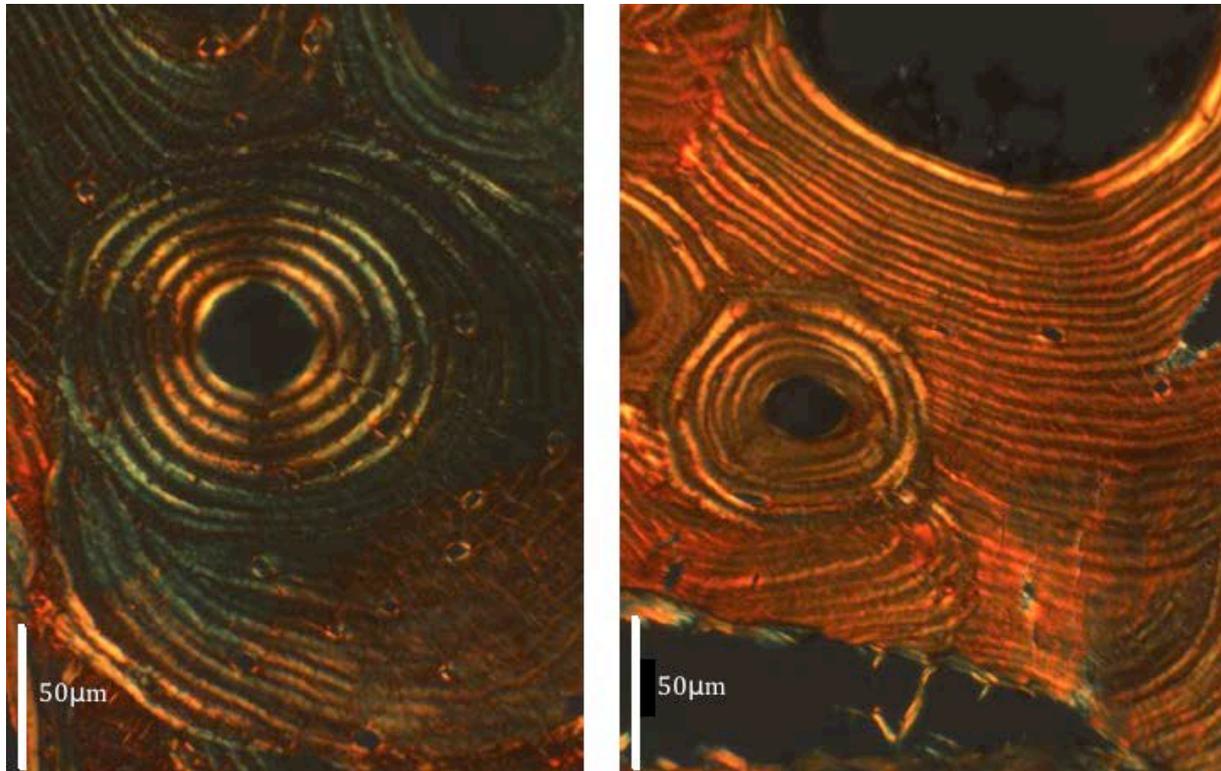


Figure 22 : Aspect microscopique des ostéons : aspect continu des lamelles concentriques parallèles autour du canal de Havers à 0 mois DPM et forte intensité de la biréfringence (coloration au rouge Picro-Sirius - visualisation en lumière polarisée pour les deux illustrations)

A partir de 6 mois (systématiquement) et jusque 24 mois *postmortem*, on observe une désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse. Jusque 12 mois *postmortem*, ce sont les ostéons qui montrent une érosion de leur partie la plus centrale, témoin de la dégradation osseuse autour du canal de Havers (figure 23). Cette dégradation semble se faire de manière centrifuge, du centre vers la périphérie.

A 24 mois *postmortem*, cette dégradation ostéonique se poursuit et s'associe à une dégradation de la partie la plus externe de l'os cortical, où la désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse apparaît (figure 23). Cette altération de l'architecture lamellaire ne présente pas les caractéristiques d'une altération de type lacunaire (par

des tunnels) liée à des microorganismes. Ces tunnels (ou lacune en coupe transversale) sont habituellement de taille plus importante et bordés de zones hyperminéralisées. En outre, une disparition de la biréfringence est observée à partir de 3 mois *postmortem* avec disparition progressive qui se poursuit jusque 24 mois et témoigne d'une dégradation du collagène.

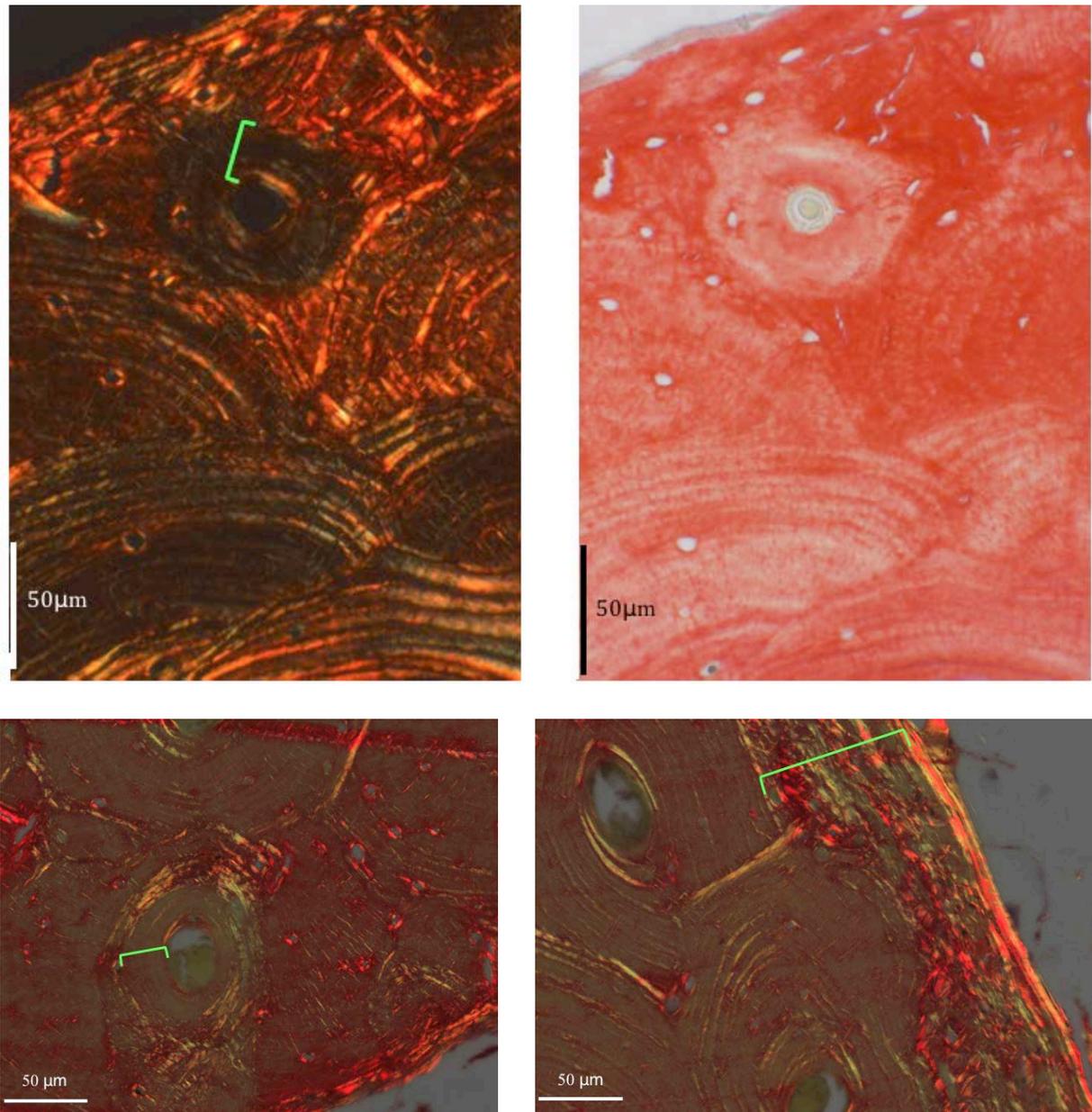


Figure 23 : Aspect microscopique de la dégradation architecturale : dégradation des lamelles osseuses autour du canal de Havers à 12 mois DPM (illustrations du haut). Désorganisation des fibres de collagène sur toute l'épaisseur de la flèche. A 24 mois, la perte de l'architecture lamellaire se poursuit et apparaît en périphérie de l'os cortical (illustrations du bas). Absence de tunnels ou de lacunes de types bactériens.

Perte de l'intensité de la biréfringence.

(coloration au rouge Picro-Sirius - visualisation en lumière polarisée et sans polarisation en haut à droite).

Au bout d'un an *postmortem*, il ressort donc qu'il existe une dégradation taphonomique marquée, située dans la zone qui entoure les canaux de Havers, c'est-à-dire au centre des ostéons. Puis à 24 mois, cette dégradation se poursuit au pourtour des ostéons et apparaît en zone corticale périphérique. Cette dégradation est de type collagénique.

En effet, le rouge Picro-Sirius (PS), constitué d'acide picrique et de rouge Sirius F3B, est un colorant spécifique du collagène réagissant avec ses groupements Lys, Hlys, et Arg. A 12 mois *postmortem*, il ne montre aucune coloration au niveau de la zone centrale ostéonique et montre une baisse de son intensité de fixation sur l'ensemble de l'ostéon dégradé (figure 24). A 24 mois, la fixation est également moins intense en zone corticale externe. Ceci signe une désorganisation des fibres de collagène : le colorant Sirius F3B a pour propriété de se fixer parallèlement aux fibres de collagène, permettant alors une augmentation de la biréfringence de celles-ci. Au niveau microscopique, cette biréfringence n'est pas observée à 12 mois DPM et *a fortiori* à 24 mois.

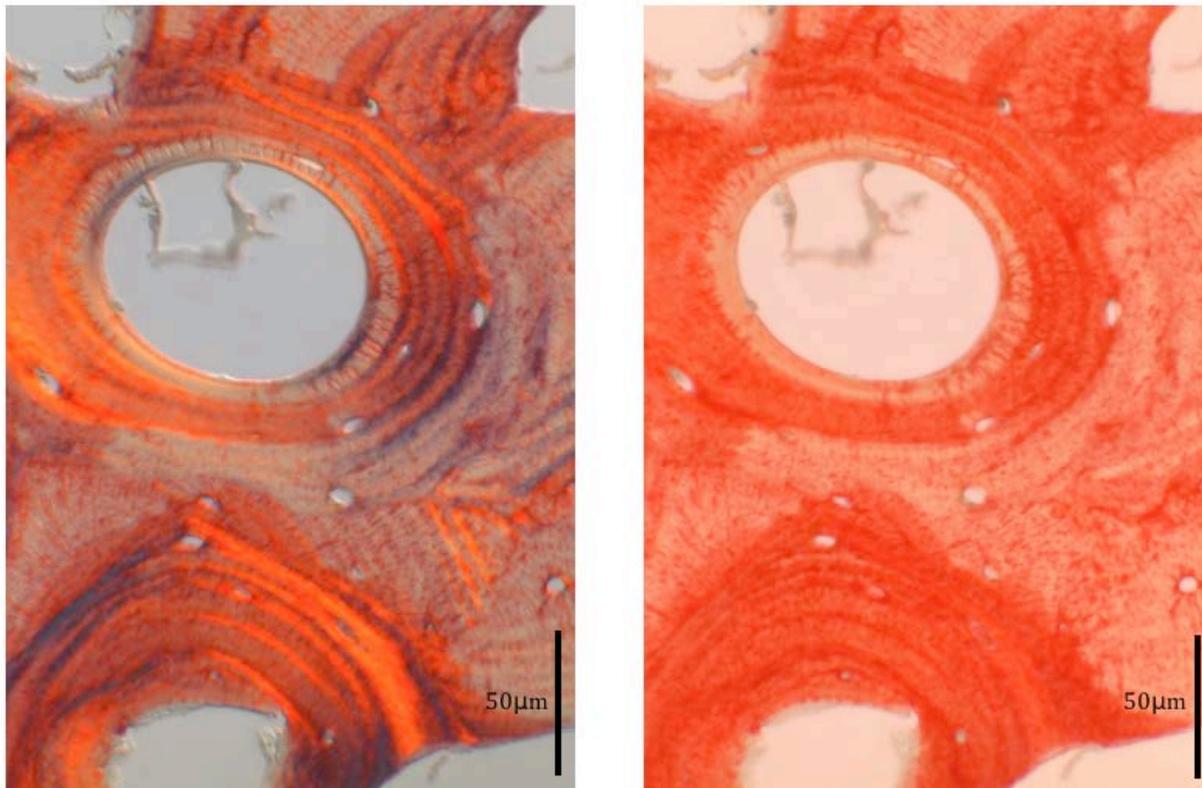


Figure 24 : Aspect microscopique de la bioérosion des ostéons à 12 DPM : perte de la fixation du rouge Picro-Sirius en zone ostéonique la plus centrale
(A gauche : coloration au rouge Picro-Sirius et visualisation en lumière NIC ; A droite : coloration au rouge Picro-Sirius).

Par ailleurs, afin d'évaluer la dégradation de l'os au cours du temps **quantitativement**, le nombre d'ostéons dégradés (perte de l'architecture lamellaire) a été relevé pour chaque section de côte osseuse (tableau 11). Ainsi, il apparaît que la dégradation ostéonique est retrouvée dans tous les échantillons de DPM de 9 et 12 mois et semble débiter à 6 mois pour la majorité d'entre eux. A 12 mois *postmortem*, cette dégradation est plus marquée : elle est au moins plus de deux fois plus importante dans quasiment toutes les côtes quand on la compare au nombre d'ostéons dégradés à 9 mois post-mortem.

N° Sujet	Côte	Temps	Nb ostéons dégradés	N° Sujet	Côte	Temps	Nb ostéons dégradés
709	C4	T0	0	722	C4	T0	0
		T3	Coupe non exploitable			T3	0
		T6	0			T6	0
		T9	3			T9	3
		T12	5			T12	8
715	C4	T0	0	746	C4	T0	0
		T3	1			T3	2
		T6	1			T6	1
		T9	4			T9	5
		T12	8			T12	10
721	C4	T0	0	747	C4	T0	0
		T3	0			T3	0
		T6	1			T6	2
		T9	2			T9	5
		T12	5			T12	10

Tableau 11 : Dénombrement des ostéons dégradés en fonction des temps d'étude (exemple de la côte C4)

Qualitativement, l'étude de la biréfringence a montré une intensité forte à 0 mois *postmortem*, en diminution à 3 mois *postmortem*, puis à 6 et 9 mois, et enfin une disparition à 12 mois et *a fortiori* à 24 mois (tableau 12)

DPM en mois	0	3	6	9	12	24
Intensité de la biréfringence	++++	+++	++	+	-	-

Tableau 12 : Intensité de la biréfringence en lumière polarisée en fonction du délai *postmortem*

DISCUSSION

Notre travail, réalisé sur une période courte à l'échelle de l'anthropologie (2 ans), a permis de mettre en évidence une altération temporelle des différentes phases osseuses via : la **dessiccation** qui explique la diminution de **fraction aqueuse** ; la **diagénèse des fractions organiques et minérales**.

Cette diagénèse a été évaluée au moyen de deux méthodes – l'une moléculaire (microspectrométrie Raman) et l'autre morphologique (histologique) – et a pu identifier plusieurs tendances :

- *L'étude des paramètres physico-chimiques* en microspectrométrie Raman a montré une tendance temporelle à :
 - La diminution du ratio phase minérale/phase organique ;
 - La diminution de la carbonatation de la phase minérale ;
 - L'augmentation de la cristallinité ;

- *L'analyse statistique multivariée des spectres Raman* a permis :
 - De distinguer des groupes temporels en les discriminant via leurs contributions organiques ;
 - De construire l'ébauche d'un modèle statistique d'utilisation pratique ;

- *L'étude microscopique* des prélèvements a montré :
 - L'absence de toute attaque microbienne sur cette période *postmortem* de 2 ans ;
 - Un mécanisme d'altération organique collagénique de type hydrolyse chimique.

I. PERTE DE POIDS DE L'OS EN PÉRIODE *POSTMORTEM*

A. Dessiccation et perte de poids de l'os

Les différences les plus notables de ce travail, étaient liées à l'influence de l'environnement dans la perte de poids de l'os. Il est possible par nos résultats, de suggérer que plus le milieu est humide et froid, moins la perte de poids est rapide. Pour autant, cette perte de poids se fait à proportions égales (30 à 40% de perte) au bout de 10 jours quelque soit le milieu. Aucune autre variable entre les milieux ne différait étant donné le même mode de préparation des os, la même terre d'inhumation le cas échéant, et l'absence d'activité d'insectes observable. Les différences chronologiques observées sont donc bien celles liées à la température et à l'humidité, ce d'autant qu'à une faible profondeur d'inhumation (moins d'une trentaine de centimètres), comme cela était le cas dans notre travail, la littérature confirme que les fluctuations de ces deux paramètres sont comparables à celles survenant en surface de sol (Rodriguez et Bass, 1985). De plus, le pH neutre de la terre d'inhumation n'a que très peu influencé la taphonomie des os (Christensen et Myers, 2011).

Wieberg et Wescott dans un travail visant à identifier le caractère *antemortem*, *périmortem*, ou *postmortem* de fractures osseuses, ont réalisé une étude sur os porcins visant à mesurer la fraction humide de l'os (bone moisture content : BMC) en fonction du délai post mortem (Wieberg et Wescott, 2008). Leurs résultats montraient que le BMC diminuait très rapidement après le décès (et donc *a contrario*, la fraction sèche des os, augmentait énormément) jusqu'à 28 jours *postmortem*, après quoi le phénomène de déshydratation se poursuit mais à

une cinétique plus faible. Une forte corrélation était donc retrouvée dans ce travail entre BMC et délai *postmortem*. Ceci corrobore notre hypothèse et nos résultats, évoquant une perte de poids de l'os liée à la dessiccation, donc à la diminution du BMC. Wieberg et Wescott dans leur travail, montraient également que si la fraction sèche des os augmentait énormément durant le premier mois *postmortem*, elle se stabilisait à l'issue de cette période et n'augmentait ensuite que très faiblement jusqu'à au moins 5 mois *postmortem* et probablement plus longtemps. Notre étude a également permis de montrer que bien qu'une stabilisation de la perte de poids de l'os a lieu après une période précoce, la tendance se poursuit malgré tout vers une perte du poids certes très faible, mais progressive au long cours. Cette perte de poids est bien liée à une dessiccation et donc notamment à l'humidité de l'environnement qui influe sur le processus de déshydratation.

Des conditions climatiques chaudes et sèches sont plus favorables à la dessiccation, car elles retardent le processus de putréfaction (Rodriguez et Bass, 1985). Sur corps entier, la déshydratation corporelle débute sur les parties corporelles qui contiennent le moins de fluides, telles les extrémités puis, elle se poursuit sur les autres structures corporelles plus riches en fluides et donc en teneur aqueuse. Il est reconnu dans la littérature, qu'un corps peut – s'il est exposé à un climat chaud et sec – se momifier très rapidement en quelques semaines. Dans les zones climatiques tempérées cependant, la momification prend au minimum plusieurs mois (Sledzik et Micozzi, 1997). Si la momification est la résultante d'une déshydratation corporelle extrême du corps, notre travail a montré qu'il est également possible de parler de déshydratation de l'os. De plus,

en l'absence de tissus mous entourant les os (les parties molles des côtes utilisées dans ce travail étaient manuellement complètement reséquées), la dessiccation osseuse tend à survenir immédiatement après le décès et est favorisée par la chaleur et une faible teneur en humidité de l'air, telle qu'elle survient usuellement sur des tissus mous. La littérature confirme l'impact de l'humidité et d'une faible température sur le degré de préservation de restes humains (Manhein, 1997) (Rodriguez, 1997) (Carter *et al.*, 2010), surtout si l'inhumation corporelle est profonde (moins d'évaporation). Un corps inhumé en sol peu profond va donc au contraire s'orienter vers un processus de momification plus aisément. La perte de poids de l'os peut donc être entendue comme la résultante de cette dessiccation.

B. Autres facteurs influents sur la perte de poids de l'os

A notre connaissance, il n'existe pas de travaux similaires qui se soient penchés sur la perte de poids de l'os, bien qu'il existe de multiples études qui se soient intéressées à la perte de poids du corps en période *postmortem*. Carter *et al.*, ont étudié la perte de poids de rats immatures inhumées dans différents environnements, et ont mis en évidence que la perte de poids corporelle dépendait de la teneur en humidité de la tombe d'inhumation (Carter *et al.*, 2010). Leurs résultats montraient que la perte de poids corporelle en sols humides était plus importante que celle survenant en sols secs. Ils expliquaient ce phénomène via la prédominance des microorganismes aérobies en milieux humides, versus les microorganismes anaérobies qui prédominent en milieux secs et qui sont moins actifs dans la décomposition corporelle (Carter *et al.*,

2010) (Tumer *et al.*, 2013). Sur cette même thématique, Jagers et Rogers (Jagers et Rogers, 2009) ont étudié la perte de poids d'os porcins inhumés dans différents milieux. Ils ont établi sur 150 jours, que les os dans des sols à forte teneur en humidité perdaient significativement plus de poids que ceux situés dans des sols plus secs, ce qui va à l'encontre de nos constatations. Ils estimaient que cette perte devait être rattachée à un lessivage minéral avec échange d'ions entre l'os et les sols. Dans notre étude, la terre des côtes inhumées en environnement extérieur était contenue dans des bacs protégés des pluies et donc de l'imprégnation aqueuse. Par conséquent, la terre a progressivement séchée même si elle restée soumise à la teneur en humidité ambiante. Elle était donc très humide initialement et est devenue de moins en moins humide. Comme la perte de poids des côtes a été constatée très rapidement dans notre étude, il est possible de corroborer nos constatations avec les données des travaux sus cités. En effet, cette perte de poids a été rapide initialement, donc lorsque que la teneur en humidité de la terre était importante. Puis, à mesure que la terre séchait, la perte de poids fut moindre. Néanmoins, outre la teneur aqueuse du sol d'inhumation, notre travail a montré l'importance de l'humidité atmosphérique dans la perte de poids de l'os : les côtes placées en environnement intérieur était soumises à une humidité ambiante moindre que celles placées en environnement extérieur, et la perte de poids initiale y fut très rapide (notamment lorsqu'elles n'étaient pas inhumées). Il est donc possible de confirmer, outre l'importance de l'humidité d'un sol (et donc le rôle des microorganismes, le lessivage minéral, les échanges ioniques sols-os...), le rôle de l'humidité ambiante dans la perte de poids via la dessiccation.

Cependant, d'autres hypothèses que la dessiccation doivent être considérées pour expliquer la perte de poids osseuse. En effet, un os frais est en masse, composé d'approximativement 15% d'eau, 20% de matière organique et 65% de matière minérale. La diagenèse osseuse se produit à différentes échelles (moléculaires, biochimiques, histologiques...) qui sont elles-mêmes influencées par l'environnement de l'os. La dessiccation ne peut donc pas à elle seule, expliquer la diagenèse ou la perte de poids d'un os (qui n'est qu'un reflet macroscopique parmi d'autres de cette diagenèse), ce d'autant qu'à l'issue d'un certain laps de temps (environ 1 mois dans notre travail mais également dans la littérature (Wieberg et Wescott, 2008)), une perte de poids, bien que plus faible, se poursuit. Des altérations organiques et minérales surviennent donc concomitamment à la déshydratation et vraisemblablement plus durablement. Ces altérations organiques et minérales peuvent être évaluées par la microspectrométrie Raman (McLaughlin et Lednev, 2011) (Zimmerman *et al.*, 2015) (Doty *et al.*, 2016) et l'histomorphologie (Hedges, 2002).

II. LA SPECTROMETRIE RAMAN : APPORTS DANS L'EVALUATION DE LA DIAGENESE

Les résultats ont montré une diminution significative du ratio de phase minérale/phase organique, sur une période *postmortem* de 2 ans, qui peut s'expliquer mathématiquement de deux façons : soit par une baisse temporelle de la fraction minérale de l'os, soit par une augmentation temporelle de la fraction organique de l'os.

Si la première de ces hypothèses – bien qu'elle soit peu significative au regard de la précocité relative de la période *postmortem* (2 ans) – peut être évoquée, la seconde ne trouve pas de signification biologique recevable et d'autres mécanismes doivent être explorés pour expliquer ces évolutions quantitatives. Ces éléments seront discutés ci-après.

A. Diagénèse minérale mesurée en spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman étant une méthode de mesure dite qualitative voire, semi-quantitative, elle ne permet pas à elle seule d'évaluer quantitativement l'altération minérale temporelle de façon exhaustive. Pour ce faire, comme expliqué plus haut (cf. chap. Introduction) et pour exemple, l'index de préservation histologique, l'étude des modifications de porosités, ou la spectrométrie de masse... seront des méthodologies idoines (Hedges et Millard, 1995) (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000) (Trueman *et al.*, 2008) car elles sont dites quantitatives.

Néanmoins, les études de la cristallinité et de la carbonatation de la phase minérale qui peuvent être évaluées par spectrométrie infra-rouge (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000) (King *et al.*, 2011) (Hollund *et al.*, 2013) ou diffraction aux rayons X (Person *et al.*, 1995), peuvent aussi l'être en spectrométrie Raman, et permettent d'appréhender malgré tout objectivement, l'évolution de la diagénèse minérale d'un os. Ainsi, classiquement dans la littérature, la diagénèse osseuse minérale se caractérise selon ces paramètres par :

- une baisse de la carbonatation minérale ;
- une augmentation de la cristallinité.

Ces modifications indiquent que des phénomènes de dissolution et de recristallisation de l'os se produisent en période *postmortem*, mais ils sont habituellement décrits dans la littérature pour une temporalité de type « archéologique ». Dans une étude portant sur des restes fossiles du Pleistocène (2,5 millions d'années à 11 500 ans avant J-C) comparés à des os modernes animaux (cheval) et analysés en spectrométrie infra-rouge, les résultats montraient des taux de carbonatation minérale clairement abaissés et des valeurs de cristallinité augmentées pour les os archéologiques (Lebon *et al.*, 2011). Dans une autre étude archéologique réalisée cette fois en spectrométrie infra-rouge et en spectrométrie Raman, sur des côtes humaines issues d'un cimetière en Thaïlande (3050-2350 ans avant J-C), comparées à des os modernes issus d'un laboratoire d'anatomie (King *et al.*, 2011), des taux de carbonatation minérale abaissés et des valeurs de cristallinité augmentées sur les os les plus anciens étaient relevés. Les mêmes observations étaient faites en spectrométrie infra-rouge dans une étude sur os archéologiques comparés à des os récents

« médico-légaux » (Patonai *et al.*, 2013). Cette dernière étude montrait même une corrélation statistiquement significative entre taux de carbonatation et cristallinité.

Outre les phénomènes de dissolution et de recristallisation qui peuvent expliquer ces modifications de paramètres, certains auteurs soulèvent également que la modification de cristallinité peut être expliquée en période *postmortem*, par une substitution dans l'os du calcium (Ca) par d'autres ions plus ou moins lourds que le Ca, et notamment pour des os très anciens (Bertoluzza *et al.*, 1997) (Nagy *et al.*, 2008) (Lebon *et al.*, 2011) (Patonai *et al.*, 2013), par du fluor issu du sol (présence d'un épaulement de francolite dans le pic de phosphate), surtout lorsque les os sont en milieu humide. Cette substitution provoque une altération de la structure des cristaux d'hydroxyapatite sous la forme d'une recristallisation, qui se traduit par une augmentation de la cristallinité. Ceci est un des exemples d'incorporation de matériel exogène lors de la diagénèse (cf. Introduction).

Les modifications temporelles mesurées de cristallinité et de carbonatation minérale, bien que très faibles dans notre travail, ont été statistiquement significatives et concordent avec la littérature. Elles témoignent donc d'une altération certes modérée, mais significative de la phase minérale de l'os pour un intervalle *postmortem* que l'on peut qualifier de « précoce » (soit 2 ans dans notre travail). Cette altération minérale précoce permet d'expliquer en partie la diminution du ratio de phase minérale/phase organique que nous avons observée dans notre étude.

L'étude de cette diagénèse minérale trouve également un intérêt certain, étant donné que l'analyse de la phase minérale d'un os renseigne indirectement sur la phase organique. En effet, la matrice organique faite principalement de collagène de type I, est incorporée dans une matrice d'hydroxyapatite et l'analyse isolée d'une phase renseigne nécessairement sur l'autre. Ceci a parfaitement été démontré dans une étude de restes osseux archéologiques par spectrométrie infra-rouge (visant à mesurer la cristallinité) et par spectrométrie de masse ICPMS (visant à évaluer les quantités de phase organique persistantes dans l'os). Des corrélations linéaires statistiquement significatives étaient retrouvées entre diminution de la carbonatation et augmentation de la cristallinité, rejoignant nos résultats et ceux de la littérature (Patonai *et al.*, 2013). Surtout, des corrélations ont été mises en évidence entre diminution quantitative de fraction organique de l'os et augmentation de cristallinité (Trueman *et al.*, 2008). Ces processus sont bien interdépendants, et l'étude de la diagénèse d'une phase renseigne nécessairement sur la diagénèse de l'autre. L'étude des ratios de phases notamment par méthodes spectrométriques trouve ainsi toute sa justification (McLaughlin et Lednev, 2011) (France *et al.*, 2014).

B. Diagénèse organique mesurée en spectrométrie Raman

Outre les protéines non collagéniques et les lipides, c'est surtout la préservation et la dégradation du collagène dans l'os qui ont fait l'objet de travaux dans la littérature. En spectrométrie, l'étude de la diagénèse organique peut être faite au moyen de l'étude de l'intensité des bandes organiques (McLaughlin et Lednev, 2011) (Patonai *et al.*, 2013). Mais c'est surtout l'étude des

ratios de phase minérale/phase organique qui est prégnante, du fait du caractère semi-quantitatif de l'analyse spectrométrique et du fait de l'interdépendance de chaque phase par rapport à l'autre (cf. supra) (France *et al.*, 2014).

L'étude de ces ratios en spectrométrie infra-rouge a montré sur des os anciens des ratios beaucoup plus élevés que sur des os récents (Lebon *et al.*, 2011). De même, en spectrométrie Raman, dans un travail portant sur la comparaison d'os « modernes » animaux et archéologiques humains, France *et al.*, ont montré des valeurs de ratios d'intensités qui étaient d'autant plus bas que les os étaient « modernes », donc à collagène bien préservé (France *et al.*, 2014). De plus, les auteurs estimaient que visuellement, au contraire des pics collagéniques, les pics de phosphates ne montraient pas de modification temporelle. Ces éléments ont également été retrouvés dans une étude en spectrométrie Raman réalisée sur os animaux (dindes) analysés en période *postmortem* précoce (2 mois) (McLaughlin et Lednev, 2011).

Plusieurs paramètres peuvent être choisis dans une volonté d'évaluation de la diagénèse organique via la spectrométrie Raman. Mais, plus que l'étude des intensités de bandes Raman, les ratios permettent une évaluation plus adaptée. Le ratio le plus représentatif présenté dans l'étude de France *et al.*, était celui intéressant les bandes $960\text{cm}^{-1}/1636\text{cm}^{-1}$ (ν_1 du phosphate/Amide I) (France *et al.*, 2014). Les auteurs estimaient que cette évaluation permettait d'obtenir une information fiable sur la fragmentation du collagène dans le temps (Tuross *et al.*, 1989). A la différence de ces travaux, notre étude a montré des modifications de ratios de phase minérale/phase organique, surtout en relation avec des rapports de bandes relatives à l'hydroxyproline et la proline, mais aussi au $\delta(\text{CH}_2)$ du collagène qui a montré son intérêt dans l'étude de la qualité du collagène sur

restes osseux archéologiques (Pestle *et al.*, 2014). En outre, ces études (McLaughlin et Lednev, 2011) (France *et al.*, 2014) qui pointaient la diminution temporelle d'intensité des pics d'amides, montraient aussi une baisse d'intensité de la région C-H (2810-2040 cm^{-1}) qu'ils attribuaient à une fragmentation collagénique en relation avec l'action enzymatique de collagénases bactériennes. Ces dernières ont pour mécanisme d'action principal la dégradation des liaisons amides. Ceci n'a pas été retrouvé dans notre travail : les rapports de bandes intéressant les liaisons de type amide I ou III n'ont pas montré les modifications temporelles les plus significatives, et la région C-H (2810-2040 cm^{-1}) n'a pas été étudiée dans la fenêtre spectrale choisie en raison de la difficulté posée par cette zone d'intérêt dans l'étude de la qualité du collagène (Frushour et Koenig, 1975) (France *et al.*, 2014).

De plus, dans ces études montrant une altération collagénique temporelle, d'autres mesures effectuées sur les mêmes os en d'autres localisations montraient à l'inverse, une préservation collagénique temporelle, sous-tendant des hétérogénéités de diagénèse au sein du même os et potentiellement des altérations organiques à mécanismes plus complexes et variables (Lebon *et al.*, 2011) (France *et al.*, 2014). Ainsi, au regard des ces interrogations et de certaines contradictions avec nos données obtenues sur os humains non archéologiques, notre travail pose la question de l'action des collagénases bactériennes sur des os humains dans la période *postmortem* précoce qui est le mécanisme le plus décrit. Plus généralement, notre étude rentre bien dans le cadre de la détermination du mode de dégradation collagénique précoce qui est une voie de recherche actuelle en développement (Turner-Walker, 2011).

III. CARACTERISATION DE LA DIAGENESE ORGANIQUE : L'ALTERATION COLLAGENIQUE *POSTMORTEM* PRECOCE

A l'inverse des études en spectrométrie Raman précitées (McLaughlin et Lednev, 2011) (France *et al.*, 2014), notre travail a montré une diminution du ratio de phase minérale/phase organique. Comme évoqué plus haut, cette diminution de ratio implique mathématiquement une diminution du numérateur et/ou une augmentation du dénominateur. S'agissant de la diagénèse minérale (numérateur), celle-ci a été objectivée par la baisse du taux de carbonatation et par l'augmentation de la cristallinité, dont les évolutions ont été statistiquement significatives, bien qu'elles aient été quantitativement faibles. S'agissant de la diagénèse organique (dénominateur), l'analyse visuelle des spectres n'a pas montré de réelles augmentations d'intensités quantitatives des bandes organiques. Comme attendu, il ne peut exister d'augmentation quantitative de la phase organique osseuse en période *postmortem* qui permettrait d'expliquer la baisse temporelle de ces ratios de phases. Cependant, qualitativement, la phase organique a subi une diagénèse *postmortem* qui a été objectivée par l'analyse multi variée des spectres qui montrait des séparations de groupes temporels sur des contributions organiques.

Nous posons donc l'hypothèse que la baisse des ratios de phase minérale/phase organique peut être liée au mode de dégradation de la phase organique de l'os. En effet, comme présenté plus haut (cf. Chap Introduction), l'altération diagénétique du collagène dans la phase organique a été très étudiée et deux mécanismes distincts permettant de l'expliquer existent dans la littérature (Nielsen-Marsh et Hedges, 2000) (Collins *et al.*, 1995) (Collins *et al.*, 2002) :

- Des attaques microbiennes créant des phénomènes de tunnelling dans l'os ;
- Un mécanisme d'hydrolyse chimique ou peptide bond hydrolysis (passage d'un collagène insoluble à un collagène soluble et gélatineux) permettant à l'os de maintenir sa structure malgré une altération protéinique.

A. Mécanisme d'altération du collagène via des attaques microbiennes

1. Altération collagénique microbienne et spectrométrie Raman

Comme expliqué dans le travail de France *et al.*, (France *et al.*, 2014), l'altération organique de l'os peut être évaluée en partie par la spectrométrie Raman, et cela a été parfaitement démontré sur des os anciens à temporalité archéologique où d'une part, les ratios de phase minérale/phase organique montraient une augmentation temporelle (particulièrement celui ν_1 du phosphate/Amide I), et d'autre part, l'intensité des pics d'amides était réduite à mesure de la diagénèse, réduction qu'ils attribuaient à une fragmentation collagénique en relation avec l'action enzymatique de collagénases bactériennes qui ont pour mécanisme d'action principal la dégradation des liaisons amides. A contrario, notre travail effectué sur des os « modernes » non archéologiques n'a ni montré une réduction d'intensités des bandes spectrales organiques, ni une augmentation des ratios de phase minérale/phase organique, mais à l'inverse, une diminution. Cette diminution observée dans notre étude n'a à notre connaissance pas été retrouvée dans la littérature. Cependant, McLaughlin et Lednev ont montré sur des fémurs de

dindes étudiés en spectrométrie Raman (McLaughlin et Lednev, 2011), s'agissant de leurs premières mesures temporelles après inhumation de 12 jours, une augmentation d'intensités (par rapport aux premières mesures effectuées avant inhumation) des bandes organiques Raman notamment assignés au $\delta(\text{CH}_2)$ collagène. Cette constatation se réduisait à l'issue de leur protocole d'analyse sur 68 jours pour montrer des intensités de bandes organiques moindres que celles mesurées avant inhumation.

Une explication à ce phénomène de « renforcement » des quantités organiques de l'os en période *postmortem*, est trouvée dans les travaux de Nielsen-Marsh *et al*, via la théorie dite de « l'exclusion enzymatique » (figure 25) (Nielsen-Marsh *et al*, 2000). Celle ci se fonde sur le fait que le collagène minéralisé est physiquement protégé de l'action enzymatique microbienne par les cristaux d'hydroxyapatite. Ainsi, les collagénases bactériennes trop larges, ne peuvent pénétrer les liaisons chimiques. Une altération partielle de la phase minérale de l'os par dissolution notamment, peut initialement « exposer » le collagène et le rendre accessible à une méthode de mesure alors qu'il était auparavant masqué par la matrice d'hydroxyapatite. Ceci permet dans un laps de temps « court », comme ce fut le cas dans notre travail, d'expliquer ce phénomène de diminution des ratios de phase minérale/phase organique et l'artificielle augmentation semi-quantitative de la phase organique de l'os qui a été aussi mise en évidence par McLaughlin et Lednev (McLaughlin et Lednev, 2011).

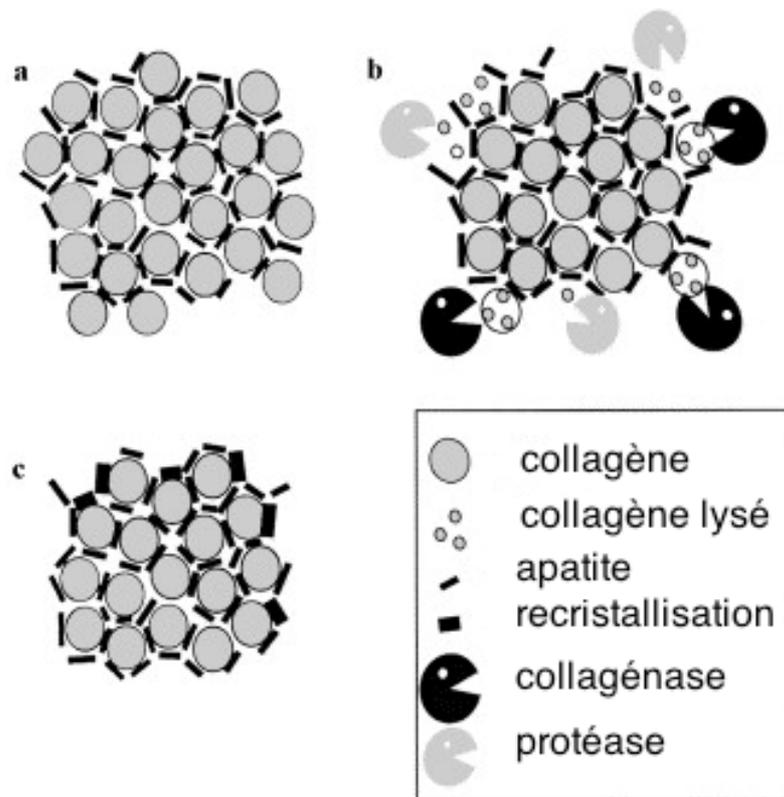


Figure 25 : Théorie de l'exclusion enzymatique (adapté de Nielsen-Marsh *et al.*, 2000)

Dans cette théorie, ce sont surtout les parties collagéniques non minéralisées qui font l'objet d'altérations bactériologiques précoces. Cependant, dans notre travail, ces parties collagéniques non minéralisées, étaient *de facto*, en quantité mineure car éliminées en partie par notre technique de préparation des échantillons (séparation des parties molles) et du fait de l'âge des sujets de l'étude : le collagène non minéralisé se situe dans les parties périphériques de l'os en remodelage. De plus, l'hydroxyapatite d'autant plus qu'elle subira des phénomènes de recristallisation, protégera complètement le collagène minéralisé qui ne pourra qu'être chimiquement modifié et ne sera pas accessible aux collagénases bactériennes.

2. *Altération collagénique microbienne en histomorphologie*

a) Détérioration histologique architecturale tunnellaire

Dans notre travail, l'étude histomorphologique des prélèvements n'a montré aucun signe objectif d'attaques bactériennes osseuses telles qu'identifiées par l'index de préservation histologique (Hedges et Millard, 1995). Ces signes décrits initialement par Wedl en 1864 (Wedl, 1864), étaient mis en relation avec des microorganismes provenant de l'environnement, colonisant l'os sous la forme de tunnels (ou canaux de forage dits de Wedl). Ils ont été détaillés ensuite par Hackett (Hackett, 1981) et dénommés destructions focales microscopiques (MFD). Dans son travail en microscopie réalisé sur 170 os humains archéologiques (os longs), 113 montraient ces tunnels. Des blocs non décalcifiés étaient inclus dans du méthyl méthacrylate et des coupes de 30 μ m étaient colorées au Masson trichrome, et examinées en lumière conventionnelle et polarisée. 4 types individualisables de ces tunnels étaient mis en évidence (figures 26 et 27) :

- **les tunnels de Wedl**, de diamètre relativement uniforme, mesurant de 5 à 10 μ m. Ils traversent toujours l'os cortical sur des trajets irréguliers non linéaires qui se subdivisent. Leurs contours sont bien délimités, ils sont la plupart du temps vides de contenu mais contiennent parfois des corps sphériques qui mesurent environ la moitié du diamètre des tunnels. Ils ont été attribués à

des attaques fongiques où les corps sphériques parfois présents dans les lumières sont des spores ;

- **les tunnels linéaires ou longitudinaux**, mesurant de 5 à 10 μ m. Ils sont souvent vides. Des dilatations sont observées en coupes sous la forme de lacunes pouvant mesurer jusque 50 μ m ;
- **les tunnels en bourgeons**, qui longent les canaux ostéoniques et donc occupent les ostéons. Ils mesurent environ 30 μ m et apparaissent de formes irrégulières en coupes ;
- **les tunnels en lamelles**, qui sont arrondis et mesurent de 10 à 250 μ m.

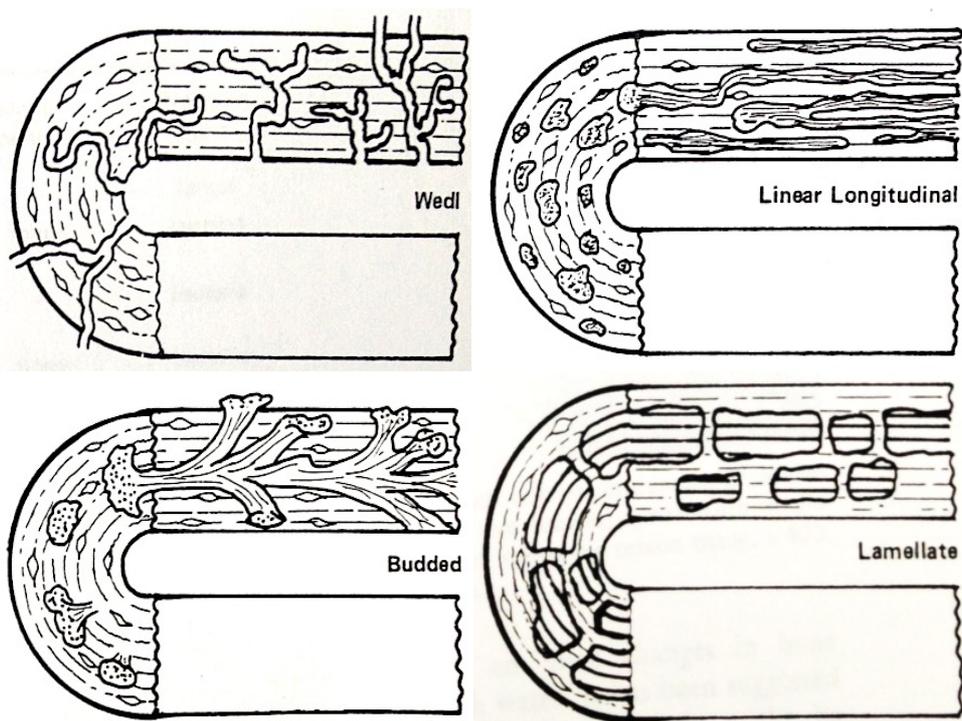


Figure 26 : Schématisation des types de tunnels individualisables dans l'os (issu de Hackett, 1981)

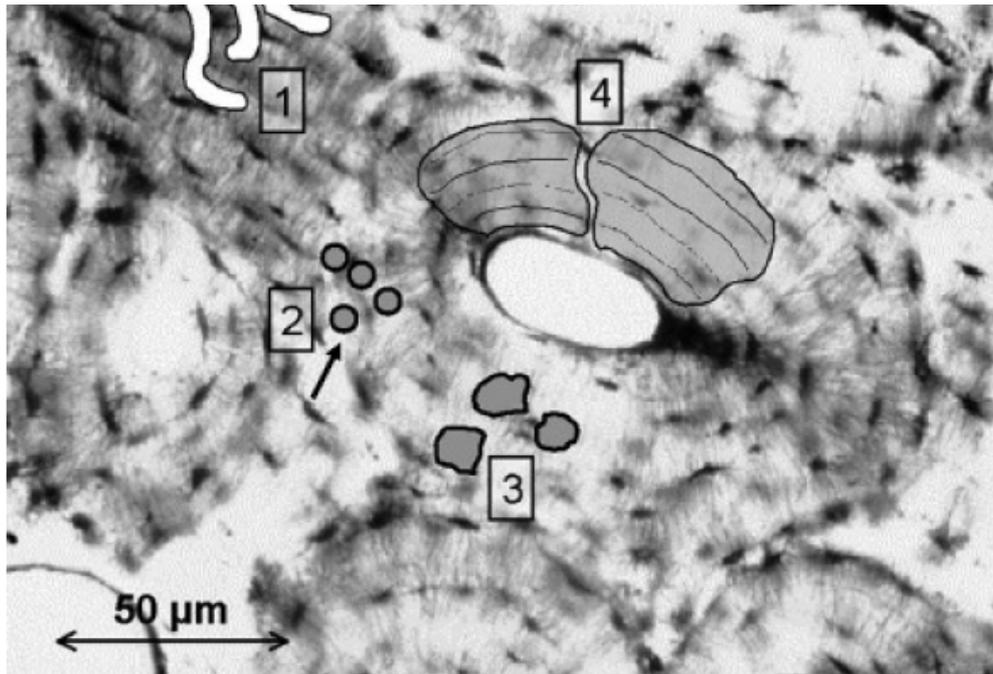


Figure 27 : Types de tunnels individualisables dans l'os en coupe transversale : 1 (tunnels de Wedl) ; 2 (tunnels linéaires) ; 3 (tunnels en bourgeons) ; 4 (tunnels en lamelles). Issu de Jans *et al.*, 2004

Ces tunnels ont été décrits uniquement sur des zones tissulaires contenant du collagène. Ainsi, pour exemple, dans l'émail dentaire, ces tunnels ne sont pas retrouvés, au contraire de la dentine (Bell et Elkerton, 2008).

Pour confirmer le rôle de microorganismes dans la genèse de ces tunnels, Hackett a enterré des os dits « stérilisés » dans de la terre, et gardés en milieu intérieur pendant un an. Celui ci a montré la présence de dépôts mycotiques, mais aucun tunnel de type Wedl. Seules certaines pièces osseuses sur cette période de 1 an ont montré les 3 autres types de tunnels, sans que ceci ne soit systématiquement observé – ce qui est concordant avec notre travail – et l'hypothèse proposée était celle d'une activité bactérienne d'origine environnementale par la terre d'inhumation.

Il confirmait cette hypothèse en précisant que les os ne montraient une atteinte tunnellaire que sur leur partie la plus externe et, le long des canaux de Havers. Dans une étude sur 233 os humains anciens archéologiques, Jan *et al.*, montraient la présence de ces tunnels (ou MFD) d'origine bactérienne dans 74% de leurs échantillons (Jans *et al.*, 2004). Ils ne relevaient pas de gradient d'altération entre les parties externes et internes de l'os mais estimaient que les attaques bactériennes se produisaient via les pores osseux naturels, donc majoritairement via les canaux de Havers. Ainsi, leurs observations permettaient de conclure que tant les bactéries endogènes (liées à la décomposition putréfactive) qu'exogènes (liés à l'environnement), pouvaient être responsables de ces altérations osseuses. Selon leurs conclusions, l'absence de parties molles sur les os – qui peut être liée à des températures extrêmes responsables d'une momification rapide, voire à des actions externes comme les démembrements (via l'action d'animaux prédateurs ou par un agresseur) – peuvent expliquer parfois l'absence d'attaque bactérienne osseuse, en l'absence de bactéries endogènes. Ces observations ont également été faites sur une étude histologique animale lors de laquelle une coloration par rouge Picro-Sirius, soulignant les protéines collagéniques, montrait ne dégradation précoce en zone périostée et endostée évoquant le rôle de bactéries issues des tissus mous attachés à l'os et via la graisse médullaire en décomposition (Boaks, *et al.*, 2014). Ceci permet d'expliquer en partie l'absence d'attaque bactérienne observée dans notre travail, étant donné la dessiccation osseuse observée très précocement (cf Chap. Discussion : perte de poids de l'os) et la séparation des parties molles lors de la

préparation des échantillons (cf Chap. Matériels et Méthodes). Néanmoins, cette question de l'action des bactéries endogènes dans la création d'altérations osseuses reste controversée (Nielsen-Marsh *et al.*, 2007) : des travaux rapportent des tunnels bactériens qui n'apparaissent qu'une fois le stade de squelettisation atteint, ce qui suggère une origine bactérienne exogène (Yoshino *et al.*, 1991), alors que d'autres en observent à quelques mois *postmortem* et évoquent une origine endogène (Bell *et al.*, 1996) (White et Booth, 2014). Ces travaux confirment tous néanmoins, alors que les tunnels de Wedl sont liés vraisemblablement à une activité fongique, que les tunnels linéaires, en bourgeons et lamellaires, ont une origine bactérienne avec pour mode d'action une altération enzymatique du collagène (Child, 1995) (Child *et al.*, 1993).

b) Modification histologique architecturale non tunnellaire

Outre l'index de préservation histologique classiquement décrit où ces tunnels sont individualisés en coupes sous formes de lacunes (Hedges et Millard, 1995), un autre index de préservation histologique a été défini sur coupes fines (de l'ordre de 30 μm) par Garland *et al.*, et adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques identifiables (Garland *et al.*, 1988) (Jans *et al.*, 2002) (cf. Chap Introduction). Notre travail histomorphologique n'ayant pas mis en évidence les lacunes (ou tunnels ou MFD) définies par Hedges et Millard (donc absence d'altérations de types bactériennes), ces autres modifications osseuses diagénétiques mesurables selon les travaux de Garland et Jans ont été explorées. Ainsi,

deux de ces modifications histologiques ont été recherchées dans notre travail : l'une **qualitative** via la modification de l'intensité de biréfringence, et l'autre **quantitative** par la comptabilisation de microfissures :

- Quand des sections osseuses sont examinées en lumière polarisée, un patron de biréfringence peut être identifié et se présente sous la forme d'une alternance de bandes lumineuses brillantes et de bandes sombres. Pour l'architecture lamellaire des ostéons, ce patron s'exprime par un aspect en croix de Malte. L'intensité de la biréfringence est notamment dépendante de la quantité et de l'orientation des fibres de collagène. Une réduction de cette intensité (voire une absence) peut s'interpréter comme liée à la détérioration du collagène (Giraud-Guille, 1988). Dans notre travail, cette biréfringence était visible lors des premières coupes à 0 mois *postmortem*, elle se réduisait à 3, 6 et 9 mois, pour complètement disparaître à 12 mois et donc *a fortiori* à 24 mois. Cette disparition de la biréfringence montre donc une dégradation du collagène sur cet intervalle *postmortem* « court », sans signe d'altération bactérienne de l'os.
- La quantification des microfissures est établie le plus souvent, selon une unité structurelle formée par un ostéon. Dans notre travail, nous avons dénombré les ostéons altérés (cf. Chap. Résultats) et montré qu'à partir de 6 mois, systématiquement sur chaque échantillon, des dégradations étaient présentes et qu'elles étaient quantitativement

plus nombreuses à 9 mois, puis à 12 mois et enfin à 24 mois. Bien que nous n'ayons pas visuellement observé ces microfissures, la désorganisation architecturale lamellaire osseuse a été particulièrement mise en évidence sur nos échantillons au pourtour des canaux de Havers jusque 12 mois *postmortem*, puis s'est associée une désorganisation de la zone corticale la plus externe. Ceci confirme les données de la littérature s'agissant d'études osseuse prospectives sur de courtes périodes *postmortem*. L'étude de Peretzschner montrait d'ailleurs qu'aucune microfissure n'était expérimentalement produite sur l'os interstitiel (Peretzschner, 2006). Elles peuvent être temporellement longues à observer en microscopie et c'est ce qui semble être le cas dans notre travail alors qu'elles expliqueraient parfaitement la perte de l'architecture lamellaire que nous visualisons. Ces microfissures sont attribuées dans la littérature (Jans *et al*, 2002) aux altérations diagénétiques organo-minérales de l'os, et plus particulièrement au gonflement provoqué par une gélatinisation du collagène (altération collagénique responsable d'une augmentation de sa solubilité) (Peretzschner, 2006). La coloration pratiquée secondairement à l'aide du rouge Picro-Sirius (absence de fixation sur ces zones altérées) a permis d'attribuer cette altération à une dégradation collagénique de type hydrolyse chimique en raison de l'affinité de ce colorant aux acides aminés Lysine, Hydroxylysine et Arginine. L'hypothèse que ces microfissures responsables de la perte de l'architecture osseuse lamellaire soient rattachées à une dégradation organique de type chimique est donc vraisemblable.

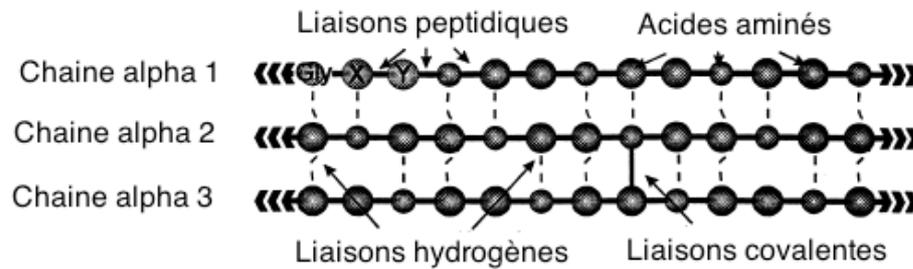
B. Mécanisme d'altération du collagène par hydrolyse chimique

L'étude de la dépolymérisation du collagène non minéralisé par hydrolyse chimique est bien connue en médecine, notamment via les travaux sur les polymères et matériau visant à traiter des pathologies cutanées, musculaires, vasculaires (Rudakova et Zaikov, 1987). Cette hydrolyse est également existante s'agissant du collagène minéralisé dans l'os. Deux processus s'associent pour cette hydrolyse : une dépolymérisation des liaisons peptidiques ; une dissolution de ces fragments polypeptidiques maintenus par des ponts hydrogènes (Collins *et al.*, 1995). La configuration en triple hélice du collagène est caractérisée par la répétition d'un triplet Gly-X-Y où X peut être un autre acide aminé mais est habituellement une proline et Y une hydroxyproline. La glycine représente donc un tiers des acides aminés du collagène, les prolines représentent 10 %, et l'hydroxylysine avec l'hydroxyproline représentent 21 % à elles deux. Les autres acides aminés sont majoritairement de l'arginine, de la lysine (cf Chap. Introduction). Il n'existe que très peu de liaisons hydrogènes intra-chaines, mais les nombreuses liaisons hydrogènes inter-chaines permettent la stabilisation du collagène.

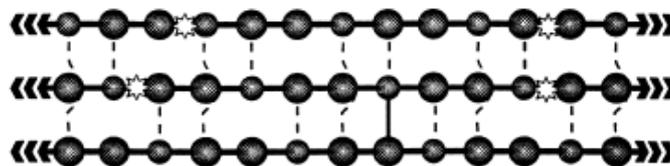
Dans l'os, le collagène minéralisé peut donc être altéré par un clivage hydrolytique dépendant de la température et du pH de l'environnement selon 3 étapes (Collins *et al.*, 1995) (figure 28) :

- étape 1 : clivage hydrolytique des liaisons peptidiques intra-chaines ;
- étape 2 : clivage des liaisons hydrogènes inter-chaines ;
- étape 3 : dissolution des chaînes fragmentées (collagène soluble, gélatinisé).

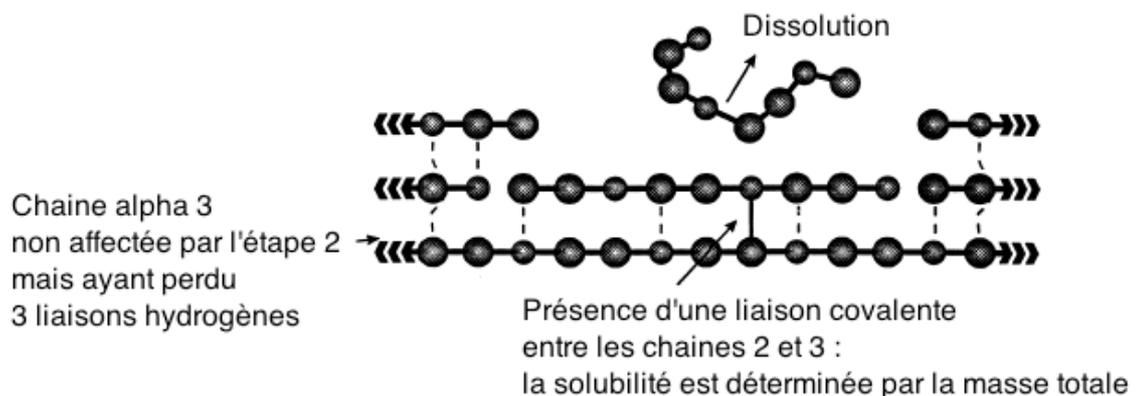
Étape 1 : hydrolyse des liaisons peptidiques



Étape 2 : Fragments avec moins de 7 liaisons hydrogènes persistantes



Étape 3 : Fragments de moins de 120 résidus persistants

Figure 28 : Modèle du clivage hydrolytique du collagène. Adapté de Collins *et al.*, 1995

Collins *et al.*, dans une étude visant à simuler mathématiquement la dégradation chimique du collagène, montraient que l'hydrolyse chimique était à l'origine de biais de mesures étant donné l'augmentation du nombre de fragments et donc de l'augmentation des taux de racémisation des acides aminés (Collins *et al.*, 1995). Dans notre étude en microspectrométrie Raman, outre la théorie de « l'exclusion enzymatique » qui permet d'expliquer en partie la

diminution des ratios de phase minérale/phase organique mesurés, l'hydrolyse chimique représente également une hypothèse valable. En effet, le clivage des liaisons provoque la libération de nombreux fragments de petite taille contenant de la proline et de l'hydroxyproline. Ainsi la méthodologie de mesure spectrométrique peut être biaisée par cette fausse augmentation des chaînes de collagène et explique la contribution de ces acides aminés proline et hydroxyproline dans la diminution observée des ratios, alors qu'au contraire, il s'agit bien d'une dégradation collagénique. De même, comme expliqué par Pfitzschner, dans une étude sur fémurs bovins analysés prospectivement (délai *postmortem* de 50 jours), une dégradation chimique du collagène sur ce laps de temps peut survenir. Or, l'hydrolyse chimique ne provoque pas de perte immédiate des fragments collagéniques du fait de leurs poids moléculaires (Pfitzschner, 2006). Ce collagène altéré reste présent dans l'os et ne sera éliminé que dans un laps de temps beaucoup plus long.

En l'absence de signe d'altérations bactériennes dans notre travail, ceci permet donc d'expliquer en partie, la baisse temporelle des ratios de phase minérale/phase organique mesurés en spectrométrie Raman. La multiplication via l'hydrolyse chimique de fragments collagéniques altérés, provoque une « fausse » augmentation de la phase organique, et donc du dénominateur dans les ratios.

L'environnement joue un rôle important dans cette hydrolyse chimique (Turner-Walker, 2011). D'une part, **le pH du sol**, qu'il soit très acide ou très basique accélèrera cette modification chimique. Collins *et al.*, estimaient qu'un pH compris entre 2 et 7 augmentait considérablement le mécanisme. De même un

pH passant de 7 à 10 augmente le phénomène hydrolytique d'un facteur 10 (Collins *et al.*, 1995). Dans notre travail l'environnement était neutre avec un pH très proche de 7, ce qui explique que l'hydrolyse, bien que présente, n'ait été mise en évidence qu'après plusieurs mois, alors même qu'expérimentalement en augmentant le pH d'un environnement à 14 sur 5-6 heures (Peretschner, 2006), des microfissures apparaissent et sont les témoins de cette hydrolyse collagénique (cf. supra). D'autre part, un **environnement sec** sera également un facteur limitant l'hydrolyse. L'Arginine et la Lysine sont les deux acides aminés les plus hydrophiles. Ainsi les chaînes fragmentées les contenant seront d'autant plus rapidement dissoutes. Ceci confirme l'apport de la coloration au rouge Picro-Sirius comme un marqueur de l'hydrolyse chimique, car il se fixe spécifiquement à ces acides aminés. Par cette méthodologie, l'hydrolyse chimique n'a été observée qu'au pourtour des canaux de Havers initialement et n'était pas étendue. Cette limitation trouve son explication dans le phénomène de dessiccation, car en effet, la déshydratation provoque l'augmentation des interactions hydrophobes en renforçant les liaisons intra-chaînes du collagène (Collins *et al.*, 1995). Notre travail qui a mis en évidence cette dessiccation osseuse rapide permet d'expliquer que l'environnement a limité initialement l'extension de l'hydrolyse. Ces paramètres limitants de l'environnement n'ont vraisemblablement cependant pas inhibé complètement la création de fissures, même si elles étaient non visibles microscopiquement. La désorganisation du système haversien au pourtour des ostéons secondaires et en périphérie de l'os cortical est un argument évoquant une telle altération. Leurs mises en évidence par des ruptures osseuses marquées et étendues est donc un phénomène à long

terme qui pourra prendre plusieurs années voire dizaines d'années, comme évoqué dans la littérature (Peretschner, 2006).

C. Synthèse : identification d'une trajectoire diagénétique *postmortem* précoce

Notre travail permet donc d'affirmer que des échantillons osseux humains étudiés en environnement contrôlé, et analysés pendant 24 mois, subissent une trajectoire diagénétique évoluant au 2^{ème} stade défini par la littérature (Hedges, 2002) (Turner-Walker *et al.*, 2002) (Smith *et al.*, 2007) (Nielsen-Marsh *et al.*, 2007), à savoir celle qualifiée de « accelerated collagen hydrolysis », dans laquelle la cristallinité augmente, la carbonatation reste stable ou en très légère baisse (ce qui a été relevé en microspectrométrie Raman) et, l'index histologique d'Oxford classiquement décrit reste élevé (Hedges et Millard, 1995) (cf Chap. Introduction).

Ces éléments indiquent que la dégradation organique observée dans notre étude n'était pas provoquée par des bactéries, mais plutôt en rapport avec une hydrolyse chimique. C'est cette hypothèse qui représente une voie de recherche à poursuivre sur une temporalité dite « médico-légale » en cas de découverte d'ossements.

CONCLUSION

Notre travail nous a permis de mettre en exergue à quel point l'évaluation de la diagénèse est multi factorielle. Cette approche a été fortement développée en anthropologie archéologique est peut être résumée schématiquement (figure 29).

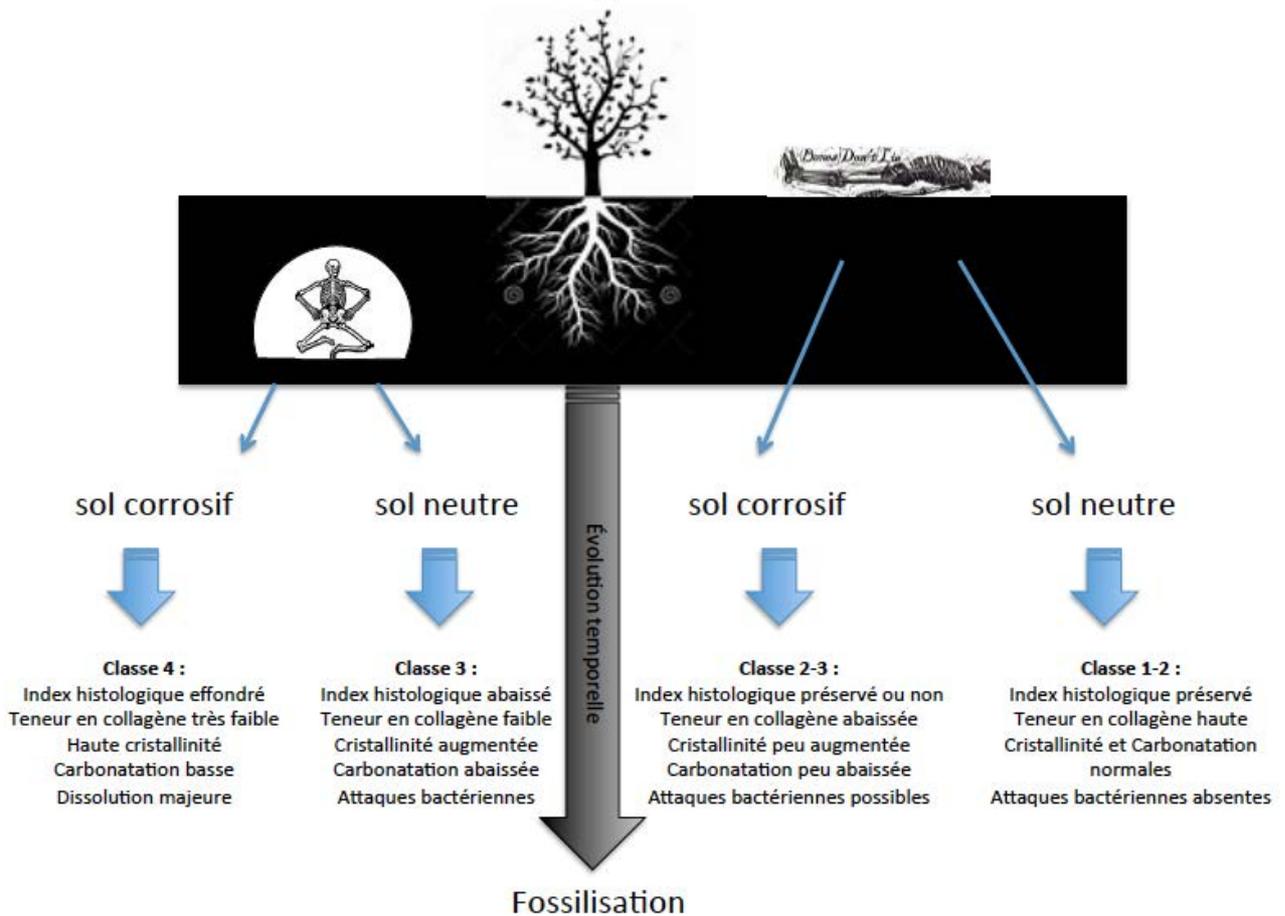


Figure 29 : Trajectoires diagénétiques. Adapté de (Smith *et al.*, 2007) (Nielsen-Marsh *et al.*, 2007). Notre étude a porté sur un sol neutre et a relevé des échantillons ayant subi une diagénèse de classe 2

Notre travail, a permis de montrer que l'anthropologie médico-légale s'inscrit dans cette démarche schématique, et il a été possible d'identifier 3 paramètres fondamentaux du vieillissement osseux qui doivent être connus du praticien qualifié en anthropologie médico-légale, et cela même sur une période d'étude de 2 ans « courte » à l'échelle de l'anthropologie :

- **L'environnement** influence fortement la diagénèse osseuse et doit être aussi bien étudié que l'os en lui-même. En effet, l'environnement choisi pour cette étude était tempéré et le sol neutre, et pourtant, l'étude de critères macroscopiques et notamment l'étude de la perte de poids de l'os, a montré une altération de composition osseuse très précoce avec phénomène de dessiccation osseuse, comparable à la déshydratation globale du corps en période *postmortem* ;
- **La diagénèse osseuse est un phénomène global** dans lequel les différentes altérations de phases minérales et organiques sont interdépendantes et peuvent être appréciées par la microspectrométrie Raman, qui outre son apport dans l'analyse de la dégradation chimique de l'os, permet par les outils statistiques qui y sont associés, d'identifier des classes temporelles de diagénèses. Ces classes, qui devront faire l'objet d'études plus longues, sur plus de sujets et dans des milieux d'environnement différents, pourraient à terme être une aide pratique et servir de référence dans la datation précise d'un os retrouvé après une « courte » période *postmortem* ;
- **L'altération organique de l'os** peut s'opérer selon des modes de dégradations chimiques ou bactériens en fonction de l'environnement et du délai *postmortem*. L'histologie peut permettre de faire ce distinguo. Sur ce délai d'étude, la dégradation collagénique de type chimique par hydrolyse est prédominante.

L'identification par le praticien qualifié en anthropologie médico-légale de ces 3 paramètres est donc fondamentale. Ils forment une unité structurelle indissociable qui est connue de longue date en anthropologie archéologique, mais qui est parfaitement

transposable en pratique médico-légale si des méthodologies adaptées sont développées. Ce développement est un enjeu scientifique considérable pour l'avenir et les voies de recherche en taphonomie à ce sujet ont un rôle essentiel à jouer pour que la médecine légale puisse répondre aux légitimes demandes exprimées par les victimes et leurs ayants-droits auprès de la justice.

REFERENCES

- Adlam, R. E., & Simmons, T. (2007). The effect of repeated physical disturbance on soft tissue decomposition—are taphonomic studies an accurate reflection of decomposition?. *Journal of forensic sciences*, 52(5), 1007-1014.
- Awonusi, A., Morris, M. D., & Tecklenburg, M. M. (2007). Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcified tissue international*, 81(1), 46-52.
- Bartsiokas, A., & Middleton, A. P. (1992). Characterization and dating of recent and fossil bone by X-ray diffraction. *Journal of Archaeological Science*, 19(1), 63-72.
- Bell, L. S. (1990). Palaeopathology and diagenesis: an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging. *Journal of Archaeological Science*, 17(1), 85-102.
- Bell, L. S., Skinner, M. F., & Jones, S. J. (1996). The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Science International*, 82(2), 129-140.
- Bell, L. S., & Elkerton, A. (2008). Unique marine taphonomy in human skeletal material recovered from the medieval warship Mary Rose. *International Journal of Osteoarchaeology*, 18(5), 523-535.
- Berg, S., & Specht, W. (1958). Studies in determination of length of time of burial of skeletal parts. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, 47(2), 209.
- Berg S (1963) The determination of bone age. In F Lundquist (ed.): *Methods of forensic Science*. New York : Wiley and Sons, 251-3
- Bertoluzza, A., Brasili, P., Castri, L., Facchini, F., Fagnano, C., & Tinti, A. (1997). Preliminary results in dating human skeletal remains by Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy*, 28(2-3), 185-188.
- Boaks, A., Siwek, D., & Mortazavi, F. (2014). The temporal degradation of bone collagen: A histochemical approach. *Forensic science international*, 240, 104-110.
- Bonucci, E. (2000). Mechanical testing of the bone and the bone-implant interface. *Basic Composition and Structure of Bone*. CRC Press, Boca Raton, FL, 3-22.
- Burket, J., Gourion-Arsiquaud, S., Havill, L. M., Baker, S. P., Boskey, A. L., & Van der Meulen, M. C. (2011). Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. *Journal of biomechanics*, 44(2), 277-284.
- Cambra-Moo, O., Meneses, C. N., Barbero, M. Á. R., Gil, O. G., Pérez, J. R., Rello-Varona, S., ... & Martín, A. G. (2012). Mapping human long bone compartmentalisation during ontogeny: A new methodological approach. *Journal of structural biology*, 178(3), 338-349.
- Carden, A., & Morris, M. D. (2000). Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of biomedical optics*, 5(3), 259-268.
- Carter, D. O., Yellowlees, D., & Tibbett, M. (2010). Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil. *Forensic science international*, 200(1), 60-66.
- Carter, D. R., & Hayes, W. C. (1977). The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 59(7), 954-962.
- Castellano, M. A., Villanueva, E. C., & von Frenckel, R. (1984). Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of Forensic Science*, 29(2), 527-534.
- Chappard, D., Baslé, M. F., Legrand, E., & Audran, M. (2011). New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporosis International*, 22(8), 2225-2240.

- Child, A. M., Gillard, R. D., & Pollard, A. M. (1993). Microbially-induced promotion of amino acid racemization in bone: isolation of the microorganisms and the detection of their enzymes. *Journal of Archaeological Science*, 20(2), 159-168.
- Child, A. M. (1995). Towards an understanding of the microbial decomposition of archaeological bone in the burial environment. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 165-174.
- Christensen, A. M., & Myers, S. W. (2011). Macroscopic observations of the effects of varying fresh water pH on bone. *Journal of forensic sciences*, 56(2), 475-479.
- Collins, M. J., Riley, M. S., Child, A. M., & Turner-Walker, G. (1995). A basic mathematical simulation of the chemical degradation of ancient collagen. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 175-183.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., ... & Turner-Walker, G. (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- Damon, P. E., Lerman, J. C., & Long, A. (1978). Temporal fluctuations of atmospheric ^{14}C : causal factors and implications. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 6, 457.
- Delannoy Y., Colard T. Anthropologie medico-légale. In: Charabidze D, Gosselin M. Insectes, cadavres et scènes de crime. De Boek: Louvain, 2014;233-43
- Dent, B. B., Forbes, S. L., & Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, 45(4), 576-585.
- Donley, G. E., & Fitzpatrick, L. A. (1998). Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization: possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends in cardiovascular medicine*, 8(5), 199-206.
- Donnelly, E., Boskey, A. L., Baker, S. P., & Van der Meulen, M. C. (2010). Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *Journal of biomedical materials research Part A*, 92(3), 1048-1056.
- Doty, K. C., Muro, C. K., Bueno, J., Halámková, L., & Lednev, I. K. (2016). What can Raman spectroscopy do for criminalistics?. *Journal of Raman Spectroscopy*, 47(1), 39-50.
- Ducher, G., Tournaire, N., Meddahi-Pellé, A., Benhamou, C. L., & Courteix, D. (2006). Short-term and long-term site-specific effects of tennis playing on trabecular and cortical bone at the distal radius. *Journal of bone and mineral metabolism*, 24(6), 484-490.
- Duraipandian, S., Zheng, W., Ng, J., Low, J. J., Ilancheran, A., & Huang, Z. (2011). In vivo diagnosis of cervical precancer using Raman spectroscopy and genetic algorithm techniques. *Analyst*, 136(20), 4328-4336.
- During, A., Penel, G., & Hardouin, P. (2015). Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Progress in lipid research*, 59, 126-146.
- Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., & Vikström, C. (2013). *Multi-and megavariate data analysis basic principles and applications*. Umetrics Academy.
- Falgayrac, G., Cortet, B., Devos, O., Barbillat, J., Pansini, V., Cotten, A., ... & Penel, G. (2012). Comparison of two-dimensional fast raman imaging versus point-by-point acquisition mode for human bone characterization. *Analytical chemistry*, 84(21), 9116-9123.
- France, C. A., Thomas, D. B., Doney, C. R., & Madden, O. (2014). FT-Raman spectroscopy as a method for screening collagen diagenesis in bone. *Journal of archaeological Science*, 42, 346-355.
- Frushour, B. G., & Koenig, J. L. (1975). Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. *Biopolymers*, 14(2), 379-391.

- Garland, A. N. (1985). A histological study of archaeological bone decomposition. In (A. Boddington, A. N. Garland & R. C. Janaway, Eds) *Death, Decay and Reconstruction*. Manchester: Manchester University Press, pp. 109–126
- Garland, A. N., Janaway, R. C., & Roberts, C. A. (1988). A study of the decay processes of human skeletal remains from the parish church of the Holy Trinity, Rothwell, Northamptonshire. *Oxford Journal of Archaeology*, 7(2), 235-249.
- Gibson, L. (1985). The mechanical behaviour of cancellous bone. *Journal of biomechanics*, 18(5), 317-328.
- Giraud-Guille, M. M. (1988). Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified tissue international*, 42(3), 167-180.
- Goodyear, S. R., Gibson, I. R., Skakle, J. M., Wells, R. P., & Aspden, R. M. (2009). A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone*, 44(5), 899-907.
- Gross, S. B., Pfitzer, E. A., Yeager, D. W., & Kehoe, R. A. (1975). Lead in human tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 32(3), 638-651.
- Hackett, C. J. (1981). Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law*, 21(4), 243-265.
- Hedges, R. E. M., & Law, I. A. (1989). The radiocarbon dating of bone. *Applied Geochemistry*, 4(3), 249-253.
- Hedges, R. E., & Millard, A. R. (1995). Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 155-164.
- Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- Hillier, M. L., & Bell, L. S. (2007). Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods. *Journal of forensic sciences*, 52(2), 249-263.
- Hoke, N., Grigat, A., Grupe, G., & Harbeck, M. (2013). Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic science international*, 228(1), 176-e1.
- Hollund, H. I., Ariese, F., Fernandes, R., Jans, M. M. E., & Kars, H. (2013). Testing an alternative high-throughput tool for investigating bone diagenesis: FTIR in attenuated total reflection (atr) mode. *Archaeometry*, 55(3), 507-532.
- Huang, J., Wang, X., Zhang, T. L., & Wang, K. (2009). Alterations of ovariectomized rat bone and impact of non-collagenous proteins on mineralization. *Joint Bone Spine*, 76(2), 176-183.
- Introna, F., Di Vella, G., & Campobasso, C. P. (1999). Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *Journal of forensic sciences*, 44, 535-538.
- Işcan, M. Y., Loth, S. R., & Wright, R. K. (1984). Metamorphosis at the sternal rib end: a new method to estimate age at death in white males. *American journal of physical anthropology*, 65(2), 147-156.
- Jagers, K. A., & Rogers, T. L. (2009). The effects of soil environment on postmortem interval: a macroscopic analysis. *Journal of forensic sciences*, 54(6), 1217-1222.
- Jans, M. M. E., Kars, H., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Nord, A. G., Arthur, P., & Earl, N. (2002). In situ preservation of archaeological bone: a histological study within a multidisciplinary approach. *Archaeometry*, 44(3), 343-352.
- Jans, M. M. E., Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Collins, M. J., & Kars, H. (2004). Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1), 87-95.

- Johnsson, K. (1997). Chemical dating of bones based on diagenetic changes in bone apatite. *Journal of archaeological science*, 24(5), 431-437.
- Junqueira, L. C. U., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 11(4), 447-455
- Kazanci, M., Wagner, H. D., Manjubala, N. I., Gupta, H. S., Paschalis, E., Roschger, P., & Fratzl, P. (2007). Raman imaging of two orthogonal planes within cortical bone. *Bone*, 41(3), 456-461.
- King, C. L., Tayles, N., & Gordon, K. C. (2011). Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *Journal of Archaeological Science*, 38(9), 2222-2230.
- Knight, B., & Lauder, I. (1969). Methods of dating skeletal remains. *Human Biology*, 322-341.
- Kristensen, H. K. (1948). An improved method of decalcification. *Stain technology*, 23(3), 151-154.
- Kunos, C. A., Simpson, S. W., Russell, K. F., & Hershkovitz, I. (1999). First rib metamorphosis: its possible utility for human age-at-death estimation. *American Journal of Physical Anthropology*, 110(3), 303-323.
- Lebon, M., Müller, K., Bahain, J. J., Fröhlich, F., Falguères, C., Bertrand, L., ... & Reiche, I. (2011). Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(5), 922-929.
- Lytle, L. T., & Hedgecock, D. G. (1978). Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains. *Journal of Forensic Science*, 23(3), 550-562.
- Maclaughlin-Black, S. M., Herd, R. J., Willson, K., Myers, M., & West, I. E. (1992). Strontium-90 as an indicator of time since death: a pilot investigation. *Forensic science international*, 57(1), 51-56.
- Manhein MH. Decomposition rates of deliberate burials: a case study of preservation. In: Haglund WD, Sorg MH, editors. Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. Boca Raton: CRC Press, 1997;469-82
- McLaughlin, G., & Lednev, I. K. (2011). Potential application of Raman spectroscopy for determining burial duration of skeletal remains. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(8), 2511-2518.
- Michalsky, M., Norrissuarez, K., Bettica, P., Pecile, A., & Moro, L. (1993). Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochemical and biophysical research communications*, 192(3), 1281-1288.
- Morko, J., Kiviranta, R., Hurme, S., Rantakokko, J., & Vuorio, E. (2005). Differential turnover of cortical and trabecular bone in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Bone*, 36(5), 854-865.
- Morris, M. D., & Mandair, G. S. (2011). Raman assessment of bone quality. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8), 2160-2169.
- Nagy, G., Lorand, T., Patonai, Z., Montsko, G., Bajnoczky, I., Marcsik, A., & Mark, L. (2008). Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR spectroscopy. *Forensic Science International*, 175(1), 55-60.
- Nielsen-Marsh, C. M., & Hedges, R. E. M. (1999). Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. *Archaeometry*, 41(1), 165-174.
- Nielsen-Marsh, C. M., & Hedges, R. E. (2000). Patterns of diagenesis in bone I: the effects of site environments. *Journal of Archaeological Science*, 27(12), 1139-1150.
- Nielsen-Marsh, C. M., Hedges, R. E., Mann, T., & Collins, M. J. (2000). A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. *Thermochimica Acta*, 365(1), 129-139.

- Nielsen-Marsh, C. M., Smith, C. I., Jans, M. M. E., Nord, A., Kars, H., & Collins, M. J. (2007). Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. *Journal of Archaeological Science*, 34(9), 1523-1531.
- Olejnik, C. (2014). *Modifications de la composition et de la structure moléculaire du tissu osseux sous l'influence des bisphosphonates* (Thèse de doctorat. Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- Patonai, Z., Maasz, G., Avar, P., Schmidt, J., Lorand, T., Bajnoczky, I., & Mark, L. (2013). Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *International journal of legal medicine*, 127(2), 529-533.
- Peretzschner, H. U. (2006). Collagen gelatinization: the key to understand early bone-diagenesis. *Palaeontographica Abteilung A*, 135-148.
- Person, A., Bocherens, H., Saliège, J. F., Paris, F., Zeitoun, V., & Gérard, M. (1995). Early diagenetic evolution of bone phosphate: an X-ray diffractometry analysis. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 211-221.
- Pestle, W. J., Ahmad, F., Vesper, B. J., Cordell, G. A., & Colvard, M. D. (2014). Ancient bone collagen assessment by hand-held vibrational spectroscopy. *Journal of Archaeological Science*, 42, 381-389.
- Proescher F, Nolan J. (1954). Progress in blood preservation. *Calif Med*, 81(3):221-5
- Ramsthaler, F., Kreutz, K., Zipp, K., & Verhoff, M. A. (2009). Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra-and interobserver error. *Forensic science international*, 187(1), 47-50.
- Ramsthaler, F., Ebach, S. C., Birngruber, C. G., & Verhoff, M. A. (2011). Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBT1®, and Combur® tests. *Forensic science international*, 209(1), 59-63.
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Glimcher, M. J. (2009). Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*, 20(6), 1013-1021.
- Ritz-Timme, S., Cattaneo, C., Collins, M. J., Waite, E. R., Schütz, H. W., Kaatsch, H. J., & Borrman, H. I. M. (2000). Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *International journal of legal medicine*, 113(3), 129-136.
- Rodriguez, W. C., & Bass, W. M. (1985). Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Science*, 30(3), 836-852.
- Rodriguez WC. Decomposition of buried and submerged bodies. In: Haglund WD, Sorg MH, editors. Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. Boca Raton: CRC Press, 1997;459-68
- Rudakova, T. E., & Zaikov, G. E. (1987). Degradation of collagen and its possible applications in medicine. *Polymer degradation and stability*, 18(4), 271-291.
- Savorani, F., Rasmussen, M. A., Mikkelsen, M. S., & Engelsen, S. B. (2013). A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food research international*, 54(1), 1131-1145.
- Schaffler, M. B., & Burr, D. B. (1988). Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of biomechanics*, 21(1), 13-16.
- Schwarcz, H. P., Agur, K., & Jantz, L. M. (2010). A new method for determination of postmortem interval: citrate content of bone. *Journal of forensic sciences*, 55(6), 1516-1522.
- Sillen, A. (1981). Strontium and diet at Hayonim Cave. *American Journal of Physical Anthropology*, 56(2), 131-137.

- Sledzik PS, Micozzi MS. Autopsied, embalmed and preserved human remains: distinguishing features in forensic and historic contexts. In: Haglund WD, Sorg MH, editors. *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. Boca Raton: CRC Press, 1997;483-95
- Smith, C. I., Nielsen-Marsh, C. M., Jans, M. M. E., & Collins, M. J. (2007). Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. *Journal of Archaeological Science*, *34*(9), 1485-1493.
- Stephenson, B. (2015). A modified Picro-Sirius Red (PSR) staining procedure with polarization microscopy for identifying collagen in archaeological residues. *Journal of Archaeological Science*, *61*, 235-243
- Suess, H. E. (1955). Radiocarbon concentration in modern wood. *Science*, *122*(3166), 415-417.
- Swift, B. (1998). Dating human skeletal remains: Investigating the viability of measuring the equilibrium between ^{210}Po and ^{210}Pb as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic science international*, *98*(1), 119-126.
- Swift, B., Lauder, I., Black, S., & Norris, J. (2001). An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic science international*, *117*(1), 73-87.
- Taylor, R. E. (1987). *Radiocarbon Dating: An Archaeological Perspective* Academic Press. *New York*.
- Taylor, R. E., Suchey, J. M., Payen, L. A., & Slota, P. J. (1989). The use of radiocarbon (^{14}C) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *Journal of Forensic Science*, *34*(5), 1196-1205.
- Thornton, J. L., Guarino, K., Rios, F. G., & Cashman, P. J. (1986). Enhancement of the luminol test by means of light amplification. *Journal of Forensic Science*, *31*(1), 254-257.
- Torres-Lagares, D., Tulasne, J. F., Pouget, C., Llorens, A., Saffar, J. L., & Lesclous, P. (2010). Structure and remodelling of the human parietal bone: an age and gender histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, *38*(5), 325-330.
- Tripp, J. A., Squire, M. E., Hamilton, J., & Hedges, R. M. (2010). A nondestructive prescreening method for bone collagen content using micro-computed tomography. *Radiocarbon*, *52*(2), 612-619.
- Trueman, C. N., Privat, K., & Field, J. (2008). Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral?. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *266*(3), 160-167.
- Tumer, A. R., Karacaoglu, E., Namli, A., Keten, A., Farasat, S., Akcan, R., ... & Odabaşı, A. B. (2013). Effects of different types of soil on decomposition: an experimental study. *Legal Medicine*, *15*(3), 149-156.
- Turner-Walker, G., Nielsen-Marsh, C. M., Syversen, U., Kars, H., & Collins, M. J. (2002). Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, *12*(6), 407-414.
- Turner-Walker, G. (2011). The mechanical properties of artificially aged bone: Probing the nature of the collagen-mineral bond. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *310*(1), 17-22.
- Tuross, N., Behrensmeyer, A. K., Eanes, E. D., Fisher, L. W., & Hare, P. E. (1989). Molecular preservation and crystallographic alterations in a weathering sequence of wildebeest bones. *Applied Geochemistry*, *4*(3), 261-270.
- Van Ruijven, L. J., Mulder, L., & Van Eijden, T. M. G. J. (2007). Variations in mineralization affect the stress and strain distributions in cortical and trabecular bone. *Journal of biomechanics*, *40*(6), 1211-1218.
- Very, J. M., Gibert, R., Guilhot, B., Debout, M., & Alexandre, C. (1997). Effect of aging on the amide group of bone matrix, measured by FTIR spectrophotometry, in adult subjects deceased as a result of violent death. *Calcified tissue international*, *60*(3), 271-275.

- Vignal JN (2007) Etude du délai post mortem. In JP Beauthier (ed.): *Traité de Médecine Légale*. Bruxelles : De Boeck, 457-9
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., & Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3), 319-336.
- Warner, S. E., Shea, J. E., Miller, S. C., & Shaw, J. M. (2006). Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcified tissue international*, 79(6), 395-403.
- Wedl, C. (1864). Ueber einen im Zahnbein und Knochen keimenden Pilz. *Sber Akad Wiss Weim K1*, 50,171-193
- Weiner, S., & Bar-Yosef, O. (1990). States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: a survey. *Journal of Archaeological Science*,17(2), 187-196.
- White, L., & Booth, T. J. (2014). The origin of bacteria responsible for bioerosion to the internal bone microstructure: results from experimentally-deposited pig carcasses. *Forensic science international*, 239, 92-102.
- Whittaker, P., Kloner, R. A., Boughner, D. R., & Pickering, J. G. (1994). Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic research in cardiology*, 89(5), 397-410
- Wieberg, D. A., & Wescott, D. J. (2008). Estimating the timing of long bone fractures: correlation between the postmortem interval, bone moisture content, and blunt force trauma fracture characteristics. *Journal of forensic sciences*,53(5), 1028-1034.
- Wild, E. M., Arlamovsky, K. A., Golser, R., Kutschera, W., Priller, A., Puchegger, S., ... & Vycudilik, W. (2000). 14 C dating with the bomb peak: An application to forensic medicine. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 172(1), 944-950.
- Wilson, A. S., Janaway, R. C., Holland, A. D., Dodson, H. I., Baran, E., Pollard, A. M., & Tobin, D. J. (2007). Modelling the buried human body environment in upland climes using three contrasting field sites. *Forensic science international*,169(1), 6-18.
- Wright, L. E., & Schwarcz, H. P. (1996). Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas, Guatemala: palaeodietary implications. *Journal of Archaeological Science*, 23(6), 933-944.
- Yerramshetty, J. S., & Akkus, O. (2008). The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. *Bone*, 42(3), 476-482.
- Yoshino, M., Kimijima, T., Miyasaka, S., Sato, H., & Seta, S. (1991). Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic science international*, 49(2), 143-158.
- Zimmerman, H. A., Meizel-Lambert, C. J., Schultz, J. J., & Sigman, M. E. (2015). Chemical Differentiation of Osseous, Dental, and Non-skeletal Materials in Forensic Anthropology using Elemental Analysis. *Science & Justice*, 55(2), 131-138.
- Zioupos, P., Cook, R. B., & Hutchinson, J. R. (2008). Some basic relationships between density values in cancellous and cortical bone. *Journal of biomechanics*, 41(9), 1961-1968.

ANNEXES

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Revues avec comité de lecture

1. Delannoy, Y., Colard, T., Le Garff, E., Mesli, V., Aubernon, C., Penel, G., Hédouin, V., Gosset, D. (2016). Effects of the environment on bone mass: A human taphonomic study. *Legal Medicine*, 20, 61-67.
2. Characterization of bone diagenesis in forensic anthropology by Raman Spectroscopy. *In prep*
3. Characterization of bone diagenesis by Histology in forensic contexts: A human taphonomic study. *In prep*
4. Caractérisation de la diagenèse osseuse par histomorphologie en contexte médico-légal. *In prep*

Chapitre d'ouvrage

Delannoy Y., Colard T. Anthropologie medico-légale. In: Charabidze D, Gosselin M. Insectes, cadavres et scènes de crime. De Boek: Louvain, 2014;233-43

Présentations en congrès

1. *Spectrométrie Raman : nouvel outil d'analyse en anthropologie taphonomique*
Y. Delannoy, T. Colard, G. Penel, G. Falgayrac, D. Gosset, V. Hédouin
14^{ème} congrès d'anthropologie médico-légale. 04 avril 2014, Nice
2. *Effets de l'environnement sur le poids osseux : étude taphonomique prospective.*
Y. Delannoy, T. Colard, C. Aubernon, D. Gosset, V. Hédouin
Séance du lundi 08 décembre 2014, Société Française de Médecine Légale, Paris
3. *Effects of soil environment on bone mass: a human prospective taphonomic study*
Y. Delannoy, T. Colard, V. Mesli, C. Aubernon, J. Boulay, V. Hedouin, D. Gosset
67th Annual scientific meeting 16-21 février 2015, American academy of forensic sciences, Washington
4. *Détermination de l'intervalle post mortem par étude de restes osseux en spectrométrie Raman*
Y. Delannoy, G. Falgayrac, O. Devos, T. Colard, G. Penel
XVII Conférence de Chimie analytique. 19-20 Janvier 2016. Namur, Belgique
5. *Détermination de l'intervalle postmortem en anthropologie : étude taphonomique prospective par spectromètre Raman*
Y. Delannoy, T. Colard, G. Falgayrac, E. Le Garff, G. Penel, V. Hédouin
16^{ème} congrès d'anthropologie médico-légale. 02 juin 2016, Nice
6. *Postmortem interval determination on skeletal remains by Raman spectrometry*
Y. Delannoy, G. Falgayrac, O. Devos, T. Colard, G. Penel
SPEC 2016. 26-30 juin 2016. Montreal, Canada

ENCADREMENTS

- **Master 2 Recherche :**

Université Paris – Descartes, master de médecine légale et de criminalistique : *Etude histomorphologique de la dégradation du collagène de l'os dans une perspective d'évaluation du délai post-mortem*

Direction de mémoire.

Année 2015-2016 par Claire LOURIA

- **Master 1:**

Université de Lille, master biologie et santé : *Création d'un modèle prédictif de détermination du délai post-mortem sur restes osseux par Spectrométrie Raman*

Direction de mémoire.

Année 2015-2016 par Thibault DE GRIEK