

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE

THESE D'UNIVERSITE

**Etude des modifications post-mortem de la phase minérale
de la dentine sclérotique**

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2023 par

Elodie MARCHAND

JURY

Madame le Professeur Clotilde ROUGE-MAILLART

Madame le Professeur Irène FRANCOIS

Madame le Docteur Céline CLEMENT

Monsieur le Professeur Valéry HEDOUIN

Monsieur le Docteur Laurent MARTRILLE

Monsieur le Docteur Benoit BERTRAND

Monsieur le Professeur Xavier DEMONDION

Madame le Docteur Anne BECART

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur

Co-directeur

DEDICACE

A la mémoire de mon père qui aurait été heureux de voir ce travail aboutir

REMERCIEMENTS

- Madame le Professeur Clotilde ROUGE-MAILLART, Professeur de médecine légale à l'Université d'Angers, chef du service de la permanence d'accès aux soins de santé du CHU d'Angers, expert près la Cour d'Appel d'Angers, centre Jean Bodin UPRES EA 4337.

Je suis honorée que vous soyez juge de mon travail et que vous présidiez ce jury. Votre implication dans mon comité de suivi individuel de thèse, au fur et à mesure de l'évolution de ce travail, m'a été précieuse, tout comme votre bienveillance.

- Madame le Professeur Irène FRANCOIS, Professeur de médecine légale à l'Université de Dijon, chef du service de médecine légale du CHU de Dijon, expert près la Cour d'Appel de Dijon, laboratoire EA4569.

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous suis reconnaissante de l'analyse que vous en ferez et des avis que vous émettrez compte-tenu de votre expertise scientifique.

- Madame le Docteur Céline CLEMENT, Maître de Conférences en odontologie à l'Université de Lorraine, référente médicale de la permanence d'accès aux soins de santé dentaire du CHRU Nancy, expert près la Cour d'Appel de Nancy, laboratoire InterPsy EA4432.

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour l'analyse que votre expertise scientifique dans le domaine dentaire apportera à cette thèse.

- Monsieur le Professeur Valéry HEDOUIN, Professeur de médecine légale à l'Université de Lille, chef du service de médecine légale du CHU de Lille, expert agréé par la Cour de Cassation, unité de taphonomie médico-légale et d'anatomie ULR 7367.

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie de votre soutien tout au long de cette thèse, mais également de vos enseignements et de vos encouragements depuis mes débuts en médecine légale. Veuillez recevoir toute ma gratitude pour la confiance que vous avez placée en moi.

- Monsieur le Docteur Laurent MARTRILLE, Maître de Conférences en médecine légale à l'Université de Montpellier, chef du service de médecine légale du CHU de Montpellier, expert près la Cour d'Appel de Montpellier, équipe de droit pénal et de sciences forensiques UR-UM212.

Vous me faites le plaisir de juger ce travail. Je vous remercie d'apporter votre expertise scientifique sur cette thèse, mais également pour votre soutien et votre implication dans ma carrière hospitalo-universitaire. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance pour votre bienveillance et vos encouragements.

- Monsieur le Docteur Benoit BERTRAND, Maître de Conférences en anthropologie à l'Université de Lille, expert près la Cour d'Appel de Douai, unité de taphonomie médico-légale et d'anatomie ULR 7367.

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail et d'apporter votre analyse scientifique en anthropologie à cette thèse.

- Monsieur le Professeur Xavier DEMONDION, Professeur d'anatomie à l'Université de Lille, radiologue au sein du service de radiologie musculosquelettique du CHU de Lille, unité de taphonomie médico-légale et d'anatomie ULR 7367.

Vous m'avez fait l'honneur de diriger cette thèse. Je vous remercie de votre bienveillance et de votre accompagnement tout au long de ce travail et des conseils scientifiques que vous m'avez apportés. Soyez assuré de toute mon estime.

- Madame le Docteur Anne BECART, Praticien hospitalier en odontologie à l'Institut de Médecine Légale et en médecine pénitentiaire du CHU de Lille, responsable de la chambre mortuaire du CHU de Lille, expert agréé par la Cour de Cassation, unité de taphonomie médico-légale et d'anatomie ULR 7367.

Vous m'avez fait l'honneur de votre confiance pour ce projet de thèse que vous avez initié en amont dans le cadre de mon master II Recherche. Je vous remercie pour votre encadrement, vos encouragements tout au long du travail et vos conseils précieux dans l'élaboration de ma thèse. Soyez assurée de mon respect et de ma reconnaissance.

- A Monsieur Ahmed ADDAD, Ingénieur de Recherche de l'Unité de Matériaux et Transformations, UMR 8207. Vous m'avez apportée votre aide et votre expertise dans le domaine de la microscopie électronique. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre accompagnement.
- Aux membres de l'Unité de Catalyse et Chimie du Solide, UMR 8181. Je vous remercie pour votre expertise dans le domaine de la diffraction en rayons X et de votre aide dans la réalisation des analyses.
- A Monsieur le Professeur Emmanuel CHAZARD, Professeur à l'Université de Lille, membre du laboratoire METRICS, ULR 2694. Je vous remercie pour votre implication et votre aide dans la réalisation des analyses statistiques de ce travail, ainsi que de votre éclairage sur les résultats présentés.
- Aux membres du laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Lille pour leur aide dans ce projet d'étude.
- A la section archéologie de la Communauté d'Agglomération du Douaisis pour le don des dents archéologiques.
- Aux membres de l'Unité de Taphonomie Médico-Légale et d'Anatomie de Lille, ULR 7367 pour leur appui dans ce travail.
- Aux personnes ayant fait don de leur corps à la science, sans qui ce travail n'aurait pas été réalisable.
- A mes collègues du service de médecine légale de Lille pour leur soutien et leur accompagnement durant mes années passées à leur côté.
- A mes collègues du service de médecine légale de Nancy pour leur accueil à mon arrivée et leur aide quotidienne.
- A mes collègues des services d'anatomopathologie, d'imagerie et de toxicologie de Nancy pour leur bienveillance et leur implication dans nos travaux communs.
- A toute ma famille pour leur soutien dans les études comme dans la vie. A ma mère pour la relecture attentive de ce travail malgré la terminologie scientifique, à ma sœur Chloé, qui malgré nos différences a toujours une pensée pour moi, à ma grand-mère toujours souriante et aimante.
- A Pierre, mon compagnon, pour son soutien au quotidien malgré les implications de mon travail. Merci d'être toujours là pour moi.

RESUME EN FRANÇAIS

Introduction : en médecine légale, l'identification des restes humains est un problème récurrent. L'estimation de l'âge au décès est l'un des critères à évaluer. Chez les adultes, la hauteur de la transparence de la dentine radiculaire est utilisée. Cependant, dans le matériel archéologique, ce phénomène apparaît inconstant et en lien avec des modifications d'aspect de la dentine sclérotique. Le but de ce travail était d'observer les modifications de la dentine sclérotique à différents délais post-mortem en se concentrant sur la partie minérale qui est le composant principal de ce tissu et qui est susceptible d'avoir des variations plus marquées sur des délais post-mortem longs.

Matériel et Méthode : l'étude comprenait deux parties (rétrospective et prospective) avec 21 dents humaines monoradiculées, trois datées du 18^{ème} siècle provenant de fouilles archéologiques et dix-huit issues de dons du corps à la science de la Faculté de médecine de l'Université de Lille conservées dans des conditions équivalentes et analysées à différents délais post-mortem de 0, 1, 2 et 5 ans.

Après inclusion en résine, les dents ont été sectionnées et polies, puis analysées au microscope électronique à balayage, complétés par une analyse semi-quantitative du calcium et du phosphore par microanalyse EDS-X, ainsi qu'une détection large d'éléments du tableau périodique. Dans un second temps nous avons réalisé une analyse cristallographique par diffractométrie en rayons X.

Résultats : les analyses ont montré l'existence de modifications tubulaires, chimiques et cristallographiques de la dentine sclérotique en fonction du délai post-mortem. Notre étude au microscope électronique à balayage nous a permis d'observer une différence d'aspect des tubules en lien avec l'augmentation du délai post-mortem : perte du col péritubulaire et obstruction de la lumière des tubules par un matériau hyperdense. La microanalyse a mis en évidence des variations des rapports phosphocalciques entre les différents groupes, notamment au niveau de la jonction avec le ciment et plus spécifiquement dans la canine qui pourrait être un bon modèle prédictif pour l'évaluation du délai post-mortem. Par diffractométrie, nous avons confirmé que la phase minérale de la dentine sclérotique, quel que soit le délai post mortem, était composée de cristaux d'hydroxyapatite, avec un meilleur niveau de cristallinité dans les dents archéologiques par rapport aux dents de délai post-mortem 5 ans, mais aussi entre les dents de délai post-mortem de 0 et 1 an, par rapport à 2 ans.

Discussion : les différences observées pourraient reposer sur des modifications post-mortem de la phase minérale de la dentine sclérotique par des phénomènes de déminéralisation et

reminéralisation, à l'origine d'une variation de la taille des cristaux d'hydroxyapatite situés dans la zone intra tubulaire et par la substitution du calcium par d'autres éléments, sous l'influence d'une action chimique et/ou bactérienne et donc une influence de l'environnement de la dent (buccal et extérieur). Ce travail nécessite d'être poursuivi, d'une part par l'utilisation de techniques d'imagerie permettant l'association d'une étude structurale, chimique et cristallographique comme la microscopie électronique à transmission, mais également par l'étude des modifications du collagène et des protéines non collagéniques rendant plus accessible les composants minéraux aux facteurs extérieurs. Il serait également pertinent de réaliser les analyses sur des dents d'intervalles post-mortem de dizaines d'années.

Mots clés : dentine, modifications, phase minérale, taphonomie

ABSTRACT

Introduction: in forensics fields, the identification of human remains is a recurrent problem. Estimating age at death is one of the criteria to be evaluated. In adults, the height of root dentin transparency is used. However, in archaeological material, this phenomenon appears to be inconsistent and related to changes in the appearance of sclerotic dentine. The aim of this study was to observe the changes in sclerotic dentin at different post-mortem intervals, focusing on the mineral part, which is the main component of this tissue and is likely to have more marked variations over longer post-mortem periods.

Material and Method: The study included two parts (retrospective and prospective) with 21 monoradicular human teeth, three dating from the 18th century from archaeological excavations and eighteen from donations of the body to science from the Faculty of Medicine of the University of Lille preserved in equivalent conditions and analyzed at different post-mortem intervals of 0, 1, 2 and 5 years. After resin embedding, the teeth were sectioned and polished, then analyzed by scanning electron microscope, completed by semi-quantitative analysis of calcium and phosphorus using EDS-X microanalysis, as well as broad detection of elements from the periodic table. We then carried out a crystallographic analysis using X-ray diffractometry.

Results: The analysis showed the existence of tubular, chemical and crystallographic changes in the sclerotic dentin as a function of the post-mortem interval. Our scanning electron microscope study revealed a difference in the appearance of the tubules linked to an increase post-mortem interval: loss of the peritubular collar and obstruction of the tubule lumen by a hyperdense material. Microanalysis highlighted variations in phosphocalcic ratios among the different groups, notably at the cementum junction and more specifically in the canine, which could be a good predictive model for assessing post-mortem interval. Using diffractometry, we confirmed that the mineral phase of sclerotic dentin, whatever the post-mortem interval, was composed of hydroxyapatite crystals, with a better level of crystallinity in archaeological teeth compared with teeth with a 5-year post-mortem interval, but also between teeth with a 0 and 1 year post-mortem interval, compared with 2 years.

Discussion: the differences observed could be due to post-mortem changes of the mineral phase of sclerotic dentin through demineralization and remineralization phenomena, resulting in variations in the size of hydroxyapatite crystals located in the intra-tubular zone and through the substitution of calcium by other elements, under the influence of chemical and/or bacterial action and therefore an influence of the tooth's environment (buccal and external). This work

needs to be pursued, on the one hand by using imaging techniques that combine structural, chemical and crystallographic studies, such as transmission electron microscopy, and on the other hand by studying changes in collagen and non-collagenous proteins making mineral components more accessible to external factors. It would also be relevant to carry out analyses on teeth from post-mortem intervals of decades.

Keywords: dentin, modifications, mineral phase, taphonomy

LISTE ET LEGENDES DES FIGURES

- Figure 1 – Structure d'une dent monoradiculée
- Figure 2 – Les étapes de l'odontogenèse
- Figure 3 – La différenciation des odontoblastes
- Figure 4 – L'aspect au microscope optique de la transparence radiculaire dentinaire sur une section longitudinale d'une incisive
- Figure 5 – Estimation de l'âge dentaire par la technique de Lamendin
- Figure 6 – L'assemblage des molécules de tropocollagène en fibrille de collagène
- Figure 7 – Le transport du calcium vers le front de minéralisation
- Figure 8 – Aspect des calcosphérites au microscope électronique à balayage
- Figure 9 – Aspect des tubules au microscope électronique à balayage
- Figure 10 – Repos et contraction musculaire
- Figure 11 – Protocole d'analyse de la partie prospective pour un individu
- Figure 12 – Exemple d'une dent incluse en résine (à gauche), puis sectionnée longitudinalement (centre) et enfin sectionnée transversalement (à droite)
- Figure 13 – Schéma du principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage
- Figure 14 – Interactions entre le faisceau incident et l'échantillon au microscope électronique à balayage
- Figure 15 – Photographie du microscope électronique à balayage JSM-7800F, JEOL utilisé dans notre étude (d'après le site internet de la Plateforme de Microscopie Electronique de Lille)
- Figure 16 – Représentation schématique des zones d'analyses dans la dentine sclérotique (zone bleue) : apex (A), proximité cément-dentine (B) et proximité pulpe-dentine (C)
- Figure 17 – Exemple d'une cartographie au MEB par sonde EDS-X et son spectre
- Figure 18 – Interactions entre le faisceau incident et une famille de plans réticulaires espacés d'une distance d

Figure 19 – Composition d'un diffractomètre

Figure 20 – Photographie du diffractomètre en rayons X SmartLab, Rigaku utilisé dans notre étude

Figure 21 – Exemple de diffractomètre en réflexion (à gauche) et en transmission (à droite)

Figure 22 – Photomicrographie obtenue au MEB en électrons secondaires (grossissement x15000 et x20 000) de la dentine sclérotique – (a) d'une dent humaine avec un délai post-mortem de 5 ans et (b) d'une dent humaine avec un délai post-mortem archéologique. Structure en maille visible au sein de la lumière du tubule

Figure 23 – Photomicrographie au MEB en électrons rétrodiffusés (grossissement x190, x350 et x370) de la dentine sclérotique d'une dent humaine – (a) avec un délai post-mortem de 0 an, (b) avec un délai post-mortem de 1 an et (c) avec un délai post-mortem de 2 ans. Tubules arrondis à proximité de la chambre pulpaire (rectangle noir), tubules allongés à proximité de la jonction avec le ciment (rectangle blanc)

Figure 24 – Photomicrographies obtenues au MEB (grossissement x4000 et x5000) en zone apicale. Dentine péri-tubulaire (flèche noire). (a) dent humaine de DPM 0 an, (b) dent humaine de DPM 1 an, (c) dent humaine de DPM 2 ans et (d) dent humaine de DPM 5 ans

Figure 25 – Photomicrographies obtenues au MEB (grossissement x2200 et x7500) en électrons rétrodiffusés de la dentine sclérotique de deux dents archéologiques. Tubules obstrués par un matériau hyperdense (flèche noire) - (a) regroupés en amas et (b) recouverts par une structure volumineuse hyperdense

Figure 26 – Distribution des 539 mesures de rapport phosphocalcique dans les échantillons de la partie rétrospective de l'étude

Figure 27 – Distribution multifactorielle des rapports phosphocalciques des échantillons de la partie rétrospective de l'étude

Figure 28 – Distribution des 539 mesures de concentration en sodium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

Figure 29 – Distribution des 539 mesures de concentration en magnésium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

Figure 30 – Distribution des 1620 mesures de rapport phosphocalcique dans les échantillons de la partie prospective de l'étude

Figure 31 - Distribution multifactorielle des rapports phosphocalciques des échantillons de la partie prospective de l'étude

Figure 32 – Distribution des 1620 mesures de concentration en sodium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

Figure 33 – Distribution des 1620 mesures de concentration en magnésium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

Figure 34 – Représentation en boxplot pour les échantillons de la partie prospective de l'étude entre type de dent/zone d'analyse en fonction du délai post-mortem

Figure 35 – Diffractomètre de l'hydroxyapatite

Figure 36 - Diffractomètres des dents de la partie rétrospective de l'étude

Figure 37 – Diffractomètres des dents de la partie prospective de l'étude

Figure 38 – Superposition des diffractomètres des dents de la partie rétrospective de l'étude

Figure 39 – Superposition des diffractomètres des dents de la partie prospective de l'étude

LISTE ET LEGENDES DES TABLEAUX

Tableau 1 – Résultats descriptifs des mesures réalisées sur les six dents de la partie rétrospective de l'étude (trois dents de délai post-mortem 5 ans et trois dents archéologiques du 18ème siècle)

Tableau 2 – Analyse de la variance des rapports phosphocalciques des six dents de la partie rétrospective de l'étude

Tableau 3 – Résultats descriptifs des mesures réalisées sur les neuf dents du sujet A (homme de 75 ans)

Tableau 4 – Résultats descriptifs des mesures réalisées sur les neuf dents du sujet C (femme 92 ans)

Tableau 5 – Analyse de la variance des rapports phosphocalciques des dix-huit dents de la partie prospective de l'étude

Tableau 6 – Analyse de la variance des rapports phosphocalciques des dix-huit dents de la partie prospective de l'étude indépendamment du sujet

Tableau 7 – Test d'association de Pearson et Spearman pour les échantillons de la partie prospective de l'étude entre type de dent/zone d'analyse et délai post-mortem

Tableau 8 – Différence d'intensité des pics en fonction de leur position (degré 2θ) pour les dents de délai post-mortem 5 ans et les dents archéologiques

Tableau 9 - Différence d'intensité des pics en fonction de leur position (degré 2θ) pour les dents de délai post-mortem 0 an, 1 an et 2 ans

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	2
REMERCIEMENTS	3
RESUME EN FRANÇAIS.....	6
ABSTRACT	8
LISTE ET LEGENDES DES FIGURES	10
LISTE ET LEGENDES DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION	18
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	20
I. Evolution de la dentine.....	20
1) La dentinogenèse	21
a. L'odontogenèse	21
b. La différenciation des odontoblastes.....	22
2) Les types de dentine.....	25
a. Les dentines périphérique et circumpulpaire	25
b. L'évolution de la dentine au cours de la vie	25
c. La dentine sclérotique	26
II. Composition de la dentine	29
1) La partie organique	29
a. Le collagène.....	29
b. Les protéines de la famille SIBLING	30
c. Les protéoglycanes	31
d. Les lipides	31
2) La partie minérale.....	32
a. La minéralisation	32
b. La composition	33
c. La structure des cristaux.....	33
3) Les tubules.....	35
III. Délai post-mortem	37
1) Définition et estimation précoce.....	37
2) Estimation des délais post-mortem intermédiaires.....	38
3) Estimation des délais post-mortem tardifs	39
a. Etude de Vavpotic et al.....	39
b. Etude de Yadav et al.....	40
c. Etude de Carrasco et al.....	40

d. Etude de Bhuyan et al.....	41
OBJECTIFS	42
MATERIEL ET METHODES	43
I. Population d'étude.....	43
1) Partie rétrospective	43
2) Partie prospective	44
II. Préparation des échantillons.....	46
1) Inclusion en résine.....	46
2) Coupe.....	46
3) Polissage	47
III. Analyse	48
1) Imagerie en Microscopie Electronique à Balayage	48
a. Principe de fonctionnement.....	48
b. Les types d'émission.....	49
c. Avantages et limites	50
d. Microscopie électronique à balayage dans notre étude.....	51
2) La spectrométrie à sélection d'énergie	53
a. Principe de fonctionnement.....	53
b. Avantages et limites	54
c. Spectrométrie à sélection d'énergie dans notre étude.....	54
d. Analyses statistiques	55
3) Diffraction en rayons X.....	56
a. Principe de fonctionnement.....	56
b. Avantages et limites	57
c. Diffraction en rayons X dans notre étude	58
RESULTATS.....	60
I. Imagerie en microscopie électronique à balayage.....	60
II. Microanalyse par sonde EDS-X.....	64
1) Reproductibilité de la mesure intra-individuelle (partie rétrospective)	64
a. Résultats descriptifs	64
b. Mesures du rapport phosphocalcique	64
i. Distribution générale.....	64
ii. Distribution multifactorielle	66
iii. Etude de variabilité des mesures	68
c. Autres éléments	69
i. Sodium.....	69

ii.	Magnésium	69
2)	Effet du délai post-mortem (partie prospective)	72
a.	Résultats descriptifs	72
b.	Mesures du rapport phosphocalcique	74
i.	Distribution générale.....	74
ii.	Distribution multifactorielle	75
iii.	Etude de variabilité.....	76
c.	Autres éléments	76
i.	Sodium.....	76
ii.	Magnésium.....	77
3)	Impact du délai post-mortem sur les variations du rapport phosphocalcique.....	80
a.	Etude exploratoire selon le sujet.....	80
b.	Etude exploratoire indépendamment du sujet.....	80
c.	Analyse prédictive	81
III.	Résultats en diffractométrie en rayons X.....	84
1)	Composition cristallographique des échantillons	84
2)	Cristallinité de la partie rétrospective	87
3)	Cristallinité de la partie prospective.....	88
	DISCUSSION	90
I.	Modifications structurales.....	90
1)	Dentine primaire et dentine secondaire	90
2)	Structure de la dentine sclérotique.....	91
3)	Aspect des tubules	91
II.	Modifications de la phase minérale	93
1)	Chimiques	93
a.	Variations du rapport phosphocalcique en fonction du délai post-mortem	93
b.	Substitutions chimiques	94
c.	Dissolution et reprécipitation.....	95
2)	Cristallographiques.....	96
a.	Identification des cristaux de la phase minérale.....	96
b.	Variations de cristallinité.....	96
c.	Implication de la phase organique	97
III.	Limites de l'étude	99
1)	Méthodes d'analyse	99
2)	Taille de l'échantillon.....	99
3)	Influence du sexe et de l'âge	100

IV. Perspectives.....	101
CONCLUSION	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
ARTICLE DE THESE	115

INTRODUCTION

La dentine, principal tissu dentaire humain, va se modifier durant la vie, permettant de distinguer trois types de dentine : la dentine primaire qui se forme au cours de l'élaboration de la dent jusqu'à la fermeture de l'apex, la dentine secondaire qui la remplace peu à peu en périphérie de la pulpe et la dentine tertiaire réactionnelle aux agressions physiques, chimiques et microbiologiques (Tsurumachi *et al.*, 2008). A partir d'une vingtaine d'années de vie, le tissu dentinaire va subir un vieillissement (dentine sclérotique) dont le mécanisme de formation va modifier l'indice de réfraction à la lumière et se traduire par un effet de transparence de la racine (Kinney *et al.*, 2005 ; Porter *et al.* 2005 ; Kabartai *et al.*, 2015). Ce phénomène est utilisé pour estimer l'âge du sujet au moment du décès (Gustafson 1950 ; Lamendin *et al.*, 1992). Différents auteurs se sont intéressés à la dentine sclérotique et se sont interrogés sur les modifications qu'il pouvait y avoir sur ce tissu en fonction du délai post-mortem, notamment pour s'assurer de la fiabilité lors de l'utilisation de la hauteur de la transparence radiculaire sur l'estimation de l'âge au décès (Sengupta *et al.*, 1999 ; Mandojana *et al.*, 2001). Les critères étudiés étaient d'ordre morphologiques comme la couleur de la dent et son aspect (Beeley et Lunt 1980 ; Sengupta *et al.*, 1999), la longueur de la racine, ainsi que la hauteur de la transparence radiculaire...et il a été observé des valeurs plus élevées de ces critères dans les dents récentes par rapport aux dents archéologiques, sans toutefois pouvoir en expliquer l'origine (Mandojana *et al.*, 2001). Ces altérations observées correspondaient à des altérations diagenétiques. Il s'agit d'un phénomène post-mortem, incluant différents processus internes au tissu et externes provenant de l'environnement dans lequel il se trouve, qui va occasionner des modifications structurales et/ou chimiques (De Luca *et al.*, 2010 ; Grunenwald *et al.*, 2014).

L'objectif de notre travail était d'observer sur des dents de différents intervalles post-mortem (récents et archéologiques), s'il existait des modifications structurales et/ou chimiques de la phase minérale, en utilisant deux techniques.

Dans le premier chapitre, nous avons contextualisé notre travail à partir de l'évolution de la dentine, de sa formation à son développement ante-mortem. Nous avons également décrit les hypothèses d'apparition de la dentine sclérotique et son utilisation en post-mortem. Enfin, nous avons redonné les éléments utilisés en médecine légale pour l'estimation du délai post-mortem et les principales études dentaires s'y intéressant.

Dans le second chapitre nous avons décrit le matériel d'étude, ainsi que les étapes de préparation réalisées sur les dents avant leur analyse. Nous avons également réexpliqué les techniques utilisées, leur intérêt et leur limite, ainsi que la mise en œuvre dans notre travail.

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les résultats de nos observations au microscope électronique à balayage pour observer la structure du tissu sclérotique et réaliser une analyse semi-quantitative de sa composition chimique à différents endroits (zone apicale, zone de jonction avec la pulpe et zone de jonction avec le ciment) ; puis de l'étude en diffraction en rayons X pour analyser la composition des cristaux et le niveau de cristallinité.

Dans le quatrième chapitre, nous avons discuté nos résultats, comparativement aux données de la littérature. En premier lieu, en s'attachant aux modifications de structure du tissu, en particulier des tubules. Puis, en discutant des variations observées sur la phase minérale, vis-à-vis du rapport phosphocalcique et de la détection d'autres éléments chimiques ; ainsi que des résultats cristallographiques et de l'impact de la phase organique. Enfin, en posant les limites de l'étude, tant sur le plan des techniques utilisées que de la méthodologie et des perspectives pouvant être envisagées.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

I. Evolution de la dentine

La dentine est le plus volumineux tissu dentaire (Porter *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2013). Elle entoure la pulpe, située au centre de la dent et est recouverte au niveau coronaire par l'émail et au niveau de la racine par le ciment (figure 1). La dentine est un tissu composé à 70% d'une partie minérale (essentiellement des cristaux d'hydroxyapatite carbonatée), à 20% d'une partie organique (majoritairement du collagène de type I) et à 10% d'eau (Carrigan *et al.* 1984). Ce tissu conjonctif minéralisé est traversé par des dizaines de milliers de tubules, parallèles entre eux, s'étendant de la pulpe jusqu'à l'émail et au ciment (Linde et Goldberg 1993 ; Farges 2012 ; Paredes 2012).

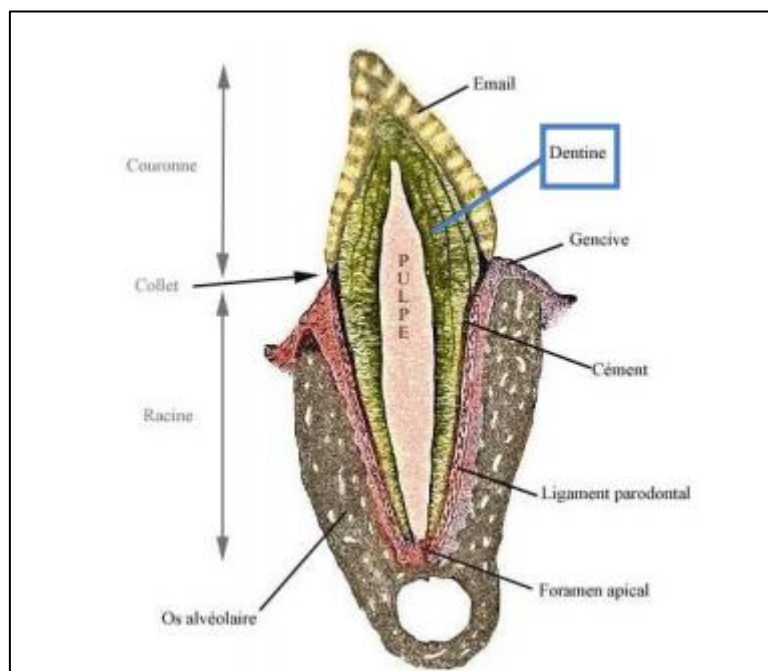


Figure 1 : structure d'une dent monoradiculée (d'après Gray 1918)

1) La dentinogenèse

La dentinogenèse correspond à la formation de la dentine par les odontoblastes en deux étapes : la synthèse et la sécrétion de la matrice organique (pré-dentine) puis la minéralisation de la pré-dentine (Carrigan *et al.* 1984).

a. L'odontogenèse

L'odontogenèse débute vers la 6^{ème} – 7^{ème} semaine de gestation pour se terminer entre 18 et 25 ans, après l'éruption de la 3^{ème} molaire. Elle se décompose en quatre stades (figure 2) (Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012 ; Ribes 2018).

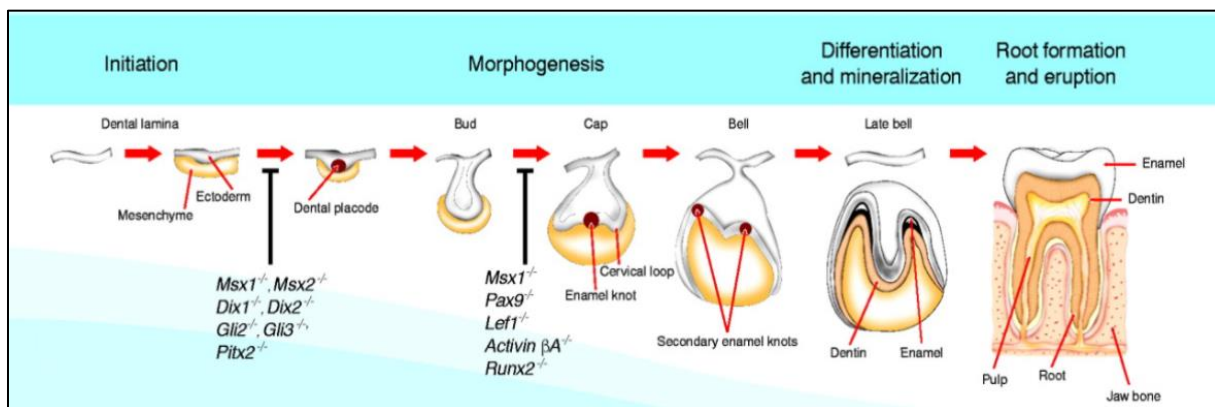


Figure 2 : les étapes de l'odontogenèse (d'après Thesleff 2003)

Le premier stade de l'odontogenèse correspond à l'initiation. On observe la formation de la lame dentaire à partir d'une prolifération épithélio-mésenchymateuse. L'accroissement du nombre de cellules épithéliales aboutit à la formation de bourgeons ou placodes dentaires, correspondant à chaque dent lactéale.

La poursuite de la prolifération épithéliale conduit à la formation d'un capuchon dentaire (stade de morphogenèse). On observe l'apparition progressive des trois parties qui constitueront la dent : l'organe de l'émail, la papille primitive qui donnera la pulpe et le follicule fibreux dont est issu le ciment.

Au stade de différenciation, les processus de croissance aboutissent à la formation de la cloche dentaire. C'est durant cette phase que les pré-odontoblastes apparaissent.

Enfin le dernier stade correspond à la formation de la couronne puis de la racine, à la mise en place du parodonte et à l'éruption dentaire.

b. La différenciation des odontoblastes

Les étapes de la formation et de la différenciation des odontoblastes sont représentées sur la figure 3 (Goldberg *et al.* 2011 ; Farges 2012 ; Paredes 2012).

Les cellules périphériques de la papille ectomésenchymateuse vont se différencier en odontoblastes. Elles sont ovalaires, composées d'un noyau central et d'organites uniformément répartis dans le cytoplasme. Elles sont situées à quelques microns de la membrane basale (épithélio-mésenchymateuse) qui constitue la lame dentaire interne.

Ces cellules vont stopper leur prolifération, s'accroître et s'accrocher par leur membrane aux fibrilles d'ancrage de la membrane basale. Il s'agit alors des pré-odontoblastes (figure 3a).

La cellule va ensuite se polariser et devenir un odontoblaste (figure 3b). Le noyau se positionne à l'opposé de la membrane basale (pôle basal), le corps cellulaire s'allonge mesurant environ 50 µm et les éléments du cytosquelette s'accumulent vers la membrane basale (pôle apical sécréteur). Un prolongement de cytosquelette se forme au pôle apical, au contact des fibrilles d'ancrage, puis se ramifie. Les branches vont croître latéralement.

A la jonction entre le corps cellulaire et le prolongement, se forme une toile terminale qui maintient les gros organites dans le corps cellulaire et laisse passer les petites vésicules. A la périphérie de cette toile, sur la membrane plasmique de l'odontoblaste, un complexe de jonctions intercellulaires se forme (couche odontoblastique), permettant la connexion avec les odontoblastes voisins. Les branches des prolongements odontoblastiques entrent également en contact avec les ramifications voisines (figure 3c).

Après formation de la couche odontoblastique, les odontoblastes vont se différencier pour sécréter la pré-dentine, d'abord à proximité de la membrane basale, puis le long des prolongements odontoblastiques. Cette sécrétion s'effectue tout au long de la vie, mais ralentit au moment de l'éruption dentaire.

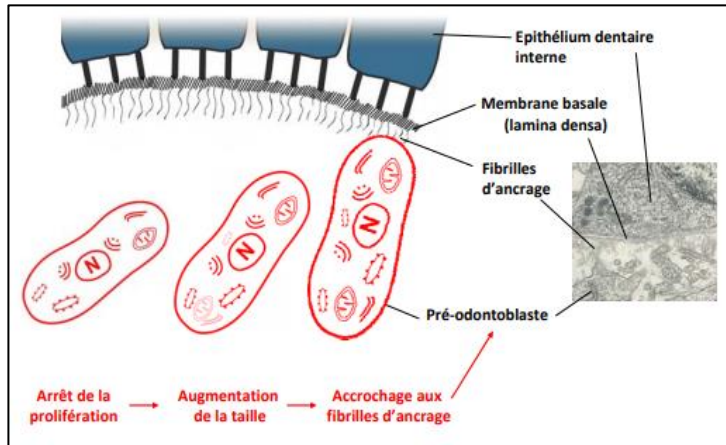
La pré-dentine une fois sécrétée, va subir une maturation et une minéralisation pour former, entre les fibrilles d'ancrage, le manteau dentinaire. L'interface entre le manteau dentinaire (dentine minéralisée) et la pré-dentine constitue le front de minéralisation (figure 3d).

Le dépôt progressif et continu de la pré-dentine repousse progressivement le corps cellulaire de l'odontoblaste vers la pulpe, entraînant un accroissement du prolongement odontoblastique, qui

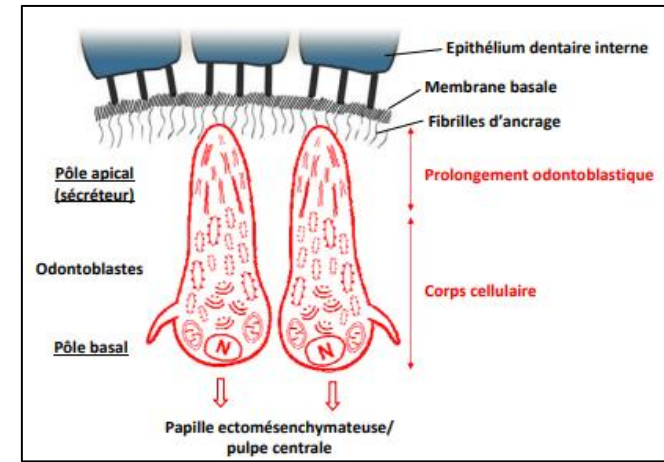
va peu à peu être entouré d'un manchon de dentine minéralisée appelé tubule dentinaire primaire. Ce phénomène s'étend aux ramifications du prolongement odontoblastiques (tubules dentinaires secondaires). Cette organisation tubulaire de la dentine constitue sa structure.

Cette différenciation des odontoblastes se fait selon un gradient temporo-spatial débutant au sommet de la cloche dentaire, pour se poursuivre de proche en proche, latéralement sur les bords de la papille ectomésenchymateuse.

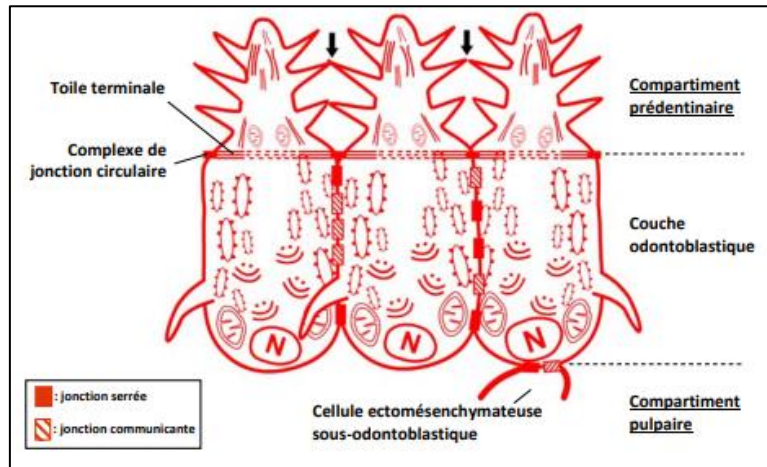
La dentinogenèse est notamment régulée par la fibronectine (glycoprotéine) produite par les fibrilles d'ancrage de la membrane basale. Cependant, elle doit nécessairement être associée à un facteur de croissance, le TGF-beta 1, produit par les cellules de l'épithélium dentaire interne. Le couple fibronectine-TGF-beta 1 est reconnu par des récepteurs présents sur la membrane des cellules périphériques, permettant l'ancrage, la polarisation et la différenciation en odontoblaste de la cellule ([Butler et Ritchie 1995](#) ; [Farges 2012](#)).



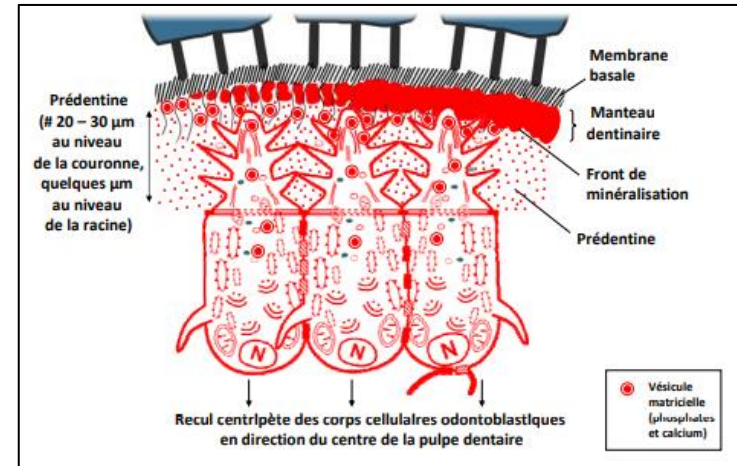
a. Formation du pré-odontoblaste



b. Odontoblaste et polarisation cellulaire



c. Toile terminale et jonctions intercellulaires



d. Prédentine et minéralisation

Figure 3 : la différenciation des odontoblastes (d'après Farges 2012)

2) Les types de dentine

a. Les dentines périphérique et circumpulpaire

Deux types de dentine ont été identifiées sur la base des différences de propriétés du minéral ou de la matrice : la dentine périphérique et la dentine circumpulpaire (Linde et Goldberg 1993 ; Dechichi *et al.* 2007 ; Goldberg *et al.* 2011).

La dentine périphérique est constituée de plusieurs couches hypominéralisées, exemptes de canalicules dentinaires : le manteau dentinaire à la partie coronaire, sur une épaisseur de 15 à 30 μm et les couches hyalines de Hopewell-Smith et granulaire de Tomes à la partie radiculaire, sur une épaisseur de 8 à 15 μm (Paredes 2012 ; Dumolié *et al.* 2016 ; Massous 2019).

La dentine circumpulpaire se compose de la dentine intertubulaire et de la dentine périlitubulaire (Linde et Goldberg 1993). La dentine intertubulaire est une matrice collagénique dont les fibres sont orientées perpendiculairement à direction du tubule (Weiner *et al.* 1999 ; Goldberg *et al.* 2011), renforcée par des plaques très minces d'apatite carbonatée (Weiner *et al.* 1999 ; Vennat 2009). La dentine périlitubulaire quant à elle, correspond à un manchon très minéralisé, mesurant environ 1 μm d'épaisseur, qui entoure la lumière du tubule (Vennat 2009 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Montoya *et al.* 2015). Cette dentine se forme par un dépôt circulaire de couches dentinaires autour du tubule, lorsque la minéralisation de la dentine intertubulaire est terminée (Montoya *et al.* 2015). Par rapport à la dentine intertubulaire, la dentine périlitubulaire est fortement minéralisée, avec des cristaux d'apatite plus petits et riches en magnésium et carbonate (Xu *et al.* 2008). Le rapport phosphocalcique entre les deux types de dentine est cependant quasiment identique, avec des variations maximales d'environ 10% (Weiner *et al.* 1999 ; Gotliv et Veis 2007). Sa portion organique se compose de protéines (glycoprotéines, protéoglycanes et phosphoprotéines), sans collagène (Gotliv et Veis 2007 ; Goldberg *et al.* 2011).

b. L'évolution de la dentine au cours de la vie

La dentine est en remaniement perpétuel, en lien avec la vitalité pulpaire, permettant de distinguer trois types de dentine (Whittaker et Bakri 1996 ; Tsurumachi *et al.* 2008 ; Simon *et al.* 2009 ; Garces-Ortiz *et al.* 2015).

La dentine primaire qui se forme à partir des odontoblastes, au cours de l'élaboration de la dent, jusqu'à la fermeture des apex (Linde et Goldberg 1993 ; Tsurumachi *et al.* 2008 ; Paredes 2012 ; Dumolié 2016).

Une fois l'édification complète de la racine, la dentine secondaire, de même composition que la précédente, la remplace peu à peu par une apposition à la périphérie de la pulpe (Linde et Goldberg 1993 ; Whittaker et Bakri 1996 ; Tsurumachi *et al.* 2008).

Enfin, la dentine tertiaire est un tissu réactionnel produit par les odontoblastes, en réponse à des agressions physiques, chimiques ou biologiques (Tsurumachi *et al.* 2008). Cependant, lorsque les odontoblastes primaires sont très altérés, des néo-odontoblastes ou odontoblastes secondaires vont sécréter un nouveau tissu dentinaire, appelé dentine réparatrice, correspondant à un tissu collagénique de type I, sans structure tubulaire (Linde et Goldberg 1993 ; Paredes 2012 ; Dumolié 2016).

c. La dentine sclérotique

Comme tous les tissus humains, la dentine va subir un vieillissement physiologique, se produisant à partir de 20-25 ans (environ 3 à 4 ans après l'éruption complète de la dent) ; on parle alors de dentine sclérotique (Whittaker et Bakri 1996 ; Porter *et al.* 2005 ; Kabartai *et al.* 2015).

Ce phénomène débute à l'apex de la dent et croît en direction coronaire. Il correspond à une obstruction des tubules par un matériau minéral (Kinney *et al.* 2005 ; Porter *et al.* 2005 ; Mandurah *et al.* 2015 ; Montoya *et al.* 2015). Cette obstruction modifie l'indice de réfraction de la lumière à travers le tissu dentinaire, se traduisant par un aspect de transparence radiculaire (Vasiliadis *et al.* 1983 ; Kinney *et al.* 2005 ; Selvamani *et al.* 2013 ; Kabartai *et al.* 2015) (figure 4).

Cependant, les mécanismes à l'origine de ce phénomène sont encore mal compris et restent controversés (Thomas *et al.* 1994 ; Selvamani *et al.* 2013). Certains auteurs énoncent qu'il s'agit de la dissolution des cristaux de la dentine intertubulaire qui précipite dans la lumière des tubules (Kinney *et al.* 2005 ; Nalla *et al.* 2005 ; Porter *et al.* 2005). D'autres évoquent une croissance centripète de la dentine péri-tubulaire par une minéralisation continue (Vasiliadis *et al.* 1983 ; Camargo *et al.* 2008 ; Tsurumachi *et al.* 2008). Plus récemment, des études affirment

que l'obstruction est liée à l'apoptose des odontoblastes (Selvamani *et al.* 2013 ; Kabartai *et al.* 2015 ; Yan *et al.* 2022).



Figure 4 : l'aspect au microscope optique de la transparence radiculaire dentinaire sur une section longitudinale d'une incisive (d'après Beauthier 2011)

La transparence radiculaire étant un phénomène évolutif ante-mortem, différents auteurs l'ont utilisée pour développer des techniques d'estimation de l'âge au moment du décès (Sengupta *et al.* 1999). Gustafson a proposé une méthode combinant six changements liés à l'âge survenant dans les tissus dentaires (attrition de l'émail, parodontose, dépôt de dentine secondaire, apposition du ciment, résorption radiculaire et transparence radiculaire) (Gustafson 1950). Cette méthode a été simplifiée par Lamendin (figure 5) à l'étude de deux critères dont la mesure de la hauteur de transparence racinaire (Lamendin *et al.* 1992) et Bang et Ramm l'ont même utilisée comme seul critère d'estimation de l'âge (Bang et Ramm 1970). La mesure de la hauteur de la transparence radiculaire peut s'effectuer sur des dents entières ou des dents sectionnées (Solheim 1989). La méthode initialement mise au point par Gustafson consistait à une évaluation subjective de la transparence radiculaire en fonction du grade d'étendue (Gustafson 1950). Par la suite il a été proposé une mesure millimétrique manuelle (Bang et Ramm 1970) puis informatisée (Lopez-Nicolas *et al.* 1990) permettant d'obtenir une estimation plus précise.

La hauteur de la transparence radiculaire est utilisée en pratique courante pour estimer l'âge au moment du décès, notamment dans un cadre médico-légal, lors de la découverte de corps altéré (Thomas *et al.* 1994). Cependant bien que la dentine sclérotique soit observée chez les sujets décédés récemment (plusieurs dizaines d'années), elle apparaît inconstante lors de décès plus anciens et notamment archéologiques (Sengupta *et al.* 1999). Associées à la disparition du phénomène de transparence, des altérations du tissu ont pu être décrites, telles qu'une dentine

« crayeuse » (Sengupta *et al.* 1999) ou « ramollie » (Beeley et Lunt 1980), tendant à supposer qu'il existerait des modifications structurales de la dentine sclérotique avec le délai post-mortem.

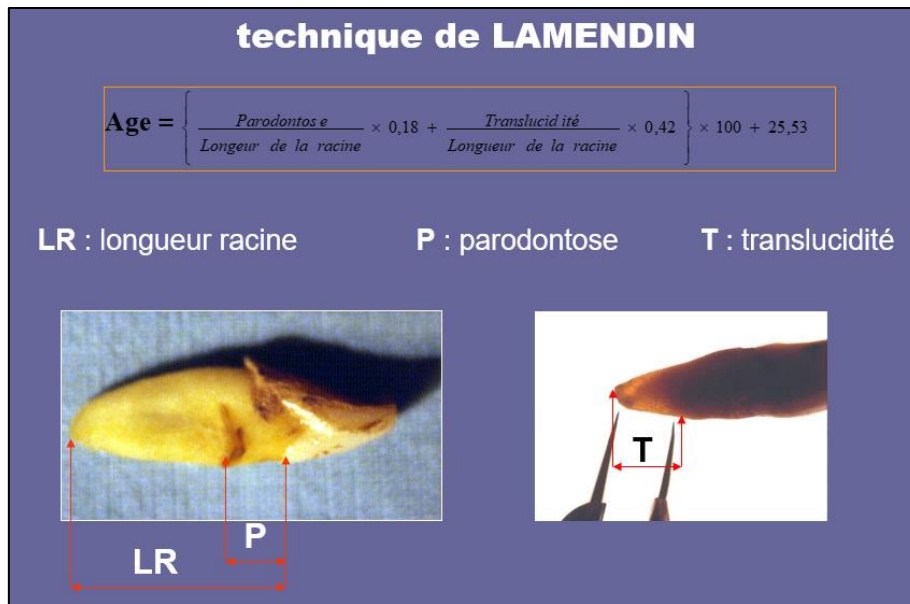


Figure 5 : estimation de l'âge dentaire par la technique de Lamendin
(d'après Rougé-Maillart 2013)

Les études publiées sur la dentine sclérotique ont porté essentiellement sur l'application des méthodes d'estimation de l'âge sur des matériaux archéologiques (Sengupta *et al.* 1999) ou aux phénomènes biologiques et biochimiques intervenant dans la transformation d'un corps soumis à différentes conditions environnementales, tel que l'enfouissement (Beeley et Lunt 1980) ou la submersion (Bell et Elkerton 2008). Il n'a pas été réalisé de travaux élémentaires sur les modifications structurales, minérales ou organiques, de la dentine sclérotique après le décès.

II. Composition de la dentine

La matrice extra-cellulaire de la dentine est constituée d'une matrice organique sur laquelle vont se déposer les plaques d'apatite carbonatée, traversée par les tubules (Butler et Richie 1995).

1) La partie organique

La partie organique de la dentine est composée à 90% de collagène et à 10% d'autres protéines non collagéniques, de protéoglycanes et de lipides (Vennat 2009 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012).

a. *Le collagène*

Les fibres de collagène dentinaires, synthétisées par les odontoblastes, sont principalement de type I (85%) et en faible proportion de type V et de type III (Butler et Richie 1995 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Abou Neel *et al.* 2016).

Le collagène de type I est un assemblage en triple hélice de deux chaînes alpha 1 et d'une chaîne alpha 2, reliées entre-elles par des ponts disulfures (Vennat 2009 ; Goldberg *et al.* 2011). Cet assemblage constitue le tropocollagène mesurant 1,5 nm de diamètre pour une longueur de 300 nm. Les molécules de tropocollagène s'assemblent entre-elles pour former un maillage régulier d'environ 50 nm de diamètre correspondant à la fibrille de collagène (Vennat 2009) (figure 6).

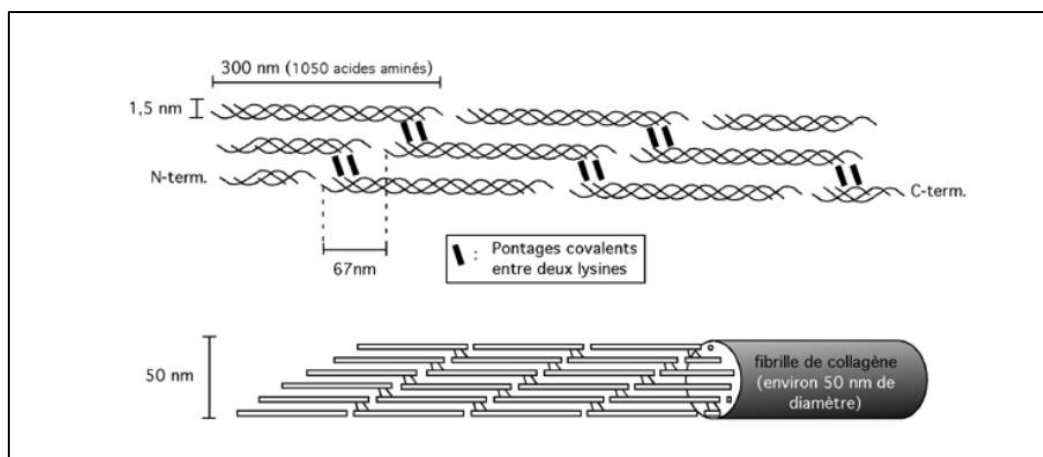


Figure 6 : l'assemblage des molécules de tropocollagène (image du haut) en fibrille de collagène (image du bas) (d'après Vennat 2009)

Les fibrilles de procollagène sont synthétisées dans le corps cellulaire des odontoblastes qui vont ensuite migrer vers la prédentine. A l'issue, elles vont se fixer dans le tissu au niveau de la dentine intertubulaire pour former le support pour la minéralisation (Butler et Richie 1995 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012) selon une orientation perpendiculaire à l'axe des tubules (Kinney *et al.* 2001).

Le collagène constitue la matrice pour la minéralisation, mais ne l'influence pas directement et cette étape nécessite donc la présence de protéines non collagéniques.

b. Les protéines de la famille SIBLING

Les protéines de la famille SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) sont au nombre de cinq : la sialophosphoprotéine de dentine (DSPP), la protéine matricielle de dentine 1 (DMP-1), la sialoprotéine osseuse (BSP), la phosphoglycoprotéine de matrice extracellulaire (MEPE) et l'ostéopontine (OPN) (Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012). Cette famille de protéines joue un rôle crucial dans la dentinogenèse et sont produites à partir de gènes situés sur le chromosome 4 (Goldberg *et al.* 2011).

La DSPP est exprimée majoritairement dans la dentine mais également en faible proportion dans l'os. Elle va se diviser notamment en deux protéines « *filles* » : la sialoprotéine dentinaire (DSP) et la phosphoprotéine dentinaire (DPP). Les études ont montré que la DPP est impliquée dans l'initiation et la maturation de la minéralisation, alors que la DSP intervient dans la régulation (Butler et Richie 1995 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012). Plus spécifiquement, à faible concentration, la DPP initie la nucléation, alors qu'à concentration élevée, elle entraîne l'inhibition de la croissance des cristaux. Elle peut ainsi réguler la taille et la forme des cristaux (Butler et Richie 1995 ; Milan *et al.* 2006).

La DMP-1 est impliquée dans la régulation de la minéralisation par sa capacité de liaison au calcium. Tout comme la DPP, elle joue un rôle dans la nucléation des cristaux et régule leur croissance. Son affinité avec les fibres de collagène facilite le dépôt de l'apatite (Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012).

L'OPN intervient dans la régulation du processus de minéralisation, en favorisant la formation de l'hydroxyapatite lorsqu'elle est phosphorylée (Goldberg *et al.* 2011).

La BSP joue un triple rôle dans la dentinogenèse en augmentant la fibrillation du collagène, en favorisant la nucléation des cristaux et en favorisant l'adhésion des odontoblastes à la matrice extracellulaire (Goldberg *et al.* 2011).

Enfin, la MEPE est utile à la différenciation des cellules pulpaires en odontoblastes, mais n'interviendrait pas dans la formation de la dentine (Goldberg *et al.* 2011).

c. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont également des protéines non collagéniques majeures de la matrice dentinaire (Butler et Richie 1995).

Initialement, il a été établi que les protéoglycanes étaient abondantes dans la prédentine et qu'elles constituaient des inhibiteurs de la minéralisation et étaient donc éliminées dans la dentine. Cependant, les études ont montré qu'elles étaient présentes au sein du tissu minéralisé. Cette constatation a abouti à l'idée qu'elles n'étaient pas détruites, mais modifiées. Finalement, il a été reconnu l'existence de deux groupes de protéoglycanes (Milan *et al.* 2004). Celles situées dans la prédentine (PD-PG) qui forment une structure amorphe permettant la fibrillation des fibrilles de collagène et celles situées dans la dentine (PG) sécrétées près du front de minéralisation qui jouent un rôle dans l'induction de la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (Milan *et al.* 2004 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Paredes 2012) et dans la croissance et la morphologie des cristaux, par l'interaction entre le collagène et le phosphate de calcium (Massous 2019).

d. Les lipides

La matrice extracellulaire de la dentine est composée d'environ 2% de lipides. Il s'agit essentiellement de cholestérol et de phospholipides. Ces derniers, dans la prédentine, constituent un réseau entre les fibres de collagène et dans la dentine, une enveloppe fine autour des cristaux d'hydroxyapatite. Les phospholipides acides joueraient également un rôle dans l'initiation de la minéralisation par leur affinité avec les ions calcium (Paredes 2012).

2) La partie minérale

a. *La minéralisation*

Durant la dentinogenèse, les ions calciums sont transportés par les odontoblastes vers le front de minéralisation (Paredes 2012). Deux mécanismes ont été proposés pour ce transport (figure 7). Le premier serait que le calcium pourrait entrer dans l'odontoblaste par le biais de vésicules d'endocytose et migrer jusqu'au front de minéralisation. Le second serait que le calcium pénétrerait par le biais de canaux calciques et, pour être transporté, devrait se lier soit à des protéines de liaison du calcium (Calcium Binding Protein – CaBP), soit à des protéines de la membrane cellulaire (annexines) (Farges 2012).

La sortie de l'odontoblaste dépendrait du lieu de minéralisation. Si elle a lieu au niveau du manteau dentinaire, entre les fibrilles d'ancrage, le calcium serait stocké dans des vésicules matricielles formées à partir de la membrane plasmique des prolongements odontoblastiques. Pour la dentine se formant autour des prolongements odontoblastiques, le calcium serait directement transféré dans la dentine par le biais de Ca-ATPases ou d'échangeur calcium/sodium (Farges 2012).

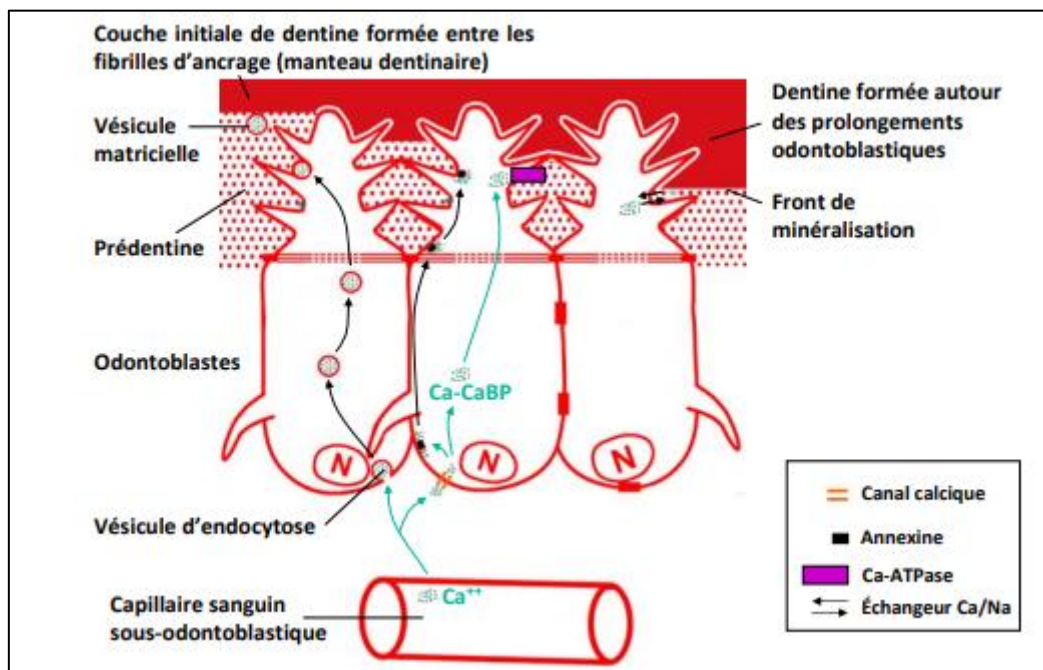


Figure 7 : le transport du calcium vers le site de minéralisation (d'après Farges 2012)

En résumé, les vésicules matricielles contiennent un ensemble de protéoglycanes, de phospholipides et de protéines non collagéniques qui lient le calcium et permettent l'initiation

et la croissance de la phase minérale. La formation de la dentine circumpulpaire se produit au sein des odontoblastes, de la prédentine et de la dentine. Les PG-PD interviennent pour la fibrillation du collagène et l'extension jusqu'à la jonction prédentine/dentine où les PG et les protéines de la famille SIBLING vont contribuer à la formation de la dentine intertubulaire. Au niveau du front de minéralisation, l'apatite va se lier aux fibres de collagène et former un maillage constituant la structure du tissu. A cette étape, les cristaux d'hydroxyapatite pourront être enrobés de phosphoprotéines et de protéoglycanes. La formation de la dentine périrtubulaire provient d'une diffusion entre les odontoblastes d'un complexe phospholipides-protéoglycane-protéines non collagéniques et de calcium (Gotliv et Veis 2007 ; Goldberg *et al.* 2011 ; Farges 2012).

b. La composition

La phase minérale de la dentine est composée de cristaux d'hydroxyapatite, constitués d'ions calcium et d'ions phosphates. Le composé $(\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6)$ est considéré comme un modèle idéal d'apatite cristallisé dans les matériaux biologiques tels que l'os et la dent (Zapanta LeGeros 1981 ; Rey *et al.* 2007) ; cependant il existe une grande quantité de modèles, en fonction des substitutions ioniques (CO_3^{2-} , F⁻, Mg^{2+} et Na^+ par exemple) et des postes vacants cationiques et anioniques (Rey *et al.* 2007). La formule utilisée pour tenir compte de ces variations est : $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y})(\text{CO}_3)_{x+y}$, ($0 \leq x \leq 6$, $0 \leq y \leq 2$) (Xu et Wang 2012).

Ces substitutions ou espèces mineures vont jouer un rôle dans la morphologie et les propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite, mais également dans les réponses biologiques du tissu. Par exemple, les carbonates influent sur la croissance des cristaux, le sodium sur le remodelage et le fluor et le magnésium sur le développement des caries (Zapanta LeGeros 1981 ; Laurencin *et al.* 2011).

c. La structure des cristaux

En fonction de la localisation dans la dentine, les cristaux vont présenter une forme différente. A proximité de la pulpe, ils prennent la forme d'aiguilles (mesurant entre 3 et 5 nm) et la forme de plaques (mesurant entre 20 à 100 nm) à proximité de la jonction avec l'émail (Kinney *et al.* 2001 ; Vennat 2009). Concernant la formation des cristaux, Kinney *et al.* suggèrent qu'ils sont nucléés dans les lacunes de collagène, c'est-à-dire dans les espaces entre les molécules de tropocollagène. Au fur et à mesure de la maturation, les aiguilles vont s'allonger et fusionner

pour former les plaques (Kinney *et al.* 2001). Tsurumachi *et al.*, ont précisé que la minéralisation était en lien avec la formation, la croissance puis la fusion de centres de calcifications (calcosphérites) se poursuivant tout au long de la vie, mais présentant un aspect différent en fonction de l'âge (Tsurumachi *et al.* 2008). L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la dentine leur a permis de décrire six aspects de minéralisation à proximité de la chambre pulpaire (figure 8) : le type 1 correspondant aux calcosphérites partiellement fusionnés, le type 2 de calcosphérites quasi-entièrement ou entièrement fusionnés, le type 3 présentant un aspect en réseau, le type 4 présentant un aspect en forme de crêtes, le type 5 présentant un aspect sphérique et le type 6 présentant un aspect sans structure. Ils ont ensuite identifié que les différents types de minéralisation observés variaient en fonction de l'âge des sujets. Dans le groupe des sujets jeunes (de 9 à 19 ans), les types 1 et 2 étaient majoritaires le long de la pulpe et les types 2 et 3 étaient retrouvés à l'apex, remplaçant peu à peu le type 1. Chez les sujets âgés (de 43 à 62 ans), les types 1 et 2 étaient retrouvés à proximité de la chambre pulpaire, mais remplacés en surface par les types 3 à 6 et par le type 4 à l'apex. Ils concluaient que les différences d'aspect des calcosphérites observés, en relation avec la localisation et l'âge, étaient en rapport avec le nombre d'odontoblastes formant les tubules. D'autres études ont également observé une diminution de la taille des cristaux d'hydroxyapatite avec l'âge du sujet (Kinney *et al.* 2005 ; Porter *et al.* 2005).

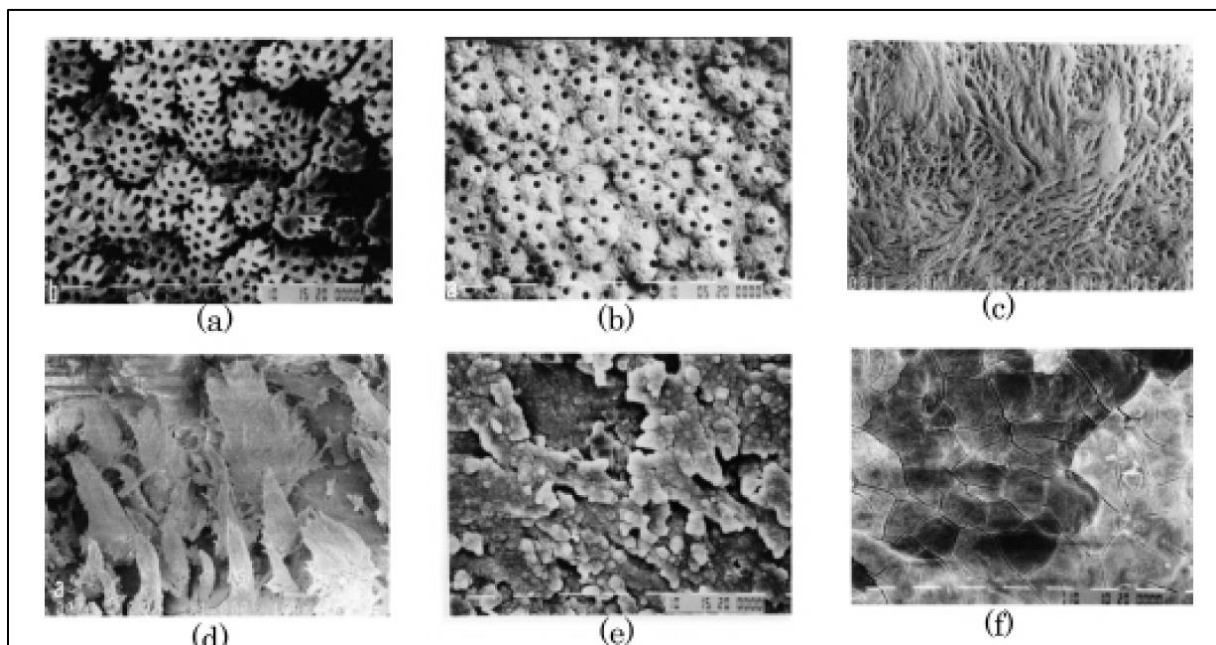


Figure 8 : aspect des calcosphérites au MEB (x1000) (d'après Tsurumachi *et al.* 2008)
 (a) calcosphérites partiellement fusionnés (type 1) – (b) calcosphérites quasi-entièrement ou entièrement fusionnés (type 2) – (c) aspect en réseau (type 3) – (d) aspect en crêtes (type 4) – (e) aspect sphérique (type 5) – (f) aspect sans structure (type 6)

3) Les tubules

Les tubules proviennent des prolongements odontoblastiques (Frank 1999 ; Vennat 2009). Ils sinuent à travers la dentine, de la pulpe vers le cément, rendant la membrane perméable, permettant une communication entre l'extérieur et l'intérieur de la dent (Carrigan *et al.* 1984 ; Linde et Goldberg 1993 ; Simon *et al.* 2009 ; Dumolié 2016) et le transfert de différents éléments (neurologiques, thermiques, chimiques et microbiens) (Mjör et Nordahl 1996). Lorsque les tubules sont ouverts, deux phénomènes opposés sont rencontrés (Linde et Goldberg 1993 ; Simon *et al.* 2009) : le phénomène de diffusion passive du milieu le plus concentré au milieu le moins concentré, particulièrement problématique vis-à-vis des contaminations bactériennes provenant de la salive, et la pression intra pulpaire qui pousse le fluide contenu dans les tubules vers l'extérieur.

Leur lumière est occupée notamment par un fluide dentinaire, dont la composition semble similaire à celle du sérum, contenant entre autres du sodium, du potassium et du chlore, provenant d'un exsudat cellulaire du parenchyme pulpaire (Simon *et al.* 2009). Après déminéralisation, il a également été observé une structure fibrineuse dense entourant les prolongements odontoblastiques appelée « *lamina limitans* » (Vennat 2009).

La répartition des tubules est variable selon leur localisation (Carrigan *et al.* 1984 ; Harran Ponce *et al.* 2001). Le nombre croît de la partie externe à la partie interne de la dentine. Ainsi, à proximité du cément, on dénombre environ 15 000 tubules par millimètre carré, 25 000/mm² dans la partie centrale et 55 000/mm² à proximité de la pulpe (Linde et Goldberg 1993 ; Mjör et Nordahl 1996). Dans la partie apicale, le nombre de tubules est le plus faible aux alentours de 8190/mm². Cette diminution serait en lien avec la formation accrue de dentine périlitubulaire (Carrigan *et al.* 1984). Le diamètre des tubules varie également en fonction de la localisation, allant de 0.8 µm à proximité de la jonction avec l'émail, jusqu'à 3 µm au contact de la pulpe (Garberoglio et Brännström 1976 ; Linde et Goldberg 1993 ; Vennat 2009). Ils sont espacés d'une distance variant entre 5 à 10 µm (Xu et Wang 2012).

Concernant leur organisation, entre les tubules qui forment les canaux principaux, il a été identifié trois types de ramification (Linde et Goldberg 1993 ; Mjör et Nordahl 1996) (figure 9). Les branches principales ou terminales, ont un diamètre entre 0.5 à 1 µm et sont organisées en « Y » en périphérie de la dentine. Les branches fines, qui ont un diamètre entre 300 et 700 nm, s'étendent à la périphérie selon un angle de 45° par rapport à la paroi des tubules, pénètrent

la dentine intertubulaire centrale et s'anastomosent souvent entre eux. Enfin, les microbranches, dont le diamètre est compris entre 25 à 200 nm, sont présentes dans l'ensemble du tissu dentinaire et de la dentine intertubulaire et périrtubulaire et sont organisées perpendiculairement aux tubules.

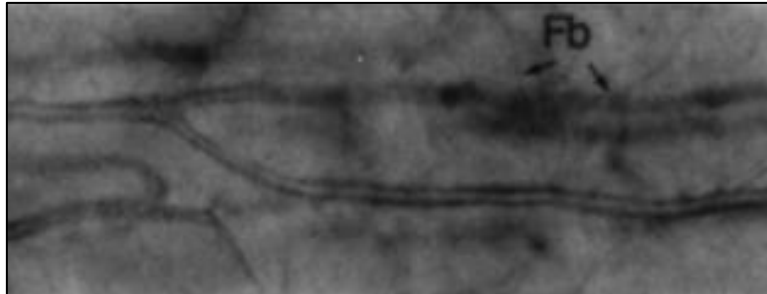


Figure 9 : aspect des tubules en MEB (d'après [Mjör et Nordahl 1996](#))
Branches principales avec fines branches (Fb) dans la dentine radiculaire déminéralisée

Après le décès, le corps humain et les tissus biologiques qui le composent, y compris la dent et la dentine, vont subir des altérations, variables en fonction du délai post-mortem écoulé.

III. Délai post-mortem

1) Définition et estimation précoce

Le délai post-mortem (DPM) se définit comme la période écoulée entre le décès et le moment de la découverte d'un corps et/ou de restes humains (Beauthier 2011).

L'estimation de ce délai peut revêtir une importance capitale dans les enquêtes pénales, confrontée aux données de l'enquête et aux différents témoignages recueillis dans le cadre de décès « récents » (corps « frais » ou en état de décomposition/momification), mais également vis-à-vis des délais de prescription dans le cas où le corps est en état de squelettisation (Le Garff 2018). Sur un corps « frais », le médecin légiste va se baser sur différents critères cliniques observables ou mesurables sur le corps, et notamment l'association de l'hypostase cadavérique, de la rigidité cadavérique et de la décroissance thermique (Beauthier 2011).

L'hypostase cadavérique ou *livor mortis* est un phénomène passif de stase sanguine dans le réseau veineux périphérique par un mécanisme hydrostatique, entraînant une dilatation vasculaire, une hémolyse et une transsudation, se traduisant par la présence de zones colorées (« *lie de vin* ») sur le corps. L'estimation du délai post-mortem va reposer sur le temps d'apparition de ces lividités (dans les trois premières heures après le décès), leur installation et leur mobilisation (jusqu'à 12 heures après le décès), leur fixation (c'est-à-dire l'absence de disparition à la pression digitale) et leur disparition (avec l'évolution des phénomènes putréfactifs).

La rigidité cadavérique ou *rigor mortis* repose sur les myofibrilles des cellules musculaires et les liaisons actine-myosine, tributaires de la présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de calcium (figure 10). Avec l'autolyse cellulaire, les ions calcium vont s'accumuler permettant la liaison de l'actine à la myosine à l'origine de la contraction musculaire et la réserve énergétique d'ATP va progressivement s'épuiser, empêchant ainsi la décontraction ; celle-ci n'apparaissant qu'avec la protéolyse bactérienne et la désorganisation moléculaire. Cette rigidité est perceptible en moyenne dès 3 heures après le décès, complète et maximale aux alentours de 6 à 12 heures, pour disparaître après 48 heures environ.

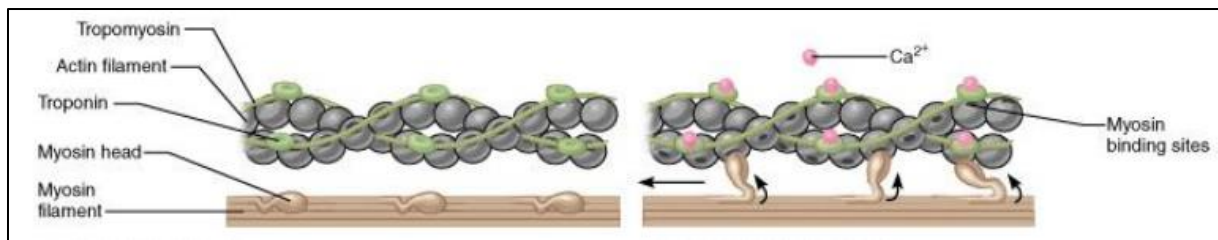


Figure 10 : repos (image de gauche) et contraction musculaire (image de droite)
(d'après [Cazorla 2004](#))

La décroissance thermique correspond à une diminution de la température centrale du corps tendant à être à l'équilibre avec la température de son environnement. La température du corps est généralement mesurée au niveau rectal et on décrit une phase de plateau initiale et terminale, avec une décroissance moyenne d'environ 1°C par heure. Le délai post-mortem est alors estimé à partir de formule ([Knight 1996](#)) ou d'abaque ([Henssge et Madea 2004](#)).

Cependant, les paramètres utilisés vont être influencés par de nombreux facteurs dépendants de l'individu (corpulence, température initiale, prise de substance, effort physique avant le décès, habillement, position) et de l'environnement (température, conditions atmosphériques et hygrométriques, accessibilité à la faune entomophage) rendant les estimations imprécises, définies par une fourchette de temps et nécessitant l'application de facteurs correctifs ([Beauthier 2011](#)).

2) Estimation des délais post-mortem intermédiaires

Au fur et à mesure du temps écoulé après le décès, le corps va subir différentes transformations également dépendantes de l'environnement dans lequel il se trouve : la décomposition, la momification et la transformation adipocireuse ([Beauthier 2011](#)).

- La décomposition repose sur l'association de l'autolyse et de la putréfaction. L'autolyse est un phénomène interne au corps correspondant à la rupture des membranes cellulaires et la putréfaction est en lien avec l'activité de micro-organismes endogènes (provenant essentiellement de la flore digestive) et exogènes, accélérée par l'intervention d'insectes nécrophages. Différents stades de décomposition ont été décrits en fonction du délai post-mortem débutant par la présence d'une tache verte abdominale (aux alentours de 2 jours après le décès), jusqu'à la disparition complète des tissus (en moyenne entre 12 à 18 mois).

- La momification correspond à la dessiccation du corps dans un environnement sec et ventilé, préférentiellement chaud, placé dans un endroit plutôt confiné, peu accessible aux insectes nécrophages. On observe généralement ce phénomène au niveau des extrémités du corps, associé à la putréfaction.
- La transformation adipocireuse résulte de la dégradation des graisses en présence d'eau et nécessite que le corps se trouve dans un milieu humide (le plus souvent un corps immergé).

L'ensemble de ces phénomènes, isolés ou associés entre eux, aboutira avec le temps, à la squelettisation du corps.

3) Estimation des délais post-mortem tardifs

Lorsque le corps est à l'état de squelettisation, l'estimation du délai post-mortem revêt un caractère complexe. Différentes techniques ont été développées sur les os, reposant sur l'étude macroscopique (Galloway *et al.* 1989), colorimétrique (Delannoy 2016), microscopique (Delannoy 2016), radio-isotopique (Capella *et al.* 2015), mais également sur les variations observées dans la phase organique par spectrométrie infra-rouge (Patonai *et al.* 2013) et minérale par diffractométrie aux rayons X (Person *et al.* 1995).

Cependant, peu d'études ont été réalisées pour estimer le délai post-mortem à partir du tissu dentaire.

a. Etude de Vavpotic et al.

Cet article s'intéresse au décompte du nombre d'odontoblastes dans la pulpe en fonction du délai post-mortem (Vavpotic *et al.* 2009).

L'étude a porté sur trente-deux corps humains âgés de 18 à 40 ans, dont les dents ne présentaient pas d'anomalie carieuse, pas de tartre ni de soins de restauration. Les maxillaires ont été extraits au moment de l'autopsie et placés dans un sac plastique ouvert, avec deux conditions de conservation : température ambiante de 23°C et réfrigération à 4.8°. Chaque jour, une dent de chaque individu a été extraite pour analyse. Après l'extraction des dents, celles-ci ont été préparées avec une solution fixatrice de formol dans le tissu pulpaire, puis décalcifiées et coupées longitudinalement en paraffine, avant coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, puis examinées au microscope optique pour réaliser un comptage des odontoblastes, en considérant que le premier échantillon de chaque cas représentait 100% des odontoblastes.

Les résultats retrouvaient une baisse moyenne de la densité des odontoblastes par heure de 130/mm² en température ambiante à 120/mm² en condition réfrigérée et il était conclu que le temps de persistance des odontoblastes ne dépassait pas 5 jours.

b. Etude de Yadav et al.

L'objectif de cette étude, était d'évaluer les changements épithéliaux (cytoplasmiques et nucléaires) et dégénératifs du tissu conjonctif gingival en post-mortem (Yadav et al. 2015).

Elle a porté sur trente et un prélèvements de corps non réfrigérés qui ont été divisés en trois sous-groupes : dix prélèvements de corps dont le délai post-mortem était inférieur à 8 heures, dix avec un délai post-mortem de 8 à 16 heures et onze avec un délai post-mortem de 16 à 24 heures. Les échantillons ont été fixés dans du formol, sectionnés et colorés à l'hématoxyline et à l'éosine, puis examinés au microscope optique.

Différents changements ont été observés avec une homogénéisation et une éosinophilie précoces, mais une vacuolisation cytoplasmique et des modifications nucléaires tardives, s'intensifiant avec le délai post-mortem.

c. Etude de Carrasco et al.

Cette étude comme celle de Vavpotic (Vavpotic et al. 2009), s'intéressait aux modifications dans la pulpe dentaire en fonction du délai post-mortem, mais en utilisant une nouvelle méthodologie et sur des intervalles plus longs de 24 heures à 6 mois (Carrasco et al. 2017).

L'étude a porté sur des troisièmes molaires (extraites pour des raisons orthodontiques) de sujets vivants, âgés de 20 à 40 ans. Il a été postulé que le jour de l'extraction s'apparentait au moment du décès. Les vingt-quatre dents ont été divisées en quatre sous-groupes de six échantillons chacun, analysés à différents intervalles post-mortem (24 heures, 1 mois, 3 mois et 6 mois), qui ont été stockés dans les mêmes conditions de laboratoire à température de 20°C. Cette fois les dents n'ont pas été fixées et sectionnées avant analyse, mais la pulpe a été préparée pour être extraite et analysée dans son entièreté avant fixation au formol et coloration histologique, puis observation au microscope optique.

Les résultats obtenus montraient une diminution du nombre de noyaux avec l'augmentation du délai post-mortem et une augmentation du pourcentage de fibres de collagène, avec des

différences significatives entre 24 heures et 6 mois, ainsi qu'entre 3 mois et 6 mois, permettant d'allonger l'estimation du délai post-mortem à partir de l'analyse histologique de la pulpe.

d. Etude de Bhuyan et al.

Cette étude est allée plus loin dans la caractérisation des modifications morphologiques et histologiques de la pulpe, en s'intéressant à un délai post-mortem jusqu'à 2 ans (Bhuyan *et al.* 2020).

Elle a porté sur quarante prémolaires non carieuses, extraites de sujets vivants pour des raisons orthodontiques, séparées en huit sous-groupes composés de cinq dents chacun, correspondant au délai post-mortem 24 heures, 48 heures, 72 heures, 1 mois, 3 mois, 6 mois, 1 an et 2 ans, après l'extraction. La méthodologie de préparation a été proche de celle de Carrasco (Carrasco *et al.* 2017).

Les modifications observées étaient d'ordre morphologique avec un changement de la coloration de la pulpe (entre 24 et 72 heures) et de sa consistance (molle à 72 heures, pour devenir sèche et friable au bout de 2 ans). L'examen au microscope optique retrouvait une dégénérescence des constituants de la pulpe jusqu'à 72 heures, puis un ralentissement au-delà d'un mois. Les modifications nucléaires augmentaient avec le délai post-mortem. Cette étude a permis d'allonger encore l'estimation du délai post-mortem à partir des modifications pulpaire.

Ces différentes études se sont intéressées à des critères morphologiques et/ou histologiques, mais ne concernaient que la pulpe dentaire et le tissu gingival. L'estimation du délai post-mortem à partir du tissu dentinaire qui est pourtant le plus volumineux, mais également celui étudié lors de l'estimation de l'âge du sujet au moment de son décès, n'a quant à lui pas fait l'objet d'étude. C'est pourtant un tissu évolutif, dont la composition à la fois organique et minérale en fait un matériau d'étude facile d'accès et propice à des investigations d'imagerie, chimique et cristallographique, qui pourrait permettre d'accéder à des estimations de délai post-mortem beaucoup plus long.

OBJECTIFS

Face aux modifications d'aspect et de consistance décrites sur des dents archéologiques, nous avons postulé qu'il pouvait exister des modifications structurales et/ou chimiques de la dentine sclérotique en fonction du délai post-mortem.

L'objectif de ce travail était d'observer d'éventuelles modifications de la partie minérale de la dentine sclérotique, compte-tenu de la part très importante qu'elle représente dans la composition de ce tissu, sur des dents humaines, à différents intervalles post-mortem.

L'objectif primaire était de proposer une méthodologie de préparation et d'analyse des échantillons en microscopie électronique à balayage, notamment du rapport phosphocalcique, ainsi qu'une analyse cristallographique en diffractométrie en rayons X.

L'objectif secondaire était d'effectuer des mesures répétées dans la dentine sclérotique d'échantillons provenant de plusieurs individus et de rechercher des variations sur la structure du tissu, dans sa composition chimique et/ou dans l'organisation des cristaux qui la compose, au cours du temps écoulé en post-mortem.

Afin de répondre aux objectifs fixés, le travail a été divisé en deux parties. La partie dite rétrospective sur des dents en possession du laboratoire, afin de mettre en place la méthodologie et une partie prospective pour laquelle des dents ont été collectées, conservées et analysées dans des conditions contrôlées et standardisées.

Le but de ce travail, à plus long terme, serait de pouvoir développer un modèle prédictif, à partir de mesures du rapport phosphocalcique, pour estimer un délai post-mortem.

MATERIEL ET METHODES

L'utilisation des échantillons biologiques respecte les réglementations en vigueur et suit les protocoles du laboratoire d'anatomie de la Faculté de Médecine de Lille pour l'utilisation d'échantillons biologiques issus des dons du corps à la science.

I. Population d'étude

L'étude a été réalisée sur vingt-quatre dents humaines monoradiculées (incisives, canines et prémolaires inférieures).

Le travail a été scindé en deux parties : une partie rétrospective et une partie prospective.

1) Partie rétrospective

Cette partie de l'étude a été effectuée sur six dents.

Trois dents provenaient de dons du corps à la science du Laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Lille. Il s'agissait d'une incisive d'un homme de 55 ans (dent 2), d'une canine d'une femme de 60 ans (dent 3) et d'une prémolaire inférieure d'une femme de 75 ans (dent 4). Ces dents avaient été extraites cinq ans avant le début de notre travail et avaient été placées individuellement dans des pots stériles, secs, fermés, puis conservées en milieu standard et contrôlé (20°C, 60% d'hygrométrie et une pression moyenne de 101.7 kPa sous hotte en laboratoire), selon un protocole établi dans le cadre d'autres études de l'Unité de Taphonomie Médico-Légale et Anatomie de l'Université de Lille ([Delannoy 2016](#) ; [Le Garff *et al.* 2017](#)).

Les trois autres dents (une incisive = dent D, une canine = dent C et une prémolaire = dent A) étaient datées du 18^{ème} siècle et provenaient de fouilles archéologiques effectuées dans la région Nord-Pas-de-Calais, obtenues par le biais de la section archéologie de la Communauté d'Agglomération du Douaisis.

Ces six dents qui avaient fait l'objet d'un travail préliminaire dans le cadre d'un Master 2 Recherche Biologie-Santé à l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille ([Marchand, 2015](#)) ont permis d'établir le protocole de préparation et d'analyse des échantillons et de vérifier la reproductibilité des analyses pour la partie prospective du travail.

2) Partie prospective

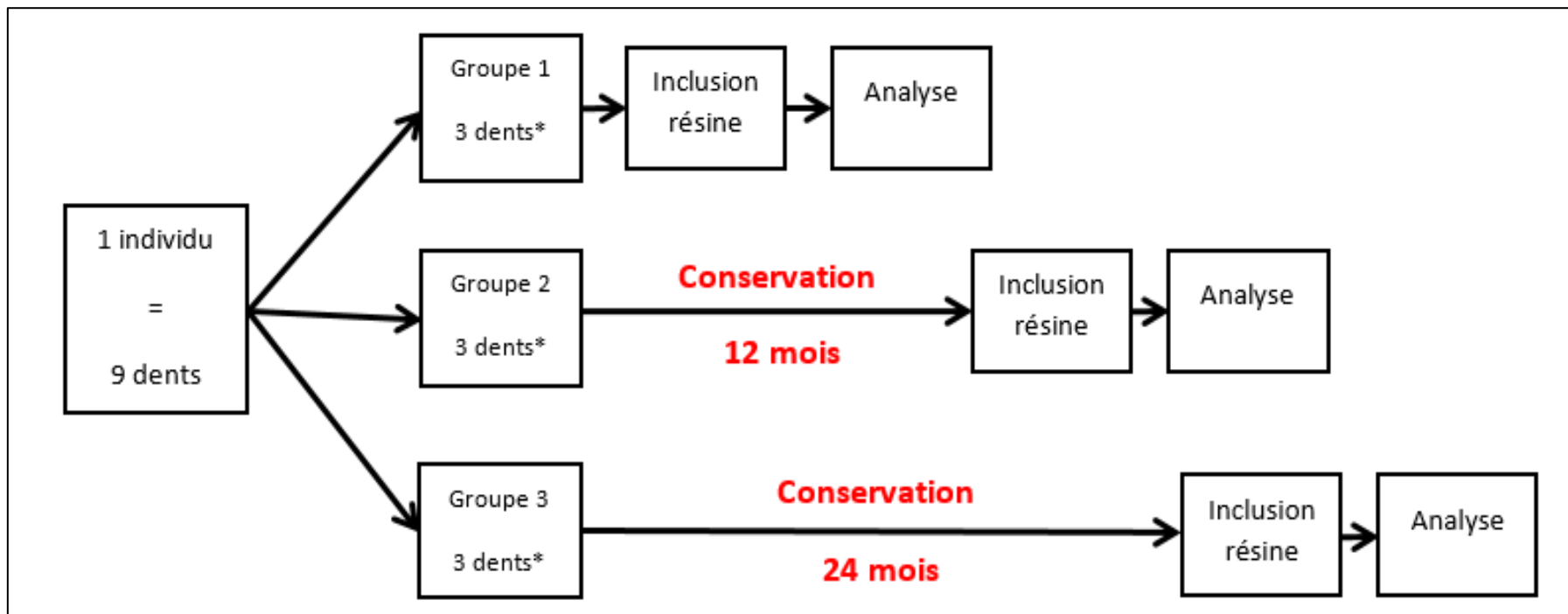
Pour cette partie de l'étude, dix-huit dents ont été extraites à partir de dons du corps à la science du Laboratoire d'Anatomie de la Faculté de Médecine de Lille.

A partir des formulaires déclaratifs du laboratoire, nous n'avons inclus que les sujets indemnes de pathologie cancéreuse, hormonale et nutritionnelle. Les dents ont été prélevées uniquement sur les sujets ne présentant pas de pathologie gingivale et ont été exclues si au moment de l'extraction, elles présentaient une anomalie morphologique (fracture, carie par exemple). De plus, les corps ne devaient avoir subi aucune congélation ni soin de conservation avant l'avulsion dentaire.

Ainsi, neuf dents (trois incisives = A2, A5, A3 ; trois canines = A1, A6, A4 et trois prémolaires = A9, A8, A10) ont été extraites d'un homme de 75 ans (sujet A) et neuf dents (trois incisives = C5, C2, C4 ; trois canines = C3, C8, C10 et trois prémolaires = C12, C11, C13) d'une femme de 92 ans (sujet C), par un odontologiste confirmé dès leur arrivée au laboratoire d'anatomie.

Les dents ont ensuite été séparées en trois groupes (figure 11). Immédiatement après l'extraction, trois dents pour chaque individu, ont été incluses en résine (groupe 1 composé de A2, A1 et A9 pour le sujet A et de C5, C3 et C12 pour le sujet C). Les autres dents extraites ont été placées individuellement dans des pots stériles, secs, fermés, puis conservées en milieu standard et contrôlé dans les mêmes conditions que celles dans lesquelles les dents de délai post-mortem 5 ans (dents 2, 3 et 4) avaient été conservées (20°C, 60% d'hygrométrie et une pression moyenne de 101.7 kPa sous hotte en laboratoire) (Delannoy 2016 ; Le Garff *et al.* 2017). A 12 mois de l'avulsion, un second groupe de trois dents provenant de chaque individu a été analysé (groupe 2 composé de A5, A6 et A8 pour le sujet A et de C2, C8 et C11 pour le sujet C). Le troisième groupe de dents a été analysé à 24 mois de l'avulsion (groupe 3 composé de A3, A4 et A10 pour le sujet A et de C4, C10 et C13 pour le sujet C).

Dans chaque groupe, les trois dents incluses pour chaque individu étaient une incisive, une canine et une prémolaire issues des maxillaires, supérieur et/ou inférieur.



**Les trois dents correspondent à une incisive, une canine et une prémolaire issues des maxillaires supérieur et/ou inférieur*

Figure 11 : protocole d'analyse de la partie prospective pour un individu

II. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons a été réalisée au sein de l'Unité de Taphonomie Médico-Légale et d'Anatomie de l'Université de Lille (ULR 7367).

1) Inclusion en résine

Avant l'analyse, afin de consolider l'échantillon pour les phases de coupe et de polissage, chaque dent a été incluse, dans un moule en silicone rempli d'un mélange de résine époxy et de durcisseur, Araldite AY 103 (Hunstman advanced materials, Basel, Suisse). Les proportions utilisées ont été celles recommandées par le fabricant, soit un dosage en poids de 100 (résine) pour 20 (durcisseur).

La dent incluse a ensuite été placée dans une pièce à 20°C jusqu'à l'obtention d'un durcissement complet, survenant après 48 heures.

2) Coupe

Après durcissement complet, chaque dent a été sectionnée en deux longitudinalement, puis transversalement, en préservant la zone de la dentine sclérotique (figure 12). Les sections ont été réalisées avec une scie à basse vitesse IsoMet®LS (Buehler, Illinois, États-Unis) composée d'une lame diamantée. La taille finale de chaque échantillon était de 1cmx1cmx0.5 cm.



Figure 12 : exemple d'une dent incluse en résine (à gauche), puis sectionnée longitudinalement (centre) et enfin sectionnée transversalement (à droite)

3) Polissage

Chaque section d'échantillon a été polie manuellement avec une granulométrie de plus en plus fine sur une polisseuse 1.03.20 (Brot technologies®, Argenteuil, France). Plusieurs étapes successives ont été réalisées avec des disques abrasifs en carbure de silicium de granulométrie respectivement de P600, P800, P1000 et P1200 (DP 250 AC, Brot technologies®, Argenteuil, France), puis deux étapes ont été réalisées avec des disques feutrés et une solution d'alumine, dont les granulométries étaient de 2 μm et 0.5 μm .

Le polissage avec les disques abrasifs était effectué dans une direction permettant de faire apparaître des stries. A l'étape suivante l'échantillon était poli dans une direction perpendiculaire à ces stries. La qualité du polissage a été contrôlée au microscope optique LaboVal 4 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne), en s'assurant que toutes les stries avaient changé d'orientation avant de changer de granulométrie.

Pour les disques feutrés, les contrôles reposaient sur la disparition des stries de polissage et l'apparition d'un « *effet miroir* ».

A l'issue, afin d'éliminer les particules résiduelles, chaque échantillon a été immergé séparément pendant 20 minutes dans un bain d'ultrasons Elmasonic S10 (Elma ultrasonic, Singen, Allemagne).

III. Analyse

Pour répondre à l'objectif de ce travail sur l'étude de la partie minérale de la dentine sclérotique, nous avons décidé d'étudier les dents sur trois aspects :

- *Structural* au microscope électronique à balayage (MEB), permettant d'observer la morphologie, l'organisation et l'ouverture des tubules de la dentine ;
- *Chimique* en couplant au MEB une analyse en spectrométrie à sélection d'énergie en rayons X, afin de réaliser des mesures semi-quantitatives du rapport phosphocalcique et la détection d'une variation d'autres éléments chimiques ;
- *Cristallographique* au diffractomètre en rayons X, pour effectuer une caractérisation des cristaux, ainsi que du degré de cristallinité.

1) Imagerie en Microscopie Electronique à Balayage

a. Principe de fonctionnement

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie basée sur les interactions entre des électrons et la matière (Marteau 2013). Un faisceau fin d'électrons va balayer la surface d'un échantillon, qui va lui-même réémettre des particules. Celles-ci vont être captées par un détecteur qui va les analyser et ainsi permettre la reconstruction d'une image de la surface (Marteau 2013 ; Alqaheem et Alomair 2020).

La structuration d'un MEB est illustrée sur la figure 13. Il se compose d'un canon (1) qui produit le faisceau d'électrons par effet thermoélectrique (filament de tungstène ou monocristal de Lanthane Hexaboride), d'une colonne maintenue sous vide dans laquelle se trouve des lentilles (2) permettant la mise en forme du faisceau et sa focalisation sur l'échantillon, d'un porte échantillon et de détecteurs (d'électrons rétrodiffusés et d'électrons secondaires) couplés à un amplificateur de signal (3) permettant la visualisation des images sur un écran d'ordinateur (Maniguet *et al.* 2009 ; Marteau 2013).

Le résultat de l'image obtenu va dépendre du contraste (c'est-à-dire la façon dont le faisceau incident va interagir avec le matériel étudié) qui est influencé par la topographie, la structure et la composition de l'échantillon ; ainsi que du grandissement (taille du champ observé) déterminé par le rapport entre la surface de l'échantillon balayée par le faisceau d'électrons et la dimension de l'image obtenue sur l'écran de visualisation (Faerber 2004).

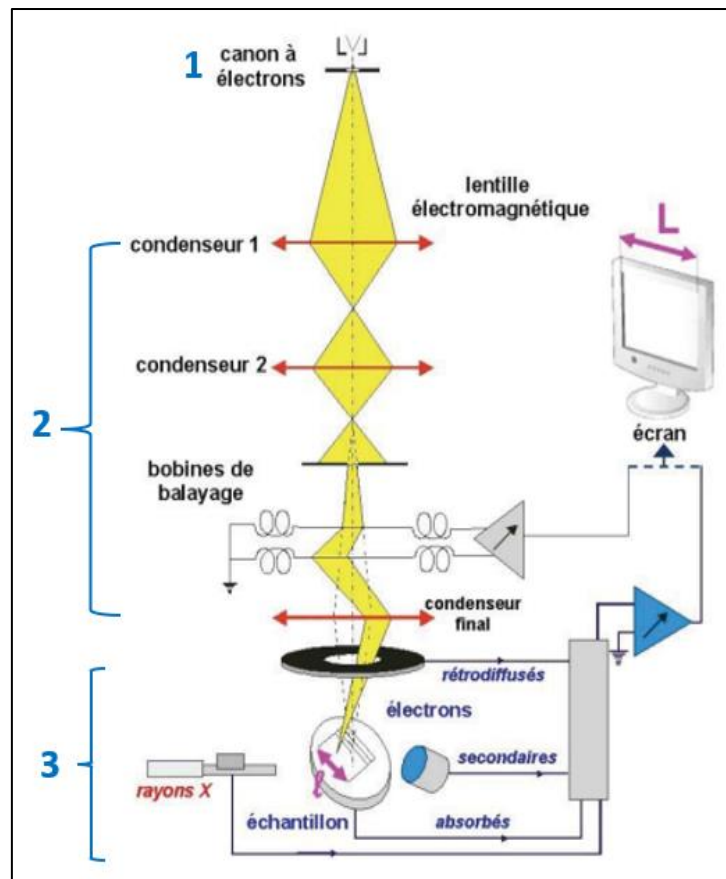


Figure 13 : schéma du principe de fonctionnement du microscope électronique à balayage (d'après Maniguet *et al.* 2009)

b. Les types d'émission

Lors de l'interaction entre les électrons et la matière, le faisceau d'électron primaire (faisceau incident), va extraire au point d'impact simultanément, différents rayonnements et notamment (Faerber 2004 ; Maniguet *et al.* 2009 ; Marteau 2013) (figure 14) :

- les électrons secondaires (ES) qui proviennent de chocs inélastiques entre les électrons primaires et ceux des atomes de l'échantillon qui sont arrachés par ionisation. Ces électrons proviennent de la surface de l'échantillon, d'une profondeur inférieure à 10 nm, permettant d'obtenir l'image en très bonne définition. Leur quantité varie en fonction de la topographie ;
- les électrons rétrodiffusés (ERD) qui proviennent de chocs élastiques entre les électrons primaires et les noyaux des atomes. Ils sont plus énergétiques que les électrons secondaires et sont issus d'une partie plus profonde de l'échantillon, permettant d'obtenir le contraste. Leur quantité croît avec le numéro atomique des atomes constitutifs de la matière analysée et varie en fonction de la topographie ;

- un rayonnement X (RX), provenant d'électrons arrachés sur les couches électroniques des atomes constituant la matière. Il est issu d'une zone encore plus profonde de l'échantillon (en lien avec la réorganisation des électrons), dont l'énergie est caractéristique de chaque élément qui les a émis, permettant d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon (microanalyse).

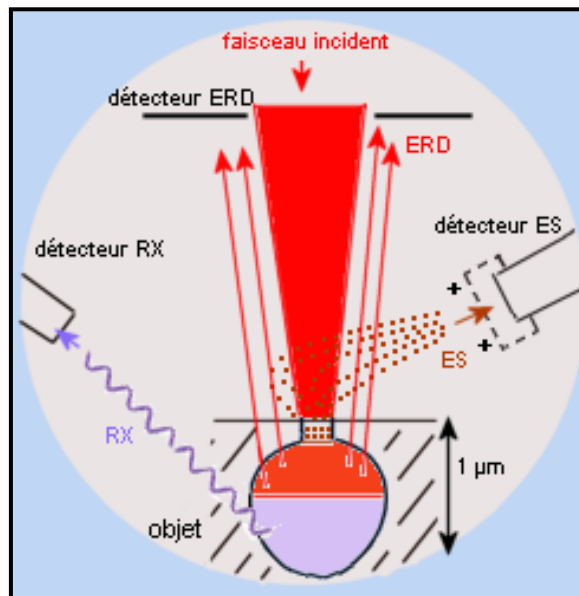


Figure 14 : Interactions entre le faisceau incident et l'échantillon au microscope électronique à balayage (d'après Auclair 2016)

c. Avantages et limites

Cette technique présente de nombreux avantages. En effet, elle permet d'obtenir à la fois des images de surface, mais également un contraste de profondeur, sur tous les matériaux solides, quelle que soit leur nature (métallique, biologiques, isolants...). Elle présente une excellente résolution allant jusqu'à un grossissement de 500 000 selon les appareils (Alquaheem et Alomair 2020). Enfin, avec un détecteur à rayons X, il est possible de réaliser une cartographie élémentaire du matériau étudié, de façon rapide (entre 100 secondes à 1 heure en fonction de l'étude réalisée) (Marteau 2013).

Elle présente néanmoins quelques contraintes. Tout d'abord l'appareil fonctionne sous vide poussé, ce qui nécessite que l'échantillon analysé puisse supporter ce vide, sans se dégrader ni le dégrader. Il faut donc une préparation préalable en fonction de sa nature (déshydratation ou nettoyage) (Fischer *et al.* 2012). Ensuite, l'échantillon doit être conducteur pour permettre l'écoulement des charges. Pour cela, une préparation en amont peut être nécessaire, par

pulvérisation cathodique d'une mince couche métallique tel que le chrome ou d'une couche de carbone par évaporation thermique (Alqaheem et Alomair 2020). Enfin, il existe une contrainte thermique liée à la dissipation du faisceau d'électrons primaires en chaleur qui peut aboutir à des modifications de la matière voire à sa destruction. Il s'agit donc de tester les conditions limites de tension et de courant avant de débiter l'analyse à proprement parler (Faerber 2004).

De ce fait, le MEB est une technique d'imagerie qui a déjà été utilisée pour étudier la structure du tissu dentinaire, tel que les tubules (Garberoglio et Brännström 1976), le réseau fibrillaire entre les processus odontoblastiques et les tubules (Garces-Ortiz et al 2015), les fibres de collagène (Vennat 2009) ou encore l'aspect général en fonction de l'âge (Tsurumachi et al. 2008). Il n'existe cependant pas d'étude s'étant intéressée à l'aspect structural de la dentine sclérotique en post-mortem, à différents intervalles.

d. Microscopie électronique à balayage dans notre étude

L'étude au microscope électronique à balayage a été réalisée au sein de l'Unité Matériaux Et Transformations (UMET), CNRS UMR 8207, de l'Université de Lille. Ce laboratoire composé de six équipes, travaille sur la science des matériaux d'application industrielle ou thérapeutique. Leur champ d'étude est varié, en interaction avec de multiples disciplines (géologie, pharmacologie, santé, mécanique...). Les thématiques de recherche concernent l'ingénierie des systèmes polymères, l'état physique des matériaux moléculaires et thérapeutiques, la métallurgie physique, mécanique et numérique, les matériaux terrestres et planétaires, la plasticité, le recyclage et la fonctionnalisation des matériaux et les phénomènes bio-adhésifs lors de la transformation des matériaux issus de l'agriculture. Ils ont dans leur locaux différents appareils et notamment la plateforme de microscopie électronique (PMEL) composée de deux microscopes électroniques à transmission, de trois microscopes électroniques à balayage et d'une microsonde électronique, ainsi que de tous les équipements permettant la préparation des échantillons (microtomes, ultramicrotomes, système de polissage...). Cette plateforme est ouverte à des collaborations nationales et internationales pour l'expertise de la caractérisation de tous types de matériaux ([site internet de l'UMET](#) ; [site internet de la PMEL](#)).

Avant l'analyse au Microscope Electronique à Balayage (MEB), il a fallu rendre conducteurs les échantillons biologiques utilisés. Nous avons réalisé une étape de métallisation en déposant une fine couche de métal conducteur (chrome) par pulvérisation (PECS, Gatan, Pleasanton, USA).

Après métallisation au chrome, les échantillons ont été analysés dans un MEB (JSM-7800F, JEOL, Tokyo, Japon) à une tension de 5 kV (figure 15). Les observations ont été réalisées en électrons secondaires, puis en électrons rétrodiffusés.



Figure 15 : photographie du microscope électronique à balayage JSM-7800F, JEOL utilisé dans notre étude (d'après le [site internet de la PMEL](#))

Pour chaque échantillon, trois zones d'étude et d'analyse ont été sélectionnées dans la dentine sclérotique (figure 16) :

- La *zone apicale* (zone A), définie comme la zone s'étendant de l'apex jusqu'à la pointe de la pulpe ;
- La *zone* située à proximité de la jonction *cément-dentine* (zone B) pour l'étude de l'influence de l'environnement ;
- La *zone* située à proximité de la jonction *dentine-pulpe* (zone C), pour l'étude de l'influence de facteurs internes.

Dans les zones de jonction, la distance de référence a été prise à la moitié de la hauteur de la partie de la racine étudiée, correspondant à la dentine sclérotique (zone bleue), pour chaque échantillon.

Les observations ont toutes été réalisées par le même observateur avec des grossissements allant de x300 à x20 000.

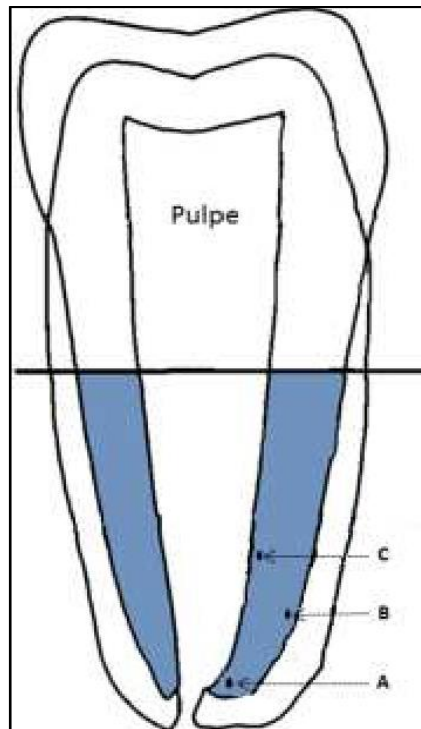


Figure 16 : représentation schématique des zones d'analyses dans la dentine sclérotique (zone bleue) : apex (A), proximité cément-dentine (B) et proximité pulpe-dentine (C)

2) La spectrométrie à sélection d'énergie

a. Principe de fonctionnement

La spectrométrie à sélection d'énergie ou Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) est utilisée dans un microscope électronique à balayage pour réaliser une analyse élémentaire de la composition d'un échantillon (Faerber 2004). Elle repose sur la détection des rayons X que nous avons précédemment décrits qui sont caractéristiques des éléments présents.

Elle se compose d'une diode silicium-lithium et d'un détecteur permettant de classer les photons X en fonction de leur énergie. Cette analyse peut se faire soit par le biais d'une cartographie, sur une zone de quelques micromètres à quelques millimètres ou d'une analyse ponctuelle choisie par l'utilisation. L'analyse peut se faire sur un échantillon solide ou sous forme de poudre. La détection des éléments présents correspond à l'analyse qualitative et l'intensité des raies mesurées par le spectromètre permet de déterminer la concentration de l'élément dans l'échantillon analysé. Cette analyse chimique peut être semi-quantitative avec normalisation des intensités ou quantitative en comparant les intensités des raies avec des standards dont la composition est connue (Faerber 2004).

b. Avantages et limites

L'avantage principal de cette technique repose sur le fait qu'elle ne nécessite pas de préparation complémentaire à celle effectuée pour l'analyse en microscopie électronique à balayage et qu'elle se réalise donc dans le même temps et sur une durée d'acquisition assez courte en fonction de la surface choisie. En contrepartie, la qualité de la microanalyse va dépendre, tout comme l'imagerie au MEB, de la préparation de l'échantillon et notamment de la qualité du polissage et de sa conductibilité (Faerber 2004 ; Marteau 2013).

La contrainte de tension précédemment décrite lors de l'analyse en microscopie électronique à balayage, va également exercer une influence sur l'analyse EDS-X, où certains éléments peuvent se confondre et nécessitent une tension plus élevée pour se distinguer. En outre, les éléments dont le numéro atomique est inférieur à 5 (bore) ou 11 (sodium), en fonction des caractéristiques de l'analyseur, ne sont pas détectables, ni ceux qui se trouveraient en trop faible quantité (Faerber 2004 ; Marteau 2013).

c. Spectrométrie à sélection d'énergie dans notre étude

Dans chaque zone d'étude nous avons effectué une cartographie par microanalyse par spectrométrie à sélection d'énergie en rayons X (AZtec, Oxford instruments, Abington, Royaume-Uni). Ces analyses ont été réalisées avec une tension de faisceau de 10 kV.

Pour chaque dent, trente mesures (surface de 5 μ m x 5 μ m) ont été faites dans chaque zone étudiée, soit quatre-vingt-dix mesures au total par échantillon, pour moitié dans la dentine péritubulaire et pour moitié dans la dentine intertubulaire.

La phase minérale de la dentine étant en majorité composée de cristaux d'hydroxyapatite carbonatée, nous avons effectué des mesures semi-quantitatives du calcium et du phosphore. Ces mesures ont été complétées par une recherche large d'autres éléments chimiques à partir du tableau périodique des éléments. Un exemple de cartographie d'une zone d'étude et du spectre correspondant est présenté sur la figure 17.

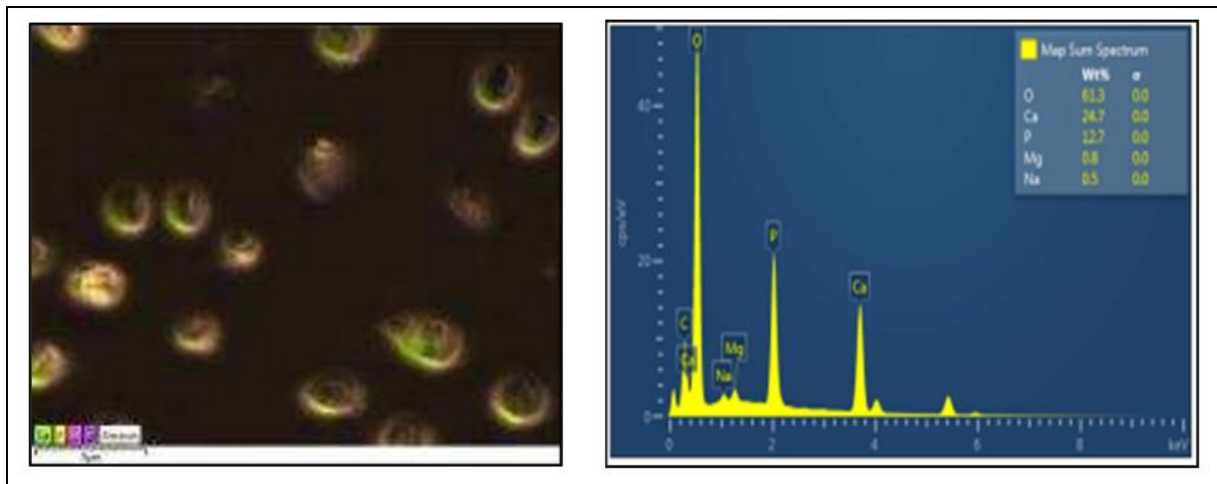


Figure 17 : exemple d'une cartographie au MEB par sonde EDS-X et son spectre

d. Analyses statistiques

Les résultats des microanalyses ont été saisis dans une base de données (Microsoft Excel, Redmond, USA). Pour l'analyse statistique de ces données, nous avons travaillé avec un professeur du laboratoire METRICS, ULR 2694 de l'Université de Lille. Il s'agit d'une équipe de recherche pluridisciplinaire en Santé Publique travaillant dans les domaines de l'ergonomie, des biostatistiques, de l'informatique médicale, des sciences de la donnée et de l'économie de la santé ([site internet de METRICS](#)).

Nous avons analysé séparément les données des parties rétrospective et prospective de l'étude. Pour chaque partie, la distribution du rapport phosphocalcique, du sodium et du magnésium a été analysée avec le logiciel R (R Core Team, Vienne, Autriche).

Une analyse de variance multivariée (ANOVA) a été réalisée pour analyser la part de variance expliquée pour chaque facteur (type de dent, zone d'analyse et délai post mortem). Pour la partie prospective de l'étude, nous avons réalisé deux tests de corrélation (Pearson et Spearman) afin d'identifier un contexte où le rapport phosphocalcique pouvait prédire au mieux le délai post-mortem. La corrélation était considérée comme absente si r ou r_s était inférieur à 0.1 ou -0.1, faible si comprise entre 0.1 et 0.3 ou -0.1 et -0.3, modéré si comprise entre 0.3 et 0.5 ou -0.3 et -0.5 et forte entre 0.5 et 1 ou -0.5 et -1.

3) Diffraction en rayons X

a. Principe de fonctionnement

La diffraction en rayons X ou DRX permet d'étudier la structure cristalline d'un échantillon. Des rayons X vont être émis par une anode (en cuivre ou en molybdène), bombardée par des électrons provenant d'un filament de tungstène chauffé électriquement, accélérés par un champ électrique (Aronica et Jeanneau 2009), qui va former un faisceau entrant en contact avec l'échantillon étudié de nature cristallographique.

Un cristal est une répétition d'atomes ou de molécules (nœuds), assemblés dans les trois dimensions de l'espace pour former une maille élémentaire. Cette répartition va constituer des plans parallèles et équidistants nommés des plans réticulaires (passant par le centre des nœuds), repérés par les indices de Miller (notés hkl) (Aronica et Jeanneau 2009).

Comme représenté sur la figure 18, certains des rayons X vont traverser l'échantillon tandis que d'autres vont être diffractés (k') dans une direction donnée par chacune des familles des plans réticulaires, lorsque la loi de Bragg est respectée : $2d_{hkl} = \lambda \sin 2\theta$ où λ est la longueur d'onde, θ l'angle du rayon incident (k) avec la surface de l'échantillon et d_{hkl} est la distance interréticulaire entre plans d'une même famille hkl (Marteau 2013 ; Serna *et al.* 2014 ; Alqaheem et Alomair 2020).

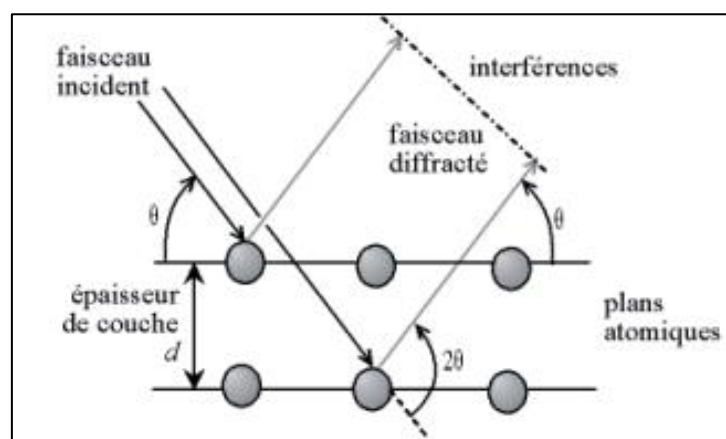


Figure 18 : Interactions entre le faisceau incident et une famille de plans réticulaires espacés d'une distance d (d'après Serna *et al.* 2014)

Il est donc admis que seuls les plans cristallins respectant cette loi vont induire une diffraction, qui sera mesurée par la variation de l'intensité en fonction de l'angle réalisé (Marteau 2013 ; Alqaheem et Alomair 2020). Ainsi, pour analyser l'ensemble de l'échantillon, il sera nécessaire

d'effectuer des rotations d'angle et leur valeur permettra de définir la distance interréticulaire entre les plans.

Un diffractomètre (figure 19) est composé d'un tube à rayons X, de différentes fentes de Soller, de fentes de divergence pour garder une surface constante d'irradiation de l'échantillon, de fentes d'antidiffusion pour minimiser les radiations et d'un détecteur (Serna *et al.* 2014).

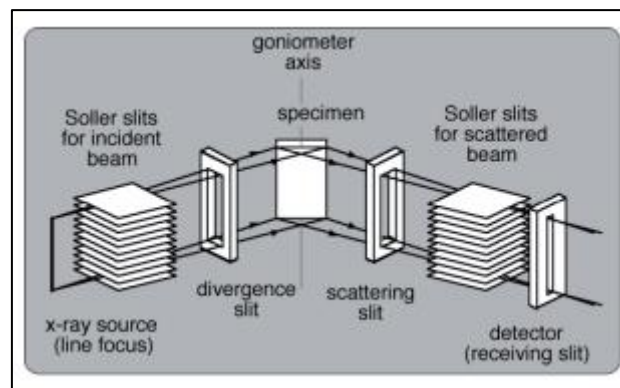


Figure 19 : Composition d'un diffractomètre (d'après Serna *et al.* 2014)

Les données analysées sont représentées sur un diffractogramme où apparaissent des pics dont la hauteur correspond à l'intensité et la position à l'angle de diffraction des différents atomes composant l'échantillon et comparés à des bases de référence pour déterminer la composition du cristal analysé.

b. Avantages et limites

La diffraction en rayons X à l'avantage d'être une technique non destructrice, permettant une analyse des échantillons sous forme solide ou de poudre (Aronica et Jeanneau 2009 ; Serna *et al.* 2014 ; Alqaheem et Alomair 2020).

Cependant l'optimisation de l'analyse en diffraction en rayons X nécessite une très bonne connaissance de la technique pour éviter l'obtention de résultats faussés. En effet, la rugosité de la surface de l'échantillon peut provoquer des atténuations de l'intensité du rayon diffracté, nécessitant une attention particulière, tout comme la microscopie électronique à balayage, dans la préparation des échantillons. De plus certains échantillons vont présenter des orientations préférentielles de diffraction, soit naturellement par l'organisation des cristaux, soit consécutivement à la préparation, ce qui peut modifier les valeurs d'intensité relative des pics et fausser les données obtenues. Enfin, nous pouvons obtenir des pics asymétriques, en rapport

avec un mauvais positionnement de l'échantillon ou d'alignement du diffractomètre (Gravereau 2012).

La diffraction en rayons X est une technique qui a été utilisée en dentaire pour caractériser la structure cristalline des dents (Egan *et al.* 2013), dans l'émail et la dentine (Hanlie *et al.* 2006 ; Xue *et al.* 2013), en fonction de l'âge (Leventouri *et al.* 2009 ; Panfilov *et al.* 2016). Cependant, bien qu'elle ait été utilisée pour étudier les modifications de cristallinité de l'os entre les altérations diagenétiques et les altérations thermiques pour une applicabilité aux ossements archéologiques (Rogers *et al.* 2010), son application dentaire en post-mortem n'a pas été publiée.

c. Diffraction en rayons X dans notre étude

L'étude de diffraction en rayons X a été réalisée au sein de l'Unité de Catalyse et Chimie du Solide (UCCS), UMR 8181, de l'Université de Lille. Ce laboratoire effectue des recherches sur l'énergie, l'environnement et le développement durable, au travers de trois axes scientifiques : la catalyse et chimie moléculaire, la catalyse hétérogène et la chimie du solide. Il dispose de multiples ressources techniques, tel qu'un plateau de spectroscopie vibrationnelle, un plateau d'analyses thermiques et texturales, un plateau matériaux pour l'énergie, un plateau matériaux pour le nucléaire et un hall pilote de catalyse. Ils ont également à leur disposition des appareils de résonance magnétique nucléaire, de criblage catalytique de haut débit et d'analyse par diffraction en rayons X. Cette plateforme est ouverte à des collaborations nationales et internationales ([site internet de l'UCCS](#)).

La préparation des échantillons pour cette analyse n'a pas été réalisée par l'auteur de ce travail, cela nécessitant une connaissance technique pour l'obtention de résultats exploitables.

Avant l'analyse en diffractométrie en rayons X, les échantillons ont de nouveau été polis selon le même protocole que décrit précédemment, pour retirer la couche de dépôt de chrome pulvérisée pour l'analyse en microscopie électronique à balayage.

Les échantillons ont été analysés dans un diffractomètre en rayons X à anode tournante (SmartLab, Rigaku, Tokyo, Japon) (figure 20). L'analyse a été réalisée sur couches minces en réflexion puis en transmission (figure 21).



Figure 20 : photographie du diffractomètre en rayons X SmartLab, Rigaku utilisé dans notre étude (d'après le [site internet de l'UCCS](#))

Le traitement des données obtenues a été réalisé à l'aide du logiciel propre au diffractomètre utilisé afin d'obtenir des spectres représentatifs pour chaque délai post-mortem étudié (0 an, 1 an, 2 ans, 5 ans et archéologique). Le niveau de cristallinité a été comparé par rapport à l'intensité des pics observés.

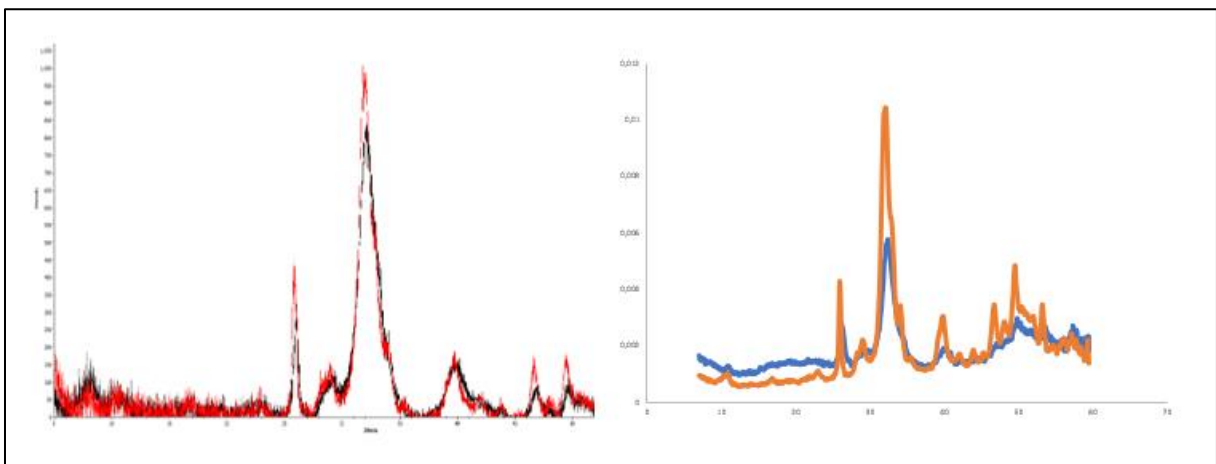


Figure 21 : exemple de diffractomètre en réflexion (à gauche) et en transmission (à droite)

RESULTATS

I. Imagerie en microscopie électronique à balayage

Lors de l'analyse des échantillons en microscopie électronique à balayage, nous avons observé que le tissu sclérotique inter tubulaire présentait un aspect homogène. A plus fort grossissement ($\times 10\,000$ à $\times 20\,000$), il présentait des irrégularités et l'observation en profondeur, notamment dans la lumière des tubules, retrouvait une structure en mailles (figure 22).

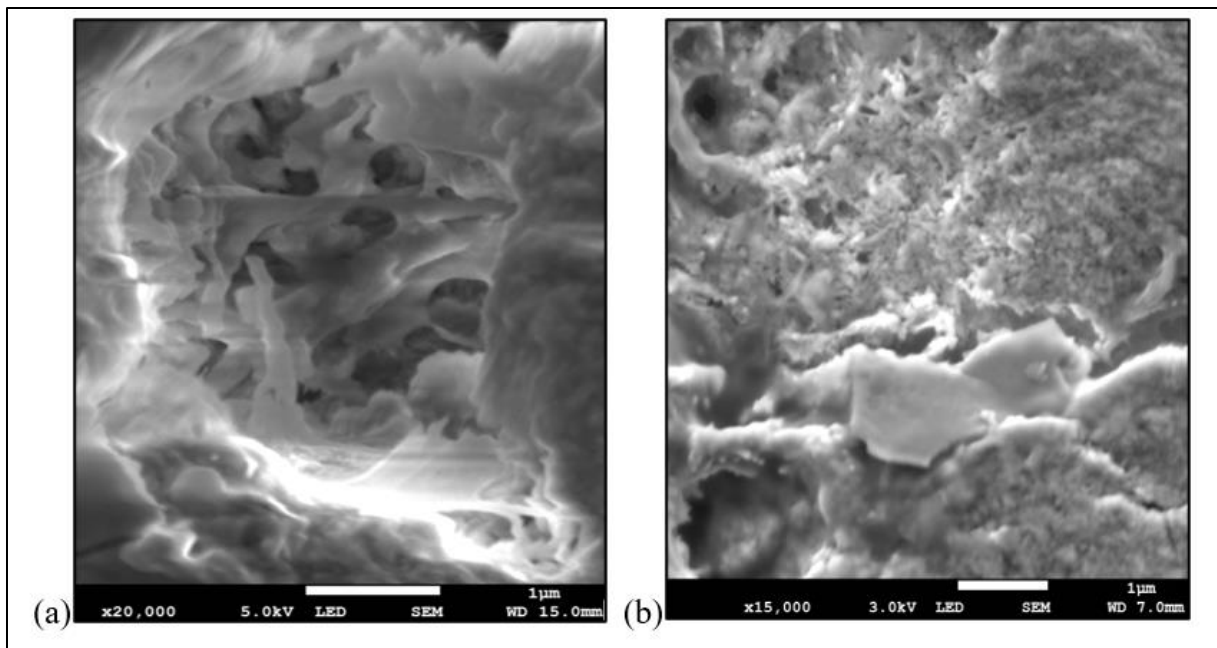


Figure 22 : photomicrographie obtenue au MEB en électrons secondaires (grossissement $\times 15\,000$ et $\times 20\,000$) de la dentine sclérotique – (a) d'une dent humaine avec un délai post-mortem de 5 ans et (b) d'une dent humaine avec un délai post-mortem archéologique.

Structure en maille visible au sein de la lumière du tubule

L'analyse en électrons rétrodiffusés a mis en évidence que les tubules étaient concentrés à proximité de la chambre pulpaire. Dans tous les échantillons, quel que soit le délai post-mortem, nous avons observé deux types de tubules dans la dentine sclérotique. Les tubules proches de la chambre pulpaire avaient un aspect arrondi et ceux à proximité de la jonction avec le ciment, avaient un aspect allongé. Il était même possible de distinguer la zone de transition entre les deux (figure 23).

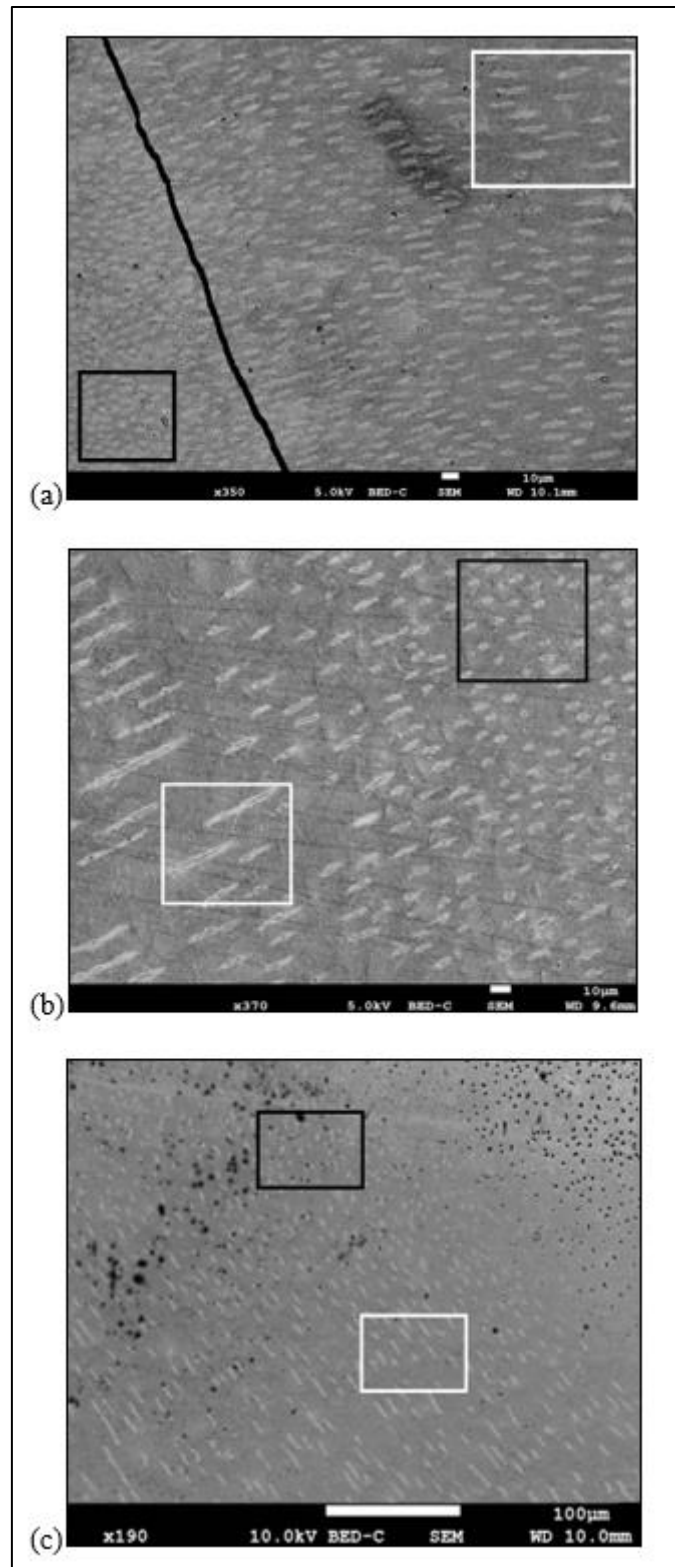


Figure 23 : photomicrographie au MEB en électrons rétrodiffusés (grossissement x190, x350 et x370) de la dentine sclérotique d’une dent humaine – (a) avec un délai post-mortem de 0 an, (b) avec un délai post-mortem de 1 an et (c) avec un délai post-mortem de 2 ans. Tubules arrondis à proximité de la chambre pulpaire (rectangle noir), tubules allongés à proximité de la jonction avec le ciment (rectangle blanc)

Les tubules situés dans la zone apicale présentait des différences d'aspect. En effet, pour les groupes avec les intervalles post-mortem les plus courts (groupes 1, 2 et 3), les tubules étaient entourés d'une collerette plus dense, correspondant à la dentine périlitubulaire, y compris pour les tubules obstrués. Cette collerette était plus fine et moins visible pour les dents dont le délai post-mortem était de 5 ans (figure 24).

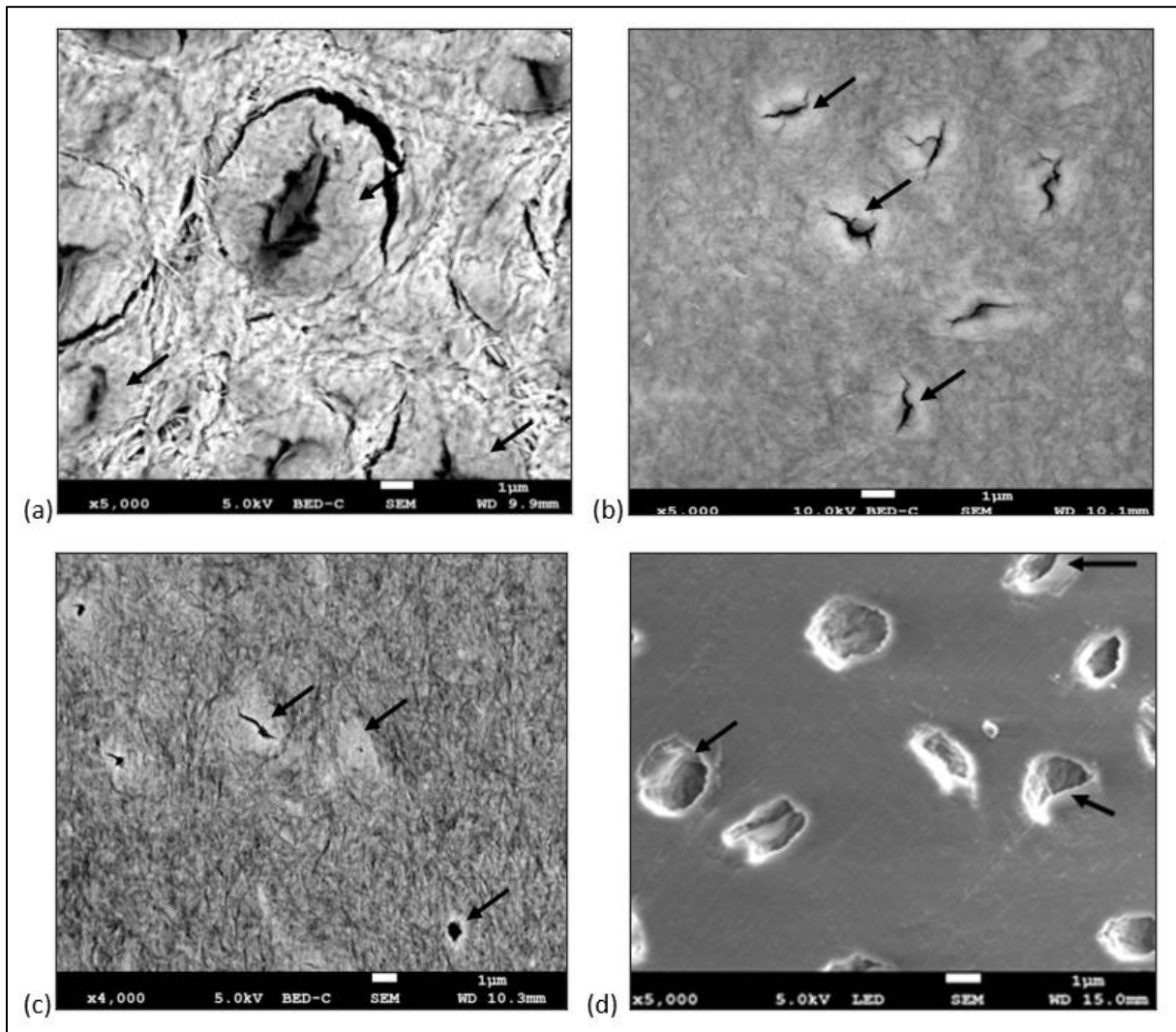


Figure 24 : photomicrographies obtenues au MEB (grossissement x4000 et x5000) en zone apicale. Dentine périlitubulaire (flèche noire).

(a) dent humaine de DPM 0 an, (b) dent humaine de DPM 1 an, (c) dent humaine de DPM 2 ans et (d) dent humaine de DPM 5 ans

Enfin, pour les dents archéologiques, en zone apicale, on observait des tubules regroupés en amas, parfois recouverts par des structures volumineuses et hyperdenses. On observait toujours au sein de ses structures la présence des tubules qui étaient oblitérés par un matériau hyperdense (figure 25).

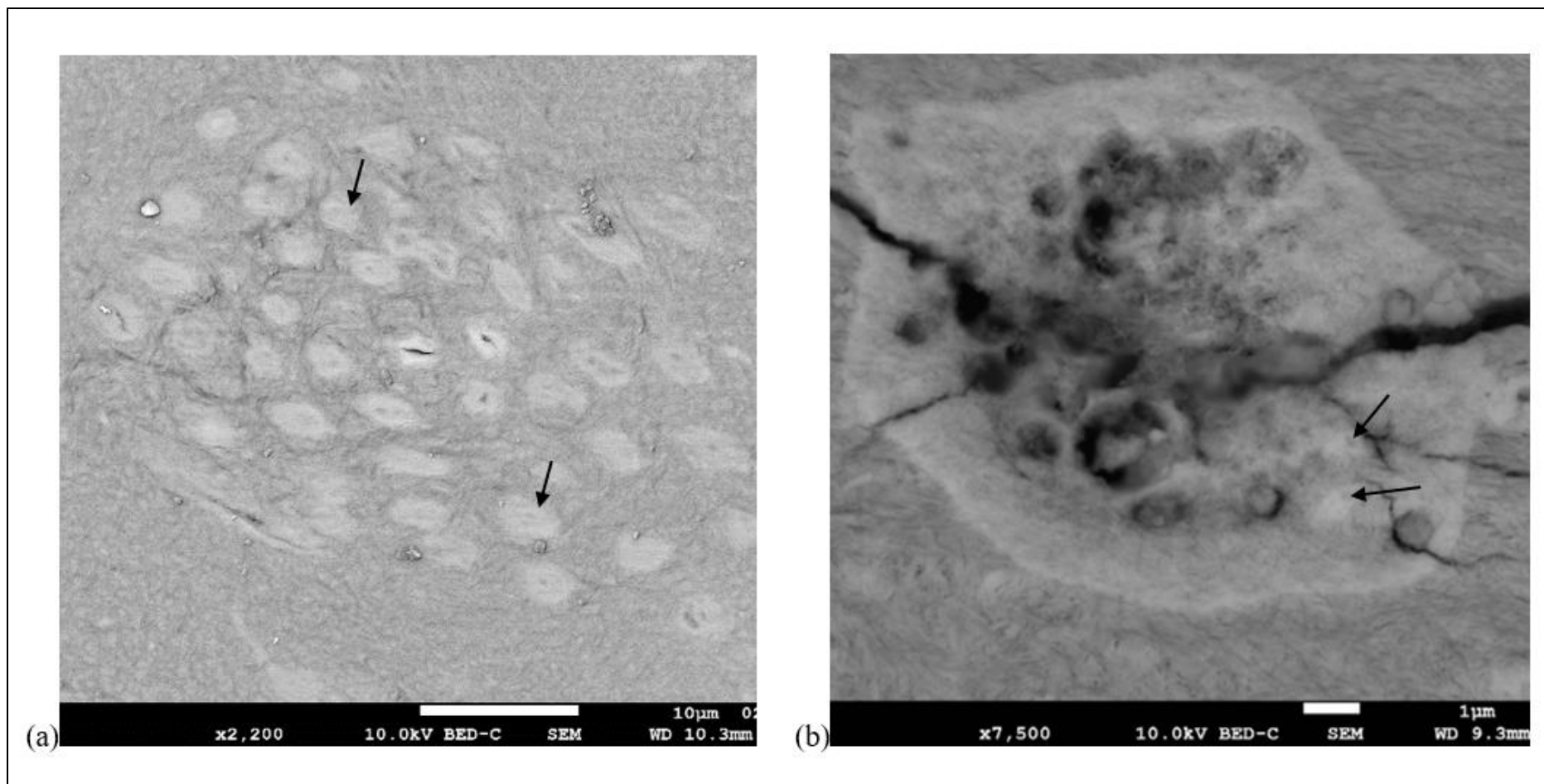


Figure 25 : photomicrographies obtenues au MEB (grossissement x2200 et x7500) en électrons rétrodiffusés de la dentine sclérotique de deux dents archéologiques. Tubules obstrués par un matériau hyperdense (flèche noire) - (a) regroupés en amas et (b) recouverts par une structure volumineuse hyperdense

II. Microanalyse par sonde EDS-X

1) Reproductibilité de la mesure intra-individuelle (partie rétrospective)

Cette partie des résultats porte sur l'analyse au microscope électronique à balayage couplée avec la spectrométrie à sélection d'énergie en rayons X pour les dents issues de la partie rétrospective de l'étude, correspondant aux trois dents de délai post-mortem cinq ans et aux trois dents archéologiques datées du 18^{ème} siècle.

a. Résultats descriptifs

Le descriptif de la population étudiée est repris dans le tableau 1.

Le nombre total de mesures effectuées sur l'ensemble des échantillons (six dents) était de 539, réparties en 179 de sexe féminin (correspondant à deux individus), 90 de sexe masculin (correspondant à un individu) et 270 de sexe inconnu (trois dents archéologiques).

Concernant le type de dents, 180 mesures ont été réalisées sur deux incisives, 179 mesures sur deux canines, et 180 mesures sur deux prémolaires. Chaque type de dent provenant respectivement d'un individu de délai post-mortem 5 ans et d'un archéologique du 18^{ème} siècle.

Enfin selon la zone d'analyse, 179 mesures ont été réalisées à proximité de la pulpe, 180 mesures à proximité du cément et 180 mesures à l'apex.

b. Mesures du rapport phosphocalcique

i. Distribution générale

Nous avons effectué 539 mesures du rapport phosphocalcique sur les six dents de la partie rétrospective.

La moyenne des mesures était de 1.99 (intervalle de confiance à 95% [1.97 ; 2]) avec un écart-type de 0.15 et la médiane à 2 (Q1-Q3 : [1.85 ; 2.11]). La valeur minimale était de 1.53 et maximale de 2.63.

La distribution des mesures du rapport phosphocalcique est représentée sur la figure 26. Nous observons la présence de deux pics de densité pour les rapports phosphocalciques de 1.85 et 2.10.

	Dent 2	Dent 3	Dent 4	Dent D	Dent C	Dent A	Total de mesures
Nombre de mesures	90	89	90	90	90	90	539
Sexe	Mâle	Femme	Femme	Inconnu	Inconnu	Inconnu	M = 90 F = 179 Inconnu = 270
Age	55 ans	60 ans	75 ans	Inconnu	Inconnu	Inconnu	55 ans = 90 60 ans = 89 75 ans = 90 Inconnu = 270
Type de dent	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive = 180 Canine = 179 Prémolaire = 180
Zone d'analyse	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 29 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 179 Cément = 180 Apex = 180

Tableau 1 : résultats descriptifs des mesures réalisées sur les six dents de la partie rétrospective de l'étude (trois dents de délai post-mortem 5 ans et trois dents archéologiques du 18^{ème} siècle)

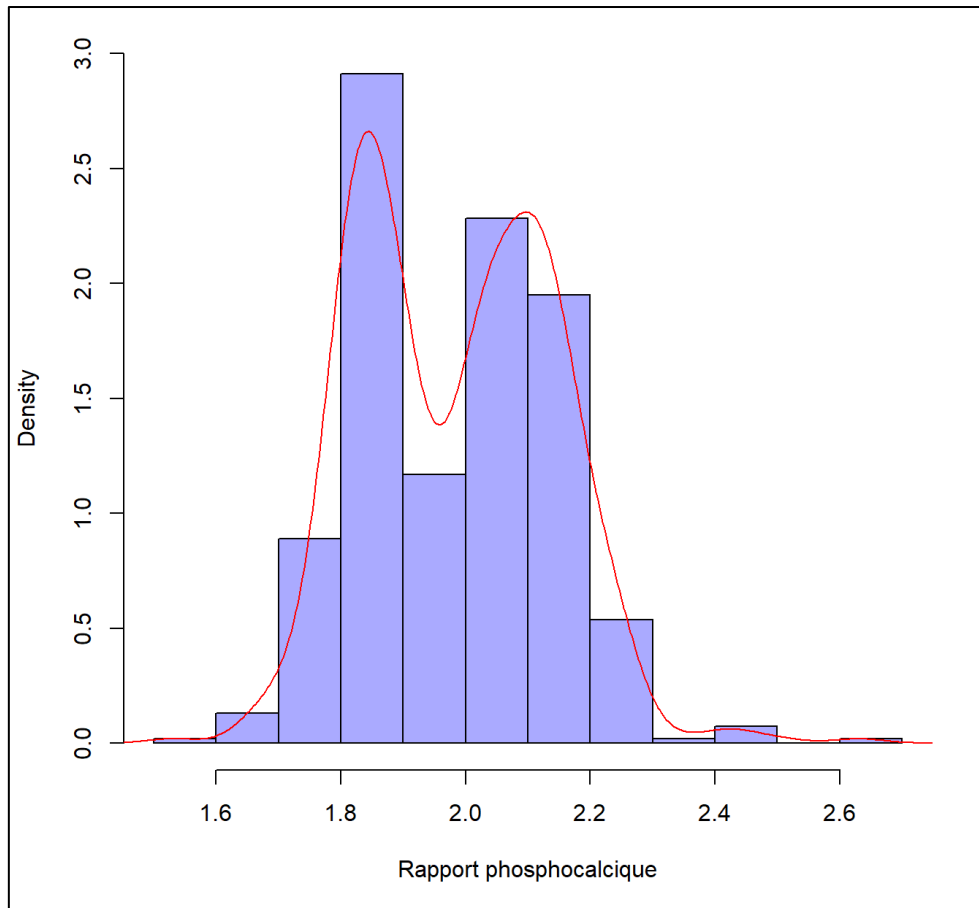


Figure 26 : distribution des 539 mesures de rapport phosphocalcique des échantillons de la partie rétrospective de l'étude

ii. Distribution multifactorielle

Nous avons analysé la distribution des rapports phosphocalciques de chaque échantillon en fonction du type de dent et de la zone d'analyse (figure 27).

Nous observons que seule une partie des mesures suit une répartition homogène. Il s'agit des mesures effectuées sur les dents archéologiques à l'exception des mesures réalisées dans la partie cément de la canine (dent C).

Concernant les dents de délai post-mortem de 5 ans, seules les mesures réalisées dans les parties cément et apex de la dent 2 (incisive) suivent une bonne répartition.

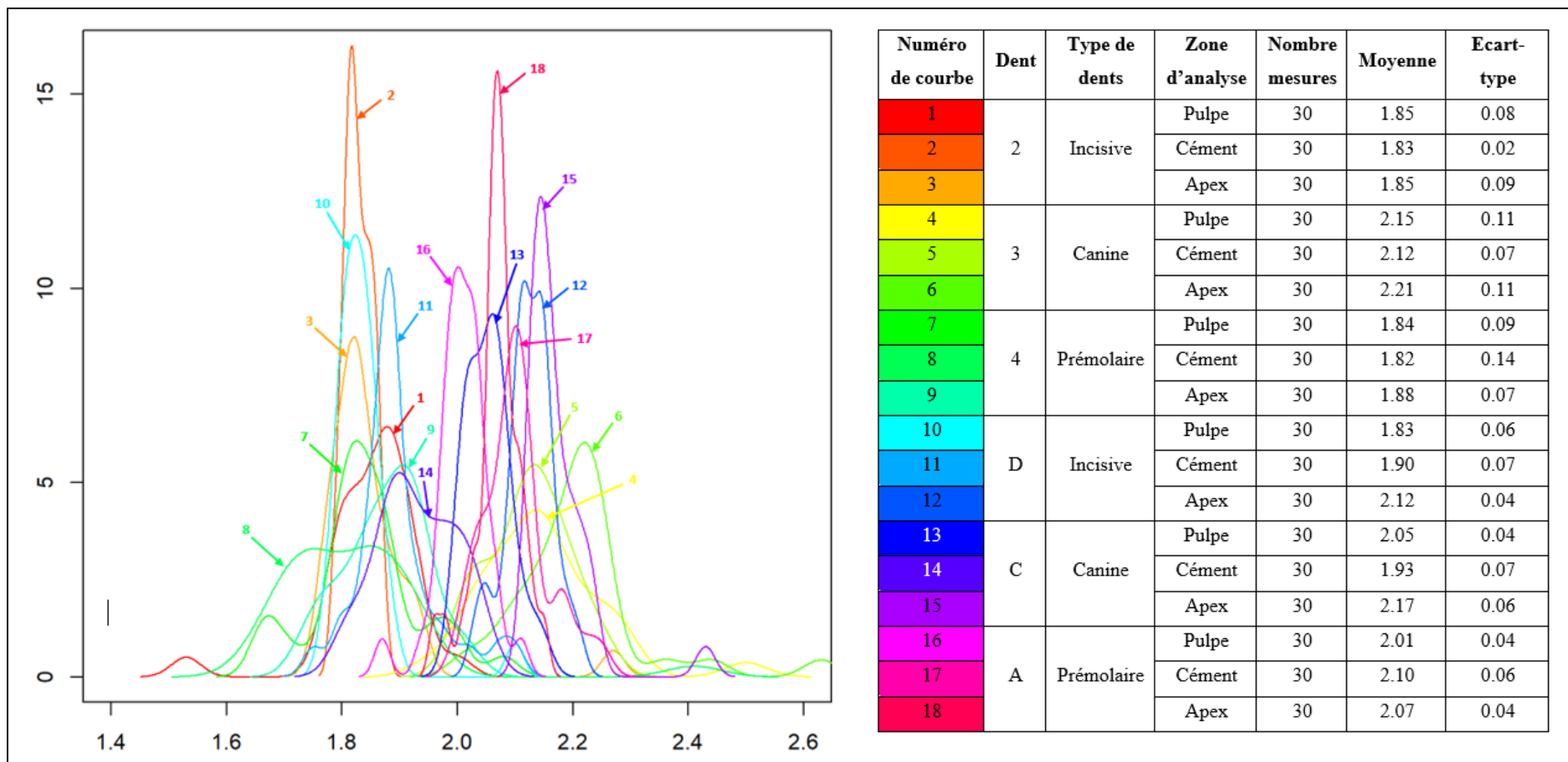


Figure 27 : distribution multifactorielle des rapports phosphocalciques des échantillons de la partie rétrospective de l'étude

iii. Etude de variabilité des mesures

A partir des mesures effectuées, nous avons voulu déterminer si pour un même individu, les valeurs observées étaient différentes ou non et donc tester la reproductibilité des mesures intra-individuelles des rapports phosphocalciques.

Nous avons réalisé une analyse de variance avec comme variable à expliquer le rapport phosphocalcique et comme variables explicatives la zone d'analyse, le type de dent et l'échantillon (tableau 2).

	Degré de liberté	Somme des carrés	F	Pr(>F)
Zone d'analyse	2	1.137	67.19	$<2 \times 10^{-16}$
Type de dents	2	4.171	246.48	$<2 \times 10^{-16}$
Echantillon	3	3.101	122.19	$<2 \times 10^{-16}$
Résidus	531	4.493		

Tableau 2 : analyse de la variance des rapports phosphocalciques des six dents de la partie rétrospective de l'étude

Nous observons que le type de dents explique 32.3% de la variance totale, le sujet 24% et la zone d'analyse 8.8%. Il existe 34.8% de la variance totale qui n'est pas expliquée par les différents facteurs choisis (résidus).

c. *Autres éléments*

i. Sodium

Nous avons effectué 539 mesures des concentrations en sodium sur les six dents de la partie rétrospective.

La moyenne était de 0.36 (intervalle de confiance à 95% [0.33 ; 0.39]) avec un écart-type de 0.37 et la médiane à 0.4 (Q1-Q3 [0 ; 0.6]). La valeur minimale était de 0 et la maximale de 1.3.

La distribution des mesures des concentrations en sodium est représentée sur la figure 28. Cette concentration était de 0 dans 46.94% des cas (253 mesures), de 0.6 dans 15.77% (46 mesures) et de 0.7 et 0.5 dans respectivement 9.65% (52 mesures) et 6.12 % (33 mesures).

ii. Magnésium

Nous avons effectué 539 mesures des concentrations en magnésium sur les six dents de la partie rétrospective.

La moyenne était de 0.56 (intervalle de confiance à 95% [0.52 ; 0.59]) avec un écart-type de 0.42 et la médiane à 0.7 (Q1-Q3 [0 ; 0.9]). La valeur minimale était de 0 et la maximale de 1.7.

La distribution des mesures des concentrations en magnésium est représentée sur la figure 29. Cette concentration était de 0 dans 32.1% des cas (173 mesures), de 0.9 dans 14.84% (80 mesures) et de 0.7 et 0.8 dans respectivement 12.62% (68 mesures) et 11.87% (64 mesures).

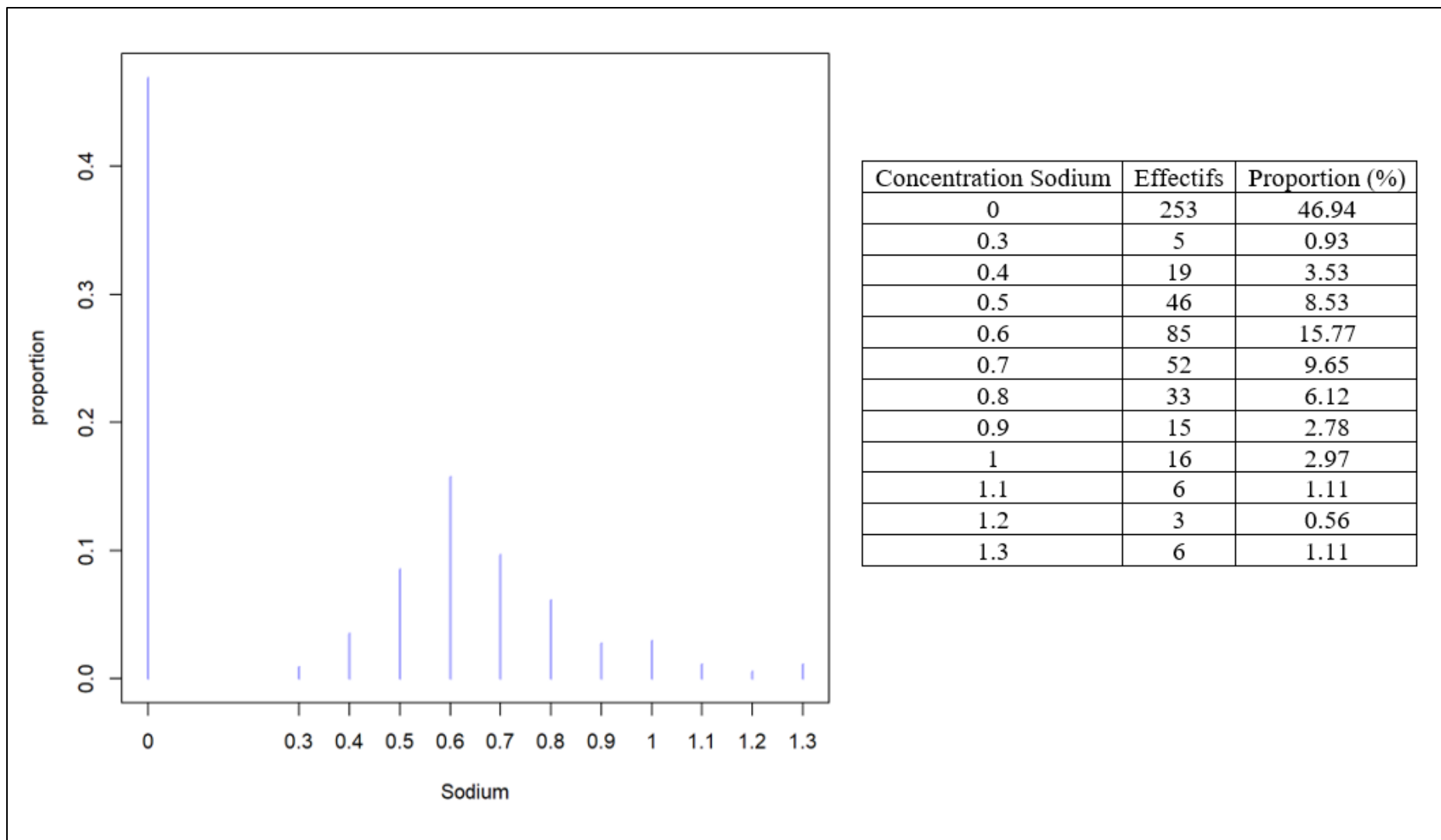


Figure 28 : distribution des 539 mesures de concentration en sodium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

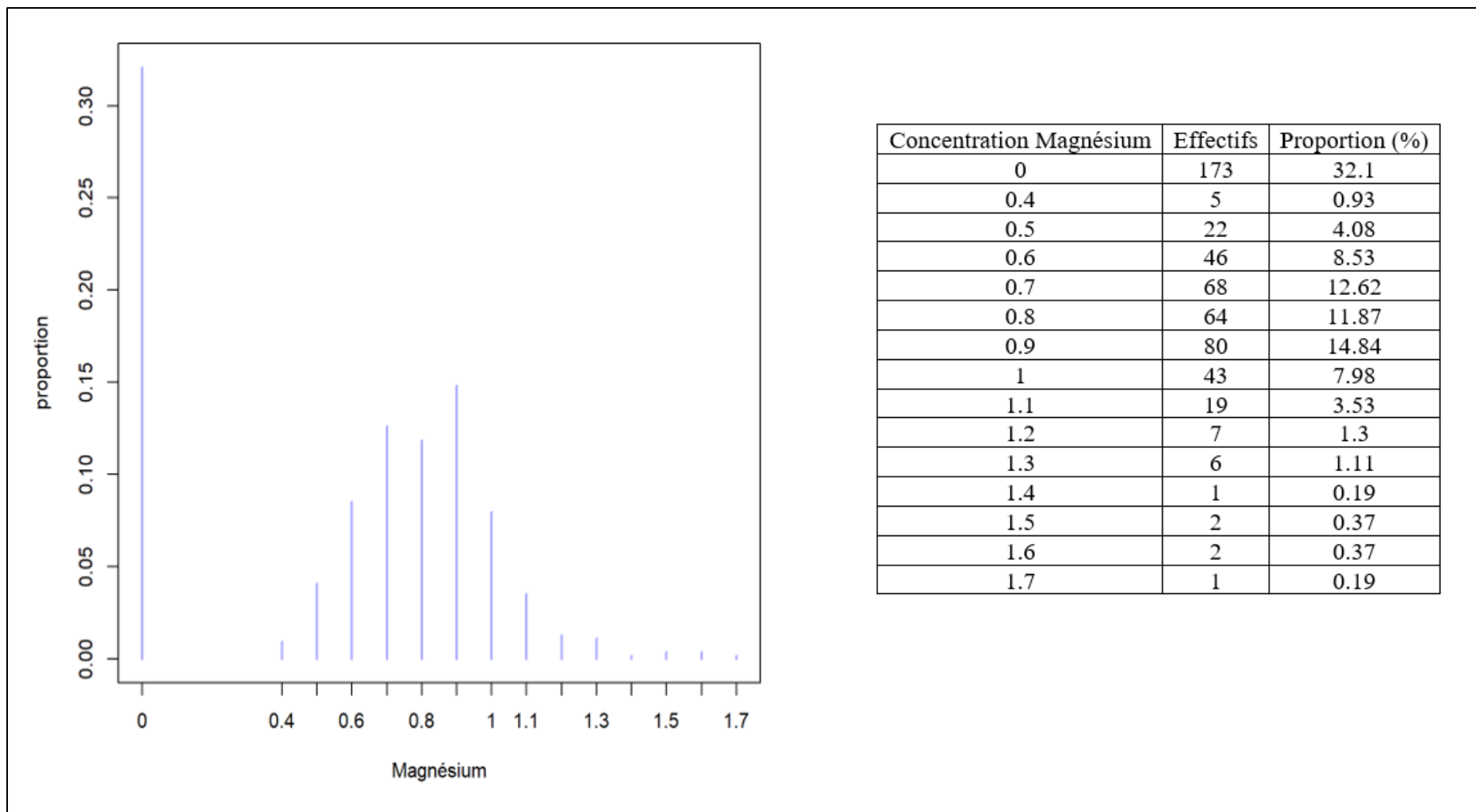


Figure 29 : distribution des 539 mesures de concentration en magnésium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

2) Effet du délai post-mortem (partie prospective)

Cette partie des résultats porte sur l'analyse au microscope électronique à balayage couplée avec la spectrométrie à sélection d'énergie en rayons X pour les dents issues de la partie prospective de l'étude, correspondant aux dix-huit dents de délai post-mortem 0 an, 1 an et 2 ans.

a. Résultats descriptifs

Le descriptif de la population étudiée est repris dans le tableau 3 pour le sujet A et le tableau 4 pour le sujet C.

Le nombre total de mesures effectuées sur l'ensemble des échantillons (dix-huit dents) était de 1620, réparties en 810 de sexe féminin (sujet C) et 810 de sexe masculin (sujet A).

Concernant le type de dents, 540 mesures ont été réalisées sur six incisives, 540 mesures sur six canines, et 540 mesures sur six prémolaires. Chaque type de dent provenant respectivement du sujet A et du sujet C.

Selon la zone d'analyse, 540 mesures ont été réalisées à proximité de la pulpe, 540 mesures à proximité du cément et 540 mesures à l'apex.

Enfin, concernant le délai post-mortem, 540 mesures ont été réalisées sur six dents à 0 an (groupe 1), 540 mesures sur six dents à 1 an (groupe 2) et 540 mesures sur six dents à 2 ans (groupe 3).

	A2	A1	A9	A5	A6	A8	A3	A4	A10	Total de mesures
Nombre de mesures	90	90	90	90	90	90	90	90	90	810
DPM	0 an	0 an	0 an	1 an	1 an	1 an	2 ans	2 ans	2 ans	0 an = 270 1 an = 270 2 ans = 270
Type de dents	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive = 270 Canine = 270 Prémolaire = 270
Zone d'analyse	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 270 Cément = 270 Apex = 270

**DPM : Délai Post-Mortem*

Tableau 3 : résultats descriptifs des mesures réalisées sur les neuf dents du sujet A (homme de 75 ans)

	C5	C3	C12	C2	C8	C11	C4	C10	C13	Total de mesures
Nombre de mesures	90	90	90	90	90	90	90	90	90	810
DPM	0 an	0 an	0 an	1 an	1 an	1 an	2 ans	2 ans	2 ans	0 an = 270 1 an = 270 2 ans = 270
Type de dents	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive	Canine	Prémolaire	Incisive = 270 Canine = 270 Prémolaire = 270
Zone d'analyse	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 30 Cément = 30 Apex = 30	Pulpe = 270 Cément = 270 Apex = 270

**DPM : Délai Post-Mortem*

Tableau 4 : résultats descriptifs des mesures réalisées sur les neuf dents du sujet C (femme 92 ans)

b. Mesures du rapport phosphocalcique

i. Distribution générale

Nous avons effectué 1620 mesures du rapport phosphocalcique sur les dix-huit dents de la partie prospective.

La moyenne des mesures était de 2.04 (intervalle de confiance à 95% [2.04 ; 2.05]) avec un écart-type de 0.12 et la médiane à 2.05 (Q1-Q3 : [1.97 ; 2.12]). La valeur minimale était de 0.5 et maximale de 2.89.

La distribution des mesures du rapport phosphocalcique est représentée sur la figure 30. Pour l'ensemble des analyses, nous observons une distribution homogène des rapports phosphocalciques.

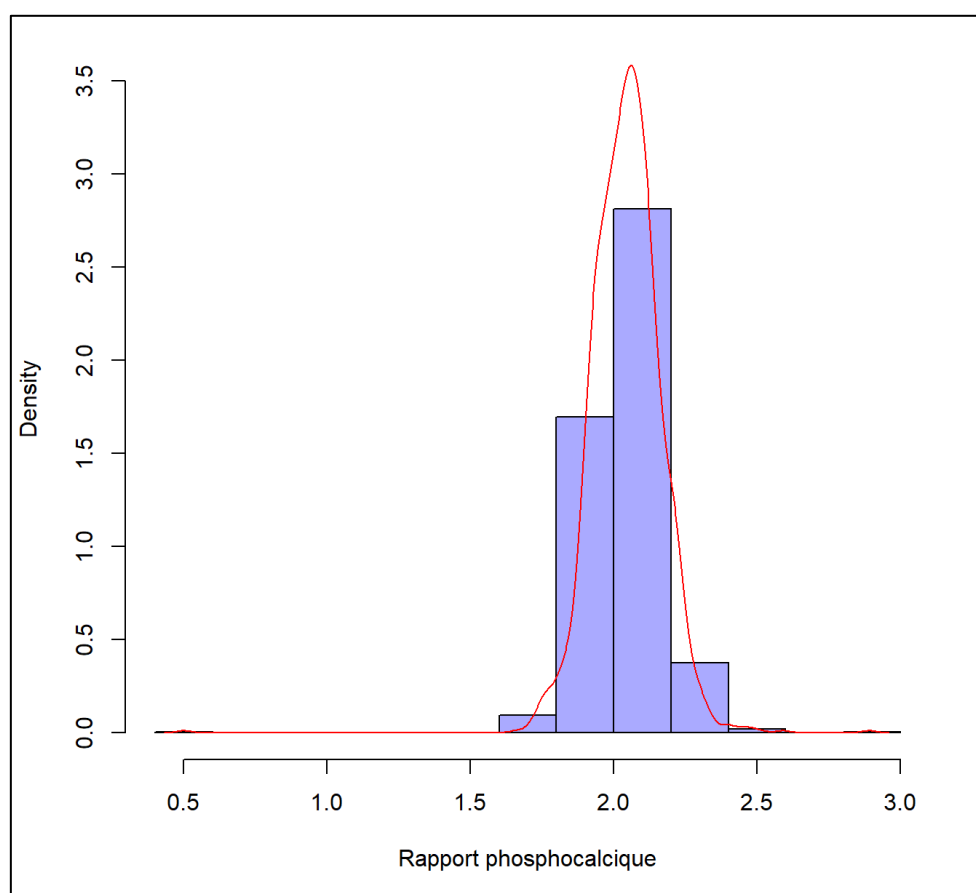


Figure 30 : distribution des 1620 mesures de rapport phosphocalcique dans les échantillons de la partie prospective de l'étude

ii. Distribution multifactorielle

Nous avons analysé la distribution des rapports phosphocalciques de chaque échantillon en fonction du type de dent et de la zone d'analyse (figure 31). Nous observons que la majorité des mesures suit une répartition homogène, pour les deux sujets, en dehors des zones apicales des canines du groupe 2 (délai post-mortem de 1 an).

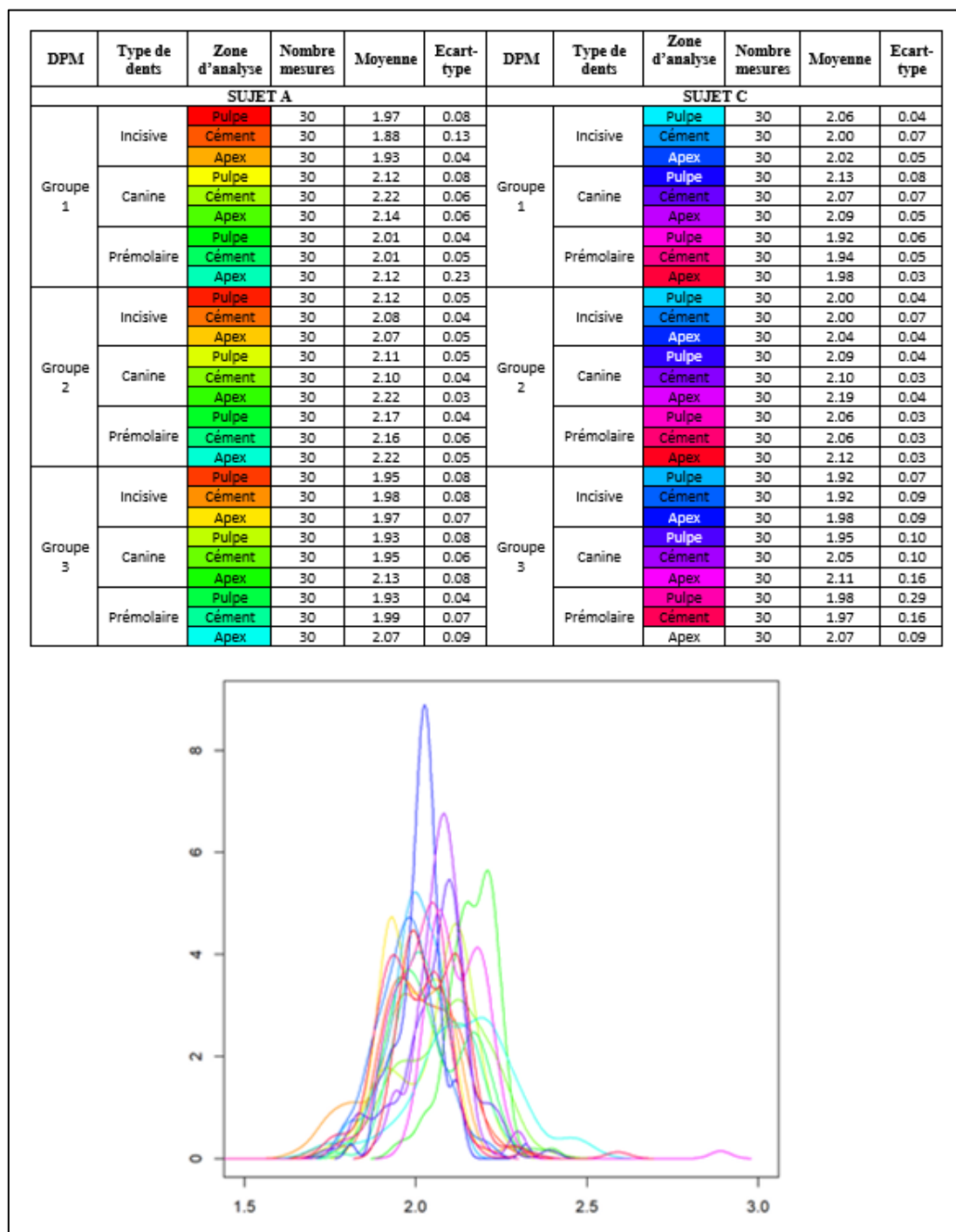


Figure 31 : distribution multifactorielle des rapports phosphocalciques des échantillons de la partie prospective de l'étude

iii. Etude de variabilité

A partir des mesures effectuées, nous avons voulu déterminer si en fonction du délai post-mortem, les valeurs observées étaient différentes ou non et donc tester la reproductibilité des mesures inter-individuelles des rapports phosphocalciques.

Nous avons réalisé une analyse de variance avec comme variable à expliquer le rapport phosphocalcique et comme variables explicatives le délai post-mortem, la zone d'analyse, le type de dent et l'échantillon (tableau 5).

	Degré de liberté	Somme des carrés	F	Pr(>F)
Délai post-mortem	2	3.630	183.32	$<2 \times 10^{-16}$
Zone d'analyse	2	1.145	57.83	$<2 \times 10^{-16}$
Type de dents	2	2.714	137.04	$<2 \times 10^{-16}$
Echantillon	1	0.338	34.14	6.2×10^{-09}
Résidus	1612	15.961		

Tableau 5 : analyse de la variance des rapports phosphocalciques des dix-huit dents de la partie prospective de l'étude

Nous observons que le délai post-mortem explique 15.3% de la variance totale, le type de dents 11.4%, la zone d'analyse 4.8% et le sujet 1.4%. Il existe 67.1% de la variance totale qui n'est pas expliquée par les différents facteurs choisis (résidus).

c. Autres éléments

i. Sodium

Nous avons effectué 1620 mesures des concentrations en sodium sur les dix-huit dents de la partie prospective.

La moyenne était de 0.52 (intervalle de confiance à 95% [0.5 ; 0.55]) avec un écart-type de 0.49 et la médiane à 0.6 (Q1-Q3 [0 ; 0.8]). La valeur minimale était de 0 et la maximale de 7.

La distribution des mesures des concentrations en sodium est représentée sur la figure 32. Cette concentration était de 0 dans 35.86% des cas (581 mesures), de 0.6 dans 13.52% (219 mesures) et de 0.7, 0.8 et 0.5 dans respectivement 12.35% (200 mesures), 11.48 % (186 mesures) et

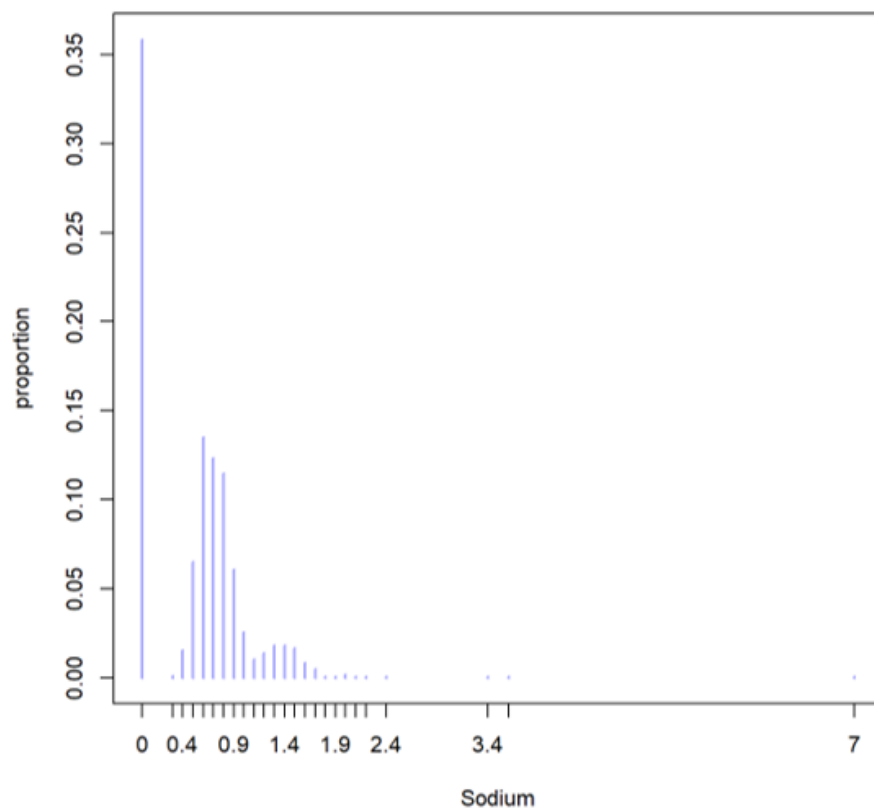
6.54% (106 mesures). Pour les concentrations au-delà de 2, une seule mesure (0.06%) était relevée pour chacune des six concentrations (2.1, 2.2, 2.4, 3.4, 3.6 et 7).

ii. Magnésium

Nous avons effectué 1620 mesures des concentrations en magnésium sur les dix-huit dents de la partie prospective.

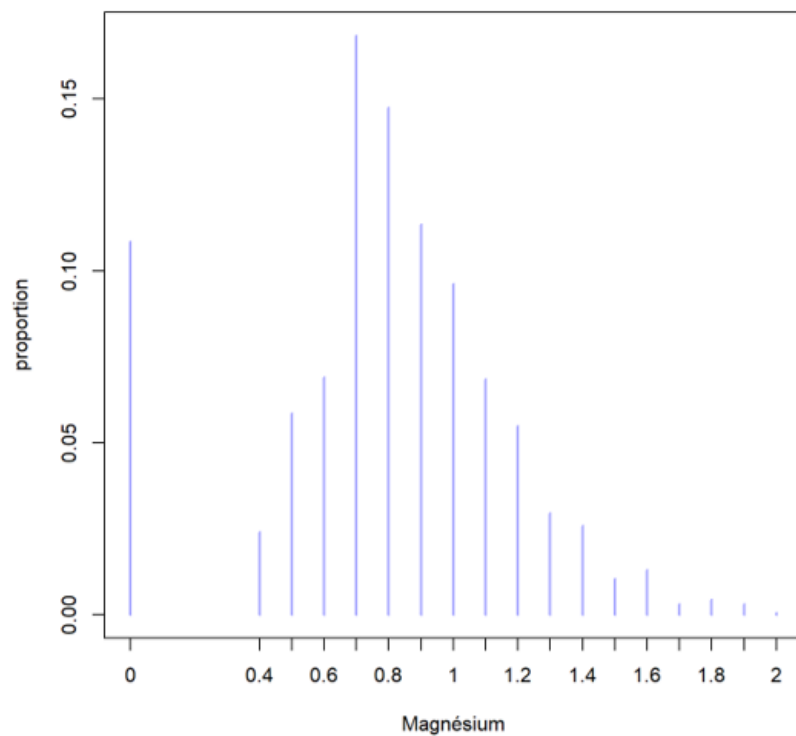
La moyenne était de 0.79 (intervalle de confiance à 95% [0.77 ; 0.81]) avec un écart-type de 0.38 et la médiane à 0.8 (Q1-Q3 [0.6 ; 1]). La valeur minimale était de 0 et la maximale de 2.

La distribution des mesures des concentrations en magnésium est représentée sur la figure 33. Cette concentration était de 0.7 dans 16.85% des cas (273 mesures), de 0.8 dans 14.75% (239 mesures), de 0.9 dans 11.36% (184 mesures) et de 0 et 1 dans respectivement 10.86% (173 mesures) et 9.63% (156 mesures).



Concentration Sodium	Effectifs	Proportion (%)
0	581	35.86
0.3	2	0.12
0.4	25	1.54
0.5	106	6.54
0.6	219	13.52
0.7	200	12.35
0.8	186	11.48
0.9	99	6.11
1	42	2.59
1.1	17	1.05
1.2	23	1.42
1.3	30	1.85
1.4	30	1.85
1.5	27	1.67
1.6	14	0.86
1.7	8	0.49
1.8	1	0.06
1.9	1	0.06
2	3	0.19

Figure 32 : distribution des 1620 mesures de concentration en sodium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)



Concentration Magnésium	Effectifs	Proportion (%)
0	176	10.86
0.4	39	2.41
0.5	95	5.86
0.6	112	6.91
0.7	273	16.85
0.8	239	14.75
0.9	184	11.36
1	156	9.63
1.1	111	6.85
1.2	89	5.49
1.3	48	2.96
1.4	42	2.59
1.5	17	1.05
1.6	21	1.3
1.7	5	0.31
1.8	7	0.43
1.9	5	0.31
2	1	0.06

Figure 33 : distribution des 1620 mesures de concentration en magnésium dans les échantillons, des effectifs et de leur proportion (en pourcentage)

3) Impact du délai post-mortem sur les variations du rapport phosphocalcique

a. Etude exploratoire selon le sujet

Les résultats de l'analyse de variance avec comme variable à expliquer le rapport phosphocalcique et comme variables explicatives le délai post-mortem, la zone d'analyse, le type de dent et l'échantillon ont été décrites dans la partie 2bii des résultats (tableau 5).

Nous avons observé que le délai post-mortem explique 15.3% de la variance totale, le type de dents 11.4%, la zone d'analyse 4.8% et le sujet 1.4%. Il existe 67.1% de la variance totale qui n'est pas expliquée par les différents facteurs choisis (résidus).

b. Etude exploratoire indépendamment du sujet

A partir des mesures effectuées, nous avons voulu déterminer si en fonction du délai post-mortem, les valeurs observées étaient différentes ou non et donc tester la reproductibilité des mesures de rapport phosphocalcique indépendamment du sujet.

Nous avons réalisé une analyse de variance avec comme variable à expliquer le rapport phosphocalcique et comme variables explicatives le délai post-mortem, la zone d'analyse et le type de dent (tableau 6).

	Degré de liberté	Somme des carrés	F	Pr(>F)
Délai post-mortem	2	3.630	173.63	$<2 \times 10^{-16}$
Zone d'analyse	2	1.145	56.67	$<2 \times 10^{-16}$
Type de dents	2	2.714	134.28	$<2 \times 10^{-16}$
Résidus	1613	16.299		

Tableau 6 : analyse de la variance des rapports phosphocalciques des dix-huit dents de la partie prospective de l'étude indépendamment du sujet

Nous observons que le délai post-mortem explique 15.3% de la variance totale, le type de dents 11.4% et la zone d'analyse 4.8%. Il existe 68.5% de la variance totale qui n'est pas expliquée par les différents facteurs choisis (résidus).

Il n'est pas observé de différence dans l'analyse de la variance pour les différentes variables explicatives, en tenant compte ou non du sujet.

c. Analyse prédictive

A partir des données obtenues, nous avons cherché à identifier un contexte, tel que le type de dent et la zone d'analyse (apex, à proximité de la jonction dentine/cément et à proximité de la jonction dentine/pulpe), susceptible de prédire le mieux possible le délai post-mortem en fonction du rapport phosphocalcique.

Nous avons réalisé un test de corrélation de Pearson posant l'hypothèse que l'effet entre les variables était linéaire, c'est-à-dire que si le rapport phosphocalcique diminue ou augmente d'une certaine valeur entre 0 et 12 mois, alors cette variation sera équivalente entre 12 et 24 mois ; ainsi qu'un test de corrélation de Spearman qui exclut l'hypothèse de linéarité et qui s'intéresse à la possibilité de « classer » les valeurs par délai post-mortem croissant. Les résultats sont repris dans le tableau 7 et représentés en boxplot sur la figure 34.

Nous avons retrouvé une association négative, c'est-à-dire que plus le rapport phosphocalcique augmente dans la zone d'analyse et le type de dent et plus le délai post-mortem est court ou inversement, avec une corrélation qui était modérée (r et r_s compris entre -0.3 et -0.5) pour l'association incisive/pulpe ($r=-0.35$ et $r_s = -0.39$) et forte (r et r_s compris entre -0.5 et -1) pour les associations canine/pulpe ($r=-0.69$ et $r_s=-0.71$) et canine/cément ($r=-0.57$ et $r_s=-0.56$).

Pour les autres associations, la corrélation était absente (r ou r_s inférieur à 0.1 ou -0.1), c'est-à-dire qu'il n'était pas possible de prédire les variations du délai post-mortem par rapport aux variations du rapport phosphocalcique selon le type de dent analysée et la zone d'analyse.

Ces éléments nous permettent de retenir que le meilleur modèle prédictif du délai post-mortem en fonction du rapport phosphocalcique concerne la zone à proximité de la jonction de la dentine avec la pulpe dans les canines.

Type de dents	Zone d'analyse	Nombre d'analyse	r	r ²	p	<u>rs</u>	<u>rs</u> ²	p
Incisive	Pulpe	180	-0.35	0.12	1.53 x 10 ⁻⁶	-0.39	0.16	2.81 x 10 ⁻⁸
	Cément	180	0.03	0.001	0.64	-0.01	1 x 10 ⁻⁴	0.87
	Apex	180	-0.02	2,6 x 10 ⁻⁴	0.83	-0.03	8 x 10 ⁻⁴	0.70
Canine	Pulpe	180	-0.69	0.48	4.99 x 10 ⁻²⁷	-0.71	0.50	9.30 x 10 ⁻²⁹
	Cément	180	-0.57	0.32	1.09 x 10 ⁻¹⁶	-0.56	0.31	2.71 x 10 ⁻¹⁶
	Apex	180	0.02	3,5 x 10 ⁻⁴	0.80	-0.02	6 x 10 ⁻⁴	0.74
Prémolaire	Pulpe	180	-0.03	8,6 x 10 ⁻⁴	0.69	0.03	0.001	0.65
	Cément	180	0.02	4,1 x 10 ⁻⁴	0.79	0.03	8 x 10 ⁻⁴	0.71
	Apex	180	0.06	0.004	0.39	0.14	0.02	0.07

r : coefficient de corrélation linéaire de Pearson

rs : coefficient de corrélation de Spearman

*r*² et rs² : part de variance expliquée

p significatif < 0.05

Tableau 7 : test d'association de Pearson et Spearman pour les échantillons de la partie prospective de l'étude entre type de dent/zone d'analyse et délai post-mortem

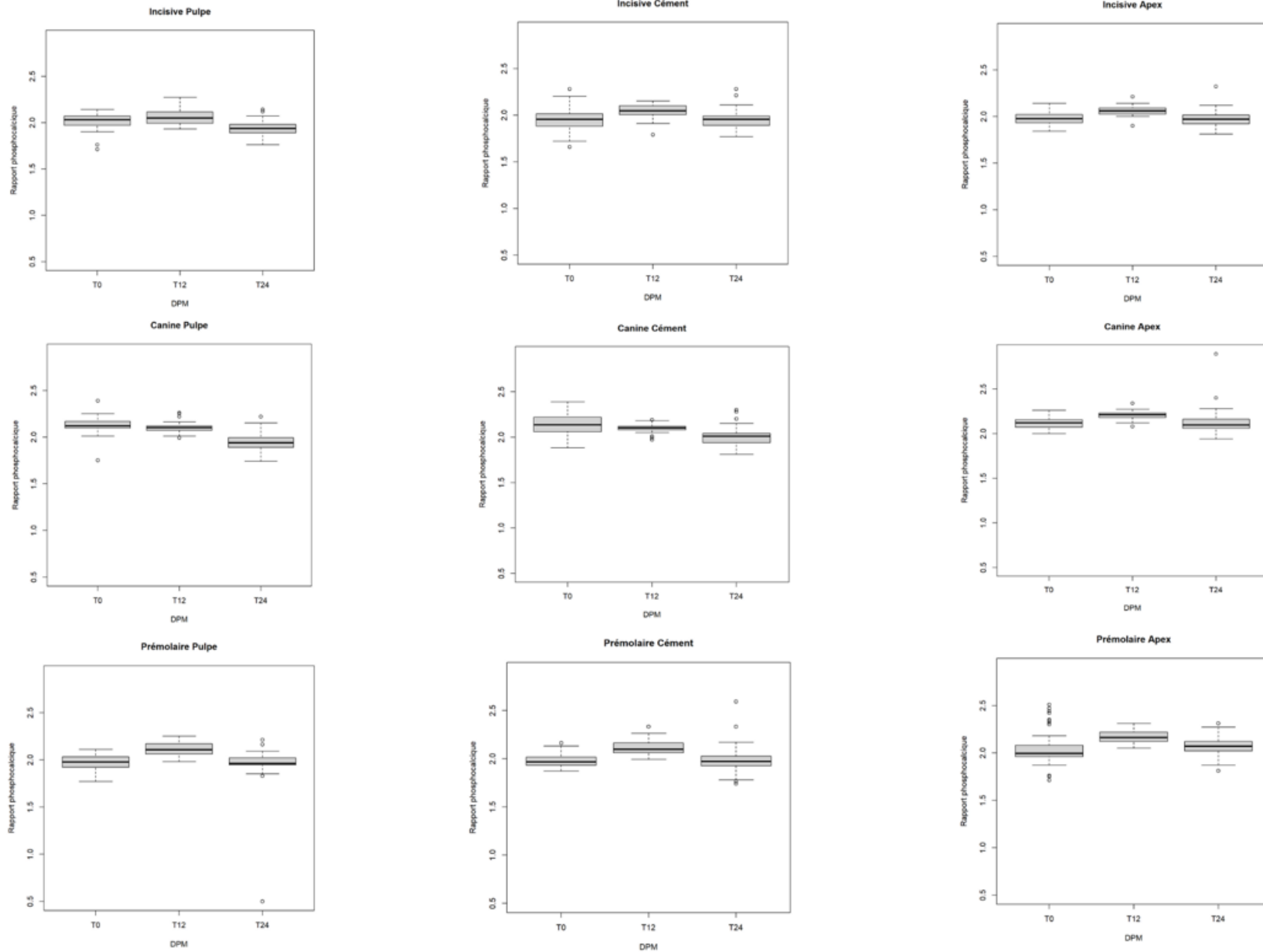


Figure 34 : représentation en boxplot pour les échantillons de la partie prospective de l'étude entre type de dent/zone d'analyse en fonction du délai post-mortem

III. Résultats en diffractométrie en rayons X

1) Composition cristallographique des échantillons

Le diffractomètre de l'hydroxyapatite est représenté sur la figure 35. On observe un positionnement de différents pics caractéristiques aux coordonnées hkl (002), (211), (300), (202), (310), (222) et (213).

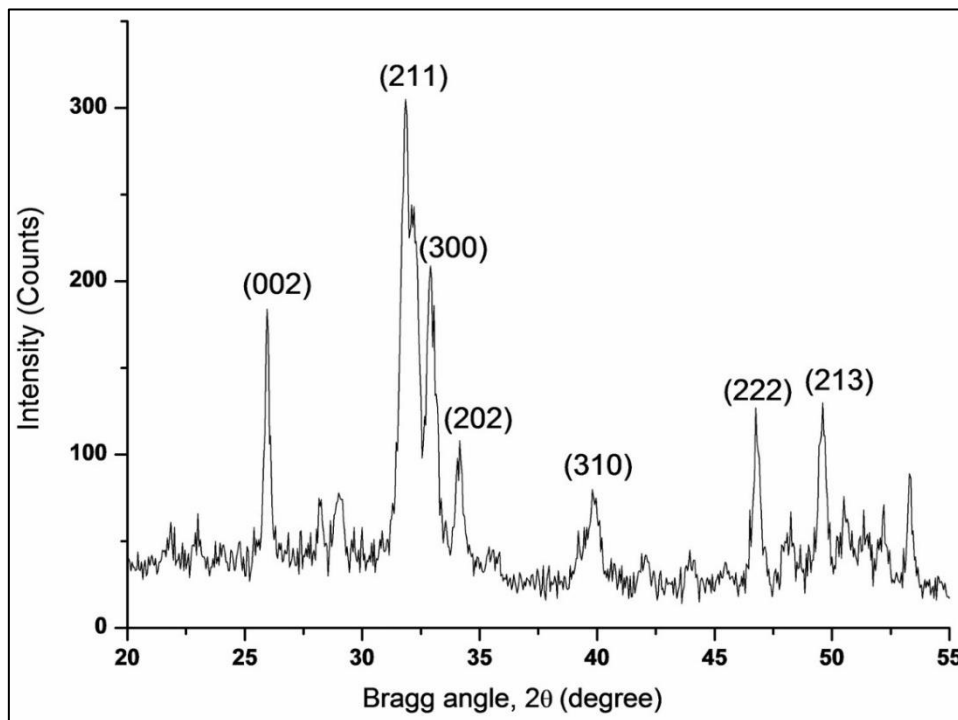


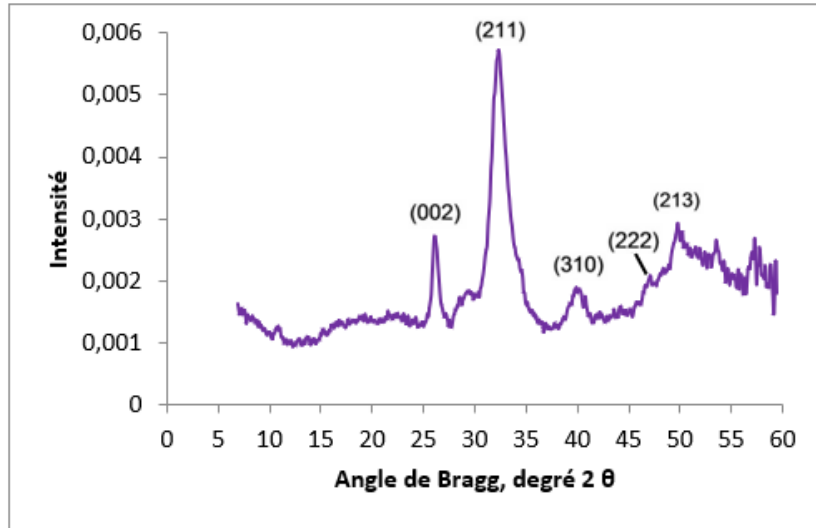
Figure 35 : diffractomètre de l'hydroxyapatite (d'après Cunha *et al.* 2015)

Les diffractomètres de l'ensemble des dents, quel soit le délai post-mortem est assez similaire à celui de référence de l'hydroxyapatite (figure 35).

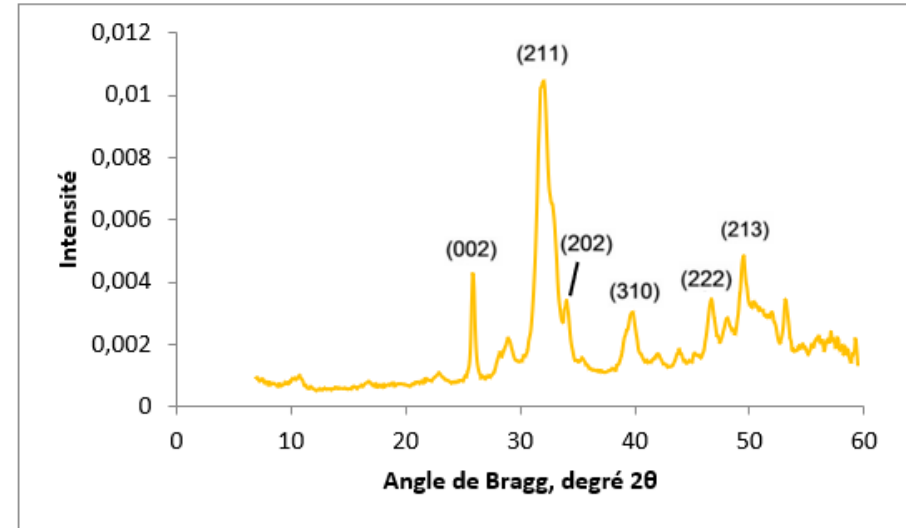
Les diffractomètres obtenus pour les dents de la partie rétrospective de l'étude sont représentés sur la figure 36. Des pics sont présents aux positionnements (002), (211), (310) et (213). Dans les dents de délai post-mortem de 5 ans, celui en position (222) est peu visible et celui en (202) n'est pas observable.

Les diffractomètres obtenus pour les dents de la partie prospective de l'étude sont représentés sur la figure 37. Des pics sont présents aux positionnements (002), (211), (310) et (222). Celui en position (202) est peu visible et celui au positionnement (213) n'est pas observable.

Pour l'ensemble des dents, quel que soit le délai post-mortem, le pic positionné en (300) n'est pas observable.

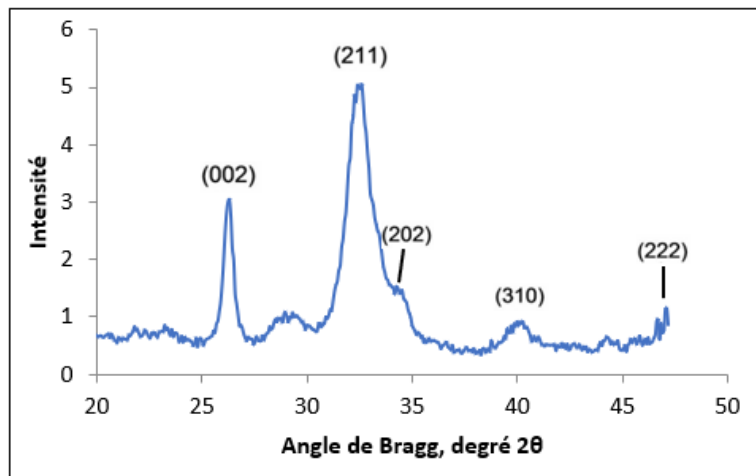


Groupe de délai post-mortem de 5 ans

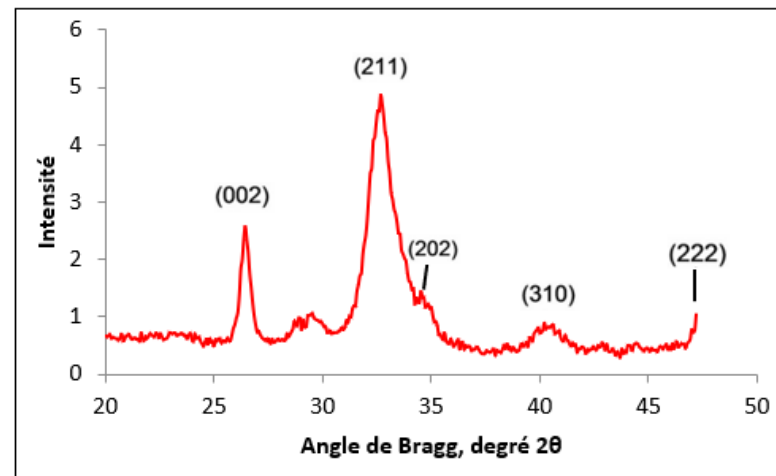


Groupe archéologique

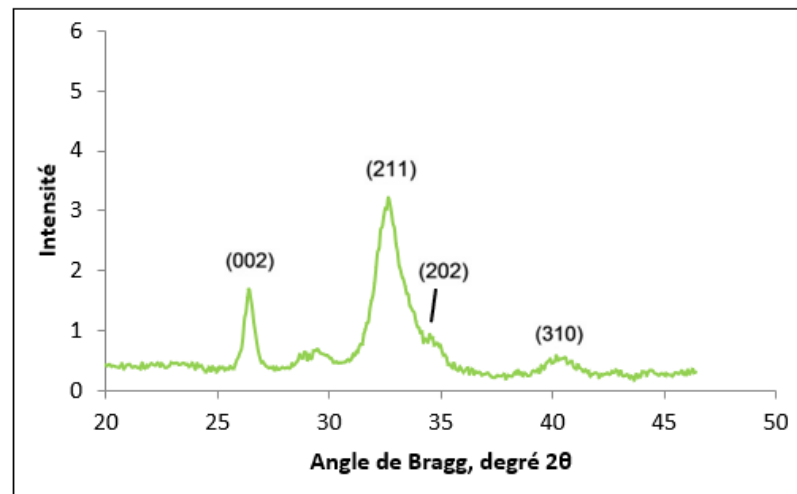
Figure 36 : diffractomètres des dents de la partie rétrospective de l'étude



Groupe 1 : délai post-mortem de 0 an



Groupe 2 : délai post-mortem de 1 an



Groupe 3 : délai post-mortem de 2 ans

Figure 37 : diffractomètres des dents de la partie prospective de l'étude

2) Cristallinité de la partie rétrospective

Nous avons superposé les diffractogrammes obtenus après analyse des dents de délai post-mortem (DPM) 5 ans et les dents archéologiques (figure 38).

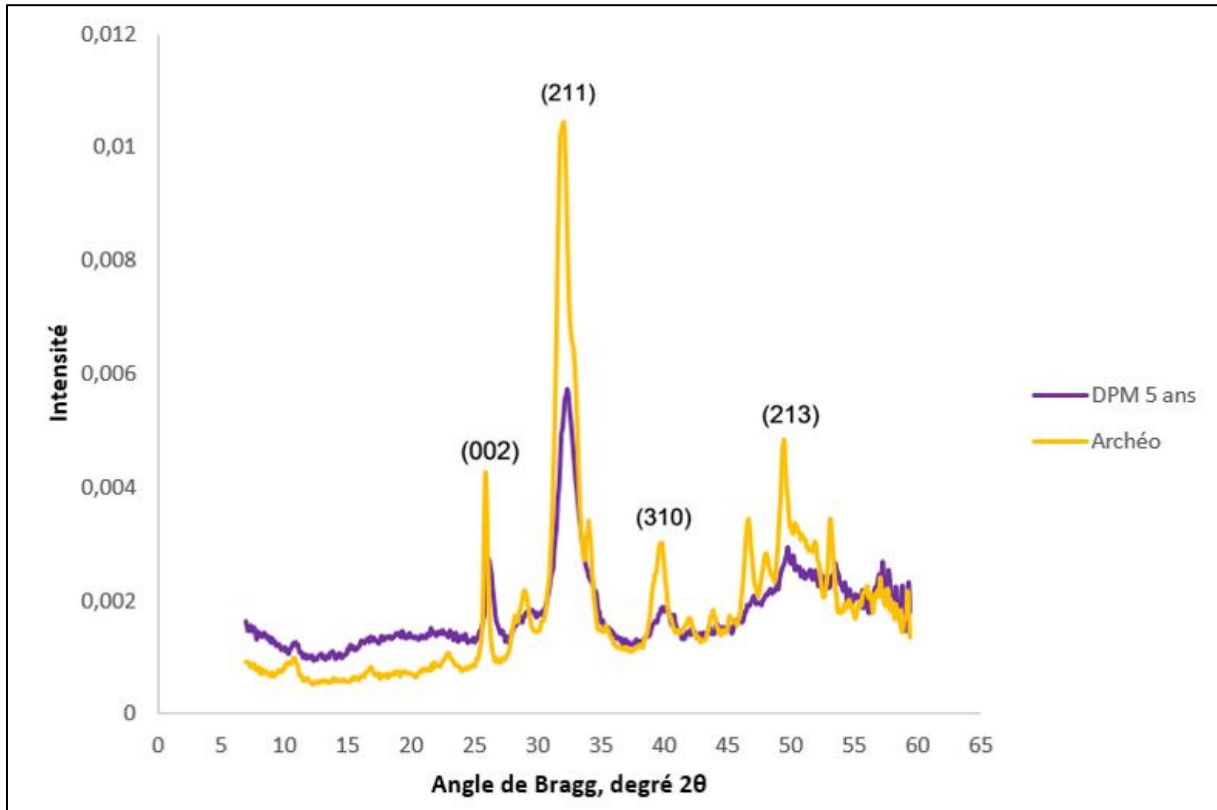


Figure 38 : superposition des diffractogrammes des dents de la partie rétrospective de l'étude

L'intensité des pics caractéristiques aux positionnements (002), (211), (310) et (213) sont regroupés dans le tableau 8, ainsi que la différence d'intensité entre les groupes.

On observe que le niveau de cristallinité dans les dents archéologiques quel que soit le positionnement des pics est plus important dans les dents archéologiques que pour les dents de délai post-mortem 5 ans. Le plus grand différentiel est observé au positionnement (211) qui est considéré pour le diffractogramme de l'hydroxyapatite comme le pic de référence (pic dont l'intensité est la plus élevée).

		Dents DPM 5 ans	Dents archéologiques	Différentiel
		Intensité des pics		
Position des pics degré 2θ	(002)	0.0027	0.0042	-0.0015
	(211)	0.0057	0.0104	-0.0047
	(310)	0.0019	0.0030	-0.0011
	(213)	0.0029	0.0047	-0.0018

Tableau 8 : différence d'intensité des pics en fonction de leur position (degré 2θ) pour les dents de délai post-mortem 5 ans et les dents archéologiques

3) Cristallinité de la partie prospective

Nous avons superposé les diffractomètres obtenus après analyse des dents de délai post-mortem 0 an (groupe 1), 1 an (groupe 2) et 2 ans (groupe 3) (figure 39).

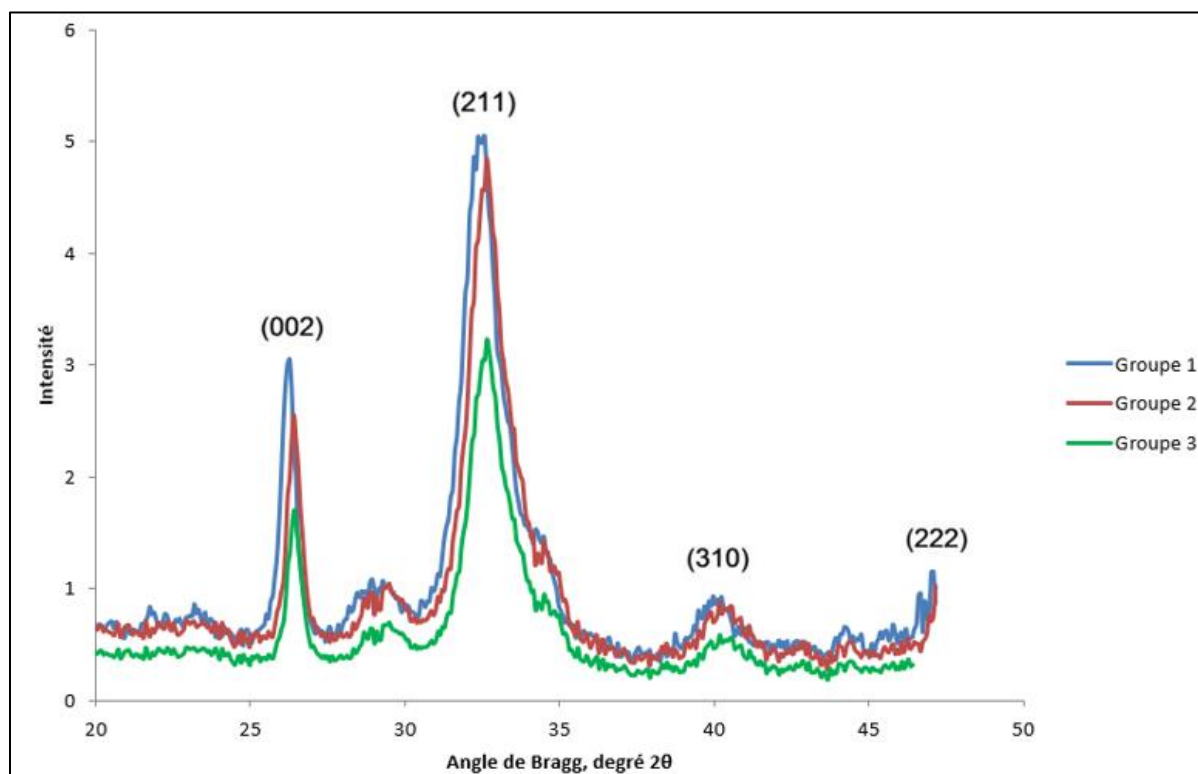


Figure 39 : superposition des diffractomètres des dents de la partie prospective de l'étude

L'intensité des pics caractéristiques aux positionnements (002), (211), (310) et (222) sont regroupés dans le tableau 9, ainsi que la différence d'intensité entre les groupes.

On observe que le niveau de cristallinité dans les dents de délai post-mortem 0 an est plus important que pour les dents des autres délais post-mortem, à l'exception du pic en position (222) où il est plus important dans les dents de délai post-mortem 1 an. Cependant ce pic n'étant pas observable pour les dents de délai post-mortem 2 ans, ne permet pas de considérer un meilleur niveau de cristallinité pour le groupe 2. Les différences d'intensité observées restent cependant peu importantes entre les dents de délai post-mortem de 0 an et de 1 an. En revanche, cette différence est plus marquée vis-à-vis des dents de délai post-mortem 2 ans et notamment au pic le plus intense positionné en (211) considéré comme le pic de référence.

		Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Différentiel	
		Intensité des pics				
Position des pics degré 2θ	(002)	3.0492	2.5543	1.7029	Groupe 1 vs Groupe 2	0.4949
					Groupe 1 vs Groupe 3	1.3463
					Groupe 2 vs Groupe 3	0.8514
	(211)	5.0472	4.8463	3.2309	Groupe 1 vs Groupe 2	0.2009
					Groupe 1 vs Groupe 3	1.8163
					Groupe 2 vs Groupe 3	1.6154
	(310)	0.8637	0.7136	0.4758	Groupe 1 vs Groupe 2	0.1501
					Groupe 1 vs Groupe 3	0.3879
					Groupe 2 vs Groupe 3	0.2378
	(222)	0.8672	2.0236	Non observable	Groupe 1 vs Groupe 2	-1.1564
					Groupe 1 vs Groupe 3	Non mesurable
					Groupe 2 vs Groupe 3	Non mesurable

Tableau 9 : différence d'intensité des pics en fonction de leur position (degré 2θ) pour les dents de délai post-mortem 0 an, 1 an et 2 ans

DISCUSSION

A partir d'éléments retrouvés dans la littérature sur des modifications d'aspects de la dentine sclérotique en post-mortem, l'objectif de notre travail était d'observer à des délais post-mortem courts : 0 an, 1 an, 2 ans, 5 ans et archéologiques datées du 18^{ème} siècle, s'il pouvait être mis en évidence des modifications de ce tissu sur des dents humaines. Nous avons tout d'abord réalisé une étude de la structure à partir d'observations au microscope électronique à balayage, que nous avons complétées par des mesures semi-quantitatives du calcium et du phosphore, ainsi que par la détection d'autres éléments, pour analyser les éventuelles variations chimiques. Les zones étudiées ont été sélectionnées à partir des hypothèses formulées sur l'apparition de la dentine sclérotique, qui débute en zone apicale, mais qui pourrait provenir de facteurs environnementaux (zone de jonction entre le ciment et la dentine) ou de facteurs internes (zone de jonction entre la pulpe et la dentine). Enfin, étant donné la présence de modifications structurales et chimiques, nous avons réalisé une étude en diffractométrie en rayons X pour une identification des cristaux et pour analyser le niveau de cristallinité.

I. Modifications structurales

1) Dentine primaire et dentine secondaire

L'organisation structurale de la dentine est complexe et se compose de trois éléments. La matrice organique est constituée de fibres de collagène principalement de type I qui est sécrétée par les odontoblastes (Goldberg *et al.* 2011 ; Abou Neel *et al.* 2016). Sous l'influence de protéines non collagéniques, les phosphoprotéines et les protéoglycanes, cette matrice va peu à peu se minéraliser et des cristaux d'apatite carbonatée vont se déposer sur les fibres de collagène (Dechichi *et al.* 2007). Ce tissu organique minéralisé va être traversé par un système tubulaire, perpendiculaire au maillage collagénique, qui correspond aux reliquats des processus odontoblastiques (Kinney *et al.* 2001 ; Nalla *et al.* 2005 ; Gotliv et Veis 2007). Les deux types de dentine physiologique dont nous avons parlé précédemment (dentine primaire et secondaire), sont de même composition (Tsurumachi *et al.* 2008). Néanmoins, il est décrit qu'elles vont se distinguer par une modification de l'orientation des tubules (Carrigan *et al.* 1984 ; Mjör *et al.* 2001). Au microscope électronique à balayage, nous avons observé une différence d'aspect des tubules entre ceux situés à proximité de la pulpe (arrondis) et ceux situés à proximité du ciment (allongés), correspondant à ce changement d'orientation notamment

observable à l'interface entre respectivement la dentine secondaire et la dentine primaire (figure 23).

2) Structure de la dentine sclérotique

Concernant la structure de la dentine sclérotique, les études menées sur des dents archéologiques ont pu observer des modifications de son aspect, sans toutefois établir de relation entre le délai post-mortem et l'importance des changements (Sengupta *et al.* 1999 ; Kyle 1986). Par exemple, des modifications très prononcées ont été mises en évidence sur des dents égyptiennes néolithiques et prédynastiques, mais pas pour des dents du mésolithique ou de l'âge de bronze (Sognaes 1955 ; Falin 1961). Ces modifications étaient en partie attribuées à une action fongique provenant des sols d'enfouissement, avec la mise en évidence d'une tunnellation du tissu, comme cela a également pu être observé en condition de submersion (Bell et Elkerton 2008 ; Massous 2019). Nous n'avons noté aucune modification du tissu au microscope ; cependant les dents que nous avons étudiées avaient un délai post-mortem très court, y compris pour les dents archéologiques ne datant que du 18^{ème} siècle et ne se trouvaient pas placées dans des conditions environnementales particulières. Le tissu dentinaire apparaissait homogène et à plus fort grossissement poreux, organisé en maille.

3) Aspect des tubules

Les modifications que nous avons pu observer au microscope électronique à balayage concernaient l'aspect des tubules et de la dentine à proximité. La matrice organique minéralisée constitue la dentine intertubulaire et les tubules qui la traversent vont être entourés d'un tissu organique, dépourvu de collagène, très fortement minéralisé appelé dentine périrtubulaire (Goldberg *et al.* 2011 ; Montoya *et al.* 2015). Au microscope nous avons pu observer la présence de ce collier entourant le tubule lui donnant un aspect en « grain de café ». Néanmoins, avec l'augmentation du délai post-mortem, ce collier disparaissait progressivement et la distinction entre la dentine intertubulaire et la dentine périrtubulaire était difficile à observer (figure 24). La disparition de la dentine périrtubulaire peut s'expliquer par des phénomènes de dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Sa structure non collagénique, comparativement à la dentine intertubulaire, facilitant cette dissolution (Weiner *et al.* 1999 ; Gotliv et Veis 2007 ; Xu *et al.* 2008). La dissolution des cristaux de la dentine est un phénomène très présent au sein de tous les tissus dentaires au cours de la vie, en lien avec les attaques acides provenant des aliments/boissons ingérés, mais également d'une production bactérienne de la bouche et en

post-mortem de l'environnement (Xu *et al.* 2010 ; Abou Neel *et al.* 2016). C'est également une des hypothèses proposée pour expliquer la formation de la dentine sclérotique lors de l'obstruction des tubules (Kinney *et al.* 2005).

Nous avons également constaté que dans les dents archéologiques, en zone apicale, les tubules apparaissaient regroupés en amas. Il n'est cependant pas possible de considérer que cette modification structurale soit en rapport avec le délai post-mortem, car elle a également été observée sur des dents cariées modernes (Mjör *et al.* 2001).

Enfin, sur ce même groupe de dents, la lumière des tubules apparaissait obstruée par un matériau hyperdense. Il pourrait s'agir de la précipitation de cristaux de taille plus importante au cours d'un phénomène de reminéralisation, sous l'influence de différents facteurs (Kendall *et al.* 2018).

II. Modifications de la phase minérale

1) Chimiques

a. Variations du rapport phosphocalcique en fonction du délai post-mortem

Afin de mettre en évidence des modifications de la composition chimique de la phase minérale de la dentine sclérotique, nous avons réalisé une analyse semi-quantitative du calcium et du phosphore, composants principaux de l'hydroxyapatite, en fonction du délai post-mortem.

Concernant l'analyse réalisée sur les dents de délai post-mortem de 5 ans et les dents archéologiques, nous avons retrouvé une moyenne du rapport phosphocalcique à 1.99, avec une distribution inhomogène et deux pics de densité observables à 1.85 et 2.10. Pour la partie prospective de l'étude, reposant sur l'analyse de dents de délai post-mortem très courts (0 an, 1 an et 2 ans), la moyenne des rapports phosphocalciques était de 2.04, avec une distribution homogène. Les données de la littérature concernant la moyenne du rapport phosphocalcique dans la dentine sont variables en fonction des sources, allant de 1.5-1.6 (Hanlie *et al.* 2006) à 2.38 (Beeley et Lunt 1980), en passant par 1.8 (Grunenwald *et al.* 2014) et 2.07 (Zapenta LeGeros 1981) et cela pour des dents modernes analysées dans le cadre d'extractions orthodontiques ou d'autopsies, ainsi que pour les dents archéologiques de périodes différentes. Néanmoins, les valeurs que nous avons pu mesurer restent dans les fourchettes décrites. Ce qui est intéressant, c'est que nos rapports phosphocalciques étaient plus bas pour les dents de délai post-mortem plus ancien. Comme nous l'avons indiqué plus haut, cette diminution de la minéralisation peut être mise en lien avec la dissolution de la dentine périrubulaire que nous avons observée en microscopie, qui va reprécipiter dans la lumière des tubules. Lors des mesures réalisées au sein de la lumière des tubules, notamment pour les dents archéologiques sur le matériau hyperdense, nous avons pu confirmer la présence de calcium et de phosphore. Néanmoins, aucune mesure semi-quantitative n'a pu être réalisée comme tenu de l'irrégularité de profondeur.

L'augmentation de la minéralisation que nous avons pu observer sur les dents de délai post-mortem court, pourrait être expliquée par une autre hypothèse proposée concernant la formation de la dentine sclérotique. Elle repose sur la mort des odontoblastes en lien avec l'apoptose cellulaire, dont les processus piégés dans les tubules ne peuvent être éliminés par les macrophages. L'odontoblaste participe à la minéralisation de la dentine par la production de pyrophosphate $P_2O_7^{4-}$, ainsi que par une activité de phosphatase alcaline qui peut hydrolyser le pyrophosphate en hydrogénophosphate HPO_4^{2-} . La dégradation des odontoblastes va donc

permettre d'augmenter la production d'hydrogénophosphate qui peut échanger des ions avec le calcium des cristaux d'hydroxyapatite, contribuant ainsi à la minéralisation tubulaire (Kabartai *et al.* 2015). Pour vérifier cette hypothèse il serait nécessaire de pouvoir mesurer le rapport molaire entre l'hydrogénophosphate et le pyrophosphate qui influent sur la formation d'hydroxyapatite (Dorozhkin 2012). Le processus odontoblastique se situant tout le long du tubule, avec un diamètre qui diminue de la pulpe vers le cément, ce phénomène serait plus important à proximité de la jonction dentine/cément. Or dans notre proposition d'un modèle prédictif de l'estimation du délai post-mortem en fonction de la valeur du rapport phosphocalcique, la zone d'analyse la mieux corrélée était la pulpe, puis le cément, dans la canine. Ces résultats confirment qu'en fonction de la zone de la dentine sclérotique, les modifications ne seront pas similaires. Cependant, ils restent à prendre avec précaution, car dans les deux parties de l'étude, la zone analysée n'expliquait que 8.8% (partie rétrospective) et 4.8% (partie prospective) de la variance du rapport phosphocalcique.

b. Substitutions chimiques

L'hydroxyapatite de calcium des tissus dentaires est un minéral non stœchiométrique permettant la substitution par différents ions. Ces substitutions vont jouer un rôle direct sur le tissu, comme les carbonates qui vont influencer la croissance des cristaux, le fluor qui limite le développement des caries, le sodium qui influence le remodelage et le magnésium qui va jouer un rôle dans la minéralisation (Dambach *et al.* 2004 ; Laurencin *et al.* 2011 ; Egan *et al.* 2013). Lors de notre analyse chimique, nous nous sommes intéressés à la détection d'autres ions à partir du tableau périodique des éléments. Les seuls ayant montré des variations détectables étaient le sodium et le magnésium. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres analyses sur des échantillons modernes et archéologiques, qui ont mis en évidence, sans les quantifier, la présence mineure de cations tels que le magnésium, le sodium et l'aluminium pour la majorité des échantillons, ainsi que des traces de strontium, de fer et de potassium dans certains échantillons (Sillen 1981 ; Daculsi *et al.* 1987 ; Egan *et al.* 2013 ; Grunenwald *et al.* 2014). L'enrichissement de l'apatite par des ions étrangers bivalents tel que le magnésium et le strontium est décrit comme plus important que pour les ions monovalents comme le sodium (Grunenwald *et al.* 2014). Cette observation est similaire à nos résultats où nous avons retrouvé des moyennes de concentration en magnésium plus importante que pour le sodium que ce soit dans la partie rétrospective de l'étude (respectivement 0.56 et 0.36) ou dans la partie prospective (respectivement 0.79 et 0.52). Ces substitutions ont été attribuées à des échanges lors des phases

de dissolution et de recristallisation de cristaux d'hydroxyapatite dans les dents vitalisées (Daculsi *et al.* 1987) ou fossilisées (Tütken et Vennemann 2011), corrélées à une diminution de la teneur en calcium de l'hydroxyapatite (Abou Neel *et al.* 2016). A partir de nos analyses, il n'est pas possible de confirmer ces éléments, car les valeurs que nous avons pu observer reposaient sur un faible échantillonnage, avec des variations pouvant être importantes en fonction des zones analysées dans une même dent.

Il est également important d'envisager, dans des études sur des échantillons archéologiques, que les substitutions ioniques puissent provenir de l'environnement dans lequel la dent se trouve, notamment dans le cadre d'enfouissement et que cette contamination va dépendre de la porosité du tissu. La porosité va déterminer la facilité avec laquelle l'eau, les ions et les micro-organismes vont pouvoir pénétrer ou sortir du tissu et donc influencer la vitesse et la nature des altérations post-mortem (Kendall *et al.* 2018). Dans une étude menée sur une tribu ancestrale de Nouvelle Guinée, neuf dents provenant de sépultures datant de -1000 à -300 ans ont été analysées. Le sol dans lequel se trouvait les sépultures contenait majoritairement de la calcite et du quartz. L'analyse des échantillons a mis en évidence la présence de ces deux éléments, en teneur faible, sans modification de la composition élémentaire (Kyle 1986). Ces constatations démontrent la possibilité d'une contamination par les sols, cependant peu importante au regard de modifications chimiques, en lien avec la faible porosité du tissu dentaire.

c. Dissolution et reprécipitation

Nous avons vu que des phénomènes de dissolution et de reprécipitation des cristaux d'hydroxyapatite de la dentine sont évoqués pour expliquer des modifications de la phase minérale en post-mortem. Ce phénomène pourrait être en lien avec une action acide, qu'elle soit chimique (Xu *et al.* 2008) ou bactérienne (Leventouri *et al.* 2009 ; Xu *et al.* 2010 ; Abou Neel *et al.* 2016).

L'action bactérienne peut être exogène (lié à l'environnement) ou endogène. L'action bactérienne endogène pouvant se produire très rapidement, dès trois jours après le décès et va être favorisée par les phénomènes de décomposition du tissu humain lui-même (Hackett 1981 ; Ascenzi et Silvestrini 1984 ; Bell *et al.* 1996). Concernant notre étude, il pourrait y avoir une influence de bactéries présentes sur la plaque dentaire, car les dents ont été nettoyées après l'avulsion, mais sans processus de décontamination ni de stérilisation chimique afin de ne pas risquer d'altérer le tissu. L'action bactérienne environnementale quant à elle, a été évoquée dans

les études sur des dents archéologiques en condition d'enfouissement (Sognaes 1955 ; Falin 1961) et de submersion (Bell et Elkerton 2008 ; Massous 2019), ne s'appliquant pas à nos échantillons de délai post-mortem précoce (0 an, 1 an et 2 ans) ou moyen (5 ans), et peu à ceux provenant des fouilles archéologiques.

Dans le cadre post-mortem, l'action chimique, en dehors d'une exposition prolongée à des produits identifiés comme tels, est attribuée à la composition acide des sols (Chaplin 1971). Comme nous l'avons décrit précédemment, c'est la porosité du tissu qui va influencer la rapidité d'altération par des facteurs environnementaux. Cependant cette exposition reste faible pour la dentine qui n'est pas directement exposée à l'environnement, puisqu'elle est protégée par l'émail et le cément. L'accessibilité au tissu se faisant par la pulpe, à travers le réseau tubulaire, qui est ouverte uniquement au niveau du foramen apical, limitant ainsi grandement l'exposition aux facteurs extérieurs (Kendall *et al.* 2018). Il existe également une action chimique interne, en lien avec l'apoptose des odontoblastes et leur absence de contrôle sur la minéralisation, qui modifie la teneur du pH du tissu, le rendant plus acide (Selvamani *et al.* 2013).

2) Cristallographiques

a. Identification des cristaux de la phase minérale

L'étude cristallographique de nos échantillons a été réalisée en diffractométrie en rayons X. Sur l'ensemble des échantillons, quel que soit le délai post-mortem, nous avons pu observer que les diffractomètres étaient tous semblables à celui de l'hydroxyapatite, avec des pics situés aux mêmes emplacements. Néanmoins l'ensemble des pics n'était pas identifiable, avec la présence d'un bruit de fond pour les dents de délai post-mortem récent (Madani 2020). Ces résultats sont semblables aux précédentes études réalisées sur la composition minérale de la dentine, où il a pu être mis en évidence des substitutions ioniques par d'autres éléments et notamment le sodium et le potassium que nous avons identifié (Sillen 1981 ; Daculsi *et al.* 1987 ; Egan *et al.* 2013 ; Grunenwald *et al.* 2014), mais ces substitutions restaient de faible importance et n'entraînaient pas de modifications majeures sur la composition cristallographique de la dentine.

b. Variations de cristallinité

Concernant l'intensité des pics, nous avons retrouvé pour les échantillons de délai post-mortem récent que ceux analysés à 0 an et 1 an étaient proches, les diffractomètres étant quasiment superposés. En revanche, à 2 ans, l'intensité était plus faible, avec un « empâtement » des pics.

Cet élargissement du spectre pourrait être en lien avec le phénomène de dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de la dentine péri-tubulaire sous l'action acide qu'elle soit chimique (Xu *et al.* 2008) ou bactériologique (Xu *et al.* 2010). Comme nous l'avons déjà évoqué nos échantillons n'ayant pas été décontaminés ni stérilisés, il est possible que durant la conservation les bactéries présentes dans la plaque dentaire aient pu exercer une influence sur les modifications observées notamment sur les niveaux de cristallinité, ce qui pourrait expliquer la diminution observée au bout des 2 ans (Leventouri *et al.* 2009). Sur les échantillons de délai post-mortem allongés, nous avons également observé une différence d'intensité des pics, plus importante pour les dents archéologiques. Comme nous l'avons évoqué concernant l'obstruction de la lumière des tubules par un matériau hyperdense, cette augmentation de cristallinité pourrait être en lien avec une augmentation de la taille des cristaux d'hydroxyapatite, ce qui a déjà pu être observé sur des matériaux humains archéologiques par rapport au tissu biominéralisés modernes. Ce phénomène est en rapport avec la dissolution de l'apatite et sa recristallisation pour former des composants plus stables et permettre au tissu de perdurer en post-mortem, se traduisant par une meilleure cristallinité du tissu (Patonai *et al.* 2013 ; Grunenwald 2014 ; Kendall *et al.* 2018). Différents paramètres vont influencer ce phénomène : l'acidité de l'environnement, la présence d'eau qui va permettre l'incorporation et la substitution avec des ions extérieurs et la perte de matière organique qui va elle-même être accélérée par l'hydrolyse acide (Kendall *et al.* 2018).

c. Implication de la phase organique

Nous n'avons pas réalisé d'analyse de la phase organique de la dentine sclérotique, mais il est indéniable qu'elle joue un rôle dans les modifications minérales que nous avons pu observer. Dans leur étude, Beeley et Lunt se sont intéressés aux modifications chimiques (calcium, phosphore et acides aminés) de sept dents présentant un aspect « *ramolli* » : quatre dents de l'âge de bronze et trois dents de la période médiévale ; comparées à six dents d'aspect « *dur* » : quatre dents du néolithique et deux dents de la fin de la période médiévale. Sur le plan minéral, il n'était pas observé de modification de teneurs en calcium et en phosphore, entre les types de dent et quel que soit le délai post-mortem. En conclusion, ils évoquaient que les modifications de « *dureté* » de la dent n'étaient pas en lien avec une atteinte de la phase minérale, mais serait en rapport avec la destruction du réseau collagénique (Beeley et Lunt 1980).

Au cours du temps, en post-mortem, la partie organique de la dentine va subir une dégradation. Il s'agit d'un processus complexe qui est lié à la nature du tissu et aux différents facteurs environnementaux dans lequel il se trouve, tels que la microbiologie, la température,

l'hygrométrie, l'hydrologie, le pH et le potentiel d'oxydoréduction du sol (Tütken et Vennemann 2011 ; Grunenwald *et al.* 2014). L'étape la plus précoce correspond à la dégradation du collagène par l'attaque microbienne et/ ou l'hydrolyse chimique. Dans l'étude de Beeley et Lunt citée précédemment, ils avaient également observé des variations dans l'analyse des protéines, toutefois sans lien avec l'âge archéologique des dents. Leur teneur était moins élevée pour les dents enfouies (correspondant aux dents molles) possiblement en lien avec l'action de collagénase bactérienne, notamment évoqué devant la présence d'une augmentation d'acide aspartique et de sérine par rapport aux dents modernes (Beeley et Lunt 1980). Dans une autre étude sur des dents du Mésolithique et du Paléolithique retrouvées dans une grotte en Angleterre, une tunnelisation attribuée à un mycelium a été mise en évidence sur quatre des dents, avec un aspect plus « *translucide* » de la dentine, attribué à la destruction du collagène. Le collagène étant protégé par les cristaux d'hydroxyapatite, il a été proposé une production simultanée d'une enzyme protéolytique (collagénase) et d'un agent de dissolution des minéraux pour expliquer la destruction dentinaire (Poole et Tratman 1978). La disparition de la partie organique va également avoir une incidence sur l'accessibilité de l'hydroxyapatite en l'exposant plus facilement aux phénomènes de dissolution et reminéralisation (Tütken et Vennemann 2011 ; Abou Neel *et al.* 2016 ; Kendall *et al.* 2018). Ces deux parties du tissu dentinaire étant synergiques.

III. Limites de l'étude

1) Méthodes d'analyse

Nous avons choisi la microscopie électronique à balayage, car cette méthode permet de visualiser la structure d'un échantillon, sans pour autant entraîner sa destruction. Toutefois, la qualité de l'analyse est fortement dépendante de la qualité de préparation de l'échantillon, c'est pour cette raison que nous avons effectué plusieurs étapes de polissage et notamment chimique (Faerber 2004 ; Marteau 2013). La tension de travail utilisée est également un facteur limitant, car une tension élevée permet de mieux distinguer les éléments (Faerber 2004 ; Marteau 2013), mais il va se créer localement un effet de charge qui peut endommager l'échantillon avec une exposition prolongée. Néanmoins, travailler à basse tension nous a permis d'obtenir des informations plus précises sur la topographie du tissu et n'apparaît pas avoir limité l'analyse chimique.

Concernant la cristallinité observée dans notre dentine sclérotique, les résultats doivent être pris avec précautions. Nous avons choisi d'effectuer les analyses sur le matériau entier et non sur poudre, ce qui a limité la qualité de l'analyse et le rendu d'intensité des pics (Rogers *et al.* 2010). L'analyse réalisée sans élimination préalable de la phase organique, a occasionné la présence d'un bruit de fond et interféré également sur l'intensité des pics observés (Egan *et al.* 2013). Ces deux paramètres ont été choisis afin d'obtenir des résultats les plus représentatifs du tissu. Enfin, nous n'avons pas non plus analysé les diffractomètres obtenus, pour mesurer les hauteurs relatives et définir l'orientation préférentielle des cristaux pour les échantillons par manque de données (Egan *et al.* 2013). Néanmoins cette problématique reste limitée car d'autres études effectuées en diffractométrie en rayons X sur des dents saines, n'ont pas mis en évidence de structure évidente ni d'orientation préférentielle des cristaux dans la dentine sclérotique (Hanlie *et al.* 2006 ; Xu *et al.* 2008 ; Xu et Wang 2012).

2) Taille de l'échantillon

Le faible nombre d'échantillons que nous avons pu utiliser pour notre travail représente la plus grande limite de notre étude. De ce fait, les résultats observés doivent être pris avec la plus grande précaution et ne sont pas généralisables. Cette faiblesse reflète deux difficultés.

La première était de pouvoir obtenir les dents nécessaires à ce travail. En France, les études réalisées en post-mortem sont effectuées dans le cadre de dons du corps à la science aux facultés

de médecine, qui ne représentent pas un très grand nombre par an. Sur le temps d'étude, nous n'avons donc pas pu obtenir un plus grand nombre de dents ni effectuer de prélèvements sur un plus grand nombre de sujets.

La seconde concernait la nécessité que nous avons d'obtenir des dents indemnes de toute pathologie, notamment carieuse. Les sujets sur lesquels nous avons pu réaliser les extractions dentaires en post-mortem étaient des sujets âgés, qui vont souvent négliger les soins dentaires en vieillissant ou parfois ne plus avoir de dents. Sur la période où nous avons réalisé notre étude seuls deux sujets ne présentaient pas ce critère d'exclusion. Par chance, nous avons pu réaliser sur chacun une extraction de neuf dents nous ayant permis de mettre en place l'analyse prospective et de pouvoir effectuer une analyse sur un même échantillonnage à différents intervalles post-mortem, mais également sur tous les types de dents monoradiculés.

3) Influence du sexe et de l'âge

Notre faible échantillonnage ne nous a pas permis d'étudier l'influence du sexe ou de l'âge sur les variations observées. Concernant le sexe, il a été mis en évidence lors d'étude sur l'apparition de la dentine sclérotique qu'il existait une différence entre les hommes et les femmes (Maples 1978), néanmoins elle n'était pas considérée comme significative (Sengupta *et al.* 1999).

Concernant l'âge, celui-ci est bien entendu corrélé au développement de la dentine sclérotique et des études archéologiques ont montré que l'utilisation de la méthode d'estimation de l'âge au décès par la mesure de la transparence radiculaire présentait un biais, compte-tenu de la difficulté à la visualiser par rapport à la dentine secondaire (Kvaal *et al.* 1994 ; Olze *et al.* 2004). Néanmoins il n'apparaît pas de différence notable sur les modifications structurales qui ont pu être observées en post-mortem (Mandojana *et al.* 2001).

Dans les analyses multifactorielles que nous avons pu réaliser sur la partie prospective de l'étude (sujets d'âge et de sexe différents), le facteur sujet n'expliquait que 1.4% de la variance, ce qui était inférieur à la zone d'analyse (4.8%) et nettement moindre que l'influence du délai post-mortem lui-même (15.3%). Cela suggère que le sexe et l'âge ne jouent qu'un rôle mineur dans les variations chimiques.

IV. Perspectives

Pour faciliter la réalisation d'études ultérieures, il pourrait être envisagé de changer de technique d'analyse et de proposer une observation en microscopie électronique en transmission. Cette technique d'imagerie a déjà été utilisée pour l'étude de la dentine sclérotique chez le vivant (Nalla *et al.* 2005). C'est une technique qui demande une plus grande préparation des échantillons que la microscopie électronique à balayage, mais qui permet de coupler l'analyse de structure, l'analyse chimique et l'analyse cristallographique en un seul temps d'examen (Alqaheem et Alomair 2020) ; ce qui donnerait l'occasion d'étudier simultanément les modifications observées et de mettre en parallèle sur des zones précises l'éventuelle disparition de la dentine péri-tubulaire, la composition phosphocalcique et la taille des cristaux d'hydroxyapatite.

Il apparaît également nécessaire de réaliser une étude sur les variations de la partie organique de la dentine sclérotique, qui sont sans aucun doute intriquées avec celles observées dans la partie minérale (Beeley et Lunt 1980). Dans ce cas, une étude par spectroscopie Raman pourrait être réalisée. C'est une technique qui repose sur les interactions entre la lumière et la matière. Elle permet de déterminer la composition d'un échantillon, ce qui aurait l'avantage de s'intéresser aux modifications concomitantes entre la phase organique et la phase minérale. Elle a déjà été utilisée sur des dents « modernes » (Balooch *et al.* 2001) et sur la caractérisation du collagène et de l'apatite (Penel *et al.* 2000).

Enfin, notre étude a été limitée en terme d'échantillons, mais également sur la durée du délai post-mortem étudié. Nous avons mis en évidence qu'il existait des variations sur des délais courts et notamment entre 1 et 2 ans de délai post-mortem. Envisager de réaliser une conservation plus longue des échantillons permettrait d'observer comment le rapport phosphocalcique et la cristallinité évoluent ; mais également de poursuivre le raisonnement sur l'analyse prédictive du délai post-mortem à partir des variations observées.

CONCLUSION

Face aux modifications d'aspect et de consistance décrites sur des dents archéologiques, nous avons postulé qu'il pouvait exister des modifications structurales et/ou chimiques de la dentine sclérotique en fonction du délai post-mortem.

L'objectif primaire de notre travail était de mettre en place une méthodologie de préparation et d'analyse des échantillons pour observer la phase minérale de la dentine sclérotique humaine et son évolution en post-mortem. Nous avons pu proposer un protocole d'étude associant une observation en microscopie électronique à balayage pour l'analyse de structure couplée à une microanalyse chimique et une diffraction en rayons X pour étudier la cristallinité du tissu.

Notre second objectif, à partir d'une étude prospective de dents extraites et analysées à différents intervalles post-mortem, était de pouvoir rechercher la présence de modifications de la phase minérale de la dentine sclérotique. Notre travail nous a permis de confirmer qu'il existait des modifications post-mortem de phase minérale de la dentine sclérotique humaine, en fonction du délai écoulé.

L'observation en microscopie électronique à balayage a mis en évidence des modifications tubulaires, sous la forme d'une disparition de la dentine péritubulaire et d'une précipitation d'un matériau hyperdense dans la lumière des tubules, corrélées au délai post-mortem. Ces modifications de structure s'accompagnaient de variations des rapports phosphocalciques, ainsi que du sodium et du magnésium, lors de la microanalyse chimique. L'analyse cristallographique a confirmé que les cristaux de la dentine sclérotique étaient de l'hydroxyapatite, mais qu'il existait une variation de la cristallinité en fonction du délai post-mortem. Celle-ci diminuait sur des délais post-mortem courts, mais était plus importante sur les dents archéologiques.

L'ensemble de ces éléments, comparés aux données de la littérature, nous font évoquer des phénomènes de dissolution des cristaux au pourtour des tubules, avec une reprécipitation de cristaux de taille plus importante dans la lumière, en post-mortem, sous l'influence d'une action acide pouvant provenir initialement de phénomènes internes par l'apoptose des odontoblastes et plus tardivement de phénomènes externes par l'action de bactéries et/ou une contamination environnementale, restant cependant limitée compte-tenu de la faible porosité du tissu dentaire et des limites d'accessibilité à la dentine.

La plus grande limite du travail reposait sur le faible échantillonnage et il est nécessaire de pouvoir effectuer ces analyses sur un plus grand nombre de dents et sur des délais post-mortem allongés permettant un meilleur suivi des variations chimiques et cristallographiques observées. En effet, à partir des variations observées, nous avons pu envisager la mise en place d'un modèle prédictif qui pourrait permettre d'estimer le délai post-mortem en fonction de la mesure du rapport phosphocalcique selon le type de dent et la zone analysée, ce qui représenterait un intérêt pratique en médecine légale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4743-63.

Alqaheem Y, Alomair AA. Microscopy and Spectroscopy Techniques for Characterization of Polymeric Membranes. *Membranes (Basel)*. 24 févr 2020;10(2):33.

Aronica C, Jeanneau E. Diffraction des rayons X – Techniques et études des structures cristallines. Ecole Nationale Supérieure de Lyon, Culture Sciences-Physiques [en ligne]. 2009. Disponible : http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/XML/db/csphysique/metadata/LOM_CSP_Diffraction-rayons-X-techniques-determination-structure.xml

Ascenzi A, Silvestrini G. Bone-boring marine micro-organisms: an experimental investigation. *Journal of Human Evolution*. 1 sept 1984;13(6):531-6.

Auclair Jean-Jacques. Fonctionnement du MEB / Principe de la microanalyse EDX [en ligne]. 2016. Disponible : <http://jean-jacques.auclair.pagesperso-orange.fr/meb/meb.htm>

Balooch M, Demos SG, Kinney JH, et al. Local mechanical and optical properties of normal and transparent root dentin. *J Mater Sci Mater Med*. juin 2001;12(6):507-14.

Bang G, Ramm E. Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontol Scand*. mars 1970;28(1):3-35.

Beauthier JP (2011). *Traité de médecine légale*. 2nd ed De Boeck S.A

Beeley JG, Lunt DA. The nature of the biochemical changes in softened dentine from archaeological sites. *Journal of Archaeological Science*. 1 déc 1980;7(4):371-7.

Bell L, Elkerton A. Unique marine taphonomy in human skeletal material recovered from the medieval warship Mary Rose. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1 sept 2008;18:523-35.

Bell LS, Skinner MF, Jones SJ. The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci Int*. 30 sept 1996;82(2):129-40.

Bhuyan L, Behura SS, Dash KC, Mishra P, Mahapatra N, Panda A. Characterization of histomorphological and microbiological changes in tooth pulp to assess post-mortem interval: an observational study. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 3 juill 2020;10(1):19.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. févr 1995;39(1):169-79.

Camargo MA, Marques MM, de Cara AA. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Arch Oral Biol*. févr 2008;53(2):105-8.

Cappella A, Gibelli D, Muccino E, Scarpulla V, Cerutti E, Caruso V, et al. The comparative performance of PMI estimation in skeletal remains by three methods (C-14, luminol test and OHI): analysis of 20 cases. *Int J Legal Med*. juill 2018;132(4):1215-24.

Carrasco PA, Brizuela CI, Rodriguez IA, Muñoz S, Godoy ME, Inostroza C. Histological transformations of the dental pulp as possible indicator of post mortem interval: a pilot study. *Forensic Sci Int*. oct 2017;279:251-7.

Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*. août 1984;10(8):359-63.

Cazorla G. Licences Masters Staps. Bordeaux. Cours sur le muscle strié squelettique [en ligne]. 2004, page 18. Disponible : <https://areaps.org/ppt/Cours%20physiologie%20licence%2C%20masters/Cazorla%20G.%20202%20Muscle%20stri%C3%A9%20squelettique%20Cours%20Licences%20Masters%20Staps.pdf>

Chaplin RE. *Study of Animal Bones from Archaeological Sites*. 1st edition. London, New York: Academic Press Inc; 1971. 170 p.

Cunha M, Menezes F, Santos G, Pinto C, Barraviera B, Martins V, et al. Hydroxyapatite and a New Fibrin Sealant Derived from Snake Venom as Scaffold to Treatment of Cranial Defects in Rats. *Materials Research*. 1 févr 2015;18:196-203.

Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res*. août 1987;66(8):1356-9.

Dambach S, Fartmann M, Kriegeskotte C, Brüning C, Hellweg S, Wiesmann H, et al. ToF-SIMS and laser-SNMS analysis of apatite formation in extracellular protein matrix of osteoblasts in vitro. *Surface and Interface Analysis*. 1 août 2004;36:711-5.

Dechichi P, Biffi J, Christian Gomes Moura C, Ameida A. A model of the early mineralization process of mantle dentin. *Micron (Oxford, England : 1993)*. 1 févr 2007;38:486-91.

Delannoy Y. Caractérisation de la diagénèse osseuse en anthropologie médico-légale : étude macroscopique, spectrométrique et histomorphologique. Université du droit et de la Santé – Lille 2, Ecole doctorale biologie et santé, thèse soutenue le 15 décembre 2016. 136 pages.

De Luca S, Alemán I, Bertoldi F, Ferrante L, Mastrangelo P, Cingolani M, et al. Age estimation by tooth/pulp ratio in canines by peri-apical X-rays: reliability in age determination of Spanish and Italian medieval skeletal remains. *Journal of Archaeological Science*. 1 déc 2010;37(12):3048-58.

Dorozhkin SV. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. *World J Methodol*. 26 févr 2012;2(1):1-17.

Dumolié C. Conserver la vitalité pulpaire en cas de lésion carieuse profonde : intérêts et principes. Université Toulouse III – Paul Sabatier, Faculté de chirurgie dentaire, thèse soutenue le 30 juin 2016. 72 pages.

Egan CK, Jacques SDM, Di Michiel M, Cai B, Zandbergen MW, Lee PD, et al. Non-invasive imaging of the crystalline structure within a human tooth. *Acta Biomaterialia*. 1 sept 2013;9(9):8337-45.

Faerber J. Microscopie électronique à balayage - Microanalyse X par sonde électronique. Institut de physique et de chimie des matériaux. Strasbourg [en ligne]. 2004. Disponible : <https://docplayer.fr/14095400-Microscopie-electronique-a-balayage-microanalyse-x-par-sonde-electronique.html>

Falin LI. Histological and histochemical studies of human teeth of the Bronze and Stone Ages. *Archives of Oral Biology*. 1 sept 1961;5(1):5-13.

Farges JC. La dentinogenèse [en ligne]. 2011-2012. Disponible : <https://docplayer.fr/16725904-Bonjour-a-tous-je-suis-le-docteur-jean-christophe-farges-professeur-des-universites-a-la-faculte-d-odontologie-de-l-universite-lyon-1-et-praticien.html>

Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning Electron Microscopy. *Current Protocols in Microbiology*. 2012;25(1):2B.2.1-2B.2.47.

Frank RM. Ultrastructure of human dentine 40 years ago--progress and perspectives. *Arch Oral Biol*. déc 1999;44(12):979-84.

Galloway A, Birkby WH, Jones AM, Henry TE, Parks BO. Decay rates of human remains in an arid environment. *J Forensic Sci*. mai 1989;34(3):607-16.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62.

Garcés-Ortíz M, Ledesma-Montes C, Reyes-Gasga J. Scanning Electron Microscopic Study on the Fibrillar Structures within Dentinal Tubules of Human Dentin. *J Endod*. sept 2015;41(9):1510-4.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 1 janv 2011;3:711-35.

Gotliv BA, Veis A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. *Calcif Tissue Int*. sept 2007;81(3):191-205.

Gravereau P. Université Bordeaux 1. Cours introduction à la pratique de la diffraction des rayons X par les poudres [en ligne]. 2012. Disponible : https://pmc.polytechnique.fr/pagesperso/tga/SMNO/documents_divers/Diffraction_des_rayons_X_Pierre_Gravereau_ICMCB.pdf

Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Lea & Febiger; 1918. 1396 p.

Grunenwald A, Keyser C, Sautereau AM, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. Novel contribution on the diagenetic physicochemical features of bone and teeth minerals, as substrates for ancient DNA typing. *Anal Bioanal Chem*. juill 2014;406(19):4691-704.

Gustafson G. Age determination on teeth. *J Am Dent Assoc*. juill 1950;41(1):45-54.

Hackett CJ. Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Med Sci Law*. oct 1981;21(4):243-65.

Hanlie H, Liyun T, Tao J. The crystal characteristics of enamel and dentin by XRD method. *J Wuhan Univ Technol-Mat Sci Edit*. 1 mars 2006;21(1):9-12.

Harrán Ponce E, Canalda Sahli C, Vilar Fernandez JA. Study of dentinal tubule architecture of permanent upper premolars: evaluation by SEM. *Aust Endod J*. août 2001;27(2):66-72.

Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Sci Int*. 10 sept 2004;144(2-3):167-75.

Kabartai F, Hoffmann T, Hannig C. The physiologic sclerotic dentin: A literature-based hypothesis. *Medical Hypotheses*. 1 déc 2015;85(6):887-90.

Kendall C, Eriksen AMH, Kontopoulos I, Collins MJ, Turner-Walker G. Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 1 févr 2018;491:21-37.

Kinney JH, Pople JA, Marshall GW, Marshall SJ. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study. *Calcif Tissue Int*. juill 2001;69(1):31-7.

Kinney JH, Nalla RK, Pople JA, Breunig TM, Ritchie RO. Age-related transparent root dentin: mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. *Biomaterials*. 1 juin 2005;26(16):3363-76.

Knight B. (1996) *Forensic pathology*. Oxford University Press, London.

Kvaal SI, Koppang HS, Solheim T. Relationship between age and deposit of peritubular dentine. *Gerodontology*. déc 1994;11(2):93-8.

Kyle JH. Effect of post-burial contamination on the concentrations of major and minor elements in human bones and teeth—the implications for palaeodietary research. *Journal of Archaeological Science*. 1 sept 1986;13(5):403-16.

Lamendin H, Baccino E, Humbert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerilli A. A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental method. *J Forensic Sci*. sept 1992;37(5):1373-9.

Laurencin D, Almora-Barrios N, de Leeuw NH, Gervais C, Bonhomme C, Mauri F, et al. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials*. 1 mars 2011;32(7):1826-37.

Le Garff E, Mesli V, Delannoy Y, Colard T, Demondion X, Becart A, et al. Technical note: early post-mortem changes of human bone in taphonomy with μ CT. *Int J Legal Med*. mai 2017;131(3):761-70.

Le Garff E. Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner. Université de Lille, Ecole doctorale biologie santé, thèse soutenue le 10 décembre 2018. 147 pages.

Leventouri Th, Antonakos A, Kyriacou A, Venturelli R, Liarokapis E, Perdikatsis V. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *Int J Biomater*. 2009;2009:698547.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):679-728.

López-Nicolás M, Canteras M, Luna A. Age estimation by IBAS image analysis of teeth. *Forensic Sci Int*. mars 1990;45(1-2):143-50.

Madani N. Etude de quelques cristaux par diffraction de rayons X. Université A. Mira-Bejaia, Département de physique. Mémoire de Master spécialité physique des matériaux, soutenu le 07 septembre 2020. 78 pages.

Mandojana JM, Martin-de las Heras S, Valenzuela A, Valenzuela M, Luna JD. Differences in morphological age-related dental changes depending on postmortem interval. *J Forensic Sci*. juill 2001;46(4):889-92.

Mandurah MM, Sadr A, Bakhsh TA, Shimada Y, Sumi Y, Tagami J. Characterization of transparent dentin in attrited teeth using optical coherence tomography. *Lasers Med Sci*. mai 2015;30(4):1189-96.

Maniguet L, Repoux M, Ruste J, Roussel-Dherbey F. Microscopie électronique à balayage et Microanalyses. 2009. Ressource en ligne, disponible : <http://excerpts.numilog.com/books/9782759800827.pdf>.

Maples WR. An improved technique using dental histology for estimation of adult age. *J Forensic Sci*. oct 1978;23(4):764-70.

Marchand E. Etude des modifications structurales de la transparence radicaire dentaire post mortem : analyse au microscope électronique à balayage. Université de Lille – Master Recherche Biologie – Santé. Mémoire de recherche, Année universitaire 2015-2016. 34 pages.

Marteau J. Caractérisation multi-échelle et analyse par essai d'indentation instrumentée de matériaux à gradient générés par procédés mécaniques et thermochimiques de traitement de surface. Université de Technologie de Compiègne, thèse soutenue le 15 octobre 2013. 214 pages.

Massous S. Étude de la diagenèse des tissus dentaires immergés en milieu naturel salin et hyperbare : processus de tunnélisation dentinaire par les micro-organismes. Université Paris Diderot – Paris 7, Faculté de chirurgie dentaire, thèse soutenue le 11 décembre 2019. 146 pages.

METRICS – ULR 2694 – Université de Lille [en ligne]. Disponible : <https://metrics.univ-lille.fr/>

Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Dentinal proteoglycans demonstrate an increasing order of affinity for hydroxyapatite crystals during the transition of predentine to dentine. *Calcif Tissue Int.* sept 2004;75(3):197-204.

Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Adsorption and interactions of dentine phosphoprotein with hydroxyapatite and collagen. *Eur J Oral Sci.* juin 2006;114(3):223-31.

Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol.* mai 1996;41(5):401-12.

Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J.* juill 2001;34(5):346-53.

Montoya C, Arango-Santander S, Peláez-Vargas A, Arola D, Ossa EA. Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. *Arch Oral Biol.* déc 2015;60(12):1811-20.

Nalla RK, Porter AE, Daraio C, Minor AM, Radmilovic V, Stach EA, et al. Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. *Micron.* 2005;36(7-8):672-80.

Olze A, Geserick G, Schmeling A. Age estimation of unidentified corpses by measurement of root translucency. *J Forensic Odontostomatol.* déc 2004;22(2):28-33.

Panfilov P, Zaytsev D, Antonova OV, Alpatova V, Kiselnikova LP. The Difference of Structural State and Deformation Behavior between Teenage and Mature Human Dentin. *Int J Biomater.* 2016;2016:6073051.

Paredes C. Dentinogenèse imparfaite de type II présentation d'un cas familial. Université Toulouse III – Paul Sabatier, Faculté de chirurgie dentaire, thèse soutenue le 23 novembre 2012, 112 pages.

Patonai Z, Maasz G, Avar P, Schmidt J, Lorand T, Bajnoczky I, et al. Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *Int J Legal Med.* mars 2013;127(2):529-33.

Penel G, Leroy G, Leroy N, et al. Spectrometrie Raman appliquée aux tissus calcifiés et aux biomateriaux Phospho-Calciques. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* janv 2000;42:55-63.

Person A, Bocherens H, Saliège JF, Paris F, Zeitoun V, Gérard M. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis. *Journal of Archaeological Science.* 1 mars 1995;22(2):211-21.

Plateforme de Microscopie Electronique - Université de Lille [en ligne]. Disponible : <https://pmel.univ-lille.fr/>

Poole DFG, Tratman EK. Post-mortem changes in human teeth from late upper Palaeolithic/Mesolithic occupants of an English limestone cave. *Archives of Oral Biology.* 1 janv 1978;23(12):1115-20.

Porter AE, Nalla RK, Minor A, Jinschek JR, Kisielowski C, Radmilovic V, et al. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials.* déc 2005;26(36):7650-60.

Rey C, Combes C, Drouet C, Sfihi H, Barroug A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C.* 1 mars 2007;27(2):198-205.

Ribes S. Pathologies génétiques affectant la minéralisation de la dent : exemple de l'amélogenèse imparfaite et de la dysplasie dentaire. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre, thèse soutenue le 18 janvier 2018, 129 pages.

Rogers K, Beckett S, Kuhn S, Chamberlain A, Clement J. Contrasting the crystallinity indicators of heated and diagenetically altered bone mineral. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 1 oct 2010;296(1):125-9.

Rouge-Maillart C. DESC de Médecine Légale. Angers. Cours sur l'anthropologie médico-légale, 18 décembre 2013, diapositive 79.

Selvamani M, Madhushankari G S, Basandi P S, Donoghue M, Nayak V, Diwakar G. Effect of Vitality on Translucent Dentine – A Study. *J Int Oral Health*. avr 2013;5(2):1-7.

Sengupta A, Whittaker DK, Shellis RP. Difficulties in estimating age using root dentine translucency in human teeth of varying antiquity. *Arch Oral Biol*. nov 1999;44(11):889-99.

Serna F, Lagneau J, Carpentier J M. La diffraction des rayons X : une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques. *Chimie Nouvelle*. Oct 2014 ;116 :1-12.

Sillen A. Strontium and diet at Hayonim Cave. *Am J Phys Anthropol*. oct 1981;56(2):131-7.

Simon S, Cooper PR, Lumley PJ. Understanding pulp biology for routine clinical practice. *ENDO (Lond Engl)*. 1 janv 2009;3:171-84.

Sognaes RF. Postmortem microscopic defects in the teeth of ancient man. *AMA Arch Pathol*. mai 1955;59(5):559-70.

Solheim T. Dental root translucency as an indicator of age. *Scand J Dent Res*. juin 1989;97(3):189-97.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 1 mai 2003;116(Pt 9):1647-8.

Thomas GJ, Whittaker DK, Embery G. A comparative study of translucent apical dentine in vital and non-vital human teeth. *Arch Oral Biol*. janv 1994;39(1):29-34.

Tsurumachi T, Huang TJ, Zhan W, Hayashi M, Ogiso B. Scanning electron microscopic study of dentinal pulpal walls in relation to age and tooth area. *J Oral Sci.* juin 2008;50(2):199-203.

Tütken T, Vennemann T. Fossil bones and teeth: Preservation or alteration of biogenic compositions? Preface. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.* 1 sept 2011;310.

Unité de Catalyse et Chimie du Solide UMR 8181 – Université de Lille [en ligne]. Disponible : <https://uccs.univ-lille.fr/index.php/fr/>

Unité Matériaux et Transformations CNRS UMR 8207 - Université de Lille [en ligne]. Disponible : <https://umet.univ-lille.fr/>

Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The histology of sclerotic human root dentine. *Arch Oral Biol.* 1983;28(8):693-700.

Vavpotic M, Turk T, Martincic DS, Balazic J. Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem. *Forensic Sci Int.* 15 déc 2009;193(1-3):122-6.

Vennat E. Etude numérique et expérimentale de l'infiltration de la dentine déminéralisée en surface par des résines composites. Ecole Centrale de Paris, Spécialité mécanique, thèse soutenue le 19 octobre 2009. 227 pages.

Weiner S, Veis A, Beniash E, Arad T, Dillon JW, Sabsay B, et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J Struct Biol.* 1 juin 1999;126(1):27-41.

Whittaker DK, Bakri MM. Racial variations in the extent of tooth root translucency in ageing individuals. *Arch Oral Biol.* janv 1996;41(1):15-9.

Xu Z, Neoh KG, Kishen A. Monitoring acid-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). *J Dent.* déc 2008;36(12):1005-12.

Xu Z, Neoh KG, Amaechi B, Kishen A. Monitoring bacterial-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy. *J Dent.* févr 2010;38(2):138-48

Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. *Arch Oral Biol.* avr 2012;57(4):383-91.

Xue J, Zavgorodniy AV, Kennedy BJ, Swain MV, Li W. X-ray microdiffraction, TEM characterization and texture analysis of human dentin and enamel. *J Microsc.* août 2013;251(2):144-53.

Yadav AB, Angadi PV, Kale AD, Yadav SK. Histological assessment of cellular changes in postmortem gingival specimens for estimation of time since death. *J Forensic Odontostomatol.* 1 juill 2015;33(1):19-26.

Yan W, Jiang E, Renteria C, Paranjpe A, Arola DD, Liao L, et al. Odontoblast apoptosis and intratubular mineralization of sclerotic dentin with aging. *Archives of Oral Biology.* 1 avr 2022;136:105371.

Zapanta LeGeros R. Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization.* 1 janv 1981;4(1):1-45.

ARTICLE DE THESE

Article

Study of Root Transparency in Different Postmortem Intervals Using Scanning Electron Microscopy

Elodie Marchand ^{1,2,*}, Benoit Bertrand ^{1,3} , Valéry Hedouin ¹, Xavier Demondion ¹ and Anne Becart ¹

¹ Unité de Taphonomie Médico-Légale et Anatomie, ULR 7367, Faculté de Médecine, Université de Lille, 59000 Lille, France; anne.becart@univ-lille.fr (A.B.)

² CHRU Nancy, Service de Médecine Légale, 54000 Nancy, France

³ Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Homme et Environnement, UMR 7194—HNHP, Institut de Paléontologie Humaine, 75013 Paris, France

* Correspondence: e.marchand06@gmail.com; Tel.: +33-320623501; Fax: +33-320623512

Abstract: In the fields of forensics, the identification of human remains is a recurrent problem. The estimated age at death is one of the copious criteria to be evaluated. In adult teeth, the height of the root dentin transparency is used to estimate age. However, in archaeological material, this phenomenon appears inconstant. The aim of this work was to observe the structural modifications of the sclerotic dentin in the teeth for different postmortem intervals. The study included two parts (retrospective and prospective study) with 21 human monoradicular teeth, from bodies donated to medical science with postmortem intervals (PMIs) of 0, 1, 2 and 5 years and archeological excavation. After inclusion based on resin, section and polishing, the samples were analyzed with a scanning electron microscope (SEM) JSM-7800F[®], and the procedure was completed via a semiquantitative analysis of calcium and phosphorus using EDX microanalysis. The analysis showed the existence of tubular and chemical modifications of sclerotic dentin at different PMIs. Our SEM study allowed us to observe a difference in tubule aspects linked to an increased PMI: the loss of peritubular collar and the lumen obstruction of tubules with a hyperdense material. Microanalysis highlighted variations in phosphocalcic ratios among the different groups, especially in the pulp area and the canine. Our hypotheses that explain these differences are based on the postmortem modifications of the crystals of the mineral phase of sclerotic dentin under the influence of chemical and/or bacterial action.



Citation: Marchand, E.; Bertrand, B.; Hedouin, V.; Demondion, X.; Becart, A. Study of Root Transparency in Different Postmortem Intervals Using Scanning Electron Microscopy.

Diagnostics **2023**, *13*, 2808. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13172808>

Academic Editor: Daniel Fried

Received: 30 July 2023

Revised: 23 August 2023

Accepted: 25 August 2023

Published: 30 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: forensic science; taphonomy; sclerotic dentin; root transparency; postmortem changes; scanning electron microscopy; estimated age at death

1. Introduction

Dentin is the tooth's most voluminous tissue [1,2]. It surrounds the pulp and is covered coronally by enamel and radicularly by cementum. It is a tissue composed of 70% mineral matrix (carbonated hydroxyapatite crystals), 20% organic matrix (mainly type I collagen) and 10% water, with thousands of parallel tubules extending from the pulp to the enamel and cementum [3,4]. Dentin is in a perpetual state of remodeling, linked to pulpal vitality, enabling us to distinguish three types of dentin. Primary dentin forms during the development of the tooth until the apexes close. Secondary dentine, with the same composition as primary dentine, gradually replaces it by apposition to the pulp periphery. Finally, tertiary dentine is a reaction tissue produced by odontoblasts in response to physical, chemical or biological aggression [4–6]. Like all human tissues, dentin undergoes physiological ageing, starting at the apex and increasing in a coronal direction around the age of 20–25 years; this is known as sclerotic dentin [1,5,7,8]. However, the mechanisms behind this phenomenon are still poorly understood and controversial [9,10]. Some authors state that it is the dissolution of intertubular dentin crystals which precipitate into the tubule lumen [1,11,12], others claim that it corresponds to the centripetal growth of peritubular dentin through continuous mineralization [4,13,14] and, more recently, studies

assert that obstruction is linked to odontoblast apoptosis [8,10]. In all cases, this intratubular mineralization leads to a partial or even complete occlusion of the tubule [5,15], resulting in a change in the refractive index through the tissue and a translucent appearance in the light [11,16]. Since root transparency is an ante-mortem evolutionary phenomenon, and studies have shown that it correlates well with a subject's age [7], this parameter is frequently used in techniques for estimating age at death. It is generally associated with other factors, such as periodontal disease [17,18], but can also be used as the sole criterion [19]. The methods described are performed either on whole teeth [18–20] or on sectioned teeth [17,19,21]. Although the height of root transparency is commonly used to estimate age at the time of death, particularly in the forensic context of the discovery of altered bodies [9], this phenomenon, observed in subjects who have died recently (several decades), appears to be inconstant in older, particularly archaeological, cases [7]. Associated with the disappearance of the transparency phenomenon, tissue alterations have been described, such as “chalky” dentine [7] or “softened” dentine [22], suggesting that structural modifications of sclerotic dentine occur with postmortem interval. Most studies of sclerotic dentin have focused on the changes observed in relation to secondary dentin. Porter's electron microscopy and Mandurah's optical coherence tomography revealed structural differences between the two types of dentin in terms of hydroxyapatite crystal size [1,23]. Raman spectroscopy by Balooch suggested changes in chemical composition, and Kinney found differences in mineralization on X-ray microtomography [11,15]. Postmortem studies have focused on the application of age estimation methods to archaeological materials [7], or on the biological and biochemical phenomena involved in the transformation of a body subjected to different environmental conditions, such as burial [22] or submersion [24]. No basic studies have been carried out on structural, mineral or organic changes in sclerotic dentine after death.

Based on the work carried out on sclerotic dentin and the changes reported by authors, we were interested in the possible changes that could be observed in sclerotic dentin postmortem. Our aim was to propose a methodology for sample preparation and analysis using scanning electron microscopy coupled with microanalysis, complemented by crystallographic analysis using X-ray diffractometry, and then to make observations using repeated measurements to look for variations over time.

2. Material and Methods

2.1. Population

The study was carried out on twenty-four monoradicular human teeth. In order to be able to make comparisons on the data studied and in particular the chemical variations, we selected the three types of monoradicular teeth (incisor, canine and premolar) for each postmortem interval subgroup. The work was divided into two parts: retrospective and prospective:

(1) Retrospective part

This part of the study was carried out on six teeth. Three teeth were donated to science from the Anatomy Laboratory of the Faculty of Medicine of Lille. They were an incisor from a 55-year-old man, a canine from a 60-year-old woman and a lower premolar from a 75-year-old woman. These teeth had been extracted five years before the start of our work. The other three teeth (an incisor, a canine and a premolar) date from the 18th century and come from archaeological excavations.

(2) Prospective part

For this study, eighteen monoradicular human teeth, without morphological, carious or restorative anomalies, were used and separated into 3 groups according to postmortem time: after extraction (group 1), then after conservation for 1 year (group 2) and for 2 years (group 3). We used teeth from body donations to science from the Anatomy Laboratory of the Faculty of Medicine of Lille, free of cancerous, hormonal and/or nutritional pathology. We included teeth from two body donations, a 75-year-old man (subject A) and a 92-year-

old woman (subject C). All teeth were extracted by the same odontologist, immediately after the subject's arrival at the laboratory, with no embalming or freezing procedures applied to the cadavers. In each subgroup, three monoradicular teeth from the same individual were used (one incisor, one canine and one premolar).

2.2. Conservation and Preparation

After extraction, each tooth was washed with distilled water and then dried manually. Teeth from groups 2 and 3 were stored individually in hermetically sealed plastic containers under the same conditions as teeth from the retrospective part of the 5-year postmortem period; under a laboratory hood at 20 °C, 60% humidity and an average pressure of 101.7 kPa [25,26]. To consolidate the specimen prior to cutting and polishing, the teeth were embedded in epoxy resin (Araldite® AY 103/Hardener HY 991, Huntsman Advanced Materials, Basel, Switzerland). After curing, each tooth was sectioned longitudinally and then transversely, preserving the sclerotic dentin zone. The cuts were made using a low-speed saw (IsoMet® LS, Buehler, IL, USA) and a diamond disc. The final size of each sample was 1 × 1 × 0.5 cm. To obtain a smooth surface, several polishing phases were applied using a hand polisher (1.03.20, Brot technologies®, Argenteuil, France). Four successive stages were carried out with silicon carbide polishing discs with grain sizes of P600, P800, P1000 and P1200 (DP 250 AC, Brot technologies®, Argenteuil, France) and two successive stages were carried out with polishing discs and alumina suspension, with grain sizes of 2 µm and 0.5 µm. At each stage, a surface inspection was carried out with an optical microscope (LaboVal 4, Zeiss, Oberkochen, Germany) before moving on to the next stage. Finally, the samples were immersed in an ultrasonic bath (Elmasonic S10, Elma ultrasonic, Singen, Germany) of distilled water for 20 min to remove residual particles from the surfaces.

2.3. Scanning Electron Microscopy Analysis

As the biological samples were not conductive, a metallization step was carried out. A thin layer of chromium was deposited via sputtering (PECS, Gatan, Pleasanton, CA, USA). After metallization, the samples were analyzed in a scanning electron microscope (JSM-7800F, JEOL, Tokyo, Japan) at 5 kV. Observations were made using secondary electrons, followed by backscattered electrons. For each sample, three areas were selected in the sclerotic dentin as specific locations for photomicrography: the apical zone (just above root closure), in the immediate vicinity of the cementum–dentin junction and in the immediate vicinity of the dentin–pulp interface. In the junction zones, the reference distance was taken at half the height of the root transparency. Magnifications ranged from ×300 to ×20,000. All observations were made by the same observer. As the mineral phase of dentin is composed of carbonated hydroxyapatite crystals [7], we carried out a semi-quantitative analysis of calcium and phosphorus, supplemented by the detection of other elements from the periodic table of elements. These analyses were carried out using energy dispersive X-ray (EDX) microanalysis (AZtec, Oxford Instruments, Abington, UK) with a beam voltage of 10 kV. For each sample, ninety measurements (area 5 µm × 5 µm) were taken in peritubular and intertubular dentin, corresponding to thirty per study area in the locations of the microphotographs.

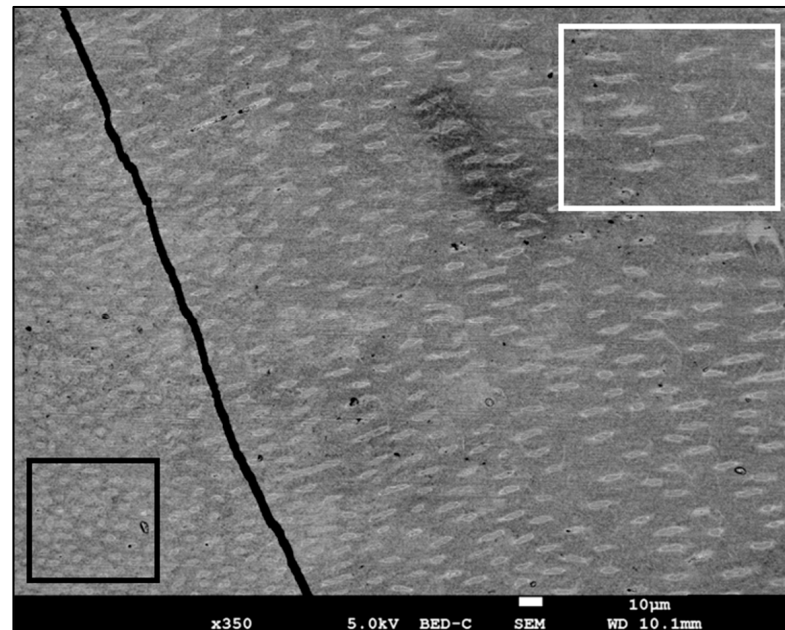
2.4. Statistical Analysis

The results of the microanalyses were entered into a database. We analyzed data from the retrospective and prospective parts of the study separately. For each part, the distribution of the phosphocalcic, sodium and magnesium ratio was analyzed. A multivariate analysis of variance (ANOVA) was performed to analysis the share of variance explained for each factor. For the prospective part of the study, we carried out two correlation tests (Pearson and Spearman) in order to identify a context where the phosphocalcic ratio could best predict the postmortem interval.

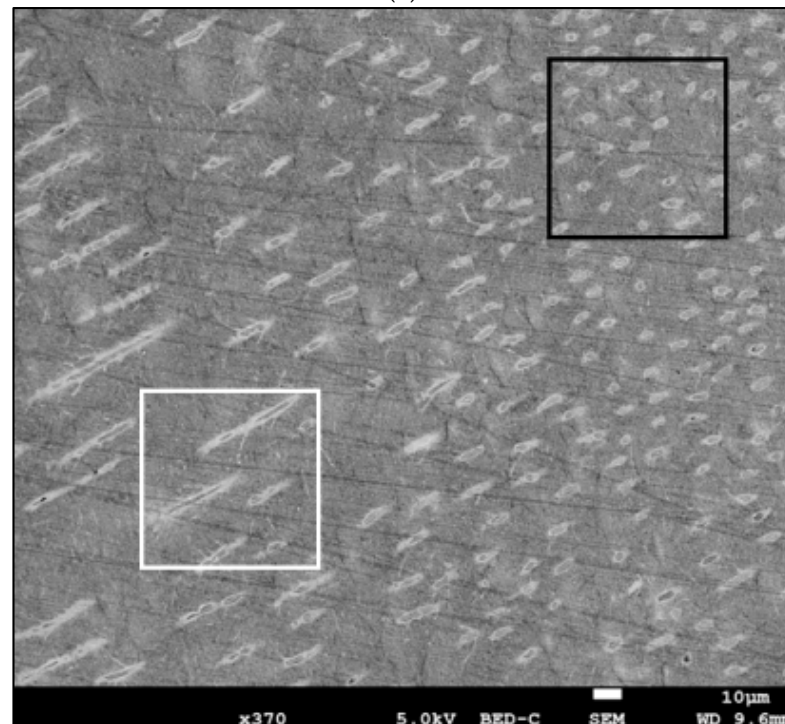
2.5. Results

(1) Appearance of sclerotic dentin and tubules

SEM analysis for all samples showed a homogeneous appearance of the sclerotic dentin. In secondary and backscattered electrons, structural analysis of sclerotic dentin indicated that tubules were concentrated close to the pulp chamber. However, we observed two types of tubules in sclerotic dentin. Tubules close to the pulp had a rounded appearance, while those close to the cementum–dentin junction were elongated. It was even possible to distinguish the transition zone between the two types (Figure 1).

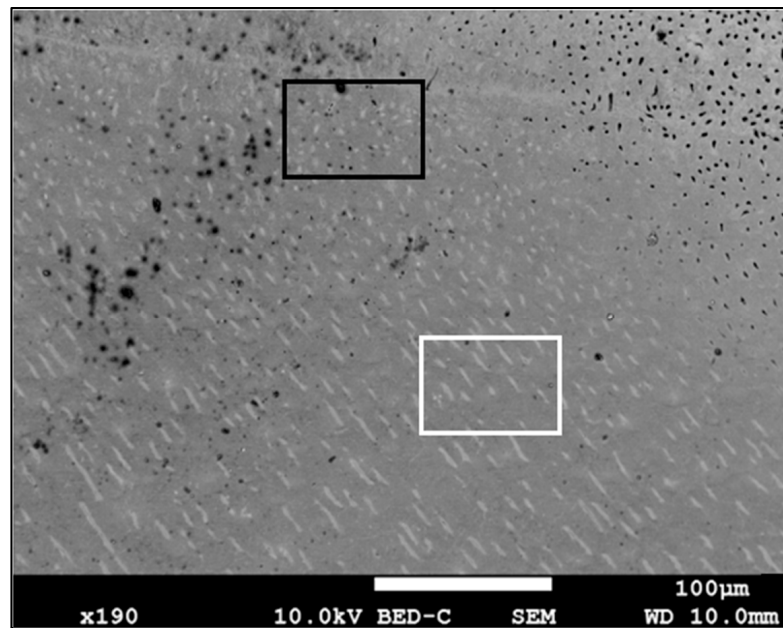


(a)



(b)

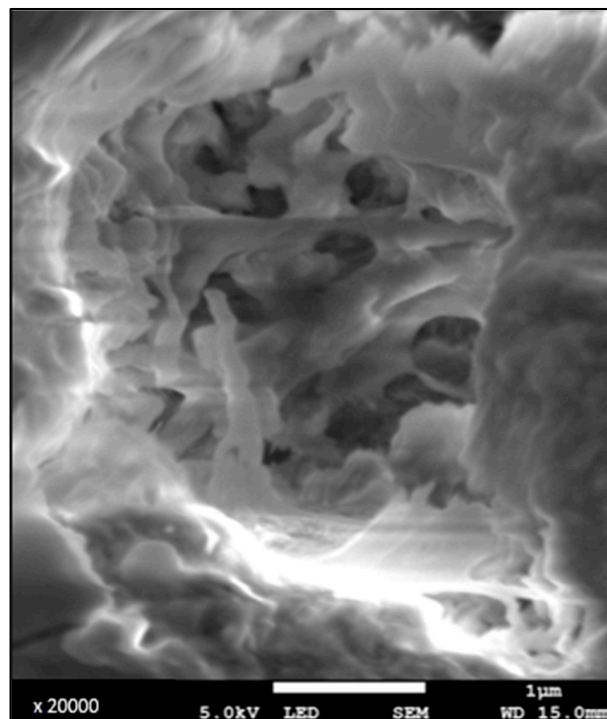
Figure 1. Cont.



(c)

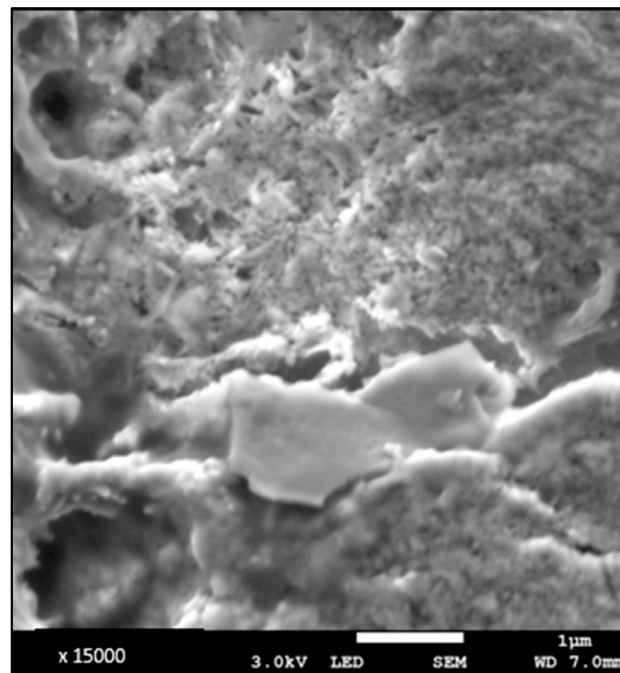
Figure 1. Photomicrograph obtained via SEM in backscattered electrons (magnification $\times 190$ and $\times 350$ – 370)—(a) human tooth with a PMI of 0 y, (b) human tooth with a PMI of 1 y and (c) human tooth with a PMI of 2 y. Tubules near pulp chamber rounded (black square), tubules near cemento–dentinal junction lengthened (white square).

At higher magnifications ($\times 10,000$ to $\times 20,000$) in the areas studied, irregular porous tissue was observed, and at greater depths, a mesh-like structure (Figure 2).



(a)

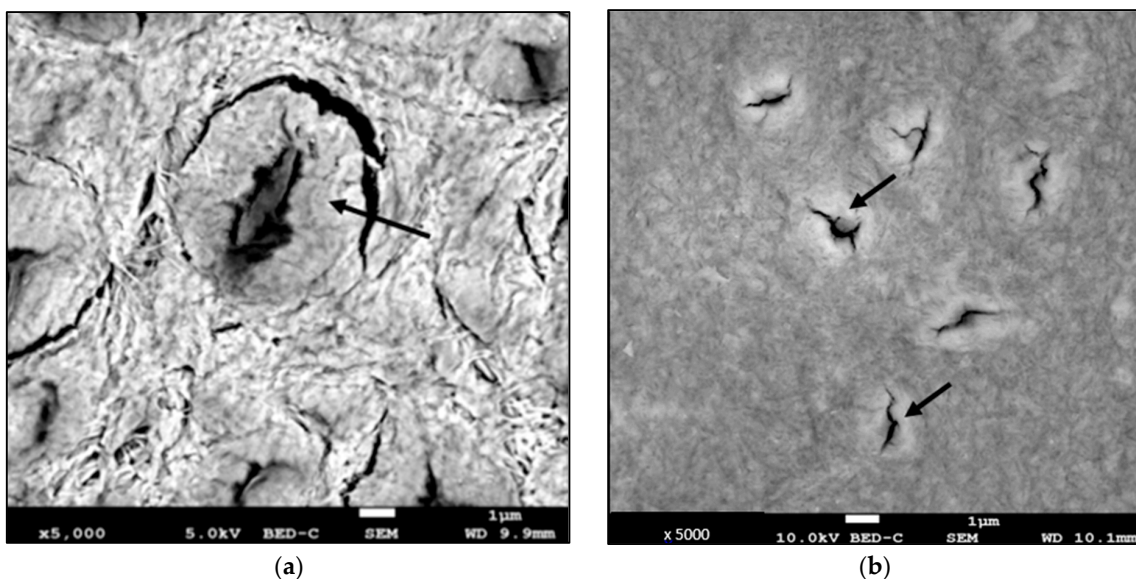
Figure 2. Cont.



(b)

Figure 2. Photomicrograph obtained via SEM in secondary electrons (magnification $\times 15,000$ and $\times 20,000$)—(a) human tooth with a PMI of 5 y, (b) human tooth with an archeological PMI. Structure in mesh in lumen of tubule.

For all samples, regardless of the postmortem interval (PMI), the study of the tubules in the three zones observed revealed similarities in appearance between those close to the pulp and cementum. On the other hand, we observed differences in the apical zone. In fact, for the groups with shorter PMIs, the tubules were surrounded by a denser collar, even for obstructed tubules. This collar was thinner and less visible for teeth with a PMI of 5 years (Figure 3). Tubules in the apical zone formed clusters. The lumen of teeth in groups 1, 2 and 3 was still visible; in contrast, for teeth with a 5-year PMI, the tubules were filled in by a homogeneous, hyperdense material. Finally, at the apex of archaeological teeth, we observed tubules obstructed by hyperdense material, which were grouped together in clusters, but covered by voluminous hyperdense structures (Figure 3).



(a)

(b)

Figure 3. *Cont.*

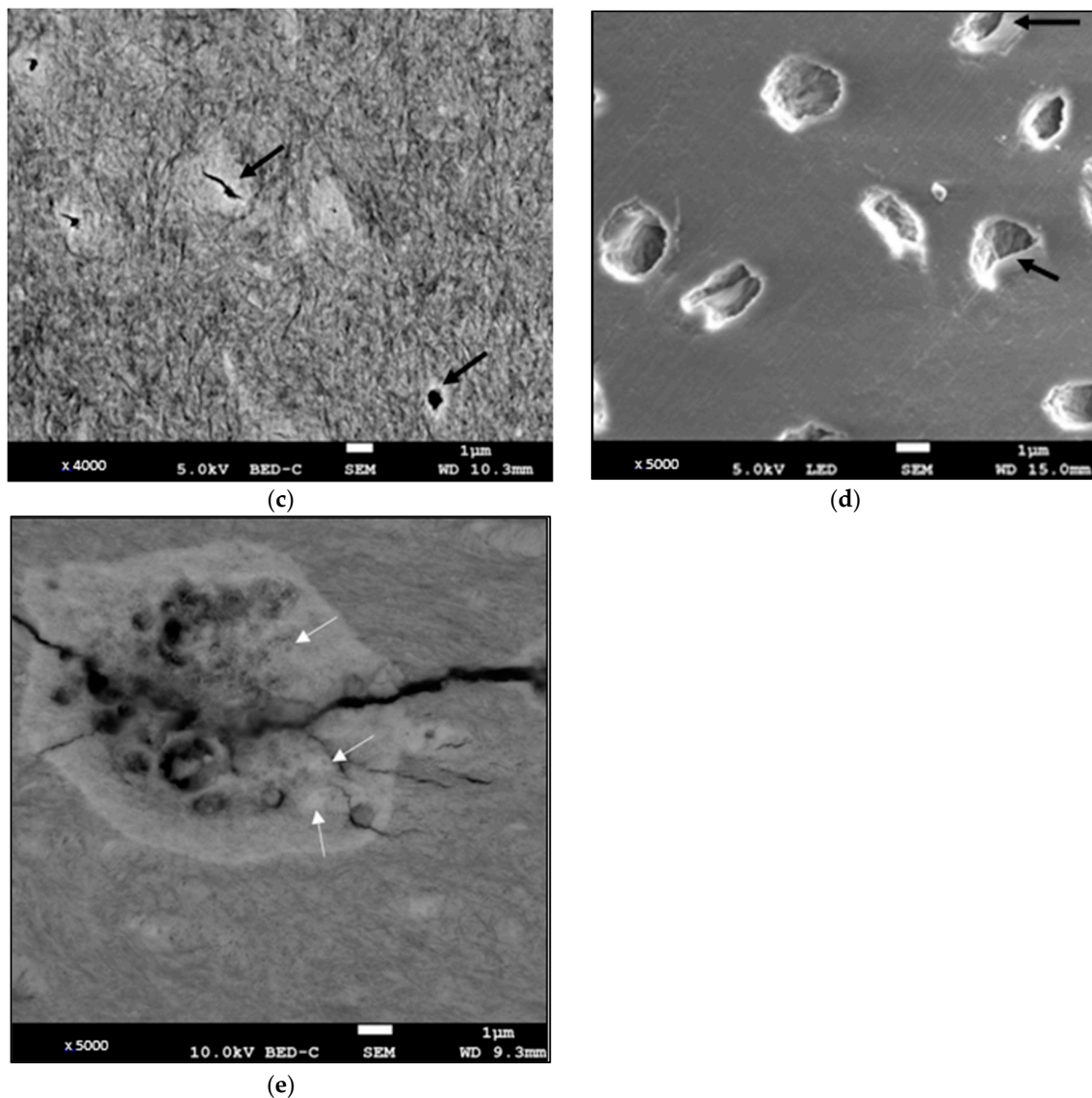


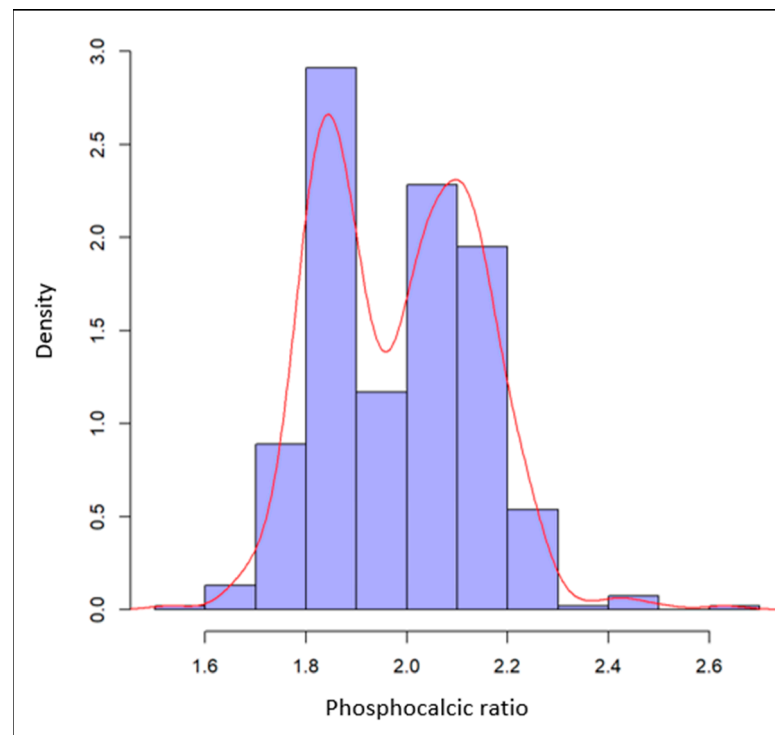
Figure 3. Photomicrographs obtained via SEM (magnification $\times 4000$ and $\times 5000$). Apical area: Tubules surrounded by a denser collar (black arrows). (a) Human tooth with a PMI of 0 y, (b) human tooth with a PMI of 1 y, (c) human tooth with a PMI of 2 y, (d) human tooth with a PMI of 5 y, (e) human tooth with an archeological PMI. Tubules obstructed by a hyperdense material (white arrow), covered by voluminous hyperdense structures.

(2) EDX Analysis

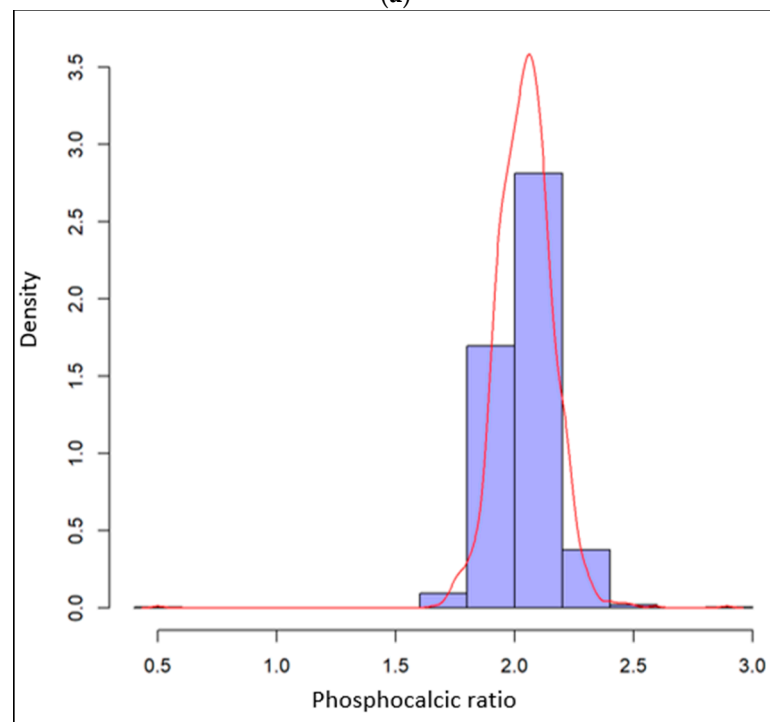
We performed 539 phosphocalcic ratio measurements on the six teeth of the retrospective part and 1620 measurements on the eighteen teeth of the prospective part. Mean measurements were 1.99 (95% CI (1.97; 2), SD 0.15) and 2.04 (95% CI (2.04; 2.05), SD 0.12), respectively. The distribution is shown in Figure 4. A more homogeneous distribution of phosphocalcic ratios is observed in the more recent PMI samples, confirmed via a multifactorial analysis according to tooth type, analysis zone and PMIs.

Concerning the analysis of variance of the phosphocalcic ratio, we observed that in both studies (retrospective and prospective), there was a significant proportion of variance not explained by the selected factors (34.8% and 67.1%), and that for the prospective part, 15.3% of the variance was explained by postmortem interval, followed by tooth type (11.4%) and analysis zone (4.8%). We performed a Pearson–Spearman correlation test between PMIs and tooth type with the analysis area (Table 1). The correlation coefficient was significant,

with a negative association, for incisor/pulp ($r = -0.35$, $r_s = -0.39$), canine/pulp ($r = -0.6$, $r_s = -0.71$) and canine/cementum ($r = -0.57$, $r_s = -0.56$).



(a)



(b)

Figure 4. (a) Distribution of the 539 phosphocalcic ratio measurements in the samples of the retrospective part and (b) distribution of the 1620 phosphocalcic ratio measurements in the samples of the prospective part.

Table 1. Pearson and Spearman association test for samples from the prospective part of the study between type of tooth/analysis area and postmortem interval.

Type of Teeth	Area of Analysis	r	r ²	p	rs	rs ²	p
Incisor	Pulp	−0.35	0.12	1.53 × 10 ^{−6}	−0.39	0.16	2.81 × 10 ^{−8}
	Cement	0.03	0.001	0.64	−0.01	1 × 10 ^{−4}	0.87
	Apex	−0.02	2.6 × 10 ^{−4}	0.83	−0.03	8 × 10 ^{−4}	0.70
Canine	Pulp	−0.69	0.48	4.99 × 10 ^{−27}	−0.71	0.50	9.30 × 10 ^{−29}
	Cement	−0.57	0.32	1.09 × 10 ^{−16}	−0.56	0.31	2.71 × 10 ^{−16}
	Apex	0.02	3.5 × 10 ^{−4}	0.80	−0.02	6 × 10 ^{−4}	0.74
Premolar	Pulp	−0.03	8.6 × 10 ^{−4}	0.69	0.03	0.001	0.65
	Cement	0.02	4.1 × 10 ^{−4}	0.79	0.03	8 × 10 ^{−4}	0.71
	Apex	0.06	0.004	0.39	0.14	0.02	0.07

r: Pearson’s linear correlation coefficient. rs: Spearman’s correlation coefficient. r² and rs²: Share of explained variance. p significant < 0.05.

With regard to the other elements detected, variations were observed only for sodium and magnesium. For sodium concentrations, we took 539 measurements on the six teeth in the retrospective part and 1620 measurements on the eighteen teeth in the prospective part. The mean values were 0.36 (95% CI (0.33; 0.39), SD 0.37) and 0.52 (95% CI (0.5; 0.55), SD 0.49), respectively, with a concentration of 0 in the majority of cases (46.94% and 35.86%). The same number of measurements were taken for magnesium concentrations. Mean values were 0.56 (95% CI (0.52; 0.59), SD 0.42) and 0.79 (95% CI (0.77; 0.81), SD 0.38), respectively. The concentration was 0 in the majority of cases (32.1%) for the retrospective part, but predominantly 0.7 (16.85%) for the prospective part.

3. Discussion

Dentin is the main human dental tissue that protects the pulp from damage [11]. The primary organic matrix of dentin, composed of collagen fibers (mainly type I), is secreted by odontoblasts. Under the influence of non-collagenous proteins (phosphoproteins and proteoglycans), dentin becomes progressively mineralized [27]. Crystals are deposited on the collagen mesh in the form of a carbonated apatite plaque. This organo–mineral matrix is crossed by a system of tubules perpendicular to the collagen fibers [12], corresponding to the remaining structure of the odontoblastic processes [28,29]. Once the root has fully formed, secondary dentine is secreted by the pulp. Both types of dentin have the same composition, but are distinguished by a change in the orientation of the tubules [3,30], which we were able to observe under microscopy. Tubules close to the pulp (secondary dentin) were rounded, while tubules close to the cementum (primary dentin) were elongated. We were even able to observe the transition zone between these two types of tubules.

The phenomenon of dentin transparency corresponds to an obstruction of the tubules by a mineral material, which modifies the refractive index of light through the tissue [1,8,11,23]. The origin of this obstruction remains controversial. It may be caused by external processes due to the environment [31] or internal processes originating from the pulp [11,32]. On the basis of these hypotheses, we decided to observe, in sclerotic dentine, the apical zone where the obstruction phenomenon begins, the zone close to the cemento–dentin junction for the influence of environmental factors, and the zone close to the dentine–pulp interface for the influence of pulpal processes. Our results showed that the analysis zone explained only 4.8% of the variance in the phosphocalcic ratio. This factor is therefore not the best one to explain the variations observed. However, in association with tooth type, we could propose a predictive model between phosphocalcic ratio and PMIs. In canine pulp, as the phosphocalcic ratio increased, PMIs decreased, or vice versa, with the best correlation (r = −0.6, rs = −0.71).

The origin of sclerotic dentin is controversial, but the mechanism of its postmortem evolution is even more unclear. Previous studies of archaeological material from different periods have noted differences in the appearance of sclerotic dentine [7,33]. Older dentine was described as “chalky” in the light, but there was no relationship between PMIs and the extent of the changes observed. Very pronounced changes were found in Neolithic and pre-dynastic Egyptian teeth, but were only slightly present in Bronze Age, Mesolithic and 500-year-old teeth [34,35]. Our SEM study showed no difference in tissue appearance between the different PMI groups. It appeared homogeneous, rather porous, and organized in mesh. However, the appearance of the tubules in the apical zone was different. The peritubular collar, presenting a “coffee-bean” appearance to the teeth observed after avulsion, was less prominent as PMIs increased. As peritubular dentin is merely mineralized tissue [36], its “disappearance” should correlate with the decrease in the phosphocalcic ratio. This is what we found. Indeed, chemical analysis showed variations in the phosphocalcic ratio according to PMIs (2.04 for recent teeth and 1.99 for old teeth). We can propose several hypotheses to explain the differences in phosphocalcic ratios observed according to PMIs. This could be due to the dissolution of peritubular dentin crystals and precipitation in the tubule lumen. Indeed, we observed that the tubule lumen of teeth with PMIs of 2 years and 5 years appeared to be obstructed by hyperdense material, which could be crystalline. This hypothesis is close to Porter’s concerning the formation of sclerotic dentin from the dissolution of intertubular dentin crystals [1]. We were able to confirm the presence of phosphorus and calcium in the tubular lumen, but were unable to quantify the phosphocalcic ratio due to irregularities in depth. Porter has suggested the involvement of chemical species such as fluorine to explain this phenomenon [1]. Although we observed no variation in the fluoride content of our samples, we did observe variations in two other elements: sodium and magnesium. These two elements could be involved in variations in the phosphocalcic ratio. Other studies have shown substitutions by magnesium, attributed to exchanges during the dissolution and recrystallization phases of hydroxyapatite crystals in vitalized [37] or fossilized [38] teeth. This dissolution of peritubular dentin crystals could also be due to the production of acid ions by bacteria [39,40]. In our study, the bacteria could have originated in the oral cavity, as the extracted teeth had not been sterilized. Bacterial action could also cause the destruction of the collagenous structure of dentin tissue, which could influence internal controls and tissue acidity, increasing the availability of ions present in large quantities, such as calcium and phosphorus [10]. These phenomena would occur over short postmortem periods (less than a hundred years) and the phosphocalcic ratio would then remain stable. This is what Beeley and Lunt found in their study of teeth from different periods (Neolithic, Bronze Age, 9th–11th centuries and 15th–17th centuries), where no significant differences in calcium and phosphorus ratios were found between the different groups [22]. Finally, Patonai et al. have demonstrated a link between crystallinity and demineralization in forensic and archaeological bones [41]. They showed that as PMI increases, the phosphocalcic ratio decreases, but the crystallinity index increases. Crystals appear larger and more ordered. An X-ray diffractometry analysis is currently underway to study variations in crystallinity as a function of PMIs in our different groups.

We chose SEM for this study because it enables us to visualize the structure of a sample without destroying it completely. However, the quality of the analysis depends on the quality of the sample preparation. To this end, we added a polishing step using aluminum suspensions. We decided to work with a voltage of between 5 and 15 keV to limit the risk of charging effects on our samples, which could be damaged by prolonged exposure. In addition, working at low voltage enabled us to obtain more precise information on tissue topography. An analysis combining secondary and backscattered electrons should be systematically carried out. In fact, backscattered electron analysis enabled us to observe topographical contrasts and identify obstructed tubules invisible to secondary electrons, corresponding to a contrast in density and/or composition. Our results are limited by a small sample size, reflecting two difficulties. The first concerns the exclusion criterion for dental pathologies. Indeed, we decided to study sclerotic dentin, and therefore the

physiological ageing of secondary dentin; the teeth therefore had to be free of pathologies, particularly carious pathologies. People who donate their tissue for scientific studies are more likely to be elderly subjects who often neglect dental care as they age, or who have no teeth left. The second difficulty was obtaining materials. In France, donations from scientific organizations remain limited and do not allow us to obtain a large number of samples for study. Finally, given the small number of samples and, above all, the small number of different subjects, we were unable to study the influence of age or sex on the changes observed. However, multifactorial analyses of the phosphocalcic ratios, particularly for the prospective part, showed that the subject factor explained only 1.4% of the variance, compared with 15.3% for the postmortem interval. This suggests that sex and age play only a minor role in chemical variations. Premortem studies of sclerotic dentin found gender differences in appearance and growth, but no significant differences. Age has an influence on sclerotic dentin growth, but Mandojana observed no structural differences in postmortem study [42]. However, we did manage to collect an identical number of incisors, canines and premolars from two subjects of different sexes and ages, enabling us to carry out an inter- and intra-individual comparative study. Finally, this work focused on very short PMIs, which could be of real interest in forensic science.

4. Conclusions

Our SEM study enabled us to observe the existence of tubular modifications in sclerotic dentin with different PMIs. By complementing this study with chemical microanalysis, we observed the presence of variations in the phosphocalcic ratio with PMIs and the possibility of proposing a predictive model. Finally, we have also highlighted variations in other elements that could be involved in these modifications. Further work is required to understand the origins of these changes. These observations, carried out on a small sample of analyses, should be carried out on a larger scale with longer postmortem times. They should focus on the canine, which showed a significant variation in phosphocalcium ratio between the PMIs studied.

Author Contributions: The following authors participated directly and substantially in the preparation of this manuscript. Conceptualization, E.M.; Methodology, E.M.; Supervision, X.D. and A.B.; Visualization, B.B. and V.H.; Writing—original draft, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All procedures performed in the present study were in accordance with the ethical standards of the institution (Faculty of Medicine, University of Lille), the national research committee of France, and the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. I would like to thank the people who donated their bodies to science, without whom this work would not have been possible.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data is available from the Unité de Taphonomie Médico-Légale et d'Anatomie de Lille.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Porter, A.E.; Nalla, R.K.; Minor, A.; Jinschek, J.R.; Kisielowski, C.; Radmilovic, V.; Kinney, J.H.; Tomsia, A.P.; Ritchie, R. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7650–7660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Xue, J.; Zavgorodniy, A.; Kennedy, B.; Swain, M.; Li, W. X-ray microdiffraction, TEM characterization and texture analysis of human dentin and enamel. *J. Microsc.* **2013**, *251*, 144–153. [[CrossRef](#)]
3. Carrigan, P.J.; Morse, D.R.; Furst, M.L.; Sinai, I.H. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J. Endod.* **1984**, *10*, 359–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tsurumachi, T.; Huang, T.J.; Zhan, W.; Hayashi, M.; Ogiso, B. Scanning electron microscopic study of dentinal pulpal walls in relation to age and tooth area. *J. Oral Sci.* **2008**, *50*, 199–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Whittaker, D.K.; Bakri, M.M. Racial variations in the extent of tooth root translucency in ageing individuals. *Arch. Oral Biol.* **1996**, *41*, 15–19. [[CrossRef](#)]
6. Garcés-Ortíz, M.; Ledesma-Montes, C.; Reyes-Gasga, J. Scanning Electron Microscopic Study on the Fibrillar Structures within Dentinal Tubules of Human Dentin. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1510–1514. [[CrossRef](#)]
7. Sengupta, A.; Whittaker, D.K.; Shellis, R. Difficulties in estimating age using root dentine translucency in human teeth of varying antiquity. *Arch. Oral Biol.* **1999**, *44*, 889–899. [[CrossRef](#)]
8. Kabartai, F.; Hoffmann, T.; Hannig, C. The physiologic sclerotic dentin: A literature-based hypothesis. *Med. Hypotheses* **2015**, *85*, 887–890. [[CrossRef](#)]
9. Thomas, G.; Whittaker, D.; Embery, G. A comparative study of translucent apical dentine in vital and non-vital human teeth. *Arch. Oral Biol.* **1994**, *39*, 29–34. [[CrossRef](#)]
10. Selvamani, M.; Madhushankari, G.S.; Basandi, P.S.; Donoghue, M.; Nayak, V.; Diwakar, G. Effect of vitality on translucent dentine—A study. *J. Int. Oral Health* **2013**, *5*, 1–7.
11. Kinney, J.; Nalla, R.; Pople, J.; Breunig, T.; Ritchie, R. Age-related transparent root dentin: Mineral concentration, crystallite size, and mechanical properties. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3363–3376. [[CrossRef](#)]
12. Nalla, R.; Porter, A.; Daraio, C.; Minor, A.; Radmilovic, V.; Stach, E.; Tomsia, A.; Ritchie, R. Ultrastructural examination of dentin using focused ion-beam cross-sectioning and transmission electron microscopy. *Micron* **2005**, *36*, 672–680. [[CrossRef](#)]
13. Vasiliadis, L.; Darling, A.; Levers, B.G. The histology of sclerotic human root dentine. *Arch. Oral Biol.* **1983**, *28*, 693–700. [[CrossRef](#)]
14. Camargo, M.A.; Marques, M.M.; de Cara, A.A.; Camargo, M.A.; Marques, M.M.; de Cara, A.A. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. *Arch. Oral Biol.* **2008**, *53*, 105–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Balooch, M.; Demos, S.G.; Kinney, J.H.; Marshall, G.W.; Balooch, G.; Marshall, S.J. Local mechanical and optical properties of normal and transparent root dentin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2001**, *12*, 507–514. [[CrossRef](#)]
16. Olze, A.; Geserick, G.; Schmeling, A. Age estimation of unidentified corpses by measurement of root translucency. *J. Forensic Odontostomatol.* **2004**, *22*, 28–33. [[PubMed](#)]
17. Gustafson, G.; Malmö, D.O. Age determination on teeth. *J. Am. Dent. Assoc.* **1950**, *41*, 45–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lamendin, H.; Baccino, E.; Humbert, J.F.; Tavernier, J.C.; Nossintchouk, R.M.; Zerilli, A. A simple technique for age estimation in adult corpses: The two-criteria dental method. *J. Forensic Sci.* **1992**, *37*, 1373–1379. [[CrossRef](#)]
19. Bang, G.; Ramm, E. Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontol. Scand.* **1970**, *28*, 3–35. [[CrossRef](#)]
20. Solheim, T. Dental root translucency as an indicator of age. *Scand. J. Dent. Res.* **1989**, *97*, 189–197. [[CrossRef](#)]
21. Johanson, G. Age of determinations from human teeth. *Odontol. Revy* **1971**, *22*, 40–126.
22. Beeley, J.; Lunt, D. The nature of the biochemical changes in softened dentine from archaeological sites. *J. Archaeol. Sci.* **1980**, *7*, 371–377. [[CrossRef](#)]
23. Mandurah, M.M.; Sadr, A.; Bakhsh, T.A.; Shimada, Y.; Sumi, Y.; Tagami, J. Characterization of transparent dentin in attrited teeth using optical coherence tomography. *Lasers Med. Sci.* **2015**, *30*, 1189–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bell, L.S.; Elkerton, A. Unique marine taphonomy in human skeletal material recovered from the medieval warship Mary Rose. *Int. J. Osteoarchaeol.* **2008**, *18*, 523–535. [[CrossRef](#)]
25. Delannoy, Y.; Colard, T.; Le Garff, E.; Mesli, V.; Aubernon, C.; Penel, G.; Hedouin, V.; Gosset, D. Effects of the environment on bone mass: A human taphonomic study. *Leg. Med.* **2016**, *20*, 61–67. [[CrossRef](#)]
26. Le Garff, E.; Mesli, V.; Delannoy, Y.; Colard, T.; Demondion, X.; Becart, A.; Hedouin, V. Technical note: Early post-mortem changes of human bone in taphonomy with Mct. *Int. J. Leg. Med.* **2016**, *131*, 761–770. [[CrossRef](#)]
27. Dechichi, P.; Biffi, J.C.G.; Moura, C.C.G.; de Almeida, A.W. A model of the early mineralization process of mantle dentin. *Micron* **2007**, *38*, 486–491. [[CrossRef](#)]
28. Kinney, J.; Pople, J.; Marshall, G.; Marshall, S. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: A small-angle X-ray scattering study. *Calcif. Tissue Int.* **2001**, *69*, 31–37. [[CrossRef](#)]
29. Gotliv, B.A.; Veis, A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: Role of a phospholipid-proteolipid complex. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, *81*, 191–205. [[CrossRef](#)]
30. Mjör, I.A.; Smith, M.R.; Ferrari, M.; Mannocci, F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int. Endod. J.* **2001**, *34*, 346–353. [[CrossRef](#)]
31. Montoya, C.; Arango-Santander, S.; Peláez-Vargas, A.; Arola, D.; Ossa, E. Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. *Arch. Oral Biol.* **2015**, *60*, 1811–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Butler, W.T.; Ritchie, H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int. J. Dev. Biol.* **1995**, *39*, 169–179.
33. Kyle, J.H. Effect of post-burial contamination on the concentrations of major and minor elements in human bones and teeth—The implications for paleodietary research. *J. Archaeol. Sci.* **1986**, *13*, 403–416. [[CrossRef](#)]
34. Sognnaes, R.F. Postmortem microscopic defects in the teeth of ancient man. *AMA Arch. Pathol.* **1955**, *59*, 559–570.
35. Falin, L.I. Histological and histochemical studies of human teeth of the Bronze and Stone Ages. *Arch. Oral Biol.* **1961**, *5*, 5–13. [[CrossRef](#)]
36. Weinera, S.; Veisb, A.; Beniasha, E.; Arada, T.; Dillon, J.W.; Sabsayb, B.; Siddiquib, F. Peritubular dentin formation: Crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 27–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Daculsi, G.; LeGeros, R.; Jean, A.; Kerebel, B. Possible physicochemical processes in human dentin caries. *J. Dent. Res.* **1987**, *66*, 1356–1359. [[CrossRef](#)]
38. Tütken, T.; Vennemann, T.W. Fossil bones and teeth: Preservations or alteration of biogenic compositions? *Palaeogeogr. Palaeoclim. Palaeoecol.* **2011**, *310*, 1–8. [[CrossRef](#)]
39. Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kyriacou, A.; Venturelli, R.; Liarokapis, E.; Perdikatsis, V. Crystal structure studies of human dental apatite as a function of age. *Int. J. Biomater.* **2009**, *2009*, 698547. [[CrossRef](#)]
40. Xu, Z.; Neoh, K.G.; Amaechi, B.; Kishen, A. Monitoring bacterial-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy. *J. Dent.* **2010**, *38*, 138–148. [[CrossRef](#)]
41. Patonai, Z.; Maasz, G.; Avar, P.; Schmidt, J.; Lorand, T.; Bajnoczky, I.; Mark, L. Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *Int. J. Leg. Med.* **2013**, *127*, 529–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Mandojana, J.M.; Heras, S.M.L.; Valenzuela, A.; Valenzuela, M.; Luna, J.D. Differences in morphological age-related dental changes depending on postmortem interval. *J. Forensic Sci.* **2001**, *46*, 889–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.