



**HAL**  
open science

## Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner

Erwan Le Garff

► **To cite this version:**

Erwan Le Garff. Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS040 . tel-02153443

**HAL Id: tel-02153443**

**<https://theses.hal.science/tel-02153443v1>**

Submitted on 12 Jun 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille  
École doctorale biologie santé

---

Année 2018

N°

Thèse pour l'obtention du Doctorat de l'Université de Lille

---

**Taphonomie osseuse humaine  
au micro-scanner**

---

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2018

Par Erwan LE GARFF

**Jury**

Madame le Professeur Irène FRANCOIS	Examineur
Monsieur le Professeur Gérald QUATREHOMME	Examineur
Monsieur le Professeur Norbert TELMON	Rapporteur
Madame le Professeur Pauline SAINT – MARTIN	Rapporteur
Monsieur le Professeur Valéry HEDOUIN	Directeur

## REMERCIEMENTS

- Monsieur le Professeur Gérald QUATREHOMME, Professeur de médecine légale à l'université de Nice, chef du service de médecine légale du CHU de Nice, expert près la Cour d'Appel d'Aix-en-Provence, laboratoire CEPAM UMR CNRS 7264

Je suis honoré que vous soyez mon juge et ayez participé aux réflexions sur ce travail. Votre parcours et votre renommée en anthropologie médico-légale et votre humanité sont des sources d'inspiration pour les jeunes médecins légistes comme moi. Soyez assuré de mon estime et de mon respect.

- 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 le privilège de juger ce travail. Je vous suis reconnaissant des analyses et avis que vous émettrez et des ouvertures interdisciplinaires que votre expertise, votre parcours et vos travaux apporteront à ce travail de thèse.

- Monsieur le Professeur Norbert TELMON, Professeur de médecine légale à l'université de Toulouse, chef du service de médecine légale du CHU de Toulouse, expert près la Cour de Cassation, laboratoire AMI UMR CNRS 5288

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Votre implication et vos questions au fur et à mesure de ce travail ont été précieuses. Votre parcours dans le champ de l'imagerie et dans celui de l'anthropologie constitue un modèle pour moi. Je vous remercie pour l'analyse et l'expertise que vous apportez à ce travail.

- Madame le Professeur Pauline SAINT – MARTIN, Professeur de médecine légale à l'université de Tours, chef du service de médecine légale du CHU de Tours, expert près la Cour d'Appel d'Orléans, laboratoire AMI UMR CNRS 5288

Votre parcours, votre travail de recherche et votre humanité sont une source d'inspiration pour moi. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

- 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 près la Cour de Cassation, laboratoire UTML&A EA 7367

Vous m'avez fait confiance et fait l'honneur de diriger ce travail de thèse que vous avez initié avec moi bien en amont dans le cadre du master II Recherche. Votre direction, vos encouragements et vos enseignements ont été précieux tout au long de ce travail. Soyez assuré de mon amitié et de mon respect.

- A Alexandra et Diane pour le bonheur et la joie qu'elles m'apportent quotidiennement  
+++
- A Pierre, Marie-Hélène (dont c'est l'anniversaire le jour de soutenance !!), Kévin, Gwenaël, Christophe, Patricia, Victor, Camille, Yvette, Huguette pour la présence et le soutien constant qu'ils me témoignent
- A ceux que j'arrive à voir : Claire, Guillaume, Capucine, Vadim, Élise, Bernard, Christophe, Philippe M
- A ceux, un peu plus loin, que je ne vois pas assez souvent à mon goût : Laurent, Damien, Caroline, Geoffrey et Manon, Jérôme O, Florent, Mathilde, Jérôme D, Julien ...

- A monsieur le Professeur Gosset, doyen de la faculté de médecine, pour son soutien et la confiance qu'il m'a témoigné jusqu'à présent
- Au Dr Anne Bécart pour son encadrement en master II et ses conseils avisés
- A mes collègues pour leur amitié et leur soutien et pour avoir permis que ce travail se réalise : Jocelyn, Raphaël, Yann, Elodie, Frédéric, Sandrine, Axelle, Thomas
- A l'ensemble de l'équipe de l'UTML&A et du service de médecine légale du CHU de Lille pour les attentions et le soutien qu'ils m'ont apporté : Damien, Cindy, Elizabeth, Béatrice, Nathalie, Philippe L, Mickael, Alexis, Jocelyne, Isabelle et Virginie
- A Pierre M pour le travail qu'il a effectué à ma demande au micro-scanner et notamment sur les analyses de côtes et à sa patience devant mes demandes souvent « rapides » et/ou « peu précises » mais qu'il arrive à contenter
- Aux étudiants que j'ai encadrés et que j'encadre pour leur participation aux travaux de recherche et pour les retours qu'ils me font sur ma capacité à enseigner/encadrer : Quentin, Caroline, Pauline, Alexia, Laura, Marie, Rémi, Lucie
- Aux personnes ayant fait don de leur corps à la science, sans qui ce travail n'aurait pas été possible

## Résumé en français - Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner

Introduction : l'estimation du délai *post mortem* (délai entre la découverte d'un cadavre et le moment du décès) est un élément important dans une enquête de police. Cette estimation est difficile lorsque le corps retrouvé est à l'état de squelette. Il existe peu d'outil pour effectuer cela.

Ce travail s'inscrit dans la volonté d'élaborer des méthodes d'estimation de l'intervalle *post mortem* sur des restes osseux. Cette thèse s'attache à apporter des données nouvelles à l'aide de la micro-imagerie en taphonomie osseuse. Plus particulièrement, nous tentons de mettre en évidence les interactions entre l'os humain *post mortem* et son environnement.

Matériels et méthodes : Des os humains issus de plusieurs dons du corps à la science ont été étudiés au micro-scanner. Ces os ont été conservés prospectivement pendant des périodes connues de temps connues. Les os ont été examinés au décours d'une conservation dans un environnement contrôlé et stable en température et en hygrométrie. Quatre axes d'expérimentation ont été retenus.

Un premier axe de travail a porté sur la mesure de la précision du micro-scanner lors de mesures répétées. Ce travail a été réalisé sur des fragments de voûtes crâniennes et des phalanges.

Un deuxième axe de travail a été réalisé sur l'impact du mode de conservation initiale de l'échantillon. Nous avons comparé l'évolution architecturale au micro-scanner de fragments de voûte crânienne conservés dans du formol à 10% ou en congélation à -20°C. Chaque échantillon a été conservé pendant 12 mois.

Un troisième axe de travail s'est attaché à décrire l'évolution micro-scannographique de fragments osseux conservés en milieu standard sur diverse période (fragments de voûte crânienne sur 4 semaines et 10 semaines - fragments de côtes sur 6 et 36 mois).

Résultats : Il a été mis en évidence que les acquisitions faites au micro-scanner sont précises et reproductibles.

Nous avons montré qu'il existe de nombreuses variations architecturales lors de la mise en conservation d'os en milieu formolé ou en congélation. Cela montre l'importance du travail sur os frais dans un contexte taphonomique.

Il a été mis en évidence des modifications architecturales significatives lors de la conservation d'os en milieu dit standard et contrôlé. Ces modifications surviennent dès les deux premières semaines de conservations pour les fragments de voûtes et sont également observées après 6 et 36 mois de conservation pour les fragments de côtes.

Discussion et conclusion : Ce travail a permis de mettre en évidence l'intérêt que représente la micro-imagerie pour l'étude de l'architecture osseuse. Il s'agit d'une technologie précise et non destructrice de l'échantillon. L'apport du micro-scanner réside dans la capacité d'analyse architecturale de volumes importants. Nos résultats confirment l'influence du milieu de conservation et du temps sur le substrat osseux. Des modifications architecturales sont déjà observables après des temps de conservation variables (de quelques semaines plusieurs mois). Ces délais sont très courts au regard du délai de prescription en matière pénale et de la taphonomie en archéologie. Ces résultats méritent d'être confrontés à des données sur un plus grand nombre d'individus, sur des durées de conservation plus longues et avec de nombreux milieux de conservation.

Mots clés : médecine légale, taphonomie, os, micro-scanner

## **ABSTRACT - Human bone taphonomy with microCT**

Introduction: Estimating post-mortem delay (the time between the discovery of a dead body and the time of death) is an important element in a police investigation. This estimate is difficult when the body found is in the skeleton state. There is little tool to do this.

This work is part of the desire to develop methods for estimating the post mortem interval on bone remains. This thesis focuses on providing new data using micro-imaging in bone taphonomy. In particular, we try to highlight the interactions between post mortem human bone and its environment.

Materials and methods: Human bones from several body donations to science were studied by micro-scanning. These bones have been conserved prospectively for known periods of time. The bones were examined during conservation in a controlled environment and stable in temperature and hygrometry. Four axes of experimentation were retained.

A first line of work focused on measuring the precision of the micro-scanner during repeated measurements. This work was done on fragments of cranial vaults and phalanges.

A second line of work was carried out on the impact of the initial mode of preservation of the sample. We compared the architectural evolution with micro-scanning of cranial vault fragments preserved in 10% formalin or freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Each sample was kept for 12 months.

A third line of work focused on describing the microCT evolution of bone fragments preserved in standard medium over various periods (cranial vault fragments over 4 weeks and 10 weeks - rib fragments over 6 and 36 months).

Results: It has been shown that micro-scanner acquisitions are accurate and reproducible.

We have shown that there are many architectural variations in the storage of bone in formaldehyde or freezing. This shows the importance of fresh bone work in a taphonomic context.

Significant architectural modifications have been demonstrated during bone conservation in a standard and controlled environment. These changes occur as early as the first two weeks of storage for the vault fragments and are also observed after 6 and 36 months of storage for the rib fragments.

Discussion and conclusion: This work has made it possible to highlight the interest that micro-imaging represents for the study of bone architecture. This is a precise and non-destructive technology of the sample. The contribution of the micro-scanner lies in the capacity of architectural analysis of large volumes. Our results confirm the influence of conservation medium and time on the bone substrate. Architectural modifications are already observable after variable conservation times (from a few weeks to several months). These delays are very short with regard to the limitation period in criminal cases and taphonomy in archeology. These results deserve to be confronted with data on a larger number of individuals, longer storage periods, and many conservation environments.

Keywords: forensic medicine, taphonomy, bone, microCT

## LISTES DES FIGURES ET LEGENDES

Figure I – 1. Les 5 échelles d'organisation anatomique de l'os.

Figure I – 2. L'architecture macroscopique d'un os long.

Figure I – 3. Schéma de l'os cortical constitué d'ostéon primaire et secondaire.

Figure I – 4. Représentation de la formation d'une fibrille de collagène.

Figure I – 5. Classification histologique Oxford.

Figure I – 6. Le  $\mu$ CT Bruker ® HR 1172 Skyscan.

Figure I – 7. La chambre d'acquisition du  $\mu$ CT Bruker ® HR 1172 Skyscan contenant un échantillon osseux de 4 x 1 cm.

Figure I – 8. Principe du  $\mu$ CT.

Figure I – 9. Acquisition en 2D.

Figure I – 10. Reconstruction.

Figure I – 11. Coupe horizontale en 2D d'un fragment de voûte crânienne humaine au  $\mu$ CT dans le cadre d'un jeu de données reconstruites en 3D, visualisation avec le logiciel dataviewer®.

Figure I – 12. Visualisation en 3D d'un fragment de voûte crânienne humaine au  $\mu$ CT dans le cadre d'un jeu de données reconstruites en 3D, visualisation avec le logiciel CTvox® avec réduction du champ pour visualiser la partie interne du fragment osseux.

Figure I – 13. Capture d'écran du logiciel CTan® avec un fragment de voûte crânienne humaine *post mortem* en coupe horizontale lors de la première étape pour une analyse de la microarchitecture osseuse.

Figure II – 1. La différence de conformation des deux séries d'images après acquisitions au  $\mu$ CT d'un fragment de voûte du crâne dans les 3 plans de l'espace avec en l'image de référence (en noir – correspondant à la première acquisition) et l'image cible (en blanc – correspond à la deuxième acquisition).

Figure II – 2. La différence de conformation du même échantillon lors des 2 acquisitions et après la première étape manuelle de « registration ». Les séries d'images sont quasiment dans la même conformation spatiale.

Figure II – 3. Les deux séries d'images ont été superposées et n'apparaissent quasiment plus après l'étape de registration automatisée (Dataviewer® software v. 1.5.1.2).

Figure II – 4. Visualisation sous la forme de « box-plots » des moyennes pour chacune des variables analysées au  $\mu$ CT en considérant les images de la 1ère acquisition (« original »), celles de la 2<sup>ème</sup> acquisition sans registration (« without registration ») et celles de la 2<sup>ème</sup> acquisition après registration (« with registration »).

Figure III - 1. La cartographie utilisée pour nommer les échantillons issus de la voûte du crâne. Par exemple, l'échantillon LF61 correspond à l'échantillon de la 6ème ligne horizontale, de la 1ère ligne verticale, du frontal gauche.

Figure III – 2. Volume osseux (BV) moyen par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation.

Figure III – 3. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le volume osseux (BV) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 4. Surface osseuse (BS) moyenne par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation

Figure III – 5. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour la surface osseuse (BS) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 6. Moyenne de l'épaisseur trabéculaire (TbTh) par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation.

Figure III – 7. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour l'épaisseur trabéculaire (TbTh) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 8. Nombre moyen de trabécules (TbN) par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation.

Figure III – 9. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le nombre moyen de trabécules (TbN) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 10. Espacement moyen des trabécules (TbSp) par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation

Figure III – 11. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour l'espacement trabéculaire moyen (TbSp) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 12. Motif trabéculaire moyen (TbPF) par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation

Figure III – 13. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le motif trabéculaire (TbPF) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure III – 14. Moyenne de la connectivité (Conn) par temps d'acquisition au cours du temps en milieu formolé et en congélation

Figure III – 15. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour la connectivité (Conn) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Figure IV – 1. La voûte crânienne après section transversale et avec les points d'échantillonnages en vue du prélèvement de fragment de voûte au trépan.

Figure IV – 2. Les variations de volume osseux (BV) pour les 4 échantillons au cours du temps.

Figure IV – 3. Les variations de volume osseux (BV) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Figure IV – 4. Les variations de la surface osseuse (BS) pour les 4 échantillons au cours du temps.

Figure IV – 5. Les variations de la surface osseuse (BS) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Figure IV – 6. Les variations du nombre de trabécules (TbN) pour les 4 échantillons au cours du temps.

Figure IV – 7. Les variations du nombre de trabécules par millimètre (TbN) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Figure IV – 8. Les variations de l'épaisseur trabéculaire (TbTh) pour les 4 échantillons au cours du temps.

Figure IV – 9. Les variations de l'épaisseur trabéculaire moyenne (TbTh) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Figure IV – 10. Les variations de la séparation trabéculaire (TbSp) pour les 4 échantillons au cours du temps.

Figure IV – 11. Les variations de séparation trabéculaire moyenne (TbSp) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Figure IV – 12. La cartographie de pointage des échantillons au sein de laquelle la randomisation a déterminé quels échantillons allaient être prélevés. Les points rouges représentent les échantillons effectivement prélevés.

Figure IV – 13. Valeurs de volume osseux (BV) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 14. Box plots des valeurs du volume osseux (BV) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 15. Valeurs de la surface osseuse (BS) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 16. Box plots des valeurs de la surface osseuse (BS) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 17. Valeurs du rapport surface sur volume osseux (BS / BV) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 18. Box plots des valeurs du rapport surface sur volume osseux (BS/BV) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 19. Valeurs du motif trabéculaire (TbPF) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 20. Box plots des valeurs du motif trabéculaire (TbPF) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 21. Valeurs de l'espacement trabéculaire (TbTh) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 22. Box plots des valeurs de l'épaisseur trabéculaire (TbTh) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 23. Valeurs du nombre de trabécules par millimètre (TbN) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 24. Box plots des valeurs du nombre de trabécules par millimètre (TbN) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 25. Valeurs du nombre de séparation trabéculaire (TbSp) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

Figure IV – 26. Box plots des valeurs de la séparation trabéculaire (TbSp) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Figure IV – 27. Photographie en vue inférieure de la 4<sup>ème</sup> côte droite d'un des individus après extraction et préparation manuelle.

Figure IV – 28. Exemple de la sixième côte gauche après le premier balayage au  $\mu$ CT, avec l'identification des trabécules en 2D (image de gauche) après binarisation avec l'algorithme d'Otsu, suivie de la sélection automatique de la région d'intérêt de la trabécule 2D (image de droite).

Figure IV – 29. Exemple de la région d'intérêt 3D des trabécules de la sixième côte gauche après l'utilisation de Marching Cube 33 ®.

Figure IV – 30. « Box plots » des rapports BV/TV à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange).

Figure IV – 31. « Box plots » des rapports TbTh/TV à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange).

Figure IV – 32. « Box plots » des rapports TbSp/TV à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

Figure IV – 33. « Box plots » des rapports BS/TV à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

Figure IV – 34. « Box plots » des rapports TbN/TV à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

Figure IV – 35. « Box plots » du TbPf à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

Figure IV – 36. Vue en coupe de la sixième côte gauche avant conservation (en bleu) et après six mois de conservation dans la partie gauche de la figure (en rouge). La superposition des images dans la partie droite de l'image permet de mettre en évidence les différences dans l'os trabéculaire avec une réduction de l'épaisseur trabéculaire.

## LISTE ET LEGENDE DES TABLEAUX

- Tableau I – 1. Les protéines non collagéniques de la matrice osseuse extracellulaire.
- Tableau I – 2. Résumé en anglais des divers articles concernant les méthodes d'estimation des DPM sur les os.
- Tableau I – 3. Stades de décomposition d'un cadavre entreposé dans un environnement aride
- Tableau I – 4. Définition des stades de vieillissement des os et mises en relation avec le DPM
- Tableau I – 5. Les critères Daubert utilisés aux États-Unis d'Amérique.
- Tableau II – 1. Paramètres d'acquisition, de reconstruction et d'analyse 3D du MicroCT ( $\mu$ CT)
- Tableau II – 2. La moyenne (ou M) (+/- écart type ou SD) et le coefficient de variation (%CV) par variable analysée pour chaque opérateur (1, 2 et 1bis).
- Tableau II – 3. Erreur de précision en valeur absolue et sur le coefficient de variation en intra et en inter opérateur pour les analyses effectuées sur le fragment de voûte crânienne.
- Tableau II – 4. La moyenne (M) des variables et l'écart type (+/- SD) pour les séries d'images avec et sans registration pour les phalanges
- Tableau III - 1. Significativité des tests statistiques pour chacune des variables analysées à l'aide du  $\mu$ CT
- Tableau IV – 1. Paramètres d'acquisition au  $\mu$ CT pendant les 4 semaines de conservation.
- Tableau IV – 2 : Comparaison des mesures au  $\mu$ CT après 10 semaines de conservation.
- Tableau IV – 3. Les tests de comparaison par paires entre les temps d'acquisition mettant en évidence pour le rapport surface / volume d'os (BS/BV) et pour la séparation trabéculaire (TbSp) des différences survenant significativement entre la première et la seconde analyse, soit après deux semaines de conservation.
- Tableau IV – 4. Paramètres d'acquisition au  $\mu$ CT
- Tableau IV – 5. Synthèse des résultats des analyses statistiques pour les côtes analysées à l'état frais et après 6 mois de conservation.
- Tableau IV – 6. Tendances pour chaque variable en fonction du type d'os étudié au  $\mu$ CT.

## Table des matières

<b>Résumé en français - Taphonomie osseuse humaine au micro-scanner .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT - Human bone taphonomy with microCT.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTES DES FIGURES ET LEGENDES .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE ET LEGENDE DES TABLEAUX.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>15</b>
<b>CHAPITRE I - PRE-REQUIS ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>16</b>
– Procédure lors de la découverte d'un cadavre et notions juridiques.....	16
– Définition du délai <i>post mortem</i> (DPM).....	16
– Rappels anatomiques et physico-chimiques sur la composition de l'os humain .....	17
○ Architecture osseuse.....	17
○ Au niveau macroscopique :.....	19
○ Au niveau microscopique :.....	20
○ A la frontière entre le microscopique et le nanoscopique :.....	21
– Méthodes d'estimation du DPM sur restes squelettiques .....	23
○ Méthodes visuelles .....	25
○ Méthodes radio-isotopiques.....	32
○ Méthodes chimiques.....	34
○ Autres méthodes.....	35
– Validité des méthodologies d'estimation du DPM osseux devant un tribunal .....	36
– Intérêts de la micro-tomodensitométrie .....	37
– Objectifs .....	44
<b>CHAPITRE II - ETUDE DE LA PRECISION DES MESURES AU <math>\mu</math>CT EN TAPHONOMIE OSSEUSE 45</b>	<b>45</b>
– Contexte .....	45
– Matériels et méthode.....	47
○ Échantillons osseux .....	47
○ Acquisition au $\mu$ CT .....	48
○ Reconstruction et superposition des acquisitions au $\mu$ CT .....	49
○ Analyse 3D des échantillons.....	51
○ Tests statistiques.....	52
– Résultats et discussion .....	53
– Conclusion .....	59
<b>CHAPITRE III - INFLUENCE DE LA CONSERVATION FORMOLEE OU EN CONGELATION SUR LA MICROARCHITECTURE TRABECULAIRE AU <math>\mu</math>CT.....</b>	<b>60</b>
– La recherche scientifique sur le corps humain en France.....	60
○ Le corps humain, objet juridique et problématiques éthiques.....	60
○ Prélèvement multi-organes (PMO) sur donneur décédé.....	61
○ Le don du corps à la science.....	62
○ La personne décédée dans le cadre médico-légal .....	62
○ Utilisation d'une collection de référence .....	63
○ Utilisation de déchets issus d'activités de soins .....	64
– Provenance des ossements en taphonomie osseuse.....	65

○	La conservation en milieu formolé et son influence sur l'os .....	65
○	La conservation osseuse en congélation.....	67
–	<b>Problématique, objectif et hypothèse(s) .....</b>	<b>68</b>
–	<b>Matériels et méthode.....</b>	<b>69</b>
○	Échantillons osseux .....	69
○	Modes et durée de conservation .....	71
○	Critères d'acquisition au $\mu$ CT .....	71
○	Analyse statistique .....	72
–	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>73</b>
–	<b>Conclusion .....</b>	<b>85</b>
	<b>CHAPITRE IV - MODIFICATIONS TRABECULAIRES AU <math>\mu</math>CT AU COURS DU TEMPS EN ENVIRONNEMENT CONTRÔLE .....</b>	<b>86</b>
–	<b>Contexte .....</b>	<b>86</b>
–	<b>Étude n°1 – Fragments de voûte crânienne conservés 4 semaines.....</b>	<b>87</b>
○	Matériels et méthode .....	87
○	Résultats et discussion .....	90
○	Conclusion : .....	99
–	<b>Étude n°2 – Fragments de voûte crânienne conservés 10 semaines en milieu dit « standard ».....</b>	<b>99</b>
○	Matériels et méthode .....	99
○	Résultats et discussion .....	103
○	Conclusion.....	116
–	<b>Étude n°3 – Fragments de côtes conservés 6 mois et 36 mois en milieu dit « standard ».</b>	<b>116</b>
○	Matériels et méthode .....	117
○	Résultats et discussion .....	123
○	Conclusion.....	132
–	<b>Conclusion du chapitre .....</b>	<b>132</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>134</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>136</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>146</b>

## INTRODUCTION

Ce travail s'attache à décrire les phénomènes structuraux que l'os humain subi en *post mortem* à l'aide du micro-scanner (ou  $\mu$ CT) en lien avec l'environnement, c'est-à-dire à réaliser une approche taphonomique osseuse au  $\mu$ CT.

Dans le premier chapitre, un rappel des notions fondamentales a été réalisé pour mieux appréhender le contexte de cette étude. Un point particulier a porté sur la nécessité de développer un outil d'estimation de l'intervalle *post mortem* sur des restes osseux. Il a également été rappelé les bases anatomiques de la structure osseuse et les déterminants de la diagenèse osseuse. Enfin, le principe de fonctionnement du  $\mu$ CT a été détaillé.

Dans le second chapitre, nous avons traité de l'erreur de précision du  $\mu$ CT et de l'évaluation de cette erreur dans un travail de taphonomie osseuse.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié l'impact de la conservation préalable des ossements dans un milieu congelé ou formolé lorsqu'un prélèvement sur corps « frais » n'a pas pu être fait. Ce chapitre permet de mettre en évidence la nécessité de travailler sur corps « frais » dès que possible.

Dans le quatrième et dernier chapitre, nous avons observé les modifications pouvant survenir sur des os humains *post mortem* au  $\mu$ CT au cours du temps. Cette étude a été faite dans un environnement dit « contrôlé » ou « standard » c'est-à-dire stable et uniforme en matière de conditions environnementales. Ce chapitre porte sur l'étude de deux types d'os (fragments de voûte et fragments de côtes). Les études ont été réalisées sur des périodes courtes de conservation d'un point de vue anthropologique ou archéologique.

Enfin, nous avons discuté l'intérêt du  $\mu$ CT dans le cadre de la taphonomie osseuse et l'impact de ce travail dans la thématique de recherche. Il a également été réalisé une mise en perspective des résultats et une réflexion sur les futurs travaux.

## CHAPITRE I - PRE-REQUIS ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE

### – Procédure lors de la découverte d'un cadavre et notions juridiques

Lors de la découverte suspecte d'un cadavre en France, l'action publique est mise en jeu. Celle-ci se met en place au travers d'une enquête de police sous la responsabilité d'un magistrat (dans le cadre de l'article 74 du Code de procédure pénale). L'enquête réalisée alors va s'attacher à déterminer les causes du décès. Pour cela, les enquêteurs peuvent être aidés par des personnes qualifiées pour réaliser des constatations techniques. Le médecin légiste intervient dans ce contexte. Il réalise l'examen du corps et apporte des réponses aux questionnements de la justice telles que de déterminer le moment du décès, identifier le défunt et déterminer les causes de la mort (article 60 du Code de procédure pénale).

Lorsque le cadavre découvert est réduit à l'état de squelette, des questions précises se posent. La question de l'initiation ou non de l'action publique par rapport au délai de prescription en matière pénale est notamment soulevée. Le délai de prescription correspond au délai après lequel il y a une extinction de l'action judiciaire. Autrement dit, il n'est plus licite d'initier une procédure judiciaire après ce délai et il n'est plus possible de condamner un auteur d'infraction. La récente révision en matière de prescription pénale prévoit un délai de prescription de 20 ans pour les homicides et de 30 ans pour les crimes avec dissimulation (loi n°2017-242 du 27 février 2017 portant réforme de la prescription en matière pénale parue au journal officiel, le 28 février 2017). Il est à noter que les crimes contre l'humanité restent imprescriptibles. Ainsi, le médecin légiste requis lors de la découverte d'ossements doit tenter de déterminer le moment du décès pour répondre à la première question intéressant l'action publique : les faits éventuels sont-ils prescrits ou peuvent-ils faire l'objet d'une enquête ?

### – Définition du délai *post mortem* (DPM)

Le délai *post mortem* est le délai entre la découverte d'un corps et le moment du décès. Il s'agit d'une période de temps qui peut être évaluée par le médecin légiste. L'estimation de ce délai aide la justice pour la classification pénale du décès et/ou pour l'identification de la personne disparue. Cette estimation repose sur des éléments d'examen clinique du cadavre et sur l'étude de son environnement. Il existe des techniques d'analyse approfondies pour cette estimation mais qui ne sont pas utilisables en pratique quotidienne pour le moment (cf infra).

Schématiquement, l'estimation du DPM est plutôt aisée et précise à proximité du moment du décès (0 à 48 heures). Cette estimation est plus difficile et devient imprécise à mesure que le DPM augmente (Beauthier 2011).

L'estimation du DPM repose sur la connaissance des phénomènes cadavériques et de son environnement. Le cadavre est fortement influencé par son environnement. L'étude de l'environnement et de son impact sur le cadavre est une partie importante de l'estimation du DPM. Cette analyse contextuelle est à réaliser conjointement à l'examen du corps. Ces analyses sont au cœur de la taphonomie médico-légale.

Les phénomènes qui surviennent sur un cadavre frais (la décroissance thermique, la rigidité cadavérique et les lividités cadavériques) sont connus et exploitables en pratique courante. Les délais d'apparition et de disparition de ces phénomènes, la cinétique d'évolution et les facteurs modifiant la cinétique de ces phénomènes sont décrits et connus. Leur utilisation est relativement robuste en pratique médico-légale. Lorsque les phénomènes putréfactifs s'installent (coloration verdâtre du tégument, décollement épidermique et des phanères, emphysème sous cutané putréfactif voire évolution spécifique du corps sous la forme d'une momification ou d'une saponification des graisses), l'influence de l'environnement et les variations interindividuelles sont moins connues. L'estimation du DPM dans ces conditions est à la fois moins sûre et moins précise. Ainsi, l'estimation du DPM pour un corps frais sera associée à un intervalle de confiance de quelques heures alors que cette estimation pour un corps putréfié, voire momifié sera associée à un intervalle de confiance de quelques semaines voire quelques mois.

Lors de la découverte d'un squelette, l'estimation du DPM est imprécise. L'estimation du DPM dans ce contexte devient un vrai challenge (Amadasia et al 2017). Cette estimation nécessite d'appréhender la composition et la structure et de l'os. Il est également nécessaire de comprendre les modifications qui surviennent sur le matériel osseux *en post mortem* en lien avec l'environnement de conservation.

#### – **Rappels anatomiques et physico-chimiques sur la composition de l'os humain**

- Architecture osseuse

L'os humain est un matériel vivant en constant remodelage pour s'adapter aux contraintes biomécaniques (déambulation et mobilisation, protection des organes) et à l'environnement (alimentation, stress inflammatoire, pathologie ...). Son organisation lui confère ses capacités

de torsion et de résistance et son architecture doit s'apprécier à différentes échelles. Il s'agit par ailleurs d'un réservoir de métabolite pour l'organisme (calcium par exemple). L'os est aussi le siège de l'activité hématopoïétique (Delannoy 2016 ; Chappard et al 2011). L'architecture osseuse peut être envisagée différemment en fonction de l'échelle d'analyse employée. Cinq niveaux sont décrits (figure I – 1).

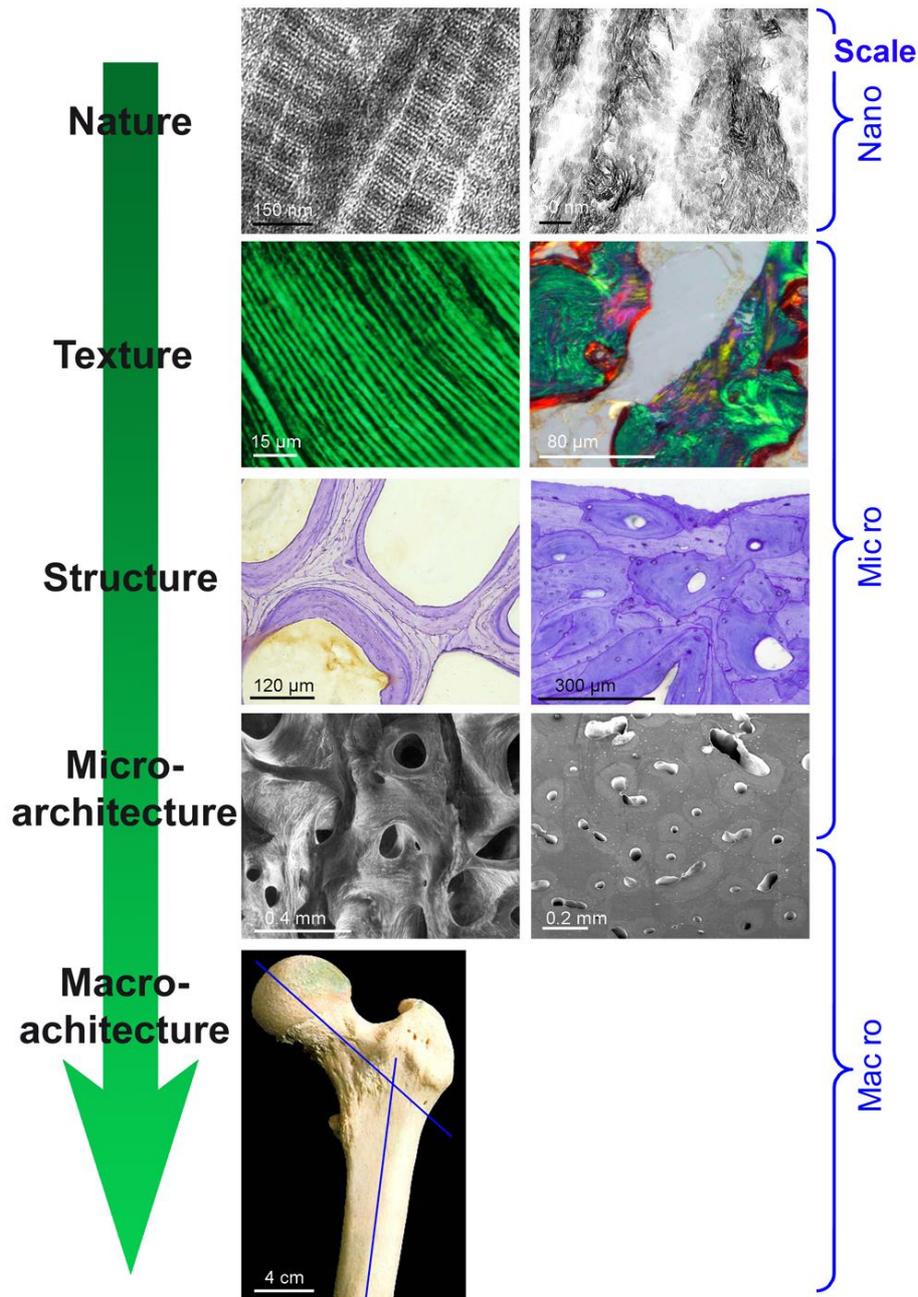


Figure I – 1. Les 5 échelles d'organisation anatomique de l'os (figure issue de Chappard et al 2011). La structure trabéculaire est représentée à gauche de la figure et la corticale à droite. Les 5 niveaux anatomiques de l'os sont représentés. La nature des os est composée à gauche de

l'organisation en fibres de collagène de la partie organique et à droite des cristaux d'hydroxyapatite en microscopie électronique en transmission. La texture de l'os est lamellaire pour l'os mature (à gauche) et en paquets éparses de collagène dans l'os néoformé (à droite) ici en microscopie à polarisation. La structure osseuse est différente dans l'os trabéculaire (à gauche) et l'os cortical (à droite) en coloration au bleu de toluidine. La microarchitecture est également différente entre l'os trabéculaire en piliers et en assiettes (à gauche) et l'os cortical et ses ostéons compactés (à droite) en microscopie électronique à balayage. La macroarchitecture de l'os avec ici les courbes et angulations en lignes bleutées sur l'extrémité supérieure d'un fémur humain.

- Au niveau macroscopique :

Pour les os longs, on distingue plusieurs structures du centre de l'os vers sa périphérie (figure I-2) :

- Le trabécule osseux : il s'agit du tissu au centre de la diaphyse (aussi appelé os spongieux). Il possède une architecture en travées dont l'orientation, l'épaisseur et la richesse des travées et la porosité sont des éléments constituant la résistance mécanique en trois dimensions d'un os long. Ces éléments sont fortement dépendants des contraintes appliquées à l'os. Il s'agit d'un tissu fortement vascularisé ;
- la corticale osseuse : il s'agit du tissu le plus dense de l'os. Il est généralement en surface de l'os au niveau des diaphyses. Il s'agit d'une structure dite Haversienne (ou os lamellaire compact) composée d'ostéons. L'ostéon est formé d'un canal central (canal de Havers) composé d'un tissu conjonctif vascularisé, de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques. Cette structure mesure 100 à 500  $\mu\text{m}$ . Autour de ce canal, des ostéocytes sont enchâssés dans des lamelles osseuses concentriques. Les canaux de Volkmann sont des canaux perpendiculaires aux canaux de Havers et reliant ceux-ci entre eux ;
- le tissu osseux périoste est un tissu intermédiaire constitué de lamelles circonférentielles situées entre la corticale et le périoste ;
- le périoste est un tissu conjonctif fortement vascularisé à prédominance fibreuse sans orientation qui entoure l'os.

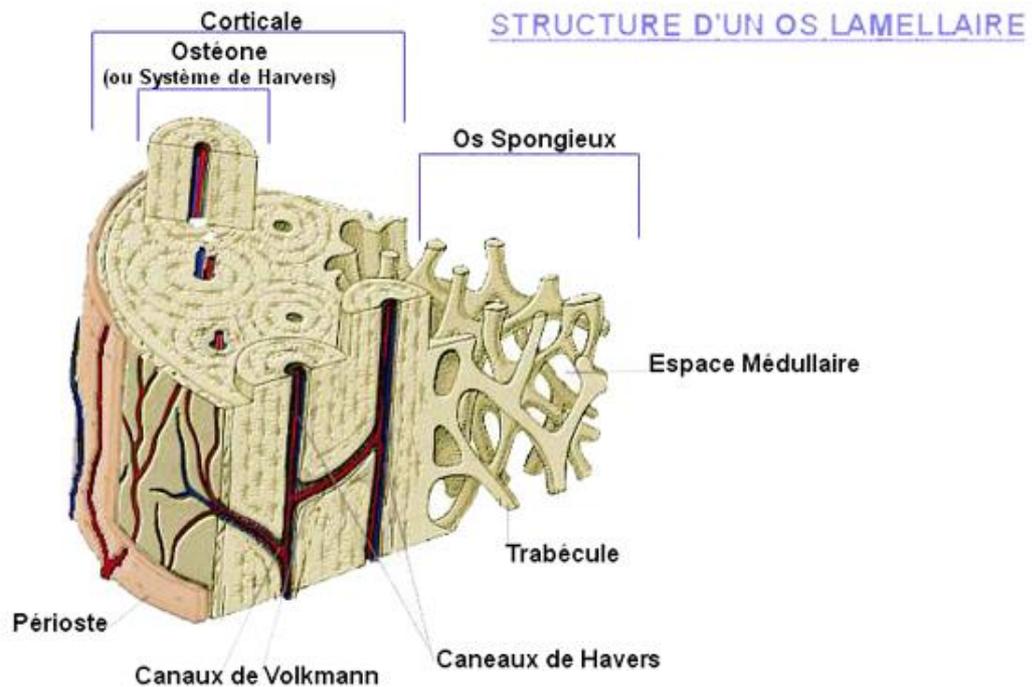


Figure I – 2. L'architecture macroscopique d'un os long.

La distinction entre os spongieux et os compact (ou cortical) tient à l'architecture et à la densité de l'os. L'os cortical est dense et microporeux. L'os spongieux est peu dense et avec une porosité de grande taille (Zioupou et al 2008). Cette distinction a été établie antérieurement avec une porosité inférieure à 30% pour le trabéculaire et supérieure à 30% pour l'os cortical (Bonucci 2000 ; Gibson 1985 ; Schaffler et Burr 1988). Cette différence de porosité entre os cortical et trabéculaire s'accompagne également d'une différence de densité minérale. Il existe une nette prédominance de la partie minérale de l'os dans la partie corticale (jusqu'à 90 % en fonction des études) (Van Ruijven et al 2007 ; Goodyear et al 2009). L'existence de ces observations n'a cependant pas abouti à un consensus à ce jour. Il n'est pas possible d'affirmer et de fixer la limite entre os cortical et trabéculaire.

- Au niveau microscopique :

L'os cortical et le trabéculaire présentent deux types de tissu osseux : l'os non lamellaire et l'os lamellaire. L'os non lamellaire est un tissu immature de dépôt rapide. Il a généralement une durée de vie courte en réponse à une période physiologique spécifique (développement fœtal puis périnatal ou réponse à un stress inflammatoire, tumoral ou traumatique). Il s'agit d'un matériel peu structuré servant de matrice à la constitution de l'os lamellaire. L'os lamellaire est

un tissu mature organisé en superposition de couches de lames parallèles de tissu osseux. L'apparition d'ostéons dit primaire se réalise dans la transition entre os non lamellaire et os lamellaire. Ces ostéons se composent d'un canal central et d'appositions concentriques d'os. Un système d'ostéons dit secondaire est présent dans les zones où la constitution de l'ostéon s'est faite sur une résorption d'un os préexistant. C'est ce système secondaire qui constitue l'os haversien (figure I – 3).

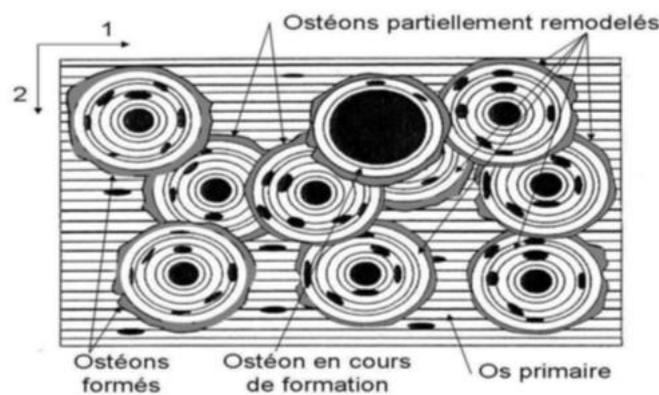


Figure I – 3. Schéma de l'os cortical constitué d'ostéon primaire et secondaire (extrait de [Henry 2006](#)). Approche micromécanique de l'os cortical : mesures de champs et simulation numérique. PhD thesis, École centrale Paris, Paris)

- A la frontière entre le microscopique et le nanoscopique :

L'os est composé d'un peu plus de 90% de matrice extracellulaire. Au sein de cette matrice, on distingue la phase minérale (environ 70%), la phase organique (environ 20% - principalement constituée de collagène de type I) et environ 10% d'eau.

Les 10% (hors matrice extracellulaire) de l'os restant sont constitués des cellules osseuses (ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes).

S'agissant de la phase organique, elle comprend principalement du collagène de type I (environ 90% de la phase organique), une substance interfibrillaire protéique non collagénique et des lipides.

La synthèse du collagène de type I débute par la fabrication de procollagène après transcription de l'ADN puis traduction par les ARN messagers. Après transcription, le procollagène présente 2 chaînes polypeptidiques alpha 1 et une chaîne alpha 2. La structure triple hélice est stabilisée

par des pontages disulfures puis les extrémités sont clivées (N term et C term) pour une transformation du procollagène en tropocollagène. Ce tropocollagène s'assemble en fibrille de 50 nm de diamètre et 300 nm de long. Ces fibrilles s'assemblent entre elles pour constituer la fibre de collagène (figure I – 4).

Les protéines non collagéniques peuvent être classées en 4 groupes (Delannoy 2016 ; Donley et Fitzpatrick 1998) les glycoprotéines, les protéoglycanes, les protéines contenant de l'acide gamma-carboxyglutamique et les protéines du sérum (tableau I – 1).

Les lipides osseux sont différemment appréciés en fonction de leur localisation (moelle osseuse ou tissu osseux minéralisé). La majorité des travaux recensés s'attache (During et al 2015 ; Hardouin et al 2014) à la caractérisation de l'adiposité médullaire notamment concernant les acides gras, le cholestérol et les phospholipides. L'adiposité de l'os minéralisé est peu étudiée à ce jour.

Tableau I – 1. Les protéines non collagéniques de la matrice osseuse extracellulaire.

Glycoprotéines	Protéoglycanes	Protéines contenant de l'acide gamma-carboxyglutamique	Protéines du sérum
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ostéonectine</li> <li>– Ostéopontine</li> <li>– Sialoprotéine</li> <li>– SAC 75</li> <li>– Thrombospondine</li> <li>– Fibronectone</li> <li>– Vitronectine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Versicane</li> <li>– Décorine</li> <li>– Biglycane</li> <li>– Hyaluronate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ostéocalcine</li> <li>– Protéine S</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Albumine</li> <li>– Facteurs de croissance</li> </ul>

S'agissant de la phase minérale, elle se compose de cristaux d'hydroxyapatite qui remplissent l'espace entre les fibrilles de collagène. Ces cristaux s'élargissent avec le temps sous l'action du remplacement d'ions phosphate par des ions carbonates rendant l'ensemble moins stables, les apatites carbonatés se dissolvant plus facilement (Ruppel et al 2008), ayant des conséquences physiques chez le vivant et potentielles en *post mortem*.

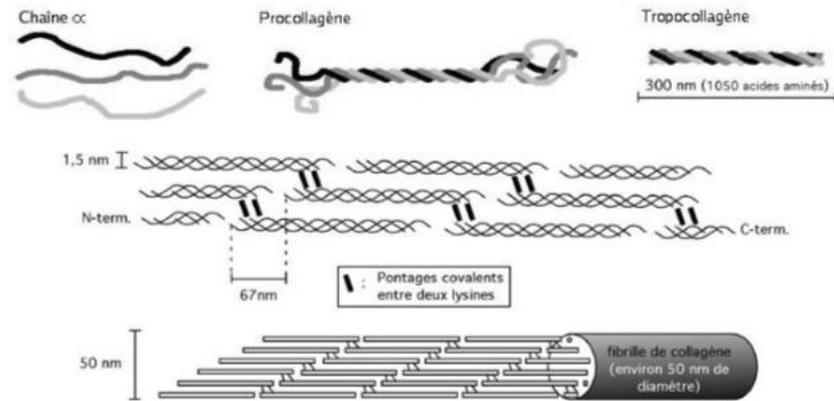


Figure I – 4. Représentation de la formation d’une fibrille de collagène (extrait de [Lefèvre 2015](#)).

#### – Méthodes d’estimation du DPM sur restes squelettiques

L’estimation du DPM sur des restes osseux en contexte médico-légal est encore à l’heure actuelle un véritable challenge ([Iqbal et al 2018](#), [Cappella et al 2015](#)). Comme nous allons le détailler par la suite, il existe aujourd’hui de nombreuses méthodes applicatives et expérimentales pour essayer de comprendre l’évolution d’un os en *post mortem*. Ces méthodes sont aussi des tentatives d’estimation du DPM. En synthèse, aucune de ces méthodes n’est suffisamment performante et fiable pour être utilisée en pratique. Il subsiste toujours un manque à ce niveau pour le légiste ou l’anthropologue qui souhaite estimer l’ancienneté d’un ossement récent.

[Cappella et al 2015](#) ont fait la synthèse un certain nombre de techniques exploratoire avec leurs limites. Cela montre qu’il existe de nombreuses pistes de recherche depuis plusieurs années sans résultat permettant d’obtenir un consensus scientifique (table I – 2).

Tableau I – 2. Résumé en anglais des divers articles concernant les méthodes d'estimation des DPM sur les os (Capella et al 2015).

Berg 1963	Plusieurs méthodes sont décrites. L'étude morphologique optique est considérée comme meilleure que les méthodes physiques ou chimiques
Knight & Lauder 1967	Le DPM peut être corrélé au contenu en azote, à la réaction positive à la benzydine et la présence de plus de 7 acides aminés en chromatographie
Knight & Lauder 1969	Existence d'une bonne corrélation entre le DPM et le contenu en azote, le contenu en acides aminés et le type d'acides aminés, la fluorescence UV, la réaction au test chimique à la benzydine et le test de diffusion sur gel (technique d'immuno-précipitation sur gel)
Facchini & Pettener 1977	Il est possible de faire la différence entre des échantillons de moins de 300 ans et des échantillons plus anciens en étudiant la réaction positive à la benzydine, la fluorescence aux UV, en fonction du poids et de la conductivité thermique des échantillons osseux
Castellano et al 1984	Trois équations de régression sont proposées pour quantifier la corrélation entre le DPM et le niveau de protéines, de triglycérides et de cholestérol dans les os
Yoshino et al 1991	Le DPM est corrélé à la fluorescence UV et aux observations microscopiques au niveau de l'os
Ramsthaler et al 2011	La présence d'un résultat négatif pour le test luminol ou d'un faible résultat pour la fluorescence UV sont de bons arguments pour exclure le caractère médico-légal d'un échantillon osseux. A contrario, un résultat positif pour le luminol ou pour la fluorescence UV sont de moins bons arguments pour retenir le caractère médico-légal d'un échantillon osseux
<b>Chimiluminescence</b>	
Introna et al 1999	Relation possible entre DPM et réaction au luminol sur de la poudre osseuse
Ramsthaler et al 2009	Test au luminol pas validé pour méthodologie isolée, mais peut aider à l'estimation du DPM
Creamer and Buck 2009	Les os archéologiques montrent une réaction plus faible au luminol que les os médico-légaux
<b>Datation au carbone 14</b>	
Taylor et al 1989	La datation au carbone 14 est utilisable en médecine légale
Ubelaker et al 2006	Les « bomb-peak » peuvent être utilisés pour les périodes pré et post 1963
Ubelaker and Parra 2011	Les valeurs en radiocarbone de l'os trabéculaire sont plus proches de celles de la troposphère au moment du décès que les valeurs de l'os cortical
<b>UV fluorescence</b>	
Hoke et al 2013	La fluorescence UV seule est non valide pour les os médico-légaux
<b>Méthodes chimiques</b>	

Cook 1968	La datation chimique des os doit être faite sur une base statistique et en tenant compte des conditions environnementales du sol.
McLaughlin and Lednev 2011	Grand potentiel de la spectroscopie Raman pour l'estimation de la durée d'enfouissement d'un os à des fins médico-légales
Howes et al 2012	Potentialité de la spectroscopie infrarouge pour évaluer les modifications associées au vieillissement osseux dans différents environnements de sol
Patonai et al 2013	Modifications statistiquement significatives de l'indice de cristallinité et de l'indice carbonate-phosphate mesurées par spectrométrie infrarouge et transformation de Fourier (FTIR) entre des os médico-légaux et archéologiques
<b>Radionucléide</b>	
MacLaughlin-Black et al 1992	Utilité du <sup>90</sup> Sr pour identifier le moment du décès dans une période qui est définie chronologiquement après ou avant le pic de niveau de <sup>90</sup> Sr, dans les années 1960
Swift 1998	Une proposition de mesure des niveaux de <sup>210</sup> Po et <sup>210</sup> Pb pour évaluer le DPM. Les limitations sont la diagenèse, le temps et le coût de la technique
Neis et al 1999	Résultats utiles du <sup>90</sup> Sr pour déterminer le DPM, mais des investigations supplémentaires devraient être menées pour déterminer l'année limite de l'activité du <sup>90</sup> Sr
Swift et al 2001	Corrélation entre les différents teneurs en radionucléides et le DPM. Des études plus importantes doivent être effectuées pour confirmer les résultats et fournir un étalonnage
Schrag et al 2012	La mesure combinée du <sup>90</sup> Sr et du <sup>210</sup> Po augmente la fiabilité de l'estimation du DPM. L'os trabéculaire est sujet aux modifications diagénétiques de la concentration en <sup>90</sup> Sr et en <sup>210</sup> Po
<b>Méthodes microscopiques</b>	
Yoshino 1991	Bonnes estimations de l'ancienneté des os par microradiographie, microscopie électronique et fluorescence UV par spectrophotométrie microscopique

- Méthodes visuelles

- Méthodes macroscopiques

Ce travail se focalisant sur les restes squelettiques, il ne sera pas traité des stades d'évolution préalables d'un cadavre (autolyse puis putréfaction) ni des éléments d'étude complémentaire tels que l'entomologie. Lors de la découverte de restes squelettisés, le médecin légiste peut s'aider de plusieurs éléments d'observation, à la fois sur les restes osseux et sur l'environnement de découverte.

L'observation macroscopique des ossements est une technique non destructrice mais observateur dépendant. Des méthodologies basées sur l'observation d'une série de cas ont été proposées dans la littérature. Les stades de décomposition et de squelettisation d'un cadavre proposés par Galloway en 1989 ([Galloway et al 1989](#)) permettent de proposer un outil d'estimation du DPM à partir de restes humains en extérieur. Cette classification (tableau I – 3) présente cependant plusieurs limites de taille puisqu'elle est observationnelle et limitée en nombre de cas. Elle a également été réalisée sur un unique environnement (Arizona aux États-Unis d'Amérique) avec un intervalle de température et une faune spécifique, non applicable dans la pratique hexagonale. Il convient également de citer la notion de vieillissement macroscopique osseux ou « bone weathering » qui a été décrite par AK Berhensmeyer en 1978 ([Berhensmeyer 1978](#)). Il s'agit d'une description de l'état macroscopique de l'os en lien avec les modifications physico-chimiques liées à l'action de l'environnement. Six stades sont décrits en fonction de l'état macroscopique de l'os (tableau I – 4). Ces stades de vieillissement ont rapidement été discutés. Ces stades manquent de précision et présentent des limites en matière d'influence du milieu de conservation peu prises en compte dans la méthode. [Pokines et al 2016](#) ont montré que les craquelures observées macroscopiquement sur des ossements étaient également observables dans le cadre de cycles de congélation/décongélation. Cet aspect osseux est hautement corrélé aux variations thermiques du milieu de conservation.

Le stade de scavenging a également été décrit comme une méthode d'estimation du DPM sur des restes squelettiques ([Haglund 1996](#)). Outre que les descriptions initiales ont été faites en lien avec une faune n'existant pas dans l'hexagone (des coyotes), l'estimation du DPM sur un critère de ce type suscite de nombreuses interrogations. La fiabilité d'une telle méthodologie et l'intervalle d'estimation très important (de quelques heures à plusieurs dizaines de mois) sont des limites de cette méthode. Le type de faune impliquée est également limitant (population actuelle d'animaux, stabilité des comportements de scavenging dans le temps par rapport aux zones géographiques concernées en lien avec l'évolution de l'activité humaine dans les mêmes zones ...).

Ces méthodes présentent donc des limites à savoir l'aspect subjectif de la classification, qui est fortement dépendante de l'expérience de l'observateur et de l'environnement. Ces méthodes ne permettent pas une estimation précise et fiable du DPM malgré leur utilisation en pratique. Elles restent cependant utiles comme une base pour des recherches plus récentes.

Tableau I – 3. Stades de décomposition d'un cadavre entreposé dans un environnement aride (adapté de Galloway et al 1989).

<b>Catégories et stades de décomposition</b>		<b>DPM</b>
A - Frais	1 – Corps frais	1 – 7 jours
	2 – Corps frais, présence d'une déshydratation	
B – Décomposition précoce	1 – Apparence blanchâtre – rosâtre, décollement épidermique, décollement des phanères	> 5 jours
	2 – Décoloration cutanée grisâtre – verdâtre, persistance de tissus mous à l'état frais	
	3 – Décoloration cutanée brunâtre, marquée sur les extrémités (doigts, orteils, nez, oreilles), persistance de tissus mous à l'état frais	
	4 – Emphysème sous cutané avec gonflement visible et décoloration cutanée verdâtre	2 – 7 jours
	5 – Rupture de la paroi abdominale sous l'effet du gonflement intense de cette région sous l'effet des gaz putréfactifs	8 jours – 1 mois
	6 – Décoloration cutanée brunâtre à noirâtre, aspect parcheminé du tégument	
C – Décomposition avancée	1 – Relâchement des tissus, effondrement de la cavité abdominale, activité entomologique importante	> 4 – 10 jours
	2 – Décomposition « humide » avec mise à nu squelettique	
	3 – Momification (certains organes intracorporels conservent leur structure)	10 jours – 1 mois
	4 – Momification des tissus externes, disparition des organes par autolyse et action des insectes nécrophages	
	5 – Momification avec squelettisation de la moitié inférieure du corps	2 – 9 mois
	6 - Adipocire	
D – Squelettisation	1 – Squelette avec persistance de tissus décomposés	2 – 9 mois
	2 – Squelette avec persistance de tissus décomposé ou momifié recouvrant moins de 50% du corps	> 6 mois
	3 – Squelette ne présentant quasiment plus de partie molle	
	4 – Squelette sans partie molle	
E – Extrême décomposition	1 – Ossements présentant une décoloration blanchâtre	> 6 mois
	2 – Ossements présentant une exfoliation	> 12 – 18 mois
	3 – Exposition du tissu osseux spongieux (= perte de substance métaphysaire)	> 5 ans

Tableau I – 4. Définition des stades de vieillissement des os et mises en relation avec le DPM (issu de [Berhensmeyer 1978](#)).

Stade de vieillissement	Estimation du DPM (en années)	Éléments de définition du stade de vieillissement
0	0 à 1 an	Absence de craquelure ou d'écaille, présence de tissus mous sur les restes osseux
1	0 à 4 ans	Craquelures osseuses parallèles au grand axe de l'os sur les os long
2	2 à 7 ans	Présence d'écailles en surface de l'os associées aux craquelures ; les écailles sont longues et fines, avec présence d'une attache osseuse ; les craquelures ont des bords angulaires ; exfoliation osseuse débutante
3	4 ans voire jusqu'à plus de 15 ans	Surface osseuse rugueuse ; texture fibreuse de l'os ; aspect vieilli de l'os sur 1 à 5 mm de profondeur, bords arrondis des craquelures
4	6 ans voire jusqu'à plus de 15 ans	Surface osseuse grossière, rugueuse et fibreuse en termes de texture ; petits et grands éclats faiblement attachés à l'os ; l'aspect de vieillissement pénètre en profondeur dans l'os ; les craquelures sont profondes et ouvertes
5	6 ans voire jusqu'à plus de 15 ans	Os fragile, se décomposant mécaniquement en morceaux.

- Méthodes colorimétriques
  - Réactions de coloration au bleu de Nil et à l'indophénol

Les travaux de Berg et Specht autour des années 1960 ([Berg & Specht 1958](#), [Berg 1963](#)) ont mis en évidence une affinité de l'os humain *post mortem* avec deux colorants le bleu de Nil (ou hydrogénosulfate) et l'indophénol. Il s'agit de deux colorants biologiques qui vont différemment colorer l'os en fonction de son pH et de sa teneur en lipides. Ces deux éléments sont corrélés à l'ancienneté de l'os. D'après ces travaux, plus l'os est ancien et plus il sera

coloré au niveau de sa corticale par du bleu de Nil mais peu par l'indophénol. Pour un os récent, l'inverse se produira avec une forte coloration par l'indophénol et une faible coloration par le bleu de Nil. Plusieurs limites sont inhérentes à cette technique et principalement l'impossibilité de conclure pour un DPM inférieur à 500 ans. Cela ne permet pas son usage dans un contexte médico-légal (Quatrehomme 2015, Delannoy 2016).

- Fluorescence aux rayonnements ultraviolets

Cette méthode se base sur la réflexion d'une section osseuse soumise à UV pour des grandes longueurs d'ondes dans une chambre noire (Delannoy 2016). L'évaluation permet d'estimer une modification colorimétrique passant par le bleu pour les os à DPM court puis, le brun, le jaune, le gris pour des DPM plus longs (Delannoy 2016, Hoke 2013). La coloration bleuâtre d'un os frais est liée à la forte présence de collagène dans cette méthode. La transition colorimétrique s'expliquant alors par la disparition progressive de la partie organique osseuse au cours du temps (Hoke 2013). Cette technique présente un intérêt dans la capacité à différencier un os très ancien (ou archéologique) d'un os récent. Cette technique a donc le potentiel d'identifier un os médico-légal (la limite étant fixée à plus ou moins de 60 ans de DPM) avec cependant des limites en matière de spécificité, sensibilité et faux positifs/négatifs (Hoke 2013).

- Fluorescence au luminol

Le luminol est une solution alcaline qui produit une lumière bleutée visible dans le noir par fluorescence lors de l'adjonction de peroxyde d'hydrogène. Cette réaction chimique est très sensible. Elle persiste pour la mise en évidence de traces de sang anciennes (Lytle, & Hedgecock, 1978). Il s'agit d'une technique usuelle de recherche de tâches de sang sur les scènes de crime. Pour les restes squelettiques, l'utilisation de cette technique repose sur le postulat que des os récents conservent des traces de sang de façon plus abondante que des os anciens. Cette technique présente de nombreux faux négatifs. Elle ne peut être utilisée sans un faisceau de suspicion important du caractère médico-légal des ossements (Ramsthaler et al 2009). Plus récemment, Cappella et al 2015 ont montré que la fluorescence au luminol pouvait

être précieuse pour affiner une datation au carbone 14 et pour différencier des os anciens et récents.

- Méthodes microscopiques

Les méthodes d'estimation du DPM sur l'étude microscopique de l'os sont basées sur les altérations de la matrice osseuse. Il s'agit d'une méthode destructrice. Elle nécessite une préparation par coupe puis fixation +/- coloration des échantillons avant étude en microscopie. La méthode d'estimation du délai *post mortem* proposée par Berg (Berg 1963) repose sur l'observation sous microscope et avec une lumière polarisée d'une section d'os décalcifié. Cette technique met en évidence les minéralisations secondaires associées à une décomposition alvéolaire sur des os anciens (délais *post mortem* supérieurs à 70-100 ans). Elle permet de rechercher la présence de matière lipidique dans les canaux de Havers, indice d'une dégradation de la moelle osseuse corrélée à un DPM inférieur à 50 ans (Urzel 2014). L'observation microscopique des os en *post mortem* a également permis d'élaborer l'hypothèse d'une dégradation collagénique d'origine bactérienne (Collins et al 2002). Dans cette hypothèse, les lacunes laissées par l'activité bactérienne seraient le siège d'une recristallisation de l'hydroxyapatite (d'origine endogène) ou par la précipitation de minéraux issus des sols (origine exogène) (Turner-Walker et al 2002 ; Turner-Walker 2011).

La classification histologique microscopique d'Oxford (OHI), a été proposée à partir de plusieurs travaux en microscopie optique et électronique à balayage (Hackett 1981 ; Garland 1985 ; Bell 1990). Cet indice permet de distinguer 6 classes en fonction du degré d'altération de la microstructure osseuse : le stade 5 correspond à un os quasi frais tandis que le stade 0 correspond à un os dont 95% de son total est altéré avec persistance uniquement des canaux de Havers comme structure identifiable au microscope (figure I – 5).

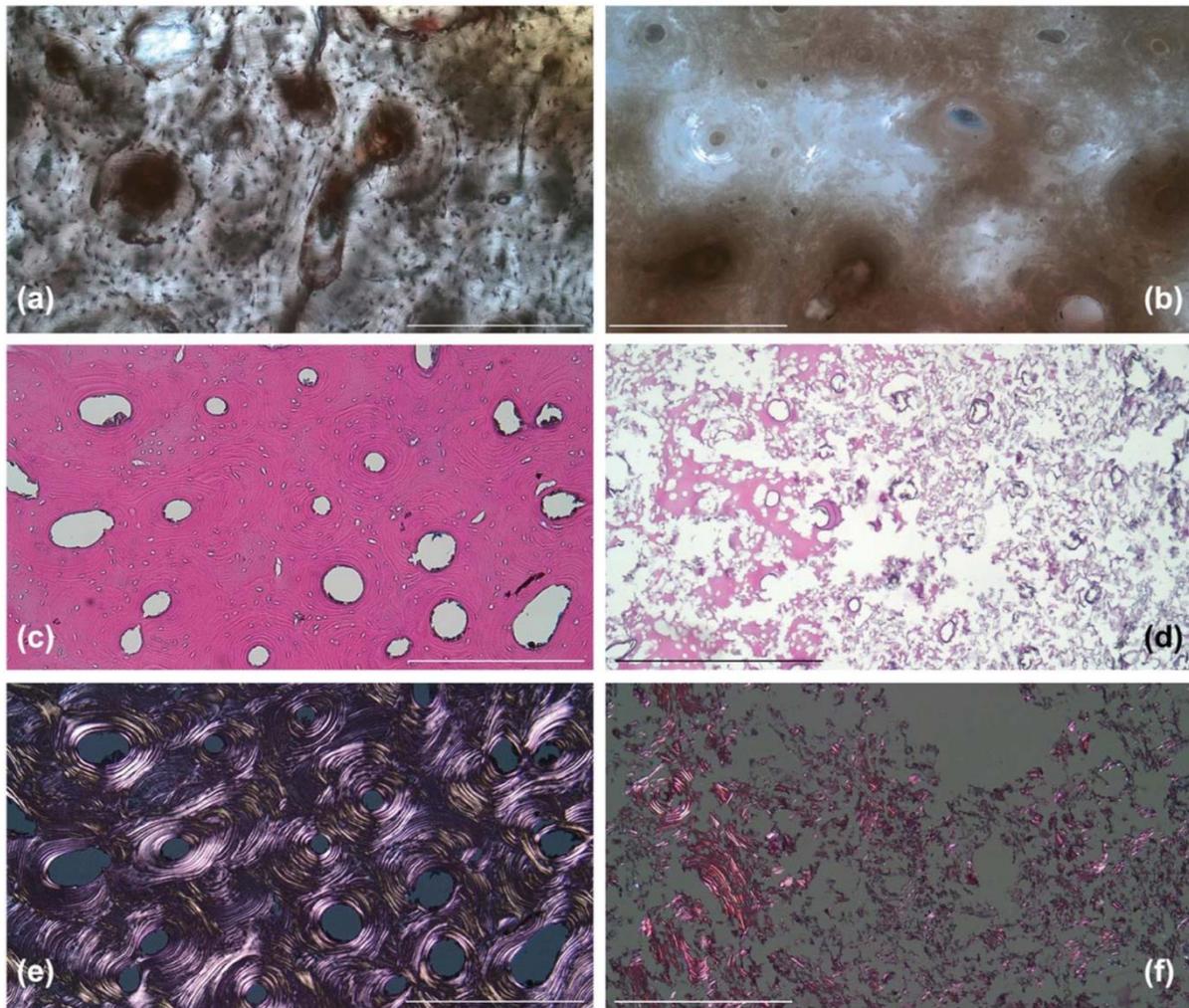


Figure I – 5. Classification histologique Oxford – (a) Tissus bien conservés non-calcifiés (score OHI 5) (lumière transmise) ; (b) Tissus mal conservés (score OHI 1) (lumière polarisée) ; (c) Tissus bien décalcifié et bien conservé (score OHI 5) (lumière transmise) ; (d) Tissu mal conservé décalcifié (score OHI 1) (lumière transmise) ; (e) degré élevé de biréfringence (lumière polarisée) ; (f) faible degré de biréfringence (lumière polarisée). 20  $\mu$ m, magnification 100 X (issue de [Caruso et al 2018](#))

Sur des coupes plus fines (de l'ordre de 30  $\mu$ m), un autre index de préservation histologique a été défini par Garland ([Garland 1988](#)) et adapté par Jans ([Jans et al 2002](#)), en 5 modifications diagénétiques identifiables caractérisées par ([Delannoy 2016](#)) :

- des destructions focales microscopiques (MFD) ou tunnels ([Hackett, 1981](#)), caractérisées par des pertes focales de collagène et d'hydroxyapatite avec des zones hyperminéralisées entourant les tunnels ;
- des inclusions correspondant à la présence de matériel exogène dans les espaces osseux vides et en rapport majoritairement avec des dépôts fongiques, du sable, de la pyrite... ;

- des infiltrations correspondant à la présence de matériel exogène ferreux (colorés par la réaction de Perl) et/ou à des cristaux d'hydroxyapatite altérés ;
- des fissures envahissant le système Haversien (fissures larges) ou restreintes aux ostéons (microfissures). Leurs différences de taille sont liées à leurs causes, à savoir l'influence de l'environnement (humidité, température) pour les fissures larges et, le remodelage lié aux altérations organo-minérales pour les microfissures ;
- l'intensité de la biréfringence examinée en lumière polarisée sur les ostéons sous la forme d'une alternance de bandes lumineuses et de bandes sombres.

À partir de ces descriptions, Delannoy ([Delannoy 2016](#) ; [Delannoy et al 2017](#)) a montré une dégradation osseuse autour des canaux de Havers puis affectant la zone corticale plus externe, se réalisant de façon centrifuge (du centre vers la périphérie). Ces altérations augmentent avec le temps de conservation sur des os humains conservés pendant 24 mois et examinés en microscopie optique. Ces travaux mettent également en évidence une disparition de la biréfringence avec le temps, témoin d'une altération du collagène par hydrolyse. L'ensemble était observé sans aucune activité bactérienne.

L'ensemble de ces travaux est prometteur dans le sens où les constatations faites sont dans un DPM court d'un point de vue anthropologique. Pour autant, ces travaux n'ont pas d'application actuelle pour l'estimation du DPM sur des restes squelettiques.

- Méthodes radio-isotopiques

Les techniques de datations radio-isotopiques sont des méthodes de datation « absolue » (c'est-à-dire chiffrée). Elles utilisent les modifications régulières d'un radio-isotope au cours du temps pour déterminer de façon rétrospective l'ancienneté de l'échantillon. Chez l'humain, l'incorporation de radio-isotopes se fait principalement par l'ingestion d'aliments. La mesure est effectuée sur des échantillons osseux en mesurant l'activité radiométrique des isotopes incorporés.

- Datation au Carbone 14

Sur Terre, le carbone 14 est formé lors de l'absorption de neutrons par les atomes d'azote de la stratosphère et des couches hautes de la troposphère. Les neutrons proviennent de la collision des rayons cosmiques avec les atomes de l'atmosphère, notamment l'oxygène.

Son unique mode de désintégration se fait par transmutation en azote  $^{14}\text{N}$  avec une période de demi-vie radioactive de  $5730 \pm 40$  ans. Le carbone 14 est un isotope radioactif du carbone.

L'ingestion de carbone 14 par un individu se fait tout au long de la vie. Le métabolisme de ce radio-isotope est stoppé lors de la mort. La décroissance du carbone 14 peut être mesurée sur des os en *post mortem*. En fonction des concentrations mesurées sur l'os par rapport à celles de l'environnement, il est possible d'estimer une période de décès.

Ce carbone 14 est affecté par l'activité humaine avec en particulier deux périodes :

- la première partie du XX<sup>e</sup> siècle, qui a vu les concentrations de carbone 14 diminuer dans l'atmosphère en raison de la consommation des énergies fossiles liée au développement de l'activité industrielle dans les pays occidentaux (Suess 1955, Delannoy 2016) ;
- la seconde partie du XX<sup>ème</sup> siècle, qui a permis d'observer le relargage dans l'atmosphère d'une grande quantité de radionucléides dont le carbone 14 lors de l'usage répété de la bombe atomique. Cet effet a été appelé « bomb peak » dans la littérature (Taylor et al 1989).

Aujourd'hui, cette concentration en carbone 14 dans l'atmosphère et les sols a diminué progressivement. C'est l'existence de ce « bomb peak » qui permet d'envisager l'usage de la datation au carbone 14 dans un contexte médico-légal. En effet, l'observation de cet effet permet théoriquement de distinguer des ossements contemporains et aux alentours de 1950 d'ossements plus anciens (Taylor et al 1989). Cela dit, l'usage de cette méthode est limité par l'existence de faux négatifs. Si son utilisation seule est peu recommandée, elle est améliorée par l'utilisation de techniques en compléments. Cela rend potentiellement utilisable cette méthode de datation en médecine légale (Cappella et al 2015). Il s'agit d'une méthode qui reste onéreuse et présentant des limites. Son utilisation en pratique quotidienne est compromise par ces éléments.

- Datation par mesure de l'activité de radionucléides liés à l'activité nucléaire humaine

Plusieurs études (Swift et al 2001 ; McLaughlin-black 1992) ont été menées sur l'activité de radionucléides, autres que le carbone 14, tels que le strontium ( $^{90}\text{Sr}$ ), le plutonium ( $^{238}\text{Pu}$ ) ou le césium ( $^{137}\text{Cs}$ ). Ces études basées sur le principe du « bomb peak » ont montré des résultats intéressants. Il persiste des limites d'interprétation avec la contamination des échantillons par l'environnement. Cela ne permet pas de retenir ce type de méthode comme utilisable pour estimer le DPM sur des restes osseux en contexte médico-légal.

- Datation par mesure de l'activité de radionucléides naturels

De la même façon que pour les radionucléides présentés précédemment, des travaux ont été menés (Swift et al 2001 ; Swift 1998) sur l'activité de radionucléides naturels tels que le plomb ( $^{210}\text{Pb}$ ) et l'uranium ( $^{234}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ ). Il existe une forte variabilité des résultats en lien avec l'habitus (notamment alimentaire) des individus *ante mortem*. Ces variations et la difficulté d'interprétation des résultats ne permettent pas de retenir ces méthodologies pour l'estimation du DPM d'ossements récents à l'heure actuelle.

- Méthodes chimiques

Schwartz et al (Schwartz et al 2010) ont montré qu'il existait une diminution du contenu en citrate des os humains en *post mortem*. Cette diminution de citrate est progressive et régulière au cours du temps (le citrate étant une molécule absorbée par l'hydroxyapatite régulant la croissance des cristaux). Ces résultats sont encourageants pour l'estimation d'un DPM récent mais, il reste une limite de précision de l'estimation réalisée. Plus récemment, la force de l'interaction entre DPM et contenu en citrate de l'os a été remise en cause avec une tendance à la sous-estimation du DPM (Wilson et al 2017 ; Brown et al 2018).

L'étude de la porosité osseuse a également été réalisée par l'intermédiaire de la teneur en humidité de l'os (Hedges & Millard, 1995). L'incorporation de mercure ou d'azote dans l'os a également été explorée (Nielsen-Marsh & Hedges 2000 a et b). Le postulat de ces travaux est que l'altération osseuse au cours du temps s'accompagne d'une modification de la porosité

(augmentation de la macro-porosité et diminution de la micro-porosité). Le problème reste que ces observations ne sont pas expliquées. Les explorations concernant les modifications de porosité osseuse ne sont donc pas encore suffisamment approfondies pour permettre de constituer un modèle prédictif pour l'estimation du DPM osseux.

- Autres méthodes
  - Spectrométrie

L'usage de la spectrométrie infra-rouge et celui de la spectrométrie Raman ont été décrits pour l'étude la partie organique de l'os et plus particulièrement de sa dégradation *post mortem* (Patonai et al 2013 ; Bertoluzza et al 1997 ; McLaughlin & Lednev 2011). De façon synthétique, la spectrométrie infrarouge exploite le fait que les molécules possèdent des fréquences spécifiques pour lesquelles elles tournent ou vibrent en correspondance avec le type de liaison des molécules. La spectroscopie Raman consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée. L'utilisation de ces deux techniques dans le champ de la taphonomie osseuse a été réalisée pour la mesure de l'altération de la phase minérale de l'os et de la dent en *post mortem*. McLaughlin & Lednev (McLaughlin & Lednev 2011) ont travaillé sur des os de dinde en spectrométrie Raman et montré sur une période de conservation courte (12 à 62 jours). Ils ont montré une corrélation entre le temps de conservation et la diminution des bandes des composants de la partie organique de l'os (amide I, amide III et delta-NH). Plus récemment, Delannoy et al (Delannoy 2016 ; Delannoy et al 2016) ont montré la survenue d'une déshydratation et principalement d'une altération de la partie organique de l'os corrélées à l'écoulement du temps. Ces études ont été faites sur des os humains *post mortem*, proposant un modèle prédictif utilisable en médecine légale sur des restes osseux.

- Diffraction

La mesure de la diffraction des rayons X par la matière est utilisée dans l'étude de la cristallinité osseuse (Bartsiokas & Middleton 1992 ; Person et al 1995). La cristallinité augmente avec le DPM sur des restes squelettiques. Il a été mis en évidence que cela était lié à des phénomènes de recristallisation de l'hydroxyapatite. Il survient également une altération du collagène osseux entraînant une instabilité de la fraction minérale osseuse de la porosité (Nielsen-Marsh &

Hedges 2000 a et b ; Hedges 2002). L'étude de la cristallinité peut également être faite par les méthodes spectrométriques présentées précédemment (Delannoy 2016). Il n'existe cependant pas d'outil validé pour l'estimation du DPM osseux en médecine légale à partir de ces méthodologies pour le moment.

– **Validité des méthodologies d'estimation du DPM osseux devant un tribunal**

Aucune méthode actuelle d'estimation du DPM osseux n'est pleinement satisfaisante d'un point de vue scientifique. En France, la méthodologie de l'expertise judiciaire n'est pas soumise à un dispositif de contrôle de méthodologie employée. Autrement dit, l'analyse de restes osseux avec estimation du DPM n'est pas soumise à un contrôle ou au suivi d'un protocole établi par les juges. À l'inverse, aux États-Unis d'Amérique, le juge est garant du contrôle et de la validation de la compétence de l'expert et de la méthodologie employée. Il y est appliqué l'arrêt dit de *Daubert*<sup>1</sup> et l'arrêt dit de *Kumho*<sup>2</sup> qui ont abouti à la création des critères de standardisation dits *Daubert* (tableau I – 5). Ces critères permettent de déterminer si la preuve apportée par l'expert peut être reçue. Ces arrêts ne sont pas appliqués en France mais, ils introduisent une notion d'exigence de rigueur scientifique indispensable à la pratique médico-légale. Ces critères sont un référentiel pour penser les outils d'analyse taphonomique en décrivant leurs apports et en détaillant leurs limites.

Tableau I – 5. Les critères Daubert utilisés aux États-Unis d'Amérique.

Concernant la méthode	Concernant le résultat de la méthode
Méthode qui a été testée	Les marges d'erreurs doivent être connues et renseignées
Méthode publiée dans une revue à comité de lecture	Les limites des résultats doivent être renseignées (taux d'erreur notamment)
Méthode acceptée par la communauté scientifique	

<sup>1</sup> Daubert contre Merrel Dow Pharmaceuticals, 1993

<sup>2</sup> Kumho Tire Co. contre Carmichael, 1999

## – Intérêts de la micro-tomodensitométrie

La micro-tomodensitométrie ( $\mu$ CT) est une technique d'imagerie équivalente au scanner médical conventionnel avec une haute définition. Il permet des acquisitions de données d'imagerie avec des pixels de quelques microns. Cette technique d'imagerie permet la collecte de données microscopiques et la reconstruction d'images en trois dimensions. Le  $\mu$ CT permet d'analyser les surfaces et les volumes des os de façon équivalente à l'histo-morphométrie. L'analyse des échantillons d'os est non destructrice contrairement à l'histo-morphométrie. Le  $\mu$ CT permet d'étudier des échantillons osseux au cours du temps. Les analyses réalisées avec le  $\mu$ CT sont précises et reproductibles. Ces analyses impliquent un volume d'intérêt (le volume étudié) important, et supérieur à d'autres techniques d'analyses telles que l'histologie ou l'histo-morphométrie.

Le  $\mu$ CT permet également de travailler sur les images acquises à plusieurs reprises et pour différentes opérations (calculs de paramètres, analyses structurales en 3D, aspect qualitatif de l'os ...). La capacité d'archivage, de partage et de comparaison des données sont également des apports de cette technologie. Cette flexibilité des données acquises s'accompagne d'une nécessité d'apprentissage des étapes obligatoirement liées à ce mode d'imagerie.

Le  $\mu$ CT utilisé dans ce travail est un  $\mu$ CT Bruker ® HR 1172 Skyscan (figure I – 6). Il s'agit d'une machine avec une chambre d'acquisition qui permet l'analyse d'objet de 6 cm de long et de 5 cm de large au maximum (figure I – 7). Cette machine peut analyser des images avec une définition allant jusqu'à des pixels de 5  $\mu$ m.



Figure I – 6. Le  $\mu$ CT Bruker ® HR 1172 Skyscan.



Figure I – 7. La chambre d'acquisition du  $\mu$ CT Bruker  $\text{\textcircled{R}}$  HR 1172 Skyscan contenant un échantillon osseux de 4 x 1 cm.

Une première étape de conditionnement des échantillons est nécessaire. Dans le  $\mu$ CT, l'échantillon tourne sur un plateau avec l'émetteur et la caméra à rayon X qui restent fixes (figure I – 8).

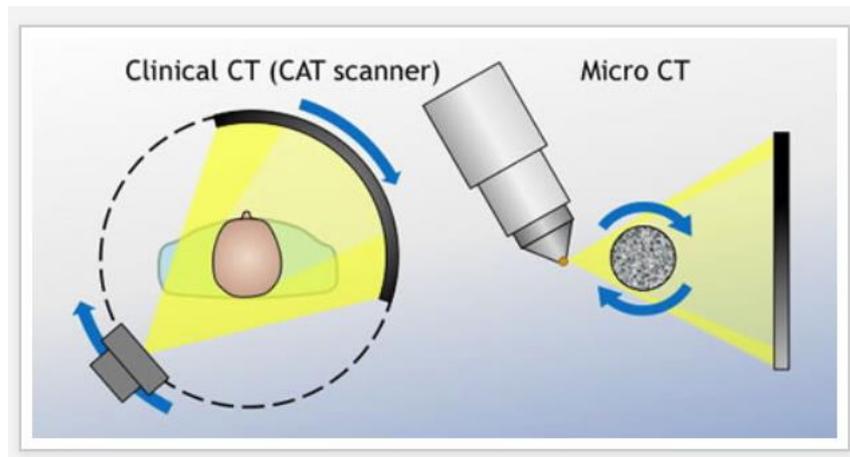


Figure I – 8. Principe du  $\mu$ CT : à gauche la modélisation du principe de fonctionnement du TDM médical standard et à droite le principe de fonctionnement du  $\mu$ CT (l'échantillon tourne sur lui-même, la caméra et l'émetteur de rayon X restent fixes).

L'étape d'acquisition des échantillons nécessite :

- de réaliser un paramétrage de l'intensité et du voltage de l'émetteur,
- de déterminer le pas de rotation et le temps d'exposition de l'objet aux rayons X,
- de déterminer la taille de pixels utilisée lors de l'analyse.

Il y a ensuite une étape de reconstruction des échantillons pour passer d'une succession d'acquisitions 2D (figure I – 9) en un jeu de données en 3D. Avec le  $\mu$ CT utilisé, cette action se réalise avec le logiciel NRecon® (figure I – 10).

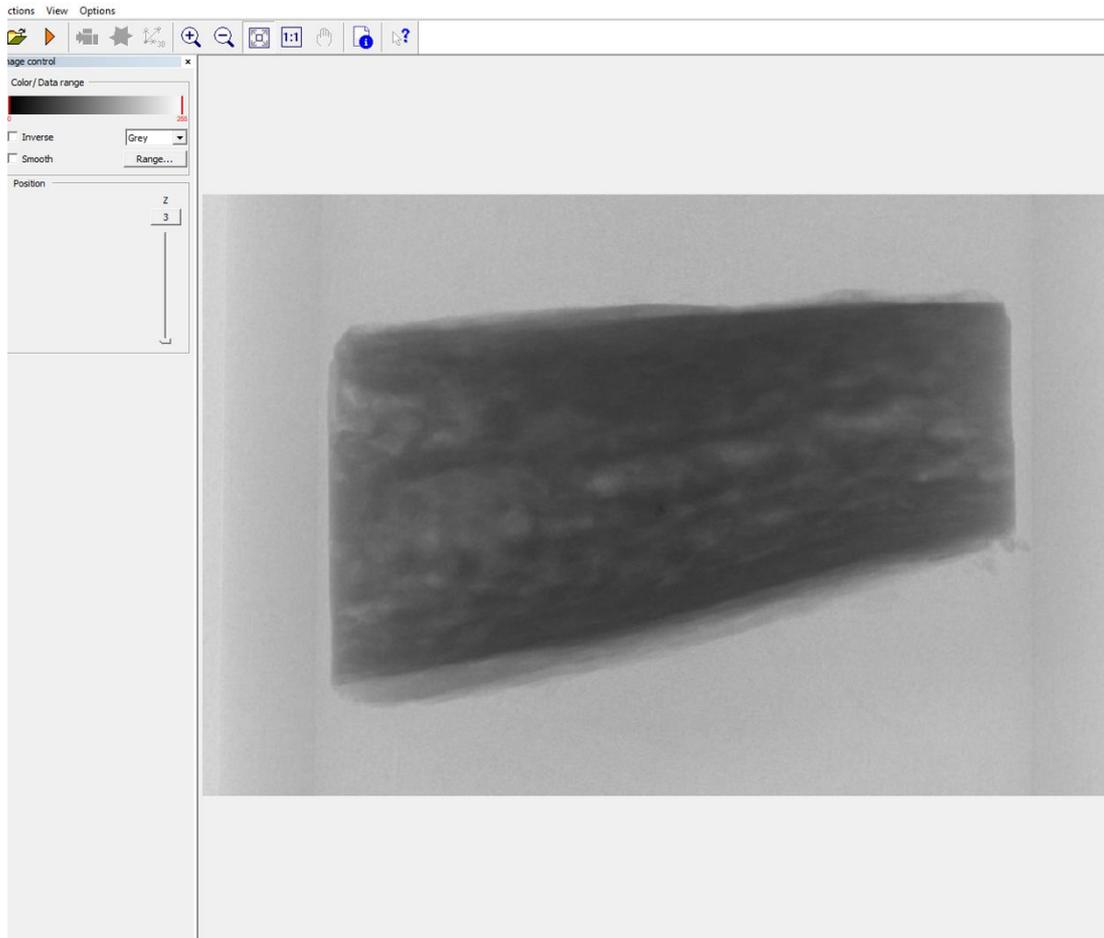


Figure I – 9. Acquisition en 2D : une coupe en 2D post acquisition au  $\mu$ CT d'un fragment de voûte crânienne humaine visualisée à l'aide du logiciel Dataviewer®.

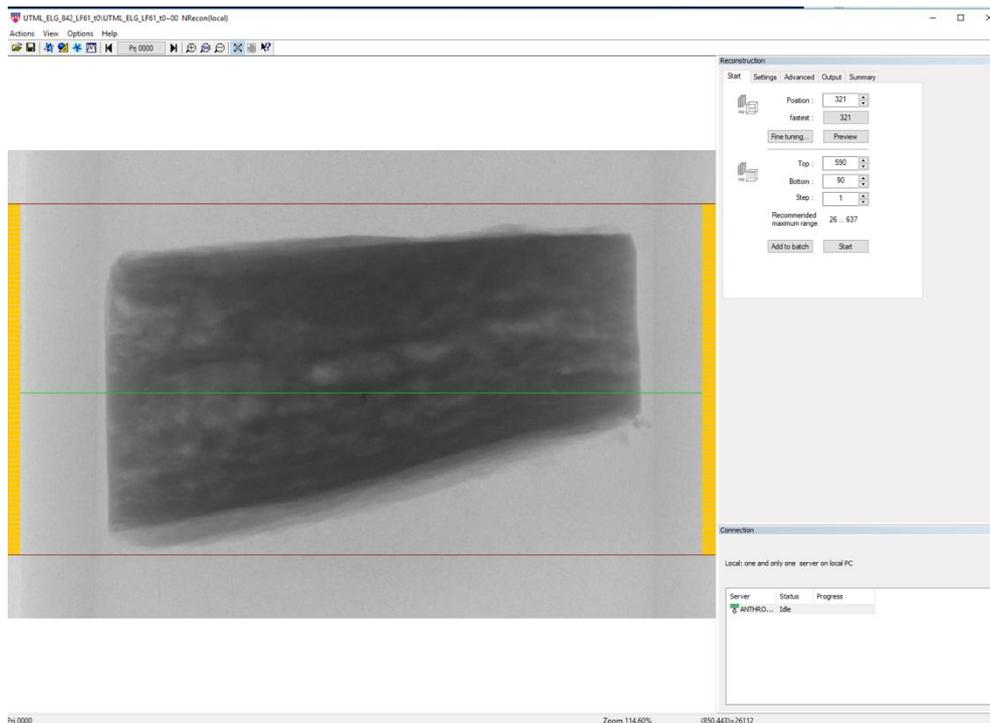


Figure I – 10. Reconstruction en 3D : étape de reconstruction d'un fragment de voûte crânienne humaine visualisée ici en 2D à l'aide du logiciel NRecon®

Cette reconstruction en 3D s'associe à deux paramètres qu'il convient de fixer à savoir le « beam hardening » et le « ring artifact correction ». Le « beam hardening » est un artefact lié à l'atténuation du faisceau de rayons X au cours de la traversée de l'objet. Cet artefact est potentiellement problématique, car il peut être en mesure de fausser les analyses. Cet artefact survient typiquement lorsque les analyses sont faites sur différents matériaux et que ces matériaux sont séparés par leur intensité à l'aide d'un seuillage. Il existe plusieurs façons de rectifier cet artefact. Nous avons réalisé une correction du « beam hardening » en post acquisition lors de la reconstruction des jeux de données en 3D. Les paramètres de la correction du « beam hardening » doivent être énoncés dans la méthodologie des travaux de  $\mu$ CT (Bouxsein et al 2010). Les « ring artifact » ou artefact en anneau sont des images accidentelles lors d'un problème de calibrage, d'une défaillance d'un ou plusieurs pixels du capteur ou de poussières sur le capteur. Cet artefact se visualise sous la forme d'un halo concentrique sur les images. Cet artefact peut être en partie corrigé en post acquisition lors de la reconstruction. Il peut également être réduit par un nettoyage, un recalibrage voire un remplacement de la source de rayons X (Bouxsein et al 2010). Après reconstruction en 3D, le jeu de données peut être analysé (figures I – 11 et I – 12).

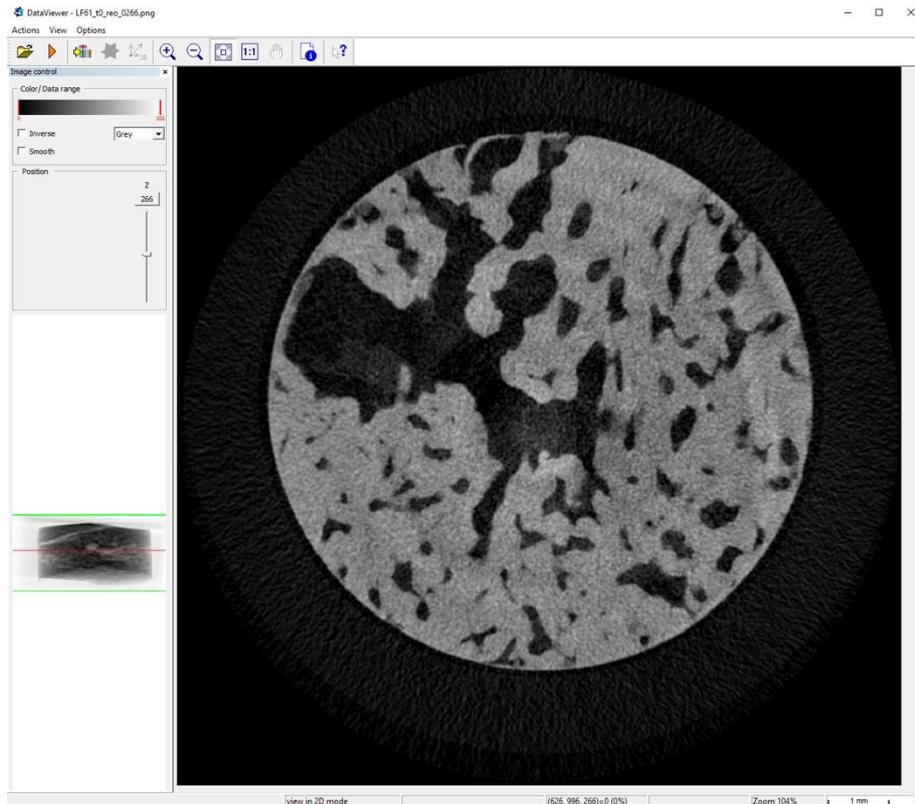


Figure I – 11. Coupe horizontale en 2D d'un fragment de voûte crânienne humaine au  $\mu$ CT dans le cadre d'un jeu de données reconstruites en 3D, visualisation avec le logiciel dataviewer®

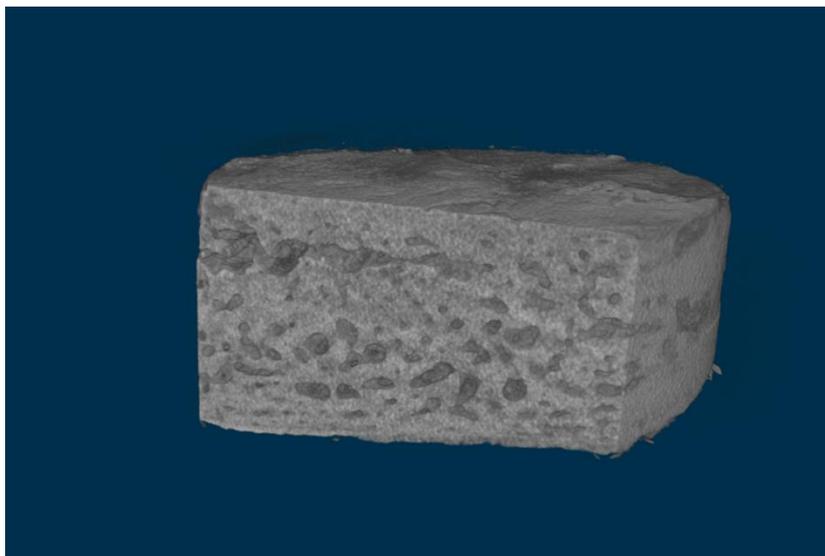


Figure I – 12. Visualisation en 3D d'un fragment de voûte crânienne humaine au  $\mu$ CT dans le cadre d'un jeu de données reconstruites en 3D, visualisation avec le logiciel CTvox® avec réduction du champ pour visualiser la partie interne du fragment osseux.

Il est également nécessaire de réaliser un travail intermédiaire de superposition des images comme il sera vu dans le chapitre II lors d'un travail au cours du temps en comparant chaque échantillon à lui-même.

Après ces étapes, il faut réaliser l'analyse des jeux de données. Pour notre  $\mu$ CT, la suite de logiciels utilisée comprend le logiciel CTan® (figure I – 13) qui est le logiciel d'analyse de la microarchitecture osseuse après reconstruction. Cette interface logicielle permet les calculs de paramètres de volume, de surface, d'indices trabéculaire et de microarchitecture dans un volume d'intérêt.

Les paramètres analysés dans ce travail sont les suivants (en accord avec les recommandations de la littérature [Bouxsein et al 2010](#)) :

- le volume total (total volume = TV) en  $\text{mm}^3$  est la totalité du volume d'analyse ;
- le volume osseux (bone volume = BV) en  $\text{mm}^3$  est le volume d'os identifié et comptabilisé dans le volume d'intérêt ;
- la surface osseuse (bone surface = BS) en  $\text{mm}^2$  est la surface de l'os comptabilisé dans le volume d'intérêt ;
- le rapport du volume osseux et du volume total (BV / TV), le rapport de la surface osseuse et le volume total (BS / TV) ;
- le rapport entre la surface osseuse et le volume osseux (BS / BV) est en  $\text{mm}^{-1}$  et reflète la relation entre ces deux variables ;
- le nombre de trabécules (TbN) en  $\text{mm}^{-1}$  est le nombre moyen de trabécules par millimètre dans le volume d'intérêt ;
- l'épaisseur trabéculaire moyenne (TbTh) en mm est l'épaisseur moyenne des trabécules dans le volume d'intérêt ;
- la séparation moyenne trabéculaire (TbSp) en mm est la distance moyenne entre les trabécules dans le volume d'intérêt,
- les indices architecturaux sont le facteur de structure trabéculaire (TbPpf), l'indice de modélisation de structure (SMI) et la densité de connectivité (ConnD). Le TbPF est un indice de connectivité inverse. Un Tb.Pf inférieur signifie des réseaux trabéculaires mieux connectés tandis qu'un Tb.Pf plus élevé signifie une structure trabéculaire plus déconnectée. Une prédominance de cavités fermées et de surfaces concaves peut pousser le Tb.Pf à des valeurs négatives - comme avec l'indice du modèle de structure (SMI). Le SMI est indicateur structurel du trabécule (comme TbPF), lorsqu'il tend vers 0 la structure est plutôt sous la forme « d'assiette » et lorsqu'il tend vers 3, la structure

trabéculaire est plutôt sous la forme de « pilier » (Bouxsein et al 2010). Les valeurs absolues de ces deux paramètres n'ont pas beaucoup de sens pris isolément et sont exprimées en  $\text{mm}^{-1}$ . La ConnD est une mesure du degré de connexion du trabécule normalisée par le volume étudié, exprimée en  $\text{mm}^{-3}$ . Il s'agit d'une variable équivalente du TbPF et du SMI.

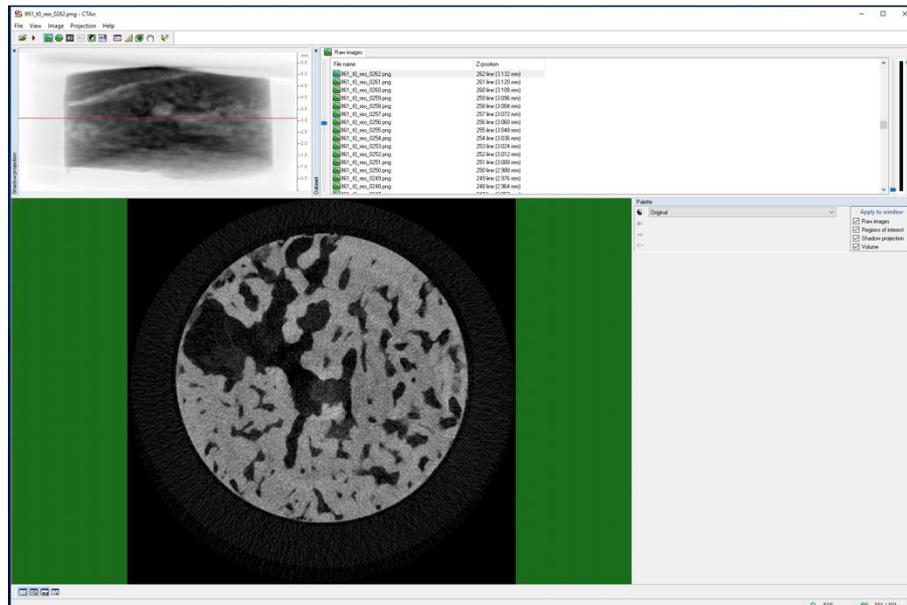


Figure I– 13. Capture d'écran du logiciel CTan® avec un fragment de voûte crânienne humaine *post mortem* en coupe horizontale lors de la première étape pour une analyse de la microarchitecture osseuse.

Pour aider à la normalisation de l'utilisation du  $\mu\text{CT}$ , et assurer une lisibilité des résultats en fonction des modèles de  $\mu\text{CT}$  et des usages, il existe des recommandations pour les utilisateurs de  $\mu\text{CT}$  (Bouxsein et al 2010). Actuellement, le  $\mu\text{CT}$  est utilisé dans des travaux sur l'architecture et la composition osseuse dans des approches nutritionnelles, rhumatologiques (ostéoporose par exemple) ou traumatiques (Chappard et al 2008). Le  $\mu\text{CT}$  est également utilisé, bien que plus faiblement, dans des travaux médico-légaux tels que pour le travail sur des fractures en balistique (Delannoy et al 2016 ; Cecchetto et al 2012).

## – Objectifs

L'objectif de ce travail est de proposer une méthodologie au  $\mu$ CT sur des os humains *post mortem* et de déterminer s'il existe des modifications architecturales osseuses *post mortem* en fonction du temps de conservation.

L'objectif premier est de développer une méthodologie de travail et les bases d'une analyse de l'os *post mortem* au  $\mu$ CT. Nous avons réalisé un travail en conditions standardisées et avec un seul milieu de conservation. Ces données permettent de collecter des données comparatives utilisables pour les travaux qui suivront celui de la thèse. Cette thèse s'est attachée uniquement à l'étude de l'os trabéculaire. Cela a été imposé par l'absence de consensus actuel sur la délimitation entre os trabéculaire et os cortical.

En cas de confirmation des modifications osseuses *post mortem* attendues au  $\mu$ CT, ce travail a pour objectif de les caractériser. Notre hypothèse est que ces modifications surviennent, en lien avec des modifications précoces de l'os (déshydratation, altération collagénique ...) sous la forme d'une modification architecturale trabéculaire associée à une diminution de la fraction osseuse analysée par le  $\mu$ CT. A long terme, le but de ces travaux est de développer un outil pour l'estimation du DPM osseux.

## CHAPITRE II - ÉTUDE DE LA PRECISION DES MESURES AU $\mu$ CT EN TAPHONOMIE OSSEUSE

### – Contexte

La micro-tomodensitométrie (microCT ou  $\mu$ CT) est un outil d'imagerie développé vers 1980 (Feldkamp et al 1989) qui fournit des images micrométriques en 3 dimensions sur des objets de petite taille. Le principe de son utilisation a fait l'objet de publication par Rutty et al (Rutty et al 2013) et Buxsein (Buxsein et al 2010). Le fonctionnement du  $\mu$ CT a fait l'objet d'un développement dans le chapitre 1. Son utilisation a été rapportée pour l'étude de l'architecture osseuse et les modifications osseuses dans le domaine médical. Par exemple, le  $\mu$ CT a été utilisé pour l'étude de l'ostéoporose ou en médecine légale pour l'étude des fractures (Rutty et al 2013). Son utilisation est également rapportée pour l'analyse de lésions osseuses de balistique intracrânienne (Delannoy et al 2016). Il s'agit d'une technique d'imagerie qui a un rendu équivalent à l'histo-morphométrie dans l'étude des volumes et des surfaces osseuses, à la fois sur des os animaux et humains (Chappard et al 2005 ; Kuhn et al 1990 ; Müller et al 1998 ; Thomsen et al 2005 ; Rühli et al 2007). Le  $\mu$ CT permet de réaliser une analyse architecturale de l'os. Il s'agit d'une méthode rapide avec un volume d'étude important. Le  $\mu$ CT permet d'étudier une pièce sans la détruire (Buxsein et al 2010 ; Chappard et al 2005 ; Kuhn et al 1990 ; Müller et al 1998 ; Thomsen et al 2005). La précision du  $\mu$ CT et la reproductibilité des mesures sont considérées comme satisfaisante (Buxsein et al 2010 ; Chappard et al 2005 ; Kuhn et al 1990 ; Müller et al 1998 ; Thomsen et al 2005). Pour autant, aucune étude n'a clairement exprimé la précision des mesures au  $\mu$ CT lors de mesures répétées en comparant un objet à lui-même au cours du temps. D'autres études ont travaillé sur la précision de mesure in vivo ou sur des individus pris au hasard et donc sans les comparer entre eux (Lu et al 2015 Lan et al 2013). Notre expérience avec le  $\mu$ CT a rapidement montré qu'il pouvait exister des variations dans les mesures répétées d'un même objet au cours du temps. Il nous est apparu que ces variations pouvaient être mises en lien avec un biais de positionnement des échantillons dans le  $\mu$ CT. À moins de laisser un échantillon dans le  $\mu$ CT pour l'ensemble d'une étude au cours du temps, il est nécessaire de manipuler les objets pour les conditionner et les placer dans la chambre d'acquisition du  $\mu$ CT. Cette manipulation et les étapes de traitement des images sont deux phases qui peuvent induire des variations. Pendant l'acquisition, les mouvements de l'objet sur lui-même entre chaque acquisition sont susceptibles d'engendrer des micromouvements. Ces micromouvements sont à même de faire varier les paramètres étudiés

au cours du temps. Par ailleurs, la notion de précision de chaque appareil n'est pas clairement exprimée par les constructeurs. Il est probable que comme pour tout objet de mesure, il existe une erreur de précision pour le  $\mu$ CT. Il est également probable que chaque type et/ou marque de  $\mu$ CT présente une erreur de précision différente. Pour éviter ces erreurs de mesures, certaines publications suggèrent l'utilisation de la superposition des images ou «*registration*» en anglais (Bouxsein et al 2010 ; Lu et al 2015 ; Lan et al 2013). Le principe de cette superposition a été présenté dans le chapitre I. Il s'agit en synthèse de replacer numériquement l'échantillon dans l'espace de façon identique à la première acquisition. Autrement dit et en l'absence de cette étape de superposition, plusieurs analyses au  $\mu$ CT d'un même objet sur la même zone peuvent donner des résultats différents. Cette différence serait uniquement liée à un biais de mesure (position dans le  $\mu$ CT, micromouvements, manipulation de l'objet). La superposition assure théoriquement l'absence ou tout du moins la réduction de ce biais de mesure (MacNeil & Boyd 2008, Nishiyama et al 2010). La registration assurerait donc reproductibilité des mesures au cours du temps (Bouxsein et al 2010 ; Lan et al 2013).

L'utilisation du  $\mu$ CT a déjà été décrite en médecine légale par exemple dans la description des stades de régénération osseuse dans le cas de fractures costales de l'enfant (Rutty et al 2013), dans l'étude de l'os coxal pour la détermination de l'âge en anthropologie médico-légale (Deguette et al 2018 ; Rutty et al 2013) ou pour l'examen microscopique de la dent pour la détermination de l'âge au décès en odontologie médico-légale (Vandervoote et al 2004, Aboshi et al 2005). En taphonomie, l'étude de pupes d'insectes nécrophages a été décrite au  $\mu$ CT (Richards et al 2012) tout comme l'étude de l'anatomie des insectes dans ce contexte (Friedrich et al 2008). La précision des mesures au  $\mu$ CT n'a pas été étudiée en médecine légale et peu en dehors de ce champ. Pour autant, les études citées précédemment suggèrent la possibilité de réaliser des mesures répétées et donc pose la même question de la précision des mesures au  $\mu$ CT.

L'objectif de ce travail est de déterminer l'impact de la registration sur les mesures au  $\mu$ CT en taphonomie osseuse. Il s'agit d'apporter des données sur les variations inter et intra opérateur lorsque cette registration est réalisée.

## – Matériels et méthode

### ○ Échantillons osseux

Pour ce travail, nous avons utilisé des os prélevés sur des corps dans le cadre de dons du corps à la science. Ces dons du corps avaient été réalisés au laboratoire d'anatomie UTML&A (EA 7367) Faculté de médecine de Lille - Université de Lille. Les corps n'avaient pas fait l'objet de traitement de conservation par un produit formolé et n'avait pas été congelé. Les corps étaient donc considérés comme frais.

Le corps a été sélectionné pour respecter un certain nombre de critères d'exclusion, à savoir :

- décès d'origine inconnue, décès de plus de 48 h,
- le sexe féminin,
- les antécédents de pathologie osseuse, nutritionnelle ou de cancer avec tropisme osseux.

Ces critères ont été établis pour travailler sur un os le moins altéré préalablement par des modifications telles que l'ostéopénie ou l'ostéoporose.

Deux types de prélèvements osseux ont été réalisés :

- des prélèvements sur une voûte crânienne ont été réalisés sur un individu de sexe masculin, décédé à l'âge de 82 ans, au décours d'une décompensation respiratoire d'une pathologie broncho-pulmonaire chronique non tumorale
- des prélèvements de phalanges ont été réalisés sur un homme décédé à 81 ans d'une cause cardiaque sans précision.

Concernant la voûte crânienne, elle a été prélevée sur le corps après une séparation mécanique des chairs puis découpée transversalement à l'aide d'une scie à ruban. A partir de cette voûte, un fragment osseux cylindrique de 9 mm de diamètre a été prélevé à l'aide d'un trépan en titane (marque Stoma®) et d'un outil à haute cinétique multi-usage (Dremel®) en région pariétale droite.

Les deuxième phalanges du 2<sup>ème</sup>, du 3<sup>ème</sup> et du 4<sup>ème</sup> doigt ont été prélevées sur les deux mains après une dissection soignée plan par plan et suite à une séparation mécanique des chairs résiduelles.

Ces échantillons ont ensuite été analysés avec un  $\mu$ CT.

- Acquisition au  $\mu$ CT

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un  $\mu$ CT Bruker ® HR 1172 hardware version 6, software version 1,5. Les paramètres d'acquisition au  $\mu$ CT pour les deux types d'ossements sont listés dans le tableau II – 1.

L'échantillon de voûte crânienne a été analysé deux fois successivement au  $\mu$ CT sans repositionnement de l'échantillon. Les paramètres d'acquisition pour ces deux temps étaient identiques.

Les 6 échantillons issus des deux mains ont été scanné 2 fois successivement dans le  $\mu$ CT sans repositionnement avec des paramètres identiques.

Tableau II – 1. Paramètres d'acquisition, de reconstruction et d'analyse 3D du MicroCT ( $\mu$ CT)

<b><math>\mu</math>CT Bruker ® Skyscan HR 1172</b>	<b>Parameters</b>	<b>Voûte</b>	<b>Phalanges</b>
Acquisition	Medium du scanner	air	
	Température dans le $\mu$ CT	27°C	
	Résolution Pixel	10 $\mu$ m	
	Tension	80 KV	
	Intensité	100 $\mu$ A	
	Filtre Aluminium	0.5 mm	
	Largeur du champ de camera	Large	
	Temps d'exposition	200 ms	1150 ms
	Pas de rotation	0.4°	0.7°
	Frame averaging	10	
Reconstruction	Ring artifact correction	7	
	Beam hardening correction	25%	
Analyse 3D	Volume d'intérêt (VOI)	trabéculaire	
	Forme du VOI	Cylindre	
	Disposition du VOI	Coupe de référence (plus bas ratio entre la quantité d'os et le volume total)	
	Taille du VOI	1,01 mm de hauteur x 6,5 mm de diamètre – 50 coupes au-dessus et également en dessous de la coupe de référence	

- Reconstruction et superposition des acquisitions au  $\mu$ CT

Après chaque acquisition, une reconstruction des images a été réalisée avec NRecon® (version 1.6.9.8) avec des paramètres de correction des artefacts identiques pour tous les échantillons (tableau II – 1).

Après la reconstruction, la première acquisition (série d’images de référence) a servi de modèles pour la seconde acquisition lors du travail de registration. Cette étape de registration (synthétisée dans le chapitre 1) a été réalisée avec le logiciel Dataviewer® (version 1.5.1.2). Ce travail a été réalisé en 2 étapes successives. La première étape était réalisée manuellement avec le passage de deux séries d’images dans des conformations différentes (figure II – 1). Cette étape manuelle permet de rapprocher les deux séries d’images dans l’espace (figure II – 2) pour permettre à l’étape automatique de se réaliser. La seconde étape était numérique automatique avec un pseudo alignement en 3D des images entres elles (figure II – 3).

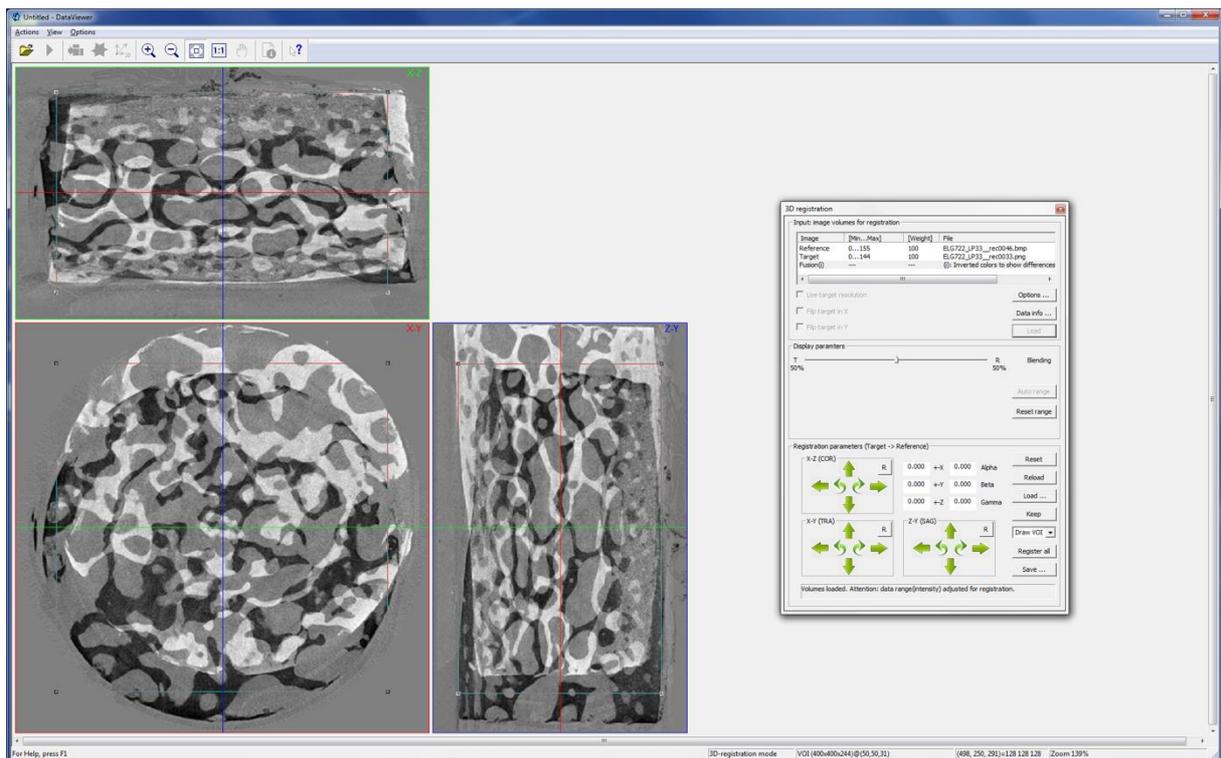


Figure II – 1. La différence de conformation des deux séries d’images après acquisitions au  $\mu$ CT d’un fragment de voûte du crâne dans les 3 plans de l’espace avec en l’image de référence (en noir – correspondant à la première acquisition) et l’image cible (en blanc – correspond à la deuxième acquisition).

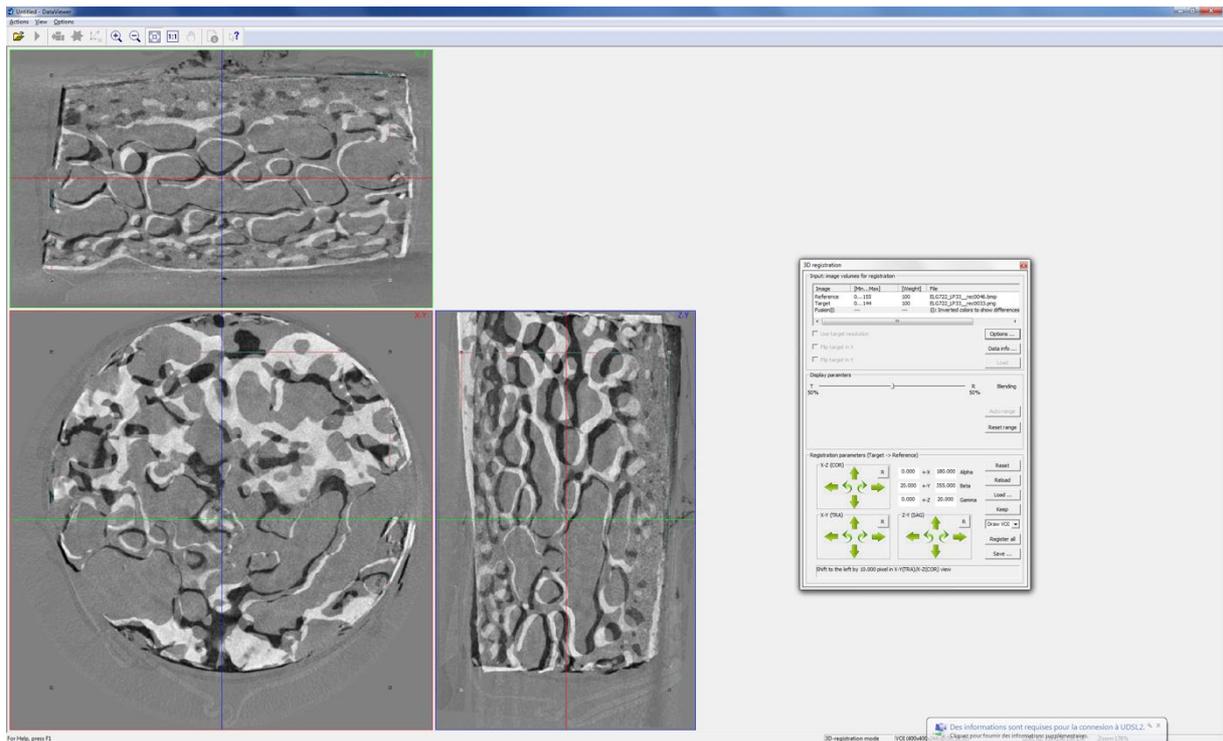


Figure II – 2. La différence de conformation du même échantillon lors des 2 acquisitions et après la première étape manuelle de « registration ». Les séries d’images sont quasiment dans la même conformation spatiale.

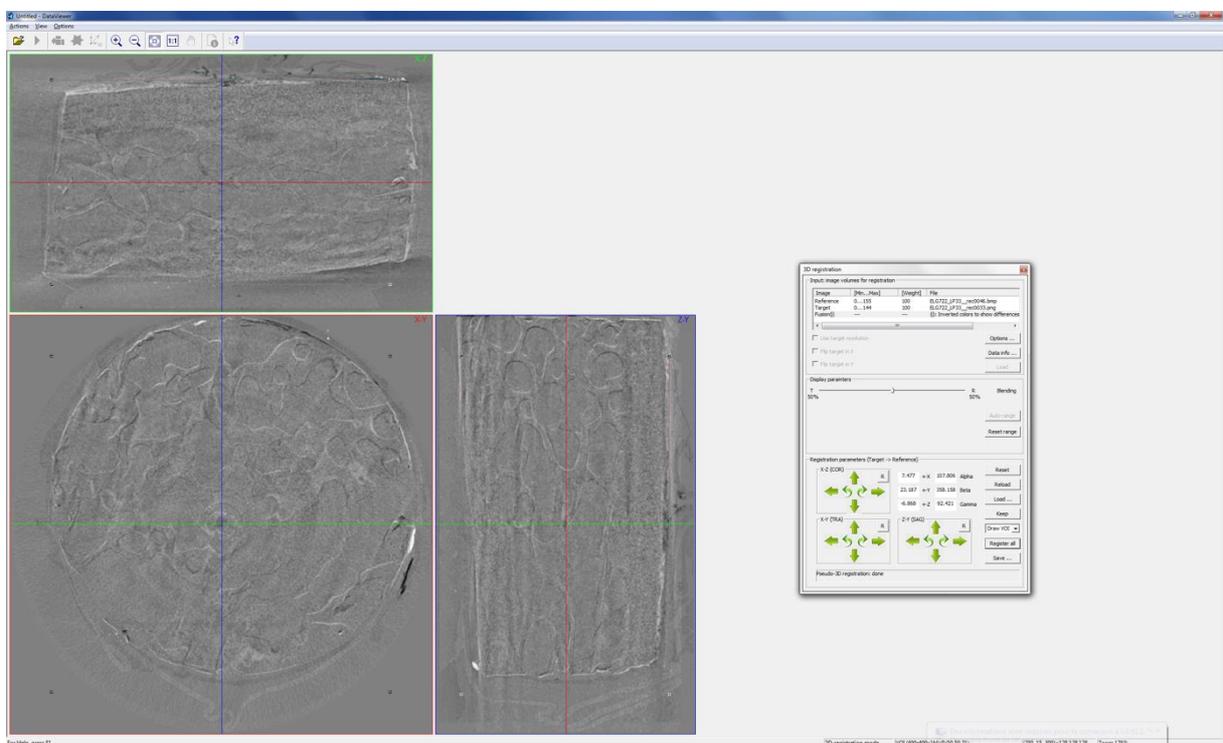


Figure II – 3. Les deux séries d’images ont été superposées et n’apparaissent quasiment plus après l’étape de registration automatisée (Dataviewer® software v. 1.5.1.2).

Pour l'échantillon de voûte du crâne, nous avons exploré la précision du processus de registration lui-même. Pour cela, la série d'images issue de la deuxième acquisition a été copier/coller 90 fois. Sur ces 90 séries :

- 30 séries ont été attribuées à un observateur 1 (étudiant en master I) ;
- 30 séries ont été attribuées à un observateur 2 (technicien du laboratoire). Ces deux opérateurs avaient tous les 2 été formés préalablement à la registration avec la méthode en 2 étapes décrite précédemment (manuelle puis automatique). La superposition a été réalisée sur les 30 séries d'images par chacun des opérateurs ;
- l'opérateur 1 a effectué une nouvelle série de superposition des 30 séries d'images restantes après un délai d'une semaine. Cette dernière série d'analyse a été appelée « opérateur 1 bis ».

Pour les phalanges, nous avons exploré la précision des mesures avec et sans superposition des images. Pour cela, nous avons effectué une copie de la série d'images lors de la 2<sup>ème</sup> acquisition au  $\mu$ CT ayant donc 2 jeux d'images correspondant à la deuxième acquisition au  $\mu$ CT. L'une de ces 2 séries d'images a été analysée sans superposition et l'autre avec superposition. Le travail de superposition a été réalisé comme pour les fragments de voûte du crâne.

#### ○ Analyse 3D des échantillons

Après les étapes de reconstruction des images en 3D avec le logiciel NRecon® (cf chapitre 1), nous avons réalisé une analyse des données à l'aide du logiciel CTan® (version 1.14.4.1). Ce logiciel a permis de sélectionner un volume d'étude (VOI). Pour sélectionner un volume d'intérêt reproductible, nous avons sélectionné ce volume à partir d'une coupe de référence dans l'os trabéculaire. Cette coupe de référence était choisie comme étant celle ayant le rapport aire osseuse sur aire totale le plus faible. Nous avons en effet constaté que cette coupe de référence en trabéculaire reste stable pour un même échantillon au cours du temps. Le volume d'intérêt appliqué a été identique pour toutes les séries d'images pour le fragment de voûte d'une part et pour les phalanges d'autre part. À partir de cette coupe de référence, 50 coupes au-dessus et 50 coupes en dessous ont été incluses dans le volume d'intérêt pour un total de 101 coupes d'os trabéculaire.

Après sélection du VOI, les images sont échelonnées en niveau de gris pour déterminer ce qui est de l'os et le reste. Une analyse en 3D est ensuite réalisée. Dans ce travail, nous avons analysé le volume osseux (BV), la surface osseuse (BS), le nombre de trabécules (Tb.N), l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) et la distance trabéculaire moyenne (Tb.Sp).

- Tests statistiques

Les données ont été saisies dans Excel® (2013, version 15.0.4420.1017) et les analyses statistiques avec XIStat® (version 2014.5.03).

Pour le fragment de voûte du crâne, une analyse descriptive a été réalisée pour chacune des variables pour les opérateurs 1, 2 et 1bis. Pour chacune de ces variables, nous avons décrit la moyenne (M) et l'écart type (SD), le coefficient de variation (%CV) défini par le calcul :  $\%CV = 100 \times (SD/M)$ . Nous avons également calculé l'erreur de précision sur l'écart type (PE<sub>SD</sub>) et sur le coefficient de variation (PE<sub>%CV</sub>) entre les observations de l'opérateur 1 et 1 bis et de l'opérateur 2. Ces derniers calculs ayant permis de vérifier la variabilité inter opérateur et intra observateur.

Pour la variabilité inter – opérateurs nous avons utilisé la formule suivante :

- $PE_{SD} = \sqrt{((SD \text{ op1}^2 + SD \text{ op2}^2)/2)}$
- $PE_{\%CV} = \sqrt{((\%CV \text{ op1}^2 + \%CV \text{ op2}^2)/2)}$

Pour la variabilité intra– opérateurs nous avons utilisé la formule suivante :

- $PE_{SD} = \sqrt{((SD \text{ op1}^2 + SD \text{ op1bis}^2)/2)}$
- $PE_{\%CV} = \sqrt{((\%CV \text{ op1}^2 + \%CV \text{ op1bis}^2)/2)}$

Pour les phalanges, nous avons détaillé la moyenne et l'écart type avant puis après registration. Nous avons ensuite réalisé une mesure la variance avec une Anova à mesures répétées pour déterminer si une différence significative était présente entre l'analyse avant et l'analyse après registration.

## – Résultats et discussion

Pour l'échantillon de voûte, nous mettons en évidence des valeurs très proches pour toutes les variables après les manœuvres de registration effectuées par les opérateurs 1, 2 et 1bis (tableau II – 2) pour la moyenne (et écart type) et le coefficient de variation. Le coefficient de variation est également très proche pour les analyses réalisées par les deux opérateurs. Nous observons une proximité plus grande pour les deux analyses effectuées par l'opérateur 1 (noté opérateur 1 et 1 bis). Nous mettons surtout en évidence la faible variation après les opérations de superposition des images. Pour le volume et la surface osseuse, la différence au niveau de la moyenne est d'environ 0,01 (respectivement en  $\text{mm}^3$  pour le volume et en  $\text{mm}^2$  pour la surface). Pour les variables d'étude de l'os trabéculaire (TbN, TbSp et TbTh), les moyennes sont identiques.

Le tableau II – 3 résume les résultats de l'erreur de précision sur les valeurs absolues et sur le coefficient de variation. Il est mis en évidence une erreur de précision plus importante en inter – opérateur pour toutes les variables qu'en intra – opérateur. Il est également observé une erreur plus importante en inter – sujet qu'en intra – sujet.

Tableau II – 2. La moyenne (ou M) (+/- écart type ou SD) et le coefficient de variations (%CV) par variable analysées pour chaque opérateur (1, 2 et 1bis).

		Opérateur 1	Opérateur 1 bis	Opérateur 2
Volume osseux (BV en mm <sup>3</sup> )	M (+/- SD)	9,9765 (+/- 0,0002)	9,9763 (+/- 0,0015)	9,9756 (+/- 0,0023)
	% CV	0,0017	0,0148	0,0232
Surface osseuse (BS en mm <sup>2</sup> )	M (+/- SD)	186,1026 (+/- 0,0070)	186,0939 (+/- 0,0158)	186,0955 (+/- 0,0290)
	% CV	0,0037	0,0085	0,0156
Nombre trabéculaire (TbN en mm <sup>-1</sup> )	M (+/- SD)	1,7292 (+/- 6,4451E-05)	1,7292 (+/- 2,8541E-04)	1,7292 (+/- 4,4126E-04)
	% CV	0,0037	0,0165	0,0255
Séparation trabéculaire (TbSp en mm)	M (+/- SD)	0,5265 (+/- 4,762E-05)	0,5265 (+/- 1,2565E-05)	0,5265 (+/- 9,2691E-05)
	% CV	0,009	0,0024	0,0176
Épaisseur trabéculaire (TbTh en mm)	M (+/- SD)	0,1708 (+/- 7,5719E-06)	0,1708 (+/- 3,5901E-06)	0,1708 (+/- 4,2948E-05)
	% CV	0,0044	0,0021	0,0251

Tableau II – 3. Erreur de précision en valeur absolue et sur le coefficient de variation en intra et en inter opérateur pour les analyses effectuées sur le fragment de voûte crânienne.

		Intra-opérateur	Inter-opérateur
Volume osseux (BV en mm <sup>3</sup> )	PEsd	0,0287	0,0353
	PE%CV	0,0909	0,1117
Surface osseuse (BS en mm <sup>2</sup> )	PEsd	0,1067	0,1342
	PE%CV	0,0782	0,0984
Nombre de trabécule (TbN en mm <sup>-1</sup> )	PEsd	0,0132	0,0159
	PE%CV	0,1006	0,1209
Séparation trabéculaire (TbSp en mm)	PEsd	0,0055	0,0084
	PE%CV	0,0756	0,1154
Épaisseur trabéculaire (TbTh en mm)	PEsd	0,0024	0,0050
	PE%CV	0,0572	0,1216

PEsd: Erreur de précision – valeur absolue, PE%CV: Erreur de précision – Coefficient de Variation

Pour les phalanges analysées au  $\mu$ CT, les résultats sont synthétisés dans le tableau II – 4. Nous mettons en évidence des résultats assez proches entre la première et la seconde acquisition au  $\mu$ CT pour le volume et la surface osseuse (BV et BS) et pour la séparation et le nombre de trabécule (TbSp et TbN). Une visualisation des données (figure II – 4) montre la répartition des analyses sous forme de « box – plots ». Nous observons cependant une différence significative entre ces deux acquisitions sans étape de registration, avec une différence de la moyenne du volume osseux (BV) d'environ  $10 \text{ mm}^3$  soit 30 % de différence. Pour la surface osseuse (BS), cette différence est de  $100 \text{ mm}^2$  soit 25 %. Pour la séparation trabéculaire, cette différence avoisine les 50 % entre les deux acquisitions sans registration.

L'analyse statistique par Anova met en évidence une différence significative entre les images originales et la seconde acquisition au  $\mu$ CT lorsqu'il n'y a pas eu de registration. Cette différence apparaît pour les variables suivantes :

- volume osseux (BV) avec  $p = 0,006$  ;
- surface osseuse (BS) avec  $p = 0,007$  ;
- nombre de trabécule (TbN) avec  $p = 0,019$  ;
- séparation trabéculaire (TbSp) avec  $p = 0,002$ .

Il n'y a pas de différence significative pour les variables entre la série d'images issues de la première acquisition et celles issues de la deuxième acquisition avec registration sauf pour l'épaisseur trabéculaire (TbTh) avec un  $p = 0,008$ .

Tableau II – 4. La moyenne (M) des variables et l'écart type (+/- SD) pour les séries d'images avec et sans registration pour les phalanges

M (+/- SD)	Images de référence (premier scan)	Série d'images sans registration (deuxième scan – pas de registration)	Série d'images avec registration (deuxième scan – registration réalisée)
Volume osseux (BV en $\text{mm}^3$ )	28,72 (+/- 3,62)	19,81 (+/- 8,2)	29,06 (+/- 3,31)
Surface osseuse (BS en $\text{mm}^2$ )	478,78 (+/- 63,36)	314,79 (+/- 142,19)	424,64 (+/- 26,35)
Séparation trabéculaire (TbSp en mm)	0,71 (+/- 0,09)	1,54 (+/- 0,68)	0,76 (+/- 0,09)
Epaisseur trabéculaire (TbTh en mm)	0,18 (+/- 0,03)	0,19 (+/- 0,03)	0,21 (+/- 0,03)
Nombre de trabécule (TbN en $\text{mm}^{-1}$ )	1,61 (+/- 0,27)	1,08 (+/- 0,53)	1,38 (+/- 0,12)

Nous montrons que les images avec registration sont améliorées en matière de reproductibilité. Nous observons néanmoins qu'il persiste des différences statistiques uniquement liées à une erreur de précision. L'absence d'étape de registration montre une variation importante des variables analysées. Ces constatations montrent la nécessité d'une telle étape dans des études avec des mesures répétées.

Notre travail montre également qu'au-delà de la variation existante avec et sans registration, il est important de renseigner l'erreur liée à la machine. Cette erreur n'étant pas ou peu précisée par le constructeur, il semble impératif de commencer par étudier la précision de la machine utilisée en fonction du type d'étude. Ce type de travail n'a pas été réalisé en médecine légale au  $\mu$ CT dans une approche taphonomique. La littérature scientifique a mis en évidence l'intérêt de la registration, mais sans en préciser l'effet. Par exemple, Lan et al ([Lan et al 2013](#)) ont montré des variations du rapport volume osseux sur volume total (BV/TV), de l'épaisseur (TbTh) et de l'espacement (TbSp) trabéculaire en fonction de la réalisation d'une registration ou non. Cette étude de Lan et al ([Lan et al 2013](#)) n'a cependant pas été réalisée dans un contexte taphonomique. Nishiyama et al ([Nishiyama et al 2010](#)) ont montré une bonne amélioration des paramètres micrométriques au cours du temps pour l'os cortical au  $\mu$ CT chez des rats vivants. Ils ont également signalé que les paramètres micrométriques étaient grandement améliorés par la registration. Les paramètres non métriques tels que l'indice de modélisation de structure (SMI) ou la connectivité sont par contre moins améliorés par la registration. Sur le cadavre humain, MacNeil & Boyd ([MacNeil & Boyd 2008](#)) ont montré une bonne reproductibilité des mesures sur la corticale osseuse à l'aide de la registration. Ainsi, ils ont montré des mesures proches sur un radius scanné 10 fois avec repositionnement par rapport au même ossement scanné 10 fois sans la superposition. Bien que cette étude ait été réalisée à l'aide de tomographie quantitative à haute résolution (HR-pQCT) au lieu d'un  $\mu$ CT, elle n'a pas montré d'erreur de précision pour les mesures du BV / TV avec repositionnement et un intervalle compris entre 0,17 et 0,26% pour TbN, TbTh et TbSp sans repositionnement.

La mise en évidence de différence significative malgré la registration est un point intéressant à discuter. La survenue de modifications entre les deux acquisitions est une possibilité. Cela étant, le temps entre les 2 acquisitions a été très court (quelques minutes) et les autres études réalisées par notre laboratoire ne suggèrent pas de variations micro-architecturales dans un tel laps de temps. L'hypothèse d'une variation des variables liée au processus de registration en lui-même est plus plausible. Dans cette hypothèse, la partie manuelle et l'automatisation peuvent jouer

un rôle dans la survenue de micro-différences. L'hypothèse d'une différence liée à la technique d'acquisition peut être écartée car le  $\mu$ CT et ses paramètres d'études étaient identiques.

Ce travail présente des biais qu'il convient de détailler :

- l'utilisation d'un faible nombre d'acquisition avec un nombre d'os limité issus d'un petit effectif de donneurs sont autant d'éléments ne nous permettant pas d'extrapoler nos résultats à une « population générale ». Cette limitation est en partie expliquée par la difficulté à collecter des pièces osseuses fraîches. Il s'agit aussi d'une limite en matière d'interprétation de la statistique analytique réalisée ;
- nous n'avons utilisé qu'un seul  $\mu$ CT et une seule suite logicielle en lien avec cette machine. Là encore, nos résultats ne peuvent donc pas être appliqués à tous les appareils de micro-imagerie ;
- cette étude ne s'est intéressée qu'à l'os trabéculaire, notamment, car sa délimitation est facilitée par rapport à l'os cortical. Là encore, il s'agit d'une limite d'interprétation et d'extrapolation de nos résultats.

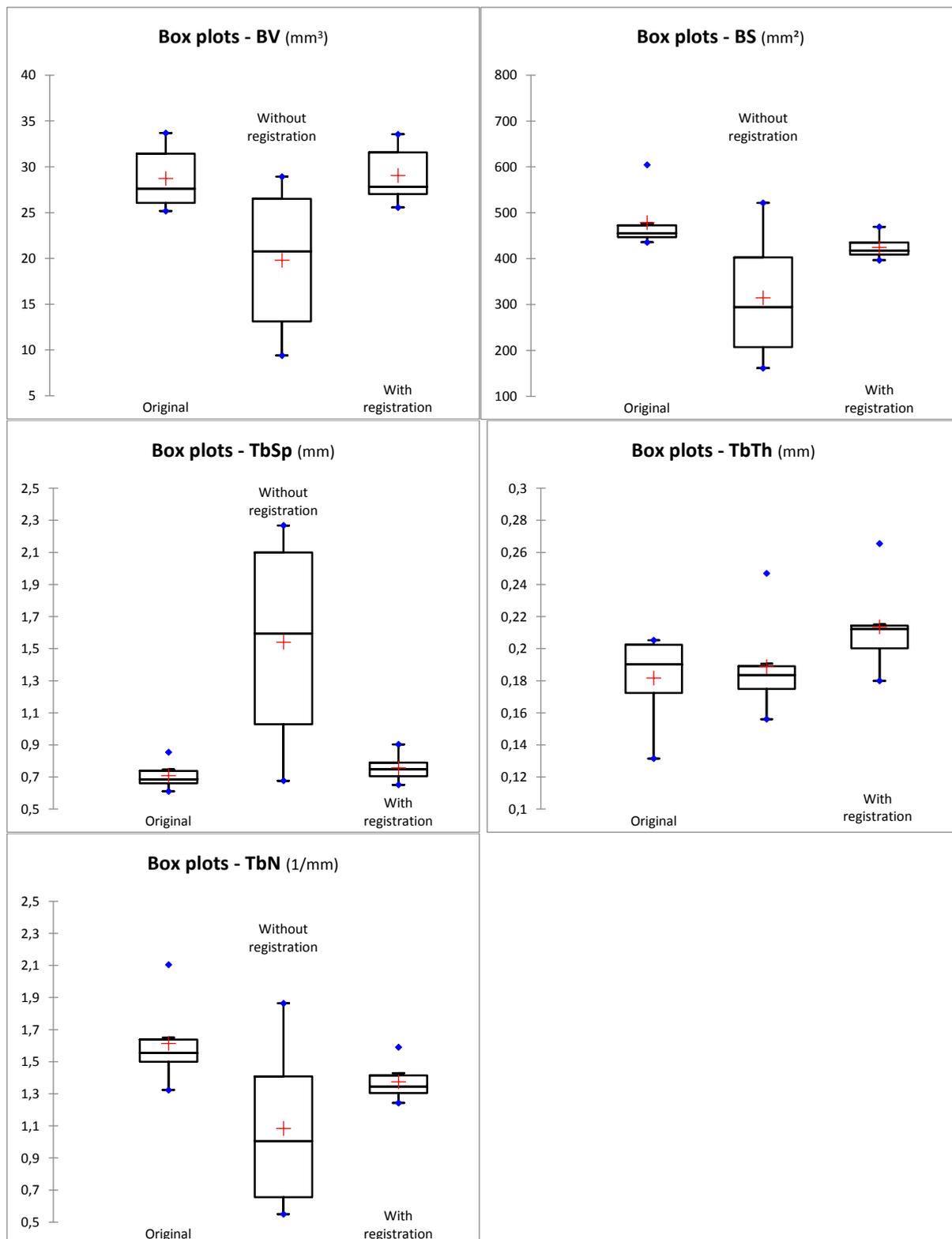


Figure II – 4. Visualisation sous la forme de “box-plots” des moyennes pour chacune des variables analysées au  $\mu$ CT en considérant les images de la 1<sup>ère</sup> acquisition (« original »), celles de la 2<sup>ème</sup> acquisition sans registration (« without registration ») et celles de la 2<sup>ème</sup> acquisition après registration (« with registration »).

Malgré ces limites, ce travail original permet de voir qu'avec peu d'échantillons et de manipulations, l'analyse au  $\mu$ CT n'est pas exempte d'erreurs de précision. Ce travail met également en évidence l'apport significatif de la registration dans les mesures répétées au  $\mu$ CT. Cet outil de superposition a été présenté ici dans des mesures répétées mais peut également servir pour comparer des pièces osseuses entre elles et issues de corps différents. Elle a probablement sa place dans des analyses  $\mu$ CT en anthropologie médico-légale ou pour l'étude osseuse en balistique lésionnelle pour superposer les lésions et permettre une comparaison la plus « exacte » possible en matière de conformation spatiale.

Au total, il est important de connaître l'erreur de précision de l'appareil utilisé, ce d'autant que des mesures répétées vont être réalisées. L'erreur de précision n'étant pas (ou peu) précisée par les constructeurs et les études préexistantes n'étant pas transposables, nous recommandons que l'usage du  $\mu$ CT en taphonomie fasse l'objet d'un travail sur l'erreur de mesure préalablement à toute autre étude.

#### – **Conclusion**

Le  $\mu$ CT a été rapporté comme un outil précis de micro-imagerie avec une bonne reproductibilité, en particulier pour les études osseuses. Nous avons réalisé une étude sur la registration en taphonomie osseuse sur un fragment de voûte crânienne et des phalanges humaines *post mortem*. La registration ou superposition des images est une technique qui améliore la précision des mesures avec le  $\mu$ CT.

Nous mettons en évidence l'intérêt de la registration en termes de réduction de l'erreur de mesure et de reproductibilité des images analysées au  $\mu$ CT au cours du temps. Nous recommandons surtout la réalisation d'une étude sur la précision de chaque appareil préalablement à une étude taphonomique au cours du temps. L'erreur de précision est à connaître par rapport à l'effet étudié.

### CHAPITRE III - INFLUENCE DE LA CONSERVATION FORMOLEE OU EN CONGELATION SUR LA MICROARCHITECTURE TRABECULAIRE AU $\mu$ CT

#### – La recherche scientifique sur le corps humain en France

Le travail en taphonomie osseuse s'attache à caractériser les modifications de l'os en lien avec son environnement. Ce travail nécessite de se procurer des échantillons osseux *post mortem*. Le travail scientifique sur des produits issus du corps humain est particulier dans le domaine de la recherche scientifique et tout particulièrement en France. Travailler sur des échantillons osseux nécessite de comprendre et de connaître le contexte juridique et éthique d'un tel axe de recherche. Il est également important de connaître les différentes possibilités de prélèvement.

##### ○ Le corps humain, objet juridique et problématiques éthiques

Le statut du corps humain est défini juridiquement par les lois de bioéthiques<sup>3,4,5,6,7</sup>. Le respect du corps humain est du genre humain est également défini dans le Code civil<sup>8</sup>.

Pour travailler sur des ossements humains *post mortem*, il faut envisager et discuter plusieurs possibilités de provenance des prélèvements. Il existe plusieurs origines à savoir : le don du corps dans le cadre d'un prélèvement multi-organes (PMO) à des fins thérapeutiques ou scientifiques, le don du corps à la science, les prélèvements dans le cadre d'une autopsie médico-légale et d'autres types de ressources.

Le travail de recherche sur des échantillons issus de corps humains soulève également des problèmes de déontologie et d'éthique. Ce type de travail impose que les projets de recherche utilisant le corps humain ou ses éléments et produits soient socialement acceptables (Urzel 2014). Le caractère mutilant des prélèvements osseux en taphonomie doit être pris en compte. Cela impose un principe d'économie des corps par mutualisation pour limiter le démembrement et/ou les mutilations. De plus, ce caractère mutilant nécessite d'envisager toutes les options

---

<sup>3</sup> Loi n°94-653 du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain

<sup>4</sup> Loi n°94-654 du 29 juillet 1994 relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humain, à l'assistance médicale à la procréation et au diagnostic prénatal

<sup>5</sup> Loi n° 94-548 du 1er juillet 1994 relative au traitement des données nominatives ayant pour fin la recherche dans le domaine de la santé et modifiant la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés

<sup>6</sup> Loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique

<sup>7</sup> Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique

<sup>8</sup> C. civ., art 16

disponibles quant à l'origine des échantillons pour cadrer avec une limitation maximale des prélèvements. Autrement dit, il n'est pas envisageable de prélever des ossements sur un corps X alors qu'un corps Y est disponible dans les mêmes conditions et fait déjà l'objet d'un prélèvement pour une autre étude. Ces principes déontologiques et éthiques doivent guider la méthodologie de recherche. Ils sont particulièrement impactants en taphonomie osseuse.

- Prélèvement multi-organes (PMO) sur donneur décédé

Il est possible de donner un organe ou des tissus de son vivant ou après sa mort dans le cadre des soins et pour sauver des vies depuis la loi du 22 décembre 1976<sup>9</sup>. Ce texte a fait depuis l'objet de plusieurs actualisations et modifications par les lois de bioéthique<sup>1,2,3,4,5</sup>. Dans ce cadre, chacun est présumé donneur sauf en cas de refus exprimé de son vivant. Ce principe a été réaffirmé à plusieurs reprises par le législateur. Il a été rappelé à nouveau par la loi de modernisation du système de santé du 26 janvier 2016. Cette loi éclaircit le rôle des proches. Elle précise comment refuser de donner ses organes. Elle prévoit notamment l'accès en ligne au registre national des refus géré par l'Agence de la biomédecine. Dans le cadre de cette loi, des prélèvements à visée de recherche scientifique peuvent être réalisés sous réserve d'une déclaration au ministère de la recherche et à l'agence de biomédecine<sup>10,11</sup>. Dans ce cadre et en dehors d'une personne mineure ou majeure sous tutelle, les proches sont informés selon une information standardisée. Le consentement présumé reste la règle (Rougé-Maillart et al 2016). Le prélèvement d'échantillons osseux pour des études taphonomiques dans ce cadre serait envisageable. Il permettrait de collecter des pièces osseuses multiples avec une parfaite connaissance des antécédents médicaux. Les sujets prélevés pourraient être des sujets jeunes contrairement aux cas de dons du corps à la science où l'âge des donateurs est généralement élevé. Ce type de don permet également de travailler sur des os pathologiques ou traumatisés. Il permet d'utiliser des os dans le cadre de décès lié à un traumatisme crânien et faisant l'objet d'un PMO par exemple. Le caractère mutilant des prélèvements en taphonomie osseuse est un facteur limitant pour ces dons. Peu de prélèvement osseux sont effectués dans les PMO, ce qui majore le potentiel mutilant d'un prélèvement à visée taphonomique. Le prélèvement d'échantillons d'os lors d'un PMO est également limité en taphonomie, car il existe d'autres

---

<sup>9</sup> Loi n°76-1181 du 22 décembre 1976 relative aux prélèvements d'organes, dites « loi Cavaillet »

<sup>10</sup> Décret n°2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires)

<sup>11</sup> Arrêté du 16 août 2007 fixant le modèle de dossier accompagnant les déclarations et les demandes d'autorisation de conservation et de préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain

possibilités de prélèvement (don du corps à la science, prélèvement osseux dans le cadre médico-légal). L'existence de ces problématiques permet de comprendre le peu d'étude médico-légale utilisant ce type de don. Pour autant, la connaissance du cadre réglementaire et le travail en pluridisciplinarité avec les équipes de PMO seraient probablement les clefs d'un accès facilité à ces pièces osseuses.

- Le don du corps à la science

Le don du corps à la science revient quant à lui à léguer son corps dans son intégralité à un établissement d'enseignement, à savoir la faculté de médecine. Cela permet aux étudiants d'apprendre l'anatomie et permet d'effectuer une activité de recherche. Pour faire don de son corps à la science, il convient de contacter la faculté de médecine la plus proche comportant un laboratoire d'anatomie. Dans ce cadre, c'est la personne qui doit faire les démarches (notamment la rédaction d'un écrit et le rapprochement avec une faculté de médecine) de son vivant pour préparer le don<sup>12</sup>. Ce type de don permet de réaliser des travaux de recherche, mais là encore des limitations existent. Le nombre de don du corps est limité dans une année. Les corps sont utilisés pour des travaux d'anatomie et font donc régulièrement l'objet d'une préparation par un produit formolé ou sont conservés par la congélation. L'âge moyen des personnes faisant don de leur corps est élevé. Cet âge au décès élevé est en lien avec une cause du décès qui est souvent naturelle. Dans ce cadre, les donneurs sont généralement porteurs de multiples pathologies.

- La personne décédée dans le cadre médico-légal

Les prélèvements médico-légaux sont réalisés lors d'une autopsie judiciaire. Ils sont « encadrés » juridiquement par le Code de procédure pénale en plus des textes précédemment présentés. L'utilisation de pièces osseuses dans ce contexte pose plusieurs problèmes simultanés. En premier lieu, la réalisation de ces prélèvements nécessite l'accord du magistrat. De la même façon que pour un PMO « classique », la recherche de la non-opposition du défunt sur le registre des refus doit être réalisée. Cela n'est pas possible pour les cadavres non identifiés, cas fréquent en pratique médico-légale. Il faut également que les prélèvements soient réalisés en moins de 48 h pour respecter la légalisation sur le délai dans le cadre des dons

---

<sup>12</sup> Don du corps à la science [disponible sur [www.service-public.fr](http://www.service-public.fr)]

d'organes. Enfin si tous les critères vus précédemment sont remplis et de façon symétrique avec la réalisation d'un PMO, le témoignage du défunt devrait être recherché auprès des proches. Cette dernière notion implique un contact entre le légiste et la famille dans un contexte judiciaire. Cela est problématique car le légiste intervient souvent en cas de mort brutale et/ou inattendue. Cela soulève également la question d'un contact entre les proches et le médecin dans un contexte de secret des opérations judiciaires. Par ailleurs, la question de la propriété des prélèvements après la fin de l'action judiciaire est une difficulté (Rougé-Maillart et al 2016). Il s'agit là d'autant d'éléments qui sont des limitations à cette pratique. L'ensemble explique en partie l'absence de prélèvement de ce type dans le cadre de la recherche médico-légale en France.

De façon similaire aux prélèvements autopsiques, le travail taphonomique sur des scellés judiciaires se heurte à de nombreuses limitations. Il faut mentionner particulièrement le risque de destruction de preuve dans ce cadre. Il convient aussi d'avoir l'accord du magistrat pour réaliser un travail sur les scellés. La problématique de l'utilisation à des fins de recherche d'un élément du corps initialement prélevé dans un cadre judiciaire (avec les problèmes de consentement que cela soulève) est également limitante ... Une piste de travail pour la taphonomie osseuse pourrait être l'utilisation de prélèvements scellés après une demande de destruction par le magistrat. En effet, à l'issue d'une période de conservation très variable, les scellés sont soit détruits soit ré-intégrés au corps à la demande de l'autorité judiciaire. En pratique, il existe aussi de nombreuses limitations à cette idée puisque l'autorité judiciaire n'autorise pas de détournement de ce qui a été ordonné. Une réquisition judiciaire de destruction d'un scellé impose la réalisation de l'acte. De plus, lorsque le scellé est composé d'ossements, la demande judiciaire est plutôt celle d'une réintégration au reste du corps au titre d'un élément corporel. Pour ces raisons, le travail taphonomique sur des scellés judiciaires ou des scellés judiciaires n'ayant plus d'usage n'est donc pas réalisé en France à notre connaissance.

- Utilisation d'une collection de référence

L'anthropologie biologique « conventionnelle » s'attache à l'étude des populations du passé. Cette discipline peut utiliser des collections de références. Ces collections sont des outils méthodologiques précieux. Elles permettent de construire des protocoles en utilisant des collections de sujets parfaitement identifiés, représentatifs d'une population homogène et

naturelle (contexte géographique, culturel et chronologique). Certaines sont des collections dont les données sont limitées (mais généralement plus nombreuses) en termes de contexte géographique, chronologique et culturel. Ces dernières ne suffisent pas à prendre en compte la variabilité globale d'un espace géographique ou chronologique plus vaste (Urzel 2014). Ce type de collection appliquée à la taphonomie pourrait permettre de s'affranchir de la problématique du prélèvement en taphonomie osseuse. Il en existe à l'international dans les plateformes taphonomiques aux USA ou en Australie. Ces complexes, aussi appelé « fermes des corps », sont des lieux où des corps humains sont entreposés en *post mortem* pour étudier les phénomènes de décomposition en lien avec l'environnement. Des collections osseuses existent au sein de ces plateformes. Il n'en existe cependant pas en France. L'importation d'échantillons humains *post mortem* à visée de recherche en France est une possibilité envisageable. Cette possibilité est cependant très compliquée à mettre en œuvre d'un point de vue administratif et douanier (déclaration aux autorités, autorisations, harmonisation des règles sanitaires des deux pays, mode de transport, coût du transport).

- Utilisation de déchets issus d'activités de soins

Les résidus opératoires « désignent les tissus, cellules et produits humains recueillis à l'occasion d'une intervention médicale lorsqu'ils sont conservés en vue d'une utilisation ultérieure » c'est-à-dire « à des fins thérapeutiques ou scientifiques »<sup>13</sup>. Les déchets d'activités de soins correspondent aux « déchets des activités de diagnostic, de suivi et de traitement préventif, curatif ou palliatif, dans les domaines de la médecine humaine et vétérinaire »<sup>14</sup>. Des éléments issus du corps humain sont alors considérés au même titre que le matériel consommable utilisé au cours des activités de soins. Ces déchets sont tenus d'être éliminés par la personne qui les a produits. Il doit être établi des documents attestant le suivi des opérations d'élimination. Dès leur production, ils doivent être séparés des autres déchets, collectés dans des emballages à usage unique, marqués et étiquetés. Leur élimination se fait par incinération<sup>15</sup>. L'utilisation de ce type d'échantillon est intéressante car le consentement est récupérable auprès de la personne qui n'est pas décédée. Le donneur peut être une personne jeune (à contrario des dons du corps à la science). Les antécédents médicaux du donneur sont connus. Il est possible de travailler sur un plus grand nombre de prélèvements osseux eu égard au nombre d'interventions chirurgicales

---

<sup>13</sup> C. *santé publ.*, article L1245-2

<sup>14</sup> C. *santé publ.*, articles R1335-1 à R1335-8

<sup>15</sup> C. *santé publ.*, article R1335-8

annuelles en France. Les pièces osseuses dans ce contexte sont susceptibles d'être traumatisées ou lésées par une pathologie. Cela peut être limitant en fonction du contexte de l'étude. Par ailleurs, ce type de provenance nécessite une collaboration entre légistes et chirurgiens ainsi que la mise en place d'une organisation pour réaliser les prélèvements et un cadre administratif rigoureux. Il s'agit là encore de possibles limitations qui peuvent expliquer le faible engouement pour ce type de ressource en recherche médico-légale.

#### – Provenance des ossements en taphonomie osseuse

Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de se procurer des échantillons osseux humains *post mortem* selon différents moyens. Ils sont plus ou moins aisés, chacun ayant des points forts et des limites.

Dans le cadre du travail effectué au sein de l'UTML&A (EA 7367) et de notre partenariat avec le laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Lille, nos échantillons osseux sont issus des dons du corps à la science. Dans ce processus, le travail sur échantillons osseux issus d'un corps frais (c'est-à-dire n'ayant pas été formolé ou congelé) est parfois rendu difficile. En effet, la majorité des dons est utilisée pour l'enseignement de l'anatomie et bénéficient d'une préparation. À de nombreuses reprises, des ossements issus de corps formolés ou ayant été congelés nous ont été proposés par le laboratoire d'anatomie. Il existe plusieurs publications sur l'influence du formol et de la congélation sur l'os humain. Nous allons les développer par la suite. En revanche, peu d'études ont été effectuées sur ces modes de conservation dans le cadre de la taphonomie.

- La conservation en milieu formolé et son influence sur l'os

Le formaldéhyde est un produit chimique bactéricide, fongicide et insecticide. L'utilisation intensive du formaldéhyde en tant qu'agent de conservation repose sur le fait que le formaldéhyde possède d'excellentes propriétés antiseptiques. Il empêche ainsi les organismes de se décomposer (Brenner 2014). Ce produit peut être classé comme un désinfectant de haut niveau (8% de formaldéhyde dans 70% d'alcool) ou de niveau « intermédiaire » à « élevé » (4 à 8% de formaldéhyde dans l'eau) (Brenner 2014 ; Mayer 2012). Le formaldéhyde est connu pour réagir avec les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Hopwood 1969). Le formaldéhyde agit en réticulant chimiquement plusieurs protéines en insérant un pont

méthylène (-CH<sub>2</sub>-) entre les atomes d'azote des protéines adjacentes, les amines et les nucléophiles associés. Cela entraîne une fixation aussi appelée « réaction chimique de type tannerie » (Brenner 2014). Les hydroxy méthyles initialement réversibles dans la réaction protéique réduisent donc par réaction de condensation des méthyles ou N-formyles hydrophobes avec formation d'acide formique. Le pontage méthylène se produit le plus souvent entre la lysine et divers autres fragments : lysine-arginine, lysine-cystéine, lysine-asparagine et lysine-glutamine. Ce pontage est fortement contrôlé sur le plan stérique, ne se produisant que lorsque des proximités favorables existent (Brenner 2014). En plus des dérivés hydroxy-méthyles des fonctions amines, la guanidine, les autres hydroxyyles, les indoles et les imidazoles sont très instables. Les couplages lysine-cystéine sont relativement stables mais réversibles. La lysine-arginine, la lysine-asparagine et la lysine-glutamine sont stables mais sensibles à l'hydrolyse acide. Les liaisons lysine-tyrosine sont très stables et résistent aux acides. Un traitement au formaldéhyde fort au cours de la fixation entraîne une quantité importante de liaisons résistantes aux acides (Bedino, 2003). Toutes les protéines ne sont pas réticulées de manière similaire ; par exemple, la solubilité des lactalbumines et des ovalbumines est même améliorée lors de la fixation formolée (Blum 1896). Le formaldéhyde peut se lier de manière covalente à l'ADN simple brin et aux protéines pour former des liaisons croisées ou avec l'albumine sérique humaine ou la valine N-terminale de l'hémoglobine pour former des adduits moléculaires (Brenner 2014).

Sur l'os, des études de résistance en biomécanique ont montré (Brenner 2014) que le stockage de formol entraînait une réduction de 50% de l'absorption d'énergie. Cette fixation augmente la fragilité des os (Goh et al 1989). Elle entraîne aussi une diminution significative de la résistance aux chocs dans les échantillons conservés sur de courtes durées (< 3 h d'embaumement) (Currey et al 1995). La fixation engendre une diminution de l'intégrité mécanique après embaumement (Ohman et al 2008). Les variations observées peuvent être dues à la déminéralisation osseuse (Fonseca et al 2008) et à une altération des propriétés viscoélastiques en réduisant la capacité de l'os à dissiper l'énergie (Nazarian et al 2009). Hammer et al 2013 (Hammer et al 2013) montrent que la fixation par formol altère la matrice organique au travers d'une modification de la masse et de l'architecture de l'os. Ces modifications entraînent un changement de la réponse mécanique et de la résistance de l'os à des contraintes. Pascart et al (Pascart et al 2016) ont également montré que la fixation par un produit formolé modifie à la fois la phase minérale (augmentation de la cristallinité et réduction du rapport minéral sur matrice) et la phase organique (augmentation du rapport hydroxy-proline sur proline et une caractérisation

statistique du groupe formolé par des pics pour l'hydroxy-proline, les lipides et le collagène) en spectrométrie Raman.

Le formol a une action antibactérienne, mais des études ont montré la possibilité de survie de bactéries voire de champignons sur les cadavres après préparation. Par exemple Svidovyi et al (Svidovyi et al 2011) retrouvent des bactéries *Bacillus* sp., *Providencia* alcalifaciens et *S. aureus*, des micromycètes *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* sp., *Hormodendron* sp. et des acariens *Dermatophagoides pteronissimus* sur les cadavres en laboratoire d'anatomie avec une préparation formolée des corps. Janczyk et al (Janczyk et al 2011) ont testé les fluides d'embaumement éthanol-polyéthylène glycol-formol après préparation des cadavres sur des échantillons de muscles et ont mis en évidence des colonies microbiennes de *Bacillus* sp. ainsi que des colonies de *Pseudomonas oryzihabitans*, de *Chryseobacterium* sp., et de *Acinetobacter* sp. dans les poumons des cadavres.

Au total, le formaldéhyde (et ses dérivés) est un produit chimique de conservation. Il modifie l'os dans sa totalité. Les études qui ont mis cela en évidence ne l'ont pas été dans un cadre taphonomique. Ces études ne sont donc pas applicables en l'état à cette discipline. Par ailleurs, aucune étude n'a été réalisée à ce sujet au  $\mu$ CT sur des os humains *post mortem*.

- La conservation osseuse en congélation

La congélation d'un os est un mode fréquent de conservation. Il est rapporté que les températures froides sont réductrices de l'activité microbienne et des effets destructurant de cette activité sur l'os (Pokines et al 2016 ; Bell et al 1996). De façon générale, le froid permet une conservation prolongée des éléments biologiques. Miller (Miller 2009 ; Miller 2011 ; Miller 2012) a constaté que les os exposés en surface en extérieur (outdoor) pouvaient être récupérés et restaient reconnaissables malgré leur état de dégradation. Ces constatations ont été réalisées après un peu plus de 200 ans de conservation dans un parc national américain. La conservation en milieu froid entraîne des modifications architecturales pour l'os notamment lié au comportement de l'eau et de son volume lors des cycles de congélation et de décongélation (Pokines et al 2016). La formation de cristaux de glace liée à la congélation de la partie aqueuse de l'os peut aussi provoquer des fissures ou cracks en anglais à un niveau macroscopique (Pokines et al 2016 ; Trueman et al 2004) et microscopique (Turpin 2017). Ces micro-lésions sont décrites dans les cycles de congélation décongélation de la roche avec un phénomène de contraction – relâchement du substrat (Hall 1999). Il peut également survenir des fractures

macroscopiques sur microfractures préexistantes en cas de choc thermique (Pokines et al 2016). Les modifications architecturales seraient liées à des modifications de températures lors des cycles diurne – nocturne. Les changements liés à ces variations se situeraient au niveau des ostéons (Conard et al 2008 ; Skedros et al 2005 ; Tappen 1969 ; Tappen & Peske, 1970).

La littérature montre que la congélation affecte la réponse mécanique de l'os humain. La rigidité et l'élasticité sont modifiées (Gleizes et al 1998). L'intégrité de l'os trabéculaire est également changée par la congélation (Lee & Jasiuk 2014). Les capacités de flexion, torsion, d'absorption d'énergie et de dureté sont modifiées sur des os congelés (Van Haaren et al 2008). La capacité fracturaire de l'os congelé (c'est à dire l'inverse de la résistance à l'apparition d'une fracture d'un os soumis à un stress mécanique est augmentée (Kaye et al 2012 ; Torimitsu et al 2014). Cela dit, les publications n'indiquent pas les mêmes tendances en fonction de la durée de conservation. Des réponses variables sont aussi décrites en fonction des pièces osseuses congelées. Ainsi, Nazarian et al 2009 (Nazarian et al 2009) ont montré l'absence de modification en termes de résistance osseuse après 2 semaines de conservation à -20°C sur des os de souris. Karr et Outram (Karr & Outram 2012) ont montré des modifications macroscopiques dans le motif fracturaire *post mortem* d'os de chevaux conservé à -20°C pendant 1 à 60 mois. Dans le même temps, d'autres travaux indiquent que la congélation n'affecte pas l'os humain et notamment l'os trabéculaire (Borchers et al 1995).

Au total, la congélation et surtout les cycles de congélation – décongélation sont des facteurs de conservation qui modifient la structure osseuse. Ces modifications entraînent un changement dans la réponse osseuse à une sollicitation mécanique. Peu d'étude se sont attachés à caractériser l'influence de la congélation sur de l'os à l'aide d'un  $\mu$ CT (Lee & Jasiuk 2014).

#### – **Problématique, objectif et hypothèse(s)**

Devant la disponibilité de pièces osseuses provenant de corps formolés ou congelés et par le peu de référence bibliographique, la problématique est de savoir s'il est possible d'utiliser ces pièces pour des études en taphonomie osseuse. L'objectif de ce travail est donc de caractériser les modifications architecturales au  $\mu$ CT d'échantillons conservés selon ces deux modalités. L'hypothèse de départ est que ces deux milieux altèrent significativement les pièces osseuses en termes de volume et de conformation osseuse au  $\mu$ CT. La validation de cette hypothèse

rendrait l'usage de ces moyens de conservation impropre à la réalisation d'un travail taphonomique.

## – Matériels et méthode

### ○ Échantillons osseux

Vingt-quatre échantillons ont été prélevés sur une voûte crânienne humain *post mortem*. Cette voûte était issue d'un unique corps, disponible au travers d'un don du corps à la science au sein du laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Lille, UTML & A (EA7367), Université de Lille.

Pour limiter les biais liés à l'origine des échantillons (ostéopénie notamment), des critères d'exclusion ont été retenus s'agissant du corps. Ils étaient les suivants :

- Individu féminin ;
- Antécédent médical ou chirurgical au niveau crânien ;
- Préparation du corps par produit formolé ou par congélation ;
- Présence d'une pathologie source d'ostéopénie à type de trouble endocrinien, trouble alimentaire et dénutrition, pathologie tumorale ;
- Décès de plus de 48 h.

Le corps devait par ailleurs être utilisé dans le cadre d'autres travaux (étude anatomique et travaux de recherches) pour limiter l'utilisation de corps et en respect des principes éthiques.

La voûte a été prélevée par découpe transversale à 1 cm au-dessus des arcades sourcilières. L'individu prélevé était un homme de 82 ans, sans antécédent hormis une hypertension artérielle et une insuffisance cardiaque d'origine coronarienne. Le décès était lié à une décompensation cardiorespiratoire. Après extraction de la voûte, les chairs ont été séparées mécaniquement de l'os en prenant garde de ne pas léser le périoste (abord précautionneux de la périphérie de l'os lors de la découpe des chairs au bistouri).

Sur cette voûte, les échantillons ont été prélevés à l'aide d'un trépan en diamant (stoma® d'un diamètre de 1 cm) et d'une perceuse multi-usage à haute vitesse (Dremel®). Les prélèvements ont été réalisés selon une cartographie utilisée dans notre laboratoire. Cette cartographie

consiste à attribuer un nom à chaque échantillon en fonction de critères appliqués à la voûte, à savoir :

- Le côté de l'échantillon : R pour « right » (droit) et L pour « left » (gauche)
- L'initial de l'os : F pour « frontal » et P pour « pariétal »
- Les numéros de lignes horizontales et verticales (figure III – 1).

Par exemple dans cette cartographie, l'échantillon RP32 correspond à l'échantillon de la 3<sup>ème</sup> ligne horizontale, de la 2<sup>ème</sup> ligne verticale, du pariétal droit (figure III - 1).

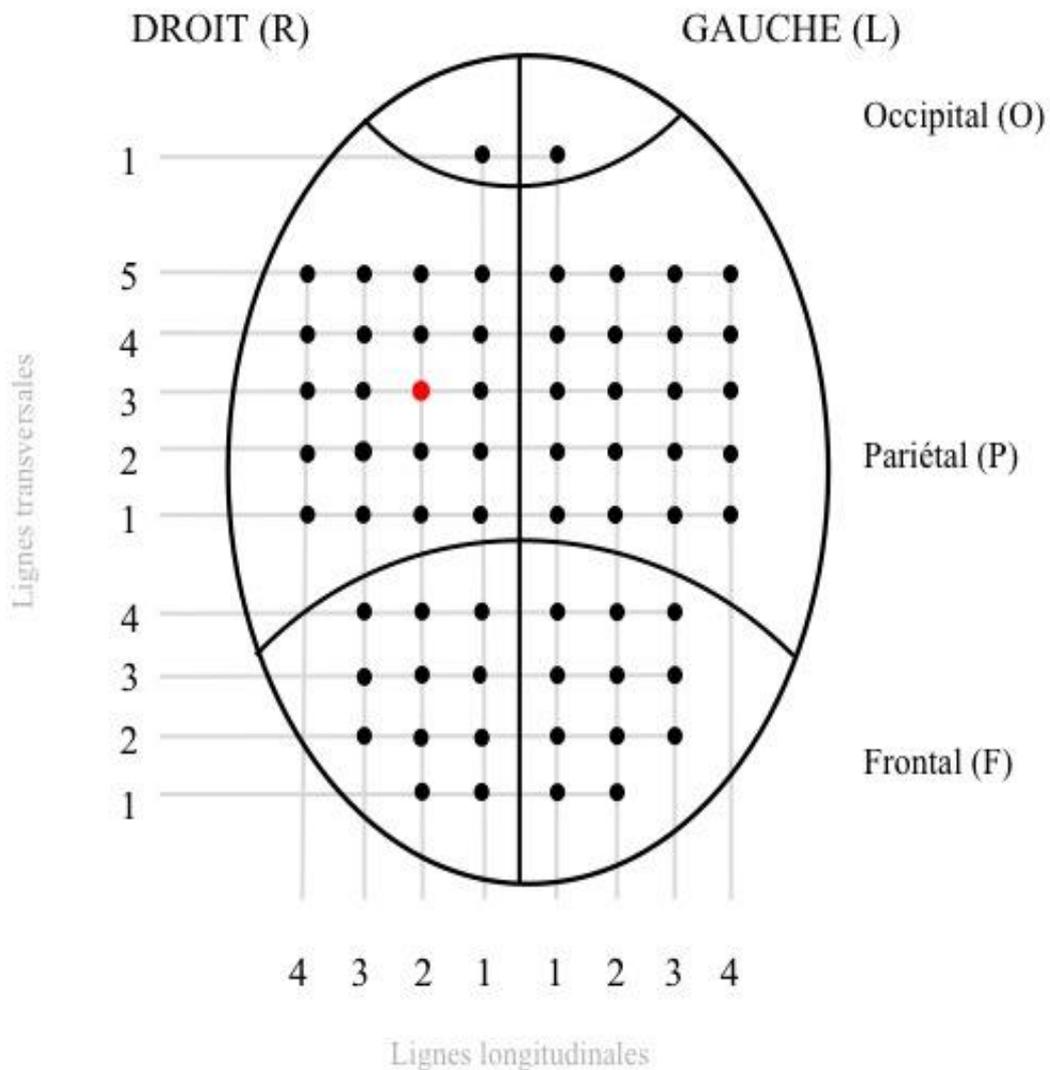


Figure III - 1. La cartographie utilisée pour nommer les échantillons issus de la voûte du crâne.

Au sein de cette cartographie, les 24 échantillons ont été tirés au hasard, avec 12 échantillons pris sur la partie gauche et 12 sur la partie droite de la voûte.

- Modes et durée de conservation

Deux milieux de conservation ont été mis en place pour les échantillons osseux : un milieu formolé et un milieu de congélation.

Arbitrairement, les échantillons issus de la partie gauche de la voûte du crâne ont été placés en milieu formolé et ceux issus de la partie droite en congélation. Concernant le milieu formolé, chaque échantillon a été plongé dans une solution formolée à 4% pH 7 après extraction. Concernant le milieu congélation, chaque échantillon a été placé dans un flacon en plastique et placé dans un congélateur à -20°C après extraction.

Les échantillons, placés dans leur milieu, ont été conditionnés pendant 12 mois à l'abri de la lumière. Des acquisitions au  $\mu$ CT ont été réalisées sur les échantillons frais avant conditionnement dans leur milieu de conservation. Ensuite, plusieurs acquisitions au  $\mu$ CT ont été réalisées après 1 mois, puis 3 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois de conservation.

Entre les acquisitions, les échantillons étaient replacés dans leur milieu de conservation. Pour les échantillons congelés, ils ont été placés 6 heures en réfrigération à 4-6°C pour permettre une décongélation lente. Ce mode a été choisi pour réduire le risque de modification architecturale brutale liée au changement de phase brutale de l'eau. Pour les échantillons formolés, ils ont été placés 6 heures sous hotte à 20°C de température (constante et stable) et dans un environnement asséchant (450m<sup>3</sup>/h) sur du papier absorbant pour permettre leur analyse dans le  $\mu$ CT sans risque d'émanation.

- Critères d'acquisition au  $\mu$ CT

Les acquisitions au  $\mu$ CT ont été réalisées sur un  $\mu$ CT Bruker ® Skyscan 1172 HR avec les paramètres d'acquisitions suivants :

- Résolution : 12  $\mu$ m
- Beam hardening : 45%

- Ring artifact correction : 10
- Exposition : 200 ms
- Pas de rotation : 0,4°

La reconstruction a été faite comme indiquée dans le chapitre I. Les images acquises aux différents temps ont été superposées par rapport à celle de la première acquisition. Cette étape permettait de s'assurer de comparer les échantillons à eux même au cours du temps. Les images ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel CtAn® à partir d'une coupe de référence dans le trabéculaire. Cette coupe de référence a été sélectionnée comme étant la coupe ayant le rapport volume osseux sur volume total le plus bas. Cette coupe reste identique au cours du temps. À partir de cette coupe, nous avons sélectionné un volume de référence (VOI) pour chaque échantillon. Nous avons sélectionné entre 20 et 100 coupes au-dessus et en dessous de cette coupe de référence, en fonction de la taille de l'échantillon et de la taille de la partie trabéculaire. La corticale externe et la corticale interne n'ont pas été étudiées dans ce travail. Ce choix a été fait en raison de l'absence de consensus s'agissant de la limite entre trabécule et corticale au  $\mu$ CT. Le VOI sélectionné a été unique pour chaque échantillon. Ce VOI a été appliqué à chacun des temps d'acquisition.

Les paramètres étudiés avec CtAn® étaient les suivants au sein du VOI (détaillés dans le chapitre I) :

- Volume osseux (BV) ;
- Surface osseuse (BS) ;
- Épaisseur trabéculaire moyenne (TbTh) ;
- Espacement trabéculaire moyen (TbSp) ;
- Nombre moyen de trabécule (TbN) ;
- Motif trabéculaire (TbPF) ;
- Connectivité (Conn).

- Analyse statistique

Les données quantitatives issues des analyses réalisées avec CtAn® ont été mises en base de données avec une description des moyennes et écart types. Après vérification de la normalité des données, nous avons réalisé une analyse de variance pour mesures répétées. Cette opération était destinée à analyser l'influence du temps de conservation et de l'interaction entre l'écoulement du temps et le mode de conservation. En cas d'effet statistique en lien avec le

mode de conservation, une analyse spécifique a été faite pour étudier les variations dans chaque type de conservation. L'ensemble a été réalisé au seuil de risque biologique à 5%.

### – Résultats et discussion

Ce travail met en évidence des variations des différentes variables analysées à l'aide du  $\mu$ CT et dans les 2 milieux de conservation. La quasi-totalité des modifications des variables est significative au niveau statistique (tableau III - 1). Il est observé un effet lié au temps. Cet effet est notable avec une interaction statistique entre le milieu de conservation et l'écoulement du temps. L'analyse par groupes de conservation met en évidence une significativité pour toutes les variables pour la conservation dans le formol. En milieu congelé, seule la variation du nombre de trabécules (TbN) est significative.

Tableau III - 1. Significativité des tests statistiques pour chacune des variables analysées à l'aide du  $\mu$ CT

	BV	BS	TbTh	TbN	TbSp	TbPf	Conn
Influence du temps de conservation	< 0,0001 *	< 0,0001 *	0,001 *	< 0,0001 *	0,001 *	< 0,0001 *	< 0,0001 *
Effet de l'interaction temps – milieu de conservation	< 0,0001 *	< 0,0001 *	0,011 *	< 0,0001 *	0,004 *	0,001 *	< 0,0001 *
Groupe Congélation	0,352	0,546	0,032	< 0,0001*	0,435	0,091	0,649
Groupe Formol	< 0,0001*	< 0,0001*	0,005*	< 0,0001*	0,001*	< 0,0001*	< 0,0001*

\* significativité des tests au risque 0,05

En considérant les variables volumiques et surfaciques, on observe des tendances équivalentes pour les deux milieux de conservation. On observe une augmentation moyenne en milieu formolé pour le BV et la BS (figure III – 2 et III – 4) et des valeurs plus stables en moyenne en congélation. Ces tendances se retrouvent également dans les « box plots » ou « boîtes à

moustaches » (figure III – 3 et III – 5) qui montrent une moindre dispersion des valeurs en congélation.

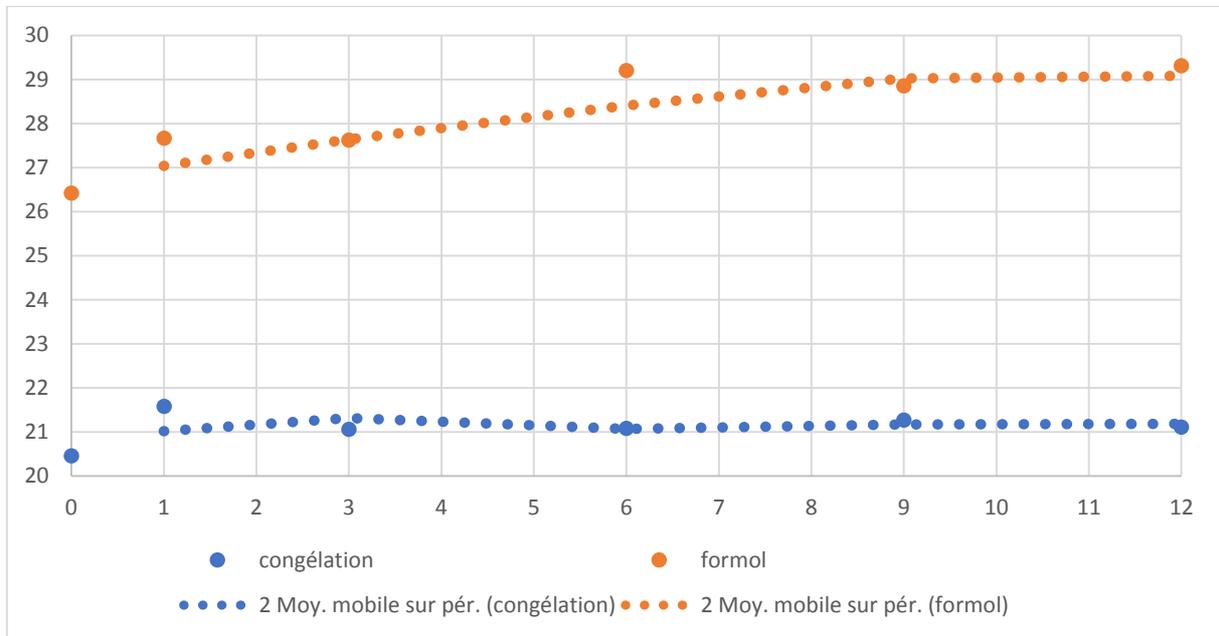


Figure III – 2. Volume osseux (BV en  $\text{mm}^3$ ) moyen par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation.

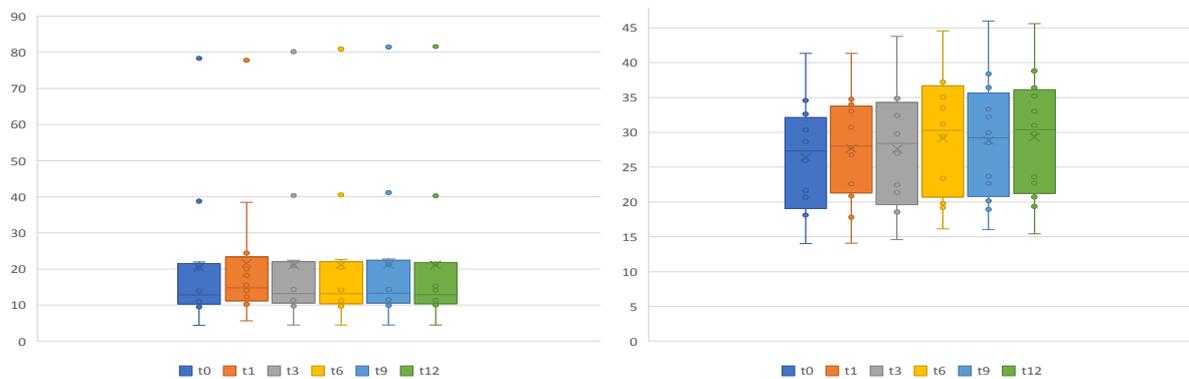


Figure III – 3. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le volume osseux (BV en  $\text{mm}^3$ ) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite)

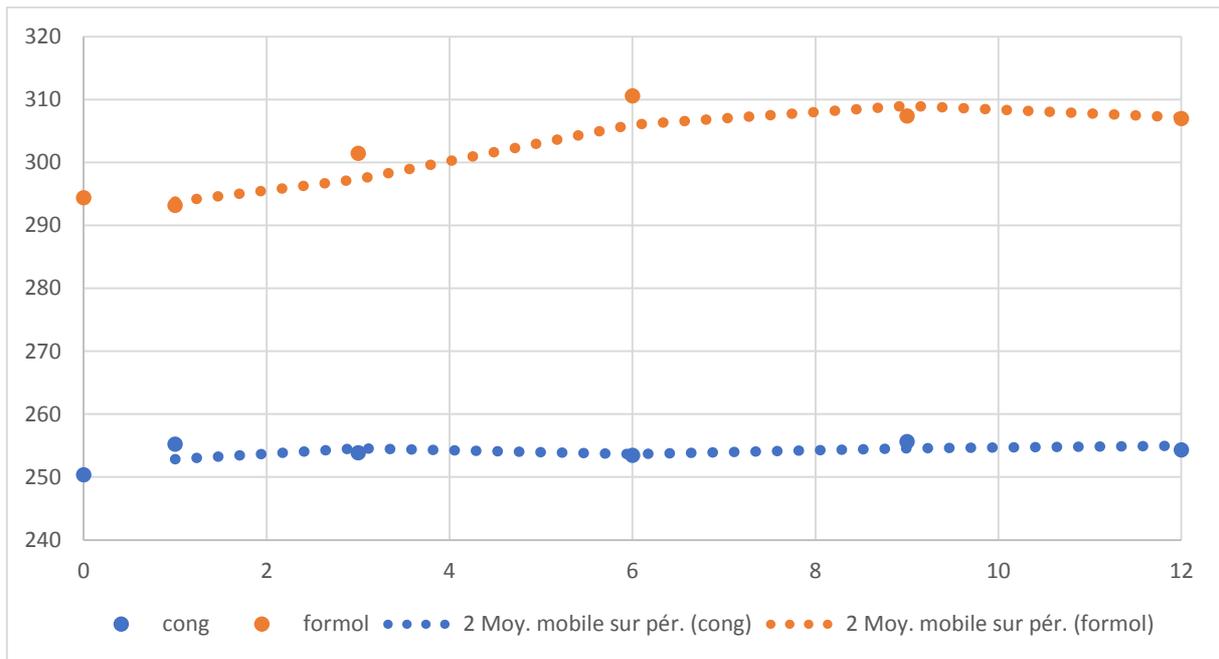


Figure III – 4. Surface osseuse (BS en  $\text{mm}^2$ ) moyenne par temps d'acquisition (en semaines) au cours du temps en milieu formolé et en congélation

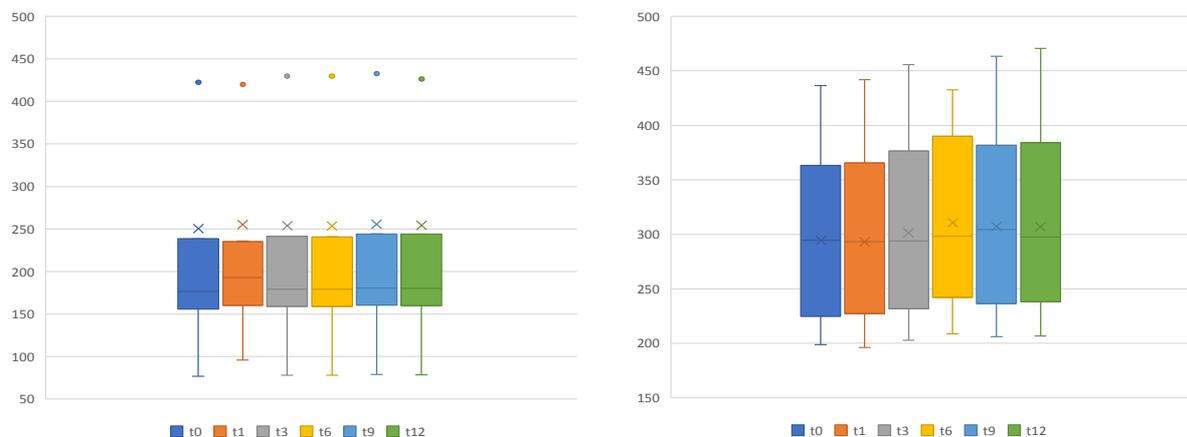


Figure III – 5. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour la surface osseuse (BS en  $\text{mm}^2$ ) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

S'agissant des variables trabéculaires, il est observé une variation plus marquée des moyennes de valeurs en milieu formolé pour l'épaisseur (figure III – 6) et le nombre de trabécules (figure III – 8). Nous observons une diminution de la valeur moyenne pour l'espacement trabéculaire (figure III – 10). La visualisation sous la forme de box plots pour l'épaisseur, le nombre de trabécules et leur espacement (figure III – 7, III – 9 et III – 11) montre cependant une disparité des mesures pour les deux modes de conservation. Cette disparité est plus marquée pour la conservation en milieu formolée.

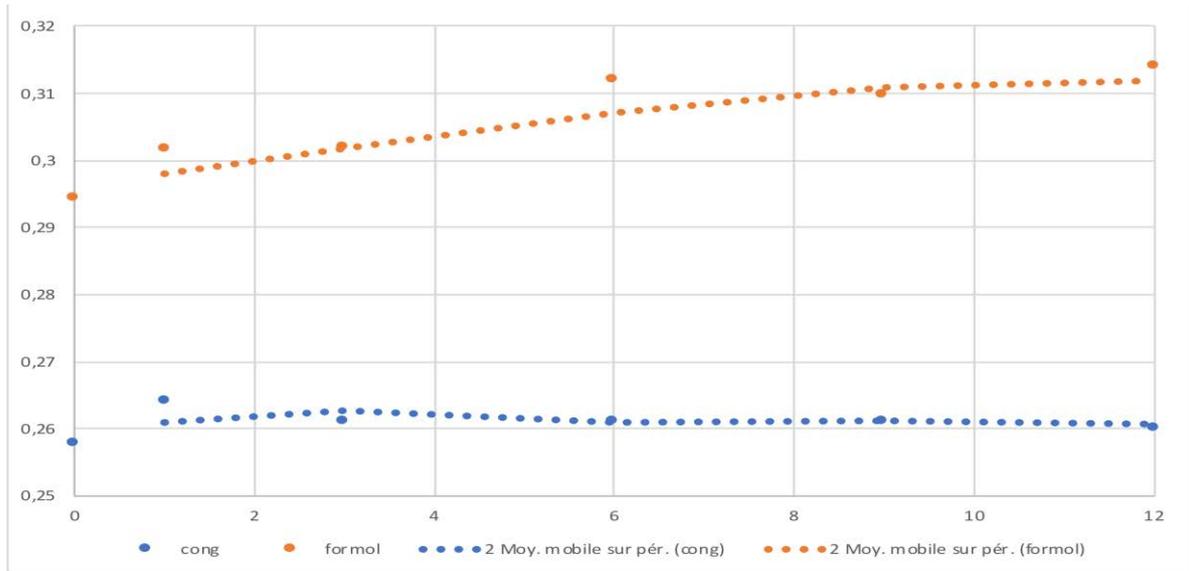


Figure III – 6. Moyenne de l'épaisseur trabéculaire (TbTh en mm) par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation.

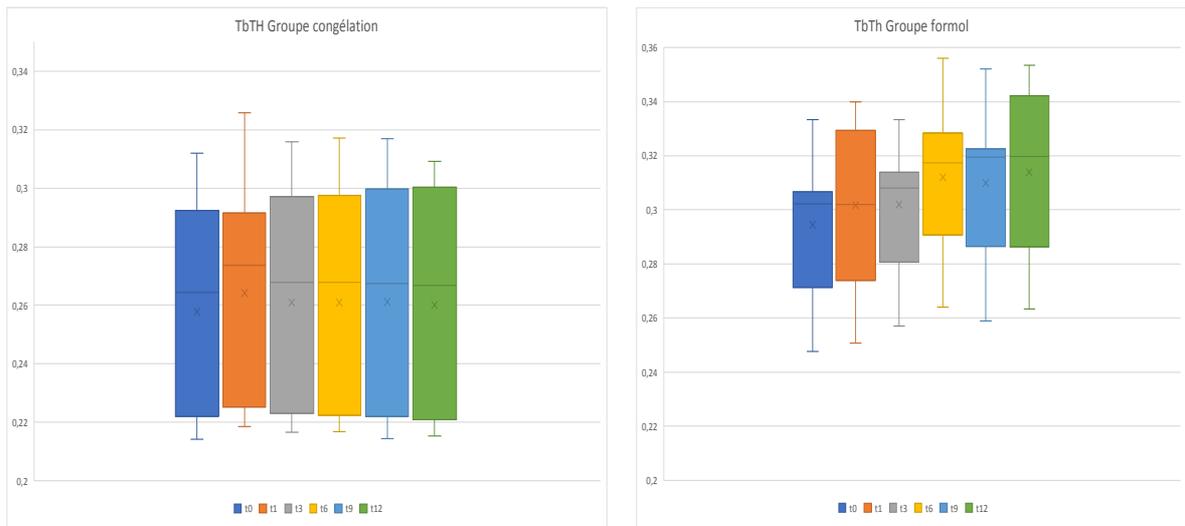


Figure III – 7. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour l'épaisseur trabéculaire (TbTh en mm) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

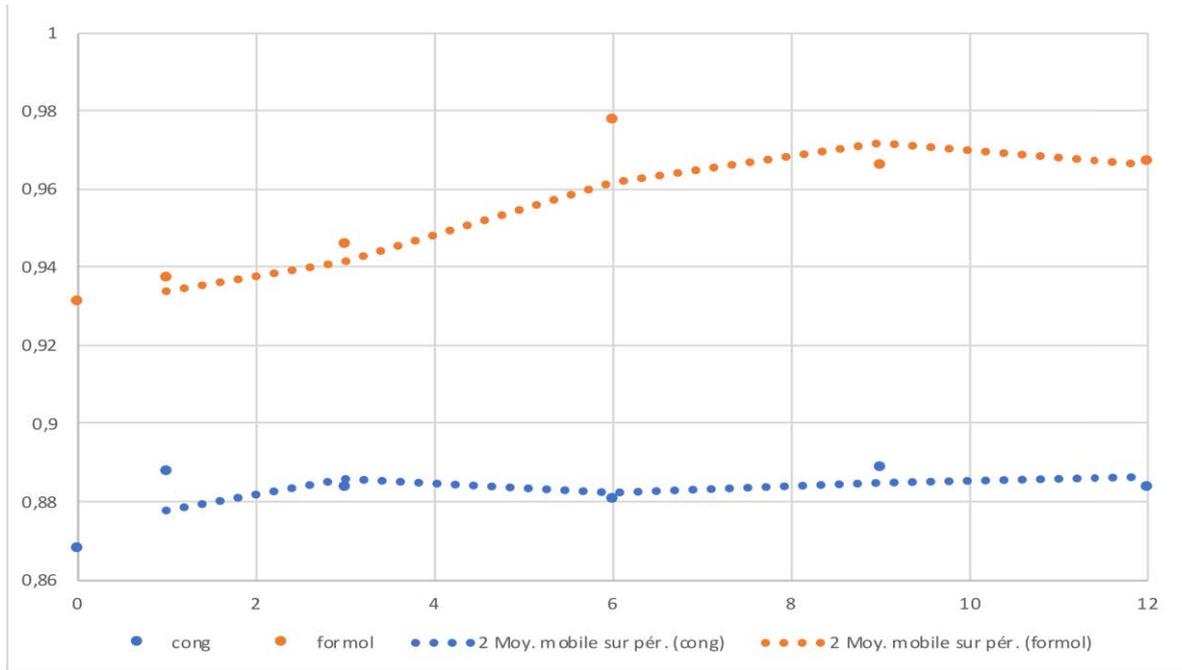


Figure III – 8. Nombre de trabécule moyen (TbN en  $\text{mm}^{-1}$ ) par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation.

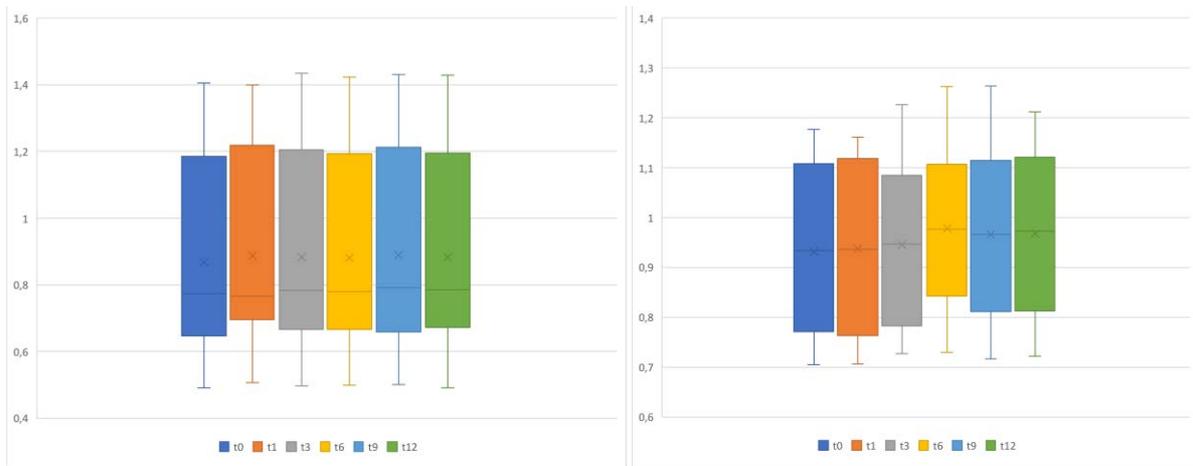


Figure III – 9. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le nombre moyen de trabécule (TbN en  $\text{mm}^{-1}$ ) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

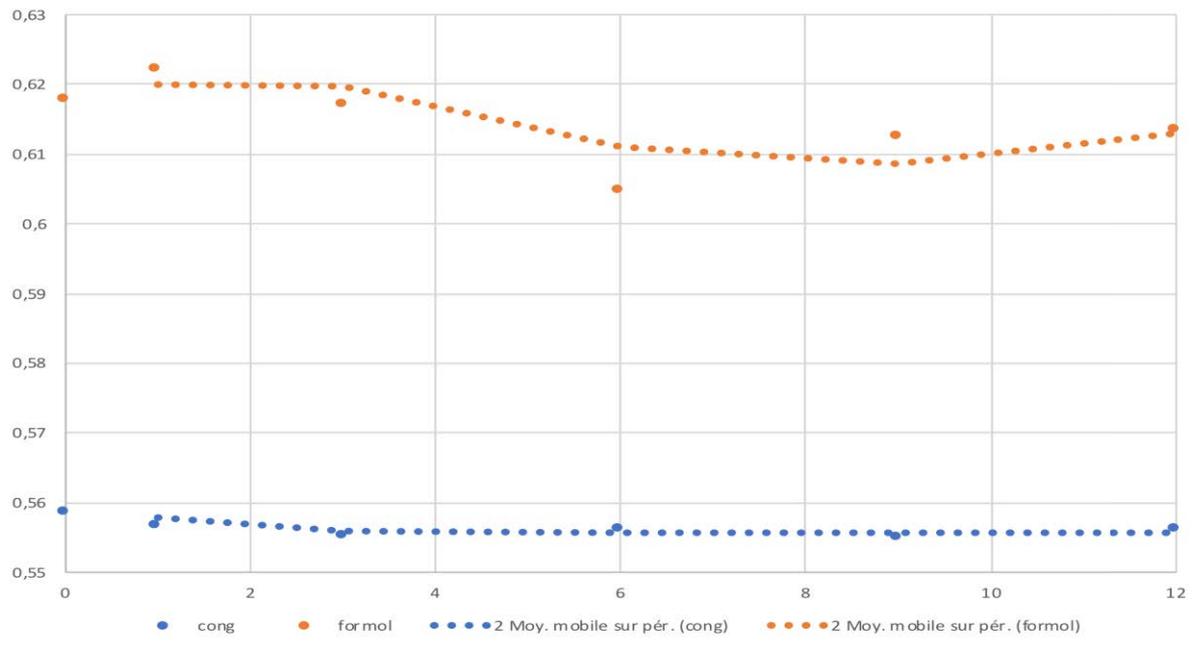


Figure III – 10. Espacement moyen des trabécules (TbSp en mm) par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation

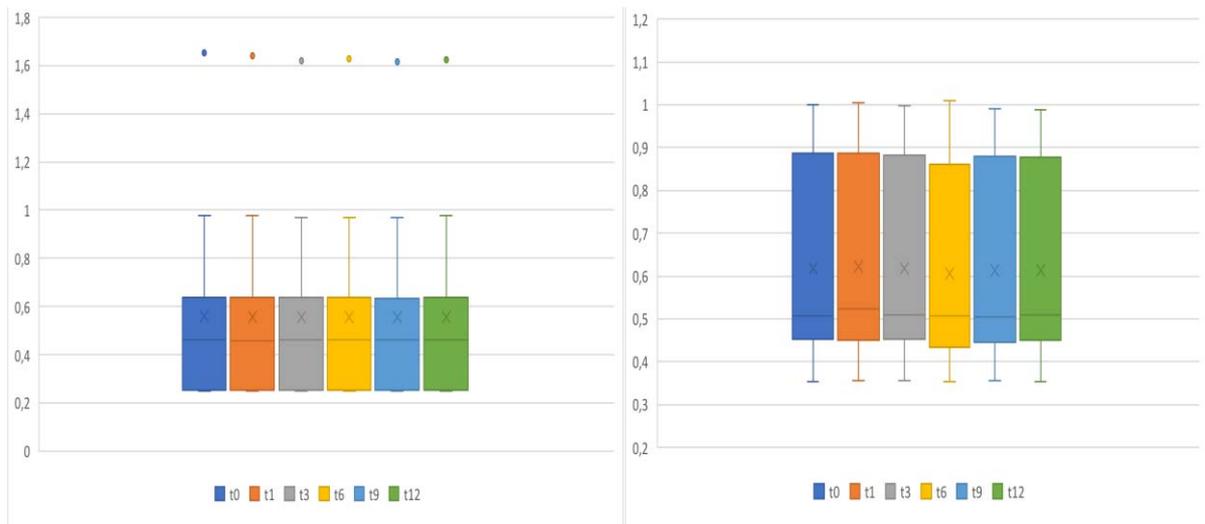


Figure III – 11. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour l'espacement trabéculaire moyen (TbSp en mm) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

Quand on s'intéresse aux indices architecturaux, le motif trabéculaire moyen par temps d'acquisition (figure III – 12) évolue fortement pour le milieu formolé par rapport à la congélation. La visualisation plus détaillée des données (figure III – 13) permet de mettre en évidence une grande variabilité des données dans les 2 milieux de conservation. La connectivité

montre de plus grande variation lors de la conservation en milieu formolé (figure III – 14). Cela est confirmé lors de la visualisation des données (figure III – 15).

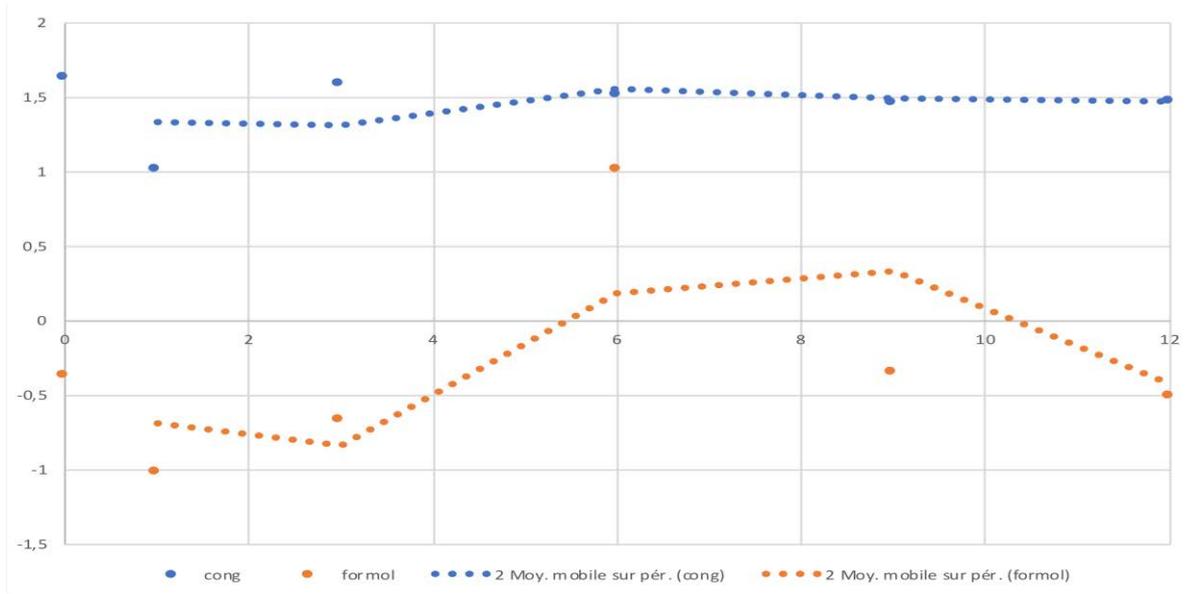


Figure III – 12. Motif trabéculaire moyen (TbPF) par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation

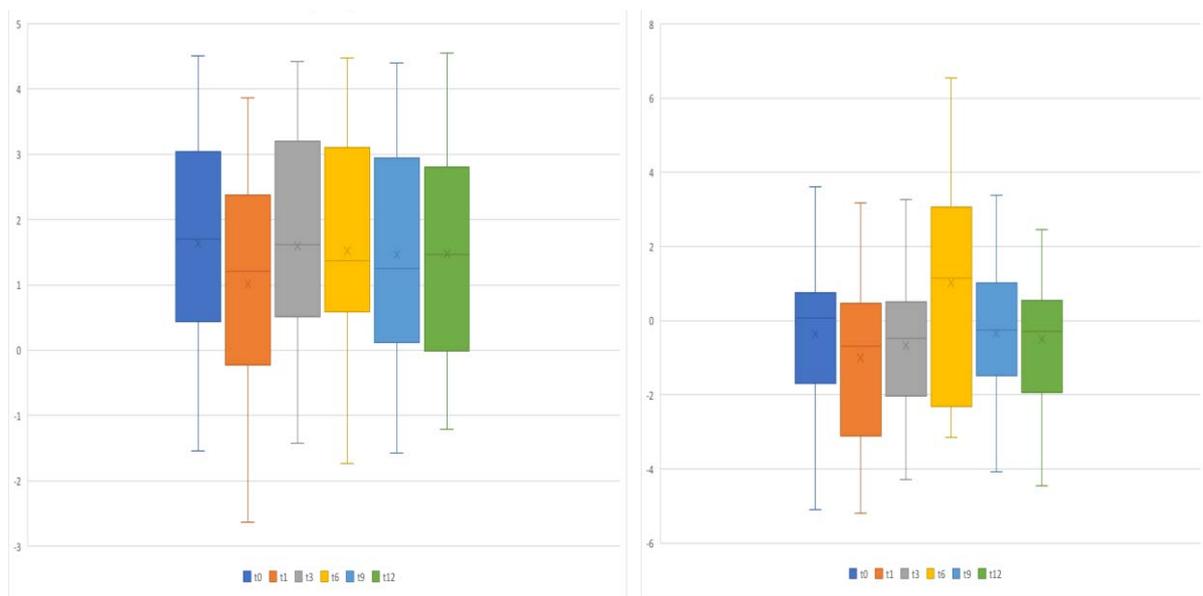


Figure III – 13. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour le motif trabéculaire (TbPF) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

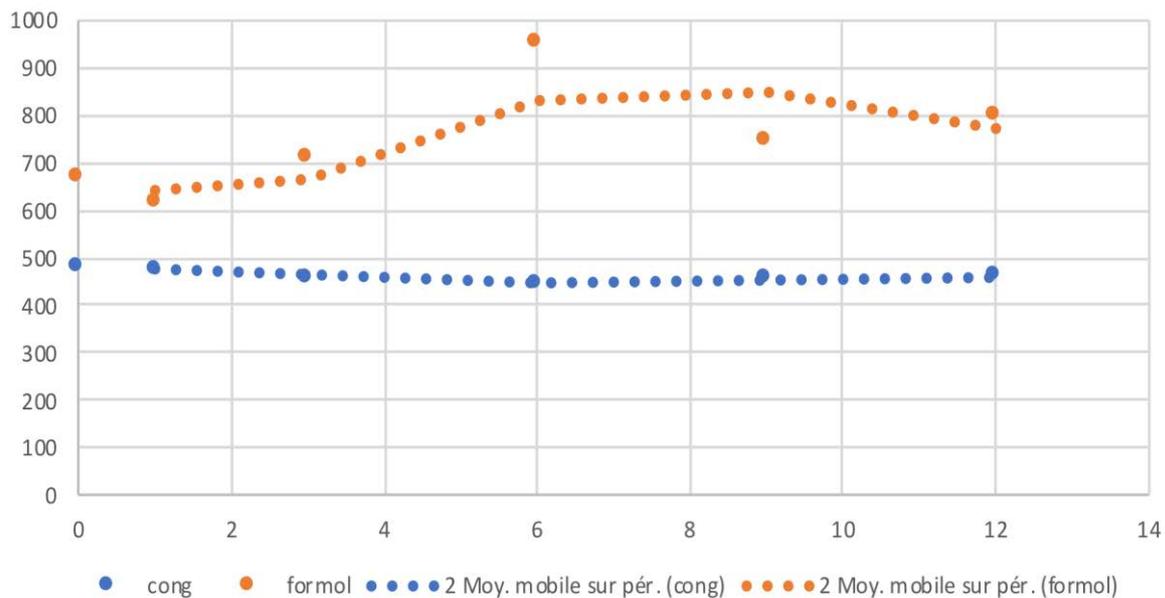


Figure III – 14. Moyenne de la connectivité (Conn) par temps d'acquisition au cours du temps (en semaines) en milieu formolé et en congélation

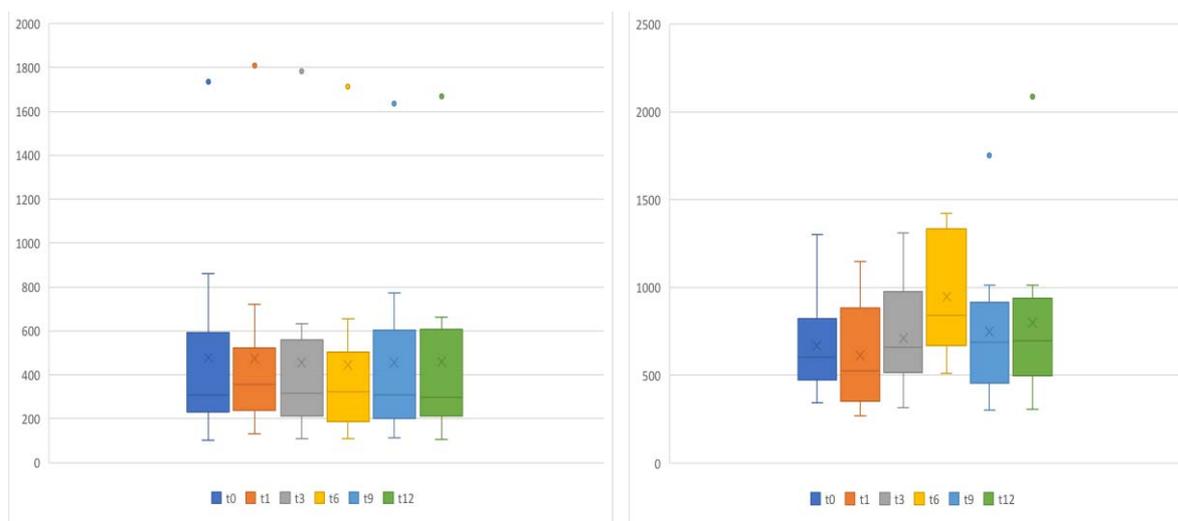


Figure III – 15. Valeurs moyennes sous la forme de « box plots » par temps d'acquisition pour la connectivité (Conn) en congélation (à gauche) et en milieu formolé (à droite).

De façon globale, la visualisation des résultats par les figures précédentes montre une tendance à une stabilité des valeurs moyennes en congélation par rapport à la conservation formolée.

Concernant la congélation, les faibles variations enregistrées peuvent s'interpréter comme une faible modification du trabécule. Cela peut être mis en lien avec les cycles de congélation/décongélation qui sont peu nombreux dans notre étude. Le nombre trabéculaire moyen par millimètre est le seul paramètre à varier significativement dans le temps en

congélation. Cette différence statistique est à pondérer par rapport la visualisation des moyennes par temps d'acquisition qui montre une stabilité relative. On peut discuter trois éléments à l'origine de ces faibles variations : le faible nombre de cycles de congélation/décongélation (et donc la déshydratation et la faible influence de micro-fractures), la durée d'étude assez courte au regard d'étude archéologique et l'influence de la congélation sur le collagène. Notre travail a mis en place 5 cycles de congélation/décongélation. Cela est peu au regard d'autres études comme par exemple, Pokines et (Pokines et al 2016) qui ont montré des variations pour 75 cycles. Au regard de cette publication, notre travail représente donc très peu de phénomènes de cristallisation / décristallisation de la partie aqueuse de l'os. Par ailleurs, le mode de décongélation « douce » a favorisé une limitation des phénomènes de variation de volume de la partie aqueuse de l'os. Lors de cette décongélation, l'échantillon restait en conservation dans un flacon hermétique, mais une déshydratation s'est probablement installée lors de chaque cycle. Cela a été susceptible de réduire progressivement la partie aqueuse de l'os et donc l'influence de sa transformation lors de la congélation. Nous n'avons pas observé de lésion macroscopique sur les échantillons osseux. Il n'a pas non plus été visualisé de lésion microscopique sur les images au  $\mu$ CT. L'hypothèse de micro-fractures osseuses induites par les cycles de congélation/décongélation ne peut être affirmée dans ce travail car la résolution étant de 12  $\mu$ m. Cette résolution peut être insuffisante pour objectiver des micro-cracks (dont la longueur est de l'ordre d'une centaine de microns mais la largeur entre une dizaine et une centaine de microns) (Larrue 2010). L'absence de modification significative de la connectivité, de l'espacement ou de l'épaisseur trabéculaire sont cependant des arguments sur le fait qu'il n'y a pas d'événements fracturaires liés aux cycles de congélation/décongélation dans notre travail. Ces arguments confortent notre évaluation visuelle. De plus, l'étude a été réalisée sur une partie de l'os susceptible d'être plus influencée par les variations puisque le trabécule présente une forte porosité. Cela aurait théoriquement pu entraîner une sensibilisé accrue aux variations de température, ce que nous n'observons pas. Nos observations donnent plus de force en termes d'interprétation sur la stabilité relative de la conservation en congélation.

Il peut être discuté que le temps d'étude ici est relativement « court » par rapport à des études sur des os archéologiques (de quelques centaines à milliers d'années). Il est possible que des événements fracturaires soient en cours mais non décelables avec le niveau de résolution du  $\mu$ CT. Ces fractures potentielles pourraient être objectivables en poursuivant cette étude plus longtemps. Cette hypothèse ne peut être renseignée actuellement par ce travail.

Le collagène a probablement été peu influencé par la congélation dans notre travail. En effet, le collagène et sa dégradation sont surtout fonction de la température, du pH et d'attaque(s) bactérienne(s). Dans le contexte de notre étude, la température utilisée n'est pas décrite comme étant un facteur favorisant de la dégradation du collagène (Kendall et al 2018). Par ailleurs, la décongélation « douce » a probablement réduit ce risque de dégradation. L'hypothèse d'une attaque bactérienne sur nos échantillons n'est pas étayée par l'aspect microscopique de nos acquisitions. Le risque d'une attaque bactérienne est théoriquement réduit par notre préparation des échantillons (séparation mécanique des chairs) et de l'environnement de conservation (-20°C).

Le  $\mu$ CT ne permet pas en l'état de formuler une hypothèse précise quant à l'origine de la variation du nombre moyen de trabécules après une congélation. Un travail complémentaire en histologie ou avec une résolution plus fine au  $\mu$ CT pourrait être conduit pour étayer l'hypothèse des micro-fractures.

Notre travail montre que la congélation permet une conservation des échantillons avec de faibles variations des paramètres au  $\mu$ CT. Les variations ne sont pas significatives sauf pour le nombre de trabécule (TbN). Pour autant, l'écoulement du temps ne semble pas majorer les variations pour ce paramètre. Ce mode de conservation peut donc être envisagé en l'absence de corps ou d'os frais dans un contexte taphonomique. Cela doit être fait en ayant à l'esprit que la congélation influence quand même certains paramètres du  $\mu$ CT.

S'agissant du milieu formolé, notre travail met en évidence des variations importantes pour chaque paramètre. Toutes ces variations sont significatives statistiquement. Il est mis en évidence une augmentation moyenne du volume (BV) et de la surface osseuse (BS), une augmentation de l'épaisseur moyenne (TbTh) et du nombre de trabécules (TbN) avec conjointement une diminution de l'espacement trabéculaire (TbSp). Enfin, il est observé une modification architecturale du trabécule sous la forme de variation du motif trabéculaire (TbPf) et une augmentation de la connectivité (Conn). Ces modifications suggèrent une augmentation de la quantité d'os sous la forme d'une majoration en taille et en nombre du trabécule. Le collagène est connu pour induire des pontages protéiques importants avec une modification architecturale osseuse. Pascart et al (Pascart et al 2016) ont montré que le formol modifie la phase minérale et la phase organique de l'os en spectrométrie Raman. Les paramètres étudiés au  $\mu$ CT vont dans ce sens d'une modification de la structure et de l'architecture osseuse. Par ailleurs, le pH et l'action du formol peuvent être à l'origine d'une recristallisation importante de la partie minérale de l'os avec une recristallisation majorée des gros cristaux au dépend des

plus petits (Kendall et al 2018). L'augmentation de quantité osseuse (BS, BS, TbTh et TbN) au  $\mu$ CT peut être le reflet d'une modification de l'aspect osseux liée à l'action chimique du formol. Il n'est cependant pas possible d'avancer plus loin dans le phénomène explicatif à l'origine de ces résultats. L'analyse au  $\mu$ CT ne permet pas d'exploration chimique en l'état. Les modifications observées semblent augmentées avec le temps de conservation pour toutes les variables. Des modifications surviennent dès le premier mois de conservation et s'accroissent avec le temps. Cela indique aussi que l'action chimique du formol s'accroît avec le temps de conservation. En matière d'application, cela suggère que la conservation d'os en milieu formolé doit être évitée pour une étude taphonomique. Cette conservation doit être évitée ce d'autant que le temps de conservation envisagé est important.

Ce travail présente plusieurs limites qu'il convient de préciser :

- L'utilisation du  $\mu$ CT seul ne permet pas d'exploration physico-chimique de l'os. Il ne permet donc pas d'explorer les variations architecturales envisagées ;
- Un seul corps a été utilisé dans cette étude. Il n'est donc pas possible de faire d'extrapolation concernant la population générale. De plus, l'âge de la personne ayant fait don de son corps ne permet pas d'être affirmatif quant au comportement d'échantillons osseux provenant d'un individu plus jeune ou de sexe féminin. Il n'est pas possible de dire dans quelle mesure l'ostéopénie relative de notre individu a pu ou non influencer le comportement osseux dans les milieux de conservation et au cours du temps ;
- Ce travail ne s'est intéressé qu'à l'os trabéculaire. Cela a été fait pour s'affranchir de l'absence de consensus sur la limite entre os trabéculaire et os cortical. Cela a également permis de se concentrer sur un os à forte porosité et dont la modification potentielle d'architecture est plus susceptible d'être identifiée au  $\mu$ CT. Cela étant, l'absence de données concernant l'os cortical peut limiter l'interprétation de nos résultats. Un travail complémentaire à ce niveau devra être réalisé ;
- Un seul type d'os a été utilisé dans ce travail. Cela est justifié par la facilité de prélever de multiples échantillons sur une voûte crânienne. La rapidité d'acquisition au  $\mu$ CT pour chaque échantillon de ce type d'os était également un argument retenu. Ce type d'ossement avait donc été choisi car il permet d'étudier de multiples fragments osseux et de répéter les mesures dans le temps. L'absence d'autre type d'ossement ne permet pas de généralisation de nos résultats. Il n'est pas possible d'assurer que le trabécule

d'une diaphyse fémorale ou humérale aura le même comportement que celui issu d'une voûte ;

- Le fait de prélever des échantillons osseux sur une voûte ne permet pas de dire si le comportement de la voûte intègre serait identique à celui des échantillons prélevés et conservés de façon indépendante. Le prélèvement, la mise à nu des bords des corticales et du trabécule, la surface d'échange qui a été augmentée par le prélèvement sont autant d'éléments imposants de considérer nos résultats comme issus de tests in vitro ;
- Le fait de travailler sur 2 milieux de conservation est limitant. Il n'est pas possible de comparer la conservation en congélation et formolé avec le résultat d'une conservation en milieu taphonomique telle qu'une conservation en terre ou en air ambiant. Des études complémentaires à ce niveau seront à réaliser. Pour autant, les 2 milieux utilisés sont ceux décrits dans de multiples publications utilisant l'os comme substrat. Il s'agissait aussi de milieux usuels de conservation de notre laboratoire pour la conservation des échantillons. Il était donc important de les tester en priorité pour déterminer si l'utilisation d'un corps frais était nécessaire par rapport à des échantillons provenant d'os congelés ou formolés ;
- Le temps de l'étude limite l'interprétation des résultats notamment en termes de comparaison avec des ossements étudiés après une conservation archéologique de plusieurs centaines d'années. Là encore, l'objectif principal du travail étant de déterminer si une conservation de faible durée affectait l'os, il n'était pas nécessaire de poursuivre sur des durées de conservation plus importante. Cette limite est donc relative.

Ce travail présente plusieurs points d'intérêt :

- en premier lieu, il permet de dire que le travail sur os frais est préférable à toute autre origine d'ossement dans une étude taphonomique. La congélation est préférable à une conservation formolée si un corps frais n'est pas disponible. Ces résultats ne sont pas généralisables, mais permettent de dire qu'en cas de conservation préalable formolée ou congelée, il est indispensable de considérer que les ossements ont été modifiés par le mode de conservation mis en place ;
- l'utilisation d'échantillons osseux humains est également un point intéressant, car les modifications mises en évidence sont interprétables sans transposition à partir d'un modèle animal ;
- Le nombre d'échantillons prélevés a permis une étude statistique analytique avec l'utilisation de tests d'analyse de variance.

Ce travail bénéficierait d'études complémentaires sur d'autres ossements humains, issus de multiples donneurs, sur des temps de conservation plus longs avec plus de milieux. Cette étude nécessite d'être confrontée à d'autres techniques d'analyse complémentaire pour déterminer l'origine des modifications architecturales constatées.

#### – **Conclusion**

Au total, ce travail met en évidence une variation importante et significative pour les différents paramètres du trabécule et de l'architecture trabéculaire au  $\mu$ CT après conservation pendant 12 mois en milieu formolé. La congélation d'échantillons osseux sur la même durée à  $-20^{\circ}\text{C}$  entraîne de très faibles variations. Ces variations sont peu significatives. Idéalement, ces deux modes de conservation ne sont pas indiqués pour une étude en taphonomie osseuse. Le travail sur os frais (ni congelé ni formolé) est préférable. S'il n'est pas possible de travailler sur des corps frais, la congélation d'un os est très préférable à une conservation formolée.

## CHAPITRE IV - MODIFICATIONS TRABÉCULAIRES AU $\mu$ CT AU COURS DU TEMPS EN ENVIRONNEMENT CONTRÔLÉ

### – Contexte

Il a été présenté dans les précédents chapitres : les facteurs identifiés et potentiels de la diagenèse osseuse (chapitre I) ; la précision du  $\mu$ CT dans une analyse osseuse taphonomique (chapitre II) ; l'influence d'une conservation préalable de l'os en congélation ou en milieu formolé dans le cadre d'un travail de taphonomie osseuse au  $\mu$ CT (chapitre III).

Comme il a été vu précédemment, le  $\mu$ CT est un outil de micro-imagerie qui n'a pas été utilisé en taphonomie osseuse jusqu'à présent. Il n'existe donc pas de données sur l'évolution architecturale trabéculaire des os humains *post mortem* au cours du temps. Dans l'optique d'approcher une technique d'estimation du délai *post mortem* osseux, nous avons travaillé sur différents types d'os humains *post mortem* au  $\mu$ CT. L'objectif de ces travaux est d'observer les variations architecturales et tenter de les caractériser. Pour cela, les études présentées par la suite se sont attachées à caractériser les modifications trabéculaires au  $\mu$ CT après une conservation dans un milieu dit « standard ».

Les connaissances sur la taphonomie osseuse étant limitée à l'heure actuelle et quasi-inexistantes au  $\mu$ CT nous nous sommes attachés à étudier les variables osseuses dans les conditions *in vitro* les plus stables possible. L'idée étant de collecter des premières données de référence puis de faire varier les conditions environnementales une à une pour étudier leurs influences respectives. Le milieu de conservation qui a été déterminé comme étant le milieu de référence ou « standard » devait être facile à réaliser, facilement reproductible et suffisamment stable pour limiter les biais. Nous avons retenu de réaliser les expériences dans le laboratoire (ou en « indoor » pour des raisons de facilité de mise en place. L'expérimentation en extérieur (ou « outdoor ») était une possibilité, mais elle ne pouvait être envisagée pour des données de référence, les conditions environnementales changeant beaucoup. De plus, les conditions environnementales outdoor dans le nord de la France n'étant pas transposables avec celles d'un autre pays ou même d'une autre région, il ne semblait pas logique de créer une collection *in vitro* et de référence avec des paramètres aussi peu comparables. Nous avons donc choisi de travailler en laboratoire, en air ambiant sous hotte avec un renouvellement d'air de 450m<sup>3</sup>/h. Cet environnement et le renouvellement d'air sont à l'origine d'une probable déshydratation intense qu'il convient de considérer dans les biais éventuels. Nous avons travaillé à une

température stable et contrôlée de 20°C à la fois parce qu'il s'agit d'une température modérée qui est facilement mise en place en laboratoire et parce qu'elle avait déjà été décrite (Delannoy et al 2016 ; Delannoy et al 2017). Le niveau d'hygrométrie de la pièce de conservation a été vérifié et est resté stable à 60%. Ces paramètres environnementaux ont été contrôlés quotidiennement pendant les 3 premiers mois de conservation à l'aide d'une sonde thermique et hygrométrique (Testo 445 © Sparta, New Jersey, USA). Ce contrôle mettait en évidence une minime variation de température autour 20°C (+/- 0,5) et d'hygrométrie autour 60% (+/-10%), permettant de valider la stabilité de ces paramètres. Les échantillons ont été conservés dans des pots en plastique avec l'alternance naturelle du jour et la nuit, sans être proche d'une source de chaleur ou de lumière spécifique.

Trois études ont été réalisées conjointement lors du travail de thèse. Une première étude sur les modifications précoces sur les 4 premières semaines au  $\mu$ CT de fragments issus d'une voûte crânienne humaine *post mortem* et conservés dans le milieu dit « standard ». Une seconde étude a été réalisée sur le même type d'échantillon mais en plus grand nombre sur une période de conservation un peu plus longue de 10 semaines. Une troisième étude a été réalisée sur des fragments de côtes humaines *post mortem* après 6 mois et 36 mois de conservation en milieu standard.

#### – Étude n°1 – Fragments de voûte crânienne conservés 4 semaines

- Matériels et méthode
  - Type d'os et origine des ossements

Nous avons utilisé des os humains dans cette étude. Une voûte crânienne a été collectée après le décès d'un individu ayant fait don de son corps à la science auprès du laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Lille (UTML&A EA 7367). Le cadavre n'avait pas été préalablement préparé ou modifié avec un traitement au formaldéhyde ou des soins funéraires. La rareté de ce type d'échantillon (corps humains non embaumés) a limité le travail actuel à une seule voûte crânienne. Le sujet était un homme d'une taille de 172 cm et pesant 50 kg. L'âge au décès était de 88 ans. La cause du décès était une insuffisance cardiaque aiguë sur une

insuffisance cardiaque chronique avec hypertrophie du ventricule gauche. Le sujet avait comme antécédent médical documenté de l'hypertension artérielle non traitée.

La voûte du crâne a été prélevée dans les 48 h après le décès avec une extraction au-dessus de la partie horizontale de l'os frontal et à 1 cm au-dessus des sutures squameuses sur les os pariétaux. L'os a été séparé manuellement des chairs (figure IV – 1).



Figure IV – 1. La voûte crânienne après section transversale et avec les points d'échantillonnages en vue du prélèvement de fragment de voûte au trépan.

Quatre échantillons d'os ont été extraits de la voûte selon la cartographie expliquée dans le chapitre III. Quatre échantillons de l'os pariétal (deux de la partie droite et deux de la partie gauche) ont été extraits avec un trépan de 9 mm de diamètre en titane. Les quatre échantillons ont été appelés pariétal gauche (LP) 21, pariétal droit (RP) 21, LP33 et RP33.

Les quatre échantillons d'os ont été placés dans l'environnement contrôlé nommé milieu « standard » tel que décrit précédemment.

Après extraction, les échantillons ont été scannés avec un  $\mu$ CT (paramètres en tableau IV – 1) avec un appareil haute résolution Bruker © SkyScan 1172, version matérielle 6, version logicielle 1,5. La même procédure a été effectuée chaque semaine pendant le premier mois après l'extraction de la voûte.

La reconstruction et les analyses des scans ont été effectuées après l'acquisition. Des paramètres  $\mu$ CT identiques ont été utilisés pour les premières (t0), seconde (t1, après 7 jours de conservation), troisièmes (t2, après 14 jours de conservation) et la quatrième acquisition (t3, après 21 jours de conservation).

Tableau IV – 1. Paramètres d'acquisition au  $\mu$ CT pendant les 4 semaines de conservation.

Medium	Air	Temps d'exposition	200 ms
Température dans la chambre d'acquisition	27°C	Pas de rotation	0.4 °
Résolution	10 $\mu$ m	Frame averaging	10
Tension	80 Kv	Rotation	180°
Intensité	100 $\mu$ A	Taille du voxel	10 $\mu$ m
Filtre	aluminium (0,5 mm)	Ring artifact	7
Distance caméra	Longue	Beam Hardening	25%

Les reconstructions ont été réalisées à l'aide du logiciel NRecon © (version 1.6.9.8). Après reconstruction, les images ont été enregistrées avec le premier (t0) ensemble d'images comme référence. Une superposition des images (ou registration) a été effectuée pour supprimer les différences de positionnement entre les temps d'acquisition. La registration nous a permis d'enregistrer un ensemble de données cible avec la même structure physique 3D que l'ensemble d'origine. La procédure de registration a toujours été identique, avec une première étape manuelle suivie d'une étape de registration 3D automatique (telle que précisé dans le chapitre II).

Le logiciel CTan © (Bruker, Kontich, Belgique) (version 1.14.4.1) a été utilisé pour les analyses de données après reconstruction et registration. Ce logiciel nous a permis de calculer les caractéristiques volumétriques et morphométriques dans un volume d'intérêt défini (VOI). Notre VOI était un volume cylindrique d'os trabéculaire de 6,5 mm de diamètre (à l'intérieur du diamètre total de 9 mm de l'échantillon osseux) et de 1,01 mm de hauteur. Le VOI était plus petit que l'échantillon pour éviter d'éventuels artefacts dus à la coupe de l'échantillon. Une coupe référentielle a été déterminée pour avoir un volume étudié systématique et reproductible. D'après nos observations et expériences précédentes, la coupe ayant le plus faible taux d'os sur la coupe (BA) par rapport à la surface totale sur la coupe (TA) reste la même après des enregistrements répétés. Cette tranche a été considérée suffisamment cohérente pour maintenir le rapport de tranche BA / TA minimum pour une tranche de référence pour chaque échantillon

au cours du temps. Cinquante tranches ont été ajoutées au-dessus et sous cette tranche référentielle pour créer le VOI. La surface et le volume ont été analysés dans ce VOI comme un seul cylindre.

Les variables étudiées comprenaient le volume total (TV), le volume osseux (BV), la surface osseuse (BS), le nombre de trabécules (Tb.N), l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) et la distance moyenne entre les trabécules (Tb.Sp).

Chaque échantillon a été observé séparément et comparé à lui-même au fil du temps, et il n'y avait aucune comparaison inter-échantillons.

Des statistiques descriptives ont été réalisées pour chaque échantillon. Des statistiques analytiques ont été réalisées pour chaque variable avec un test de Shapiro-Wilk pour tester la normalité de distribution des variables et une Anova à mesures répétées si possible. Il a été réalisé un test de Friedman (non paramétrique) en cas de non-normalité des distributions. Le faible échantillon disponible dans ce travail indiquait néanmoins de garder une réserve sur l'interprétation des statistiques analytiques. L'ensemble du travail statistique a été réalisé avec Excel® et XIStat®.

- Résultats et discussion

Le volume osseux (BV) a présenté une tendance à la diminution pour les 4 échantillons aux cours du temps (figure IV – 2 et IV – 3). La différence moyenne pour le volume osseux entre l'extraction et après un mois de conservation est de -1,9%. Nous observons des variations importantes entre l'extraction de l'échantillon et les différents temps de conservation. La distribution des variables satisfaisant le test de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ), une analyse par Anova à mesures répétées a été réalisée. Elle met en évidence une différence significative au cours du temps avec  $p = 0,012$ . Concernant l'observation de la variable BV, il est observé pour RP21, RP33 et LP33 une ré-augmentation du volume osseux sur le dernier temps d'acquisition. Il est peu probable que ces variations soient liées à un biais technique en raison de l'utilisation de la superposition des images. L'ordre de grandeur des variations observées (autour de  $0,3 - 0,5 \text{ mm}^3$  de variations) est également trop important pour que ces observations soient attribuées à une erreur ou à un biais technique d'acquisition au  $\mu\text{CT}$ .

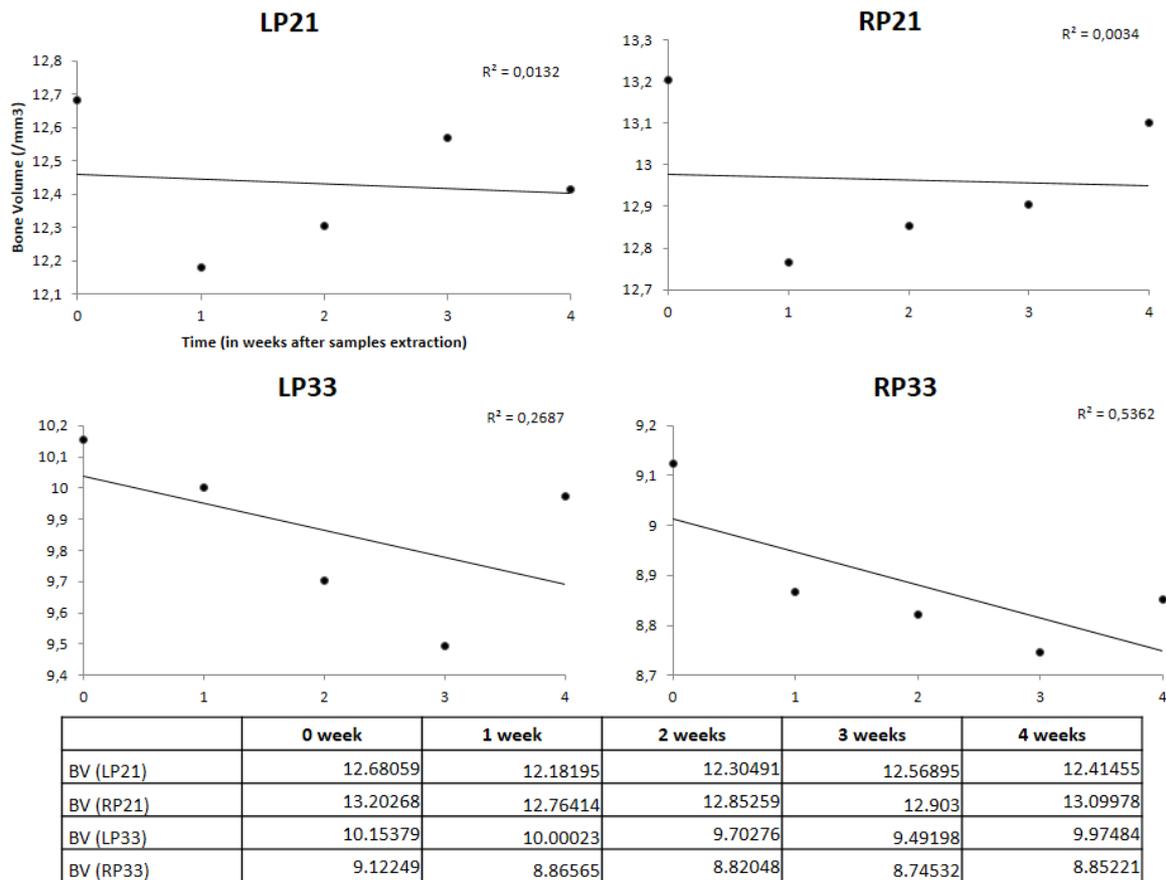


Figure IV – 2. Les variations de volume osseux (BV) pour les 4 échantillons au cours du temps.

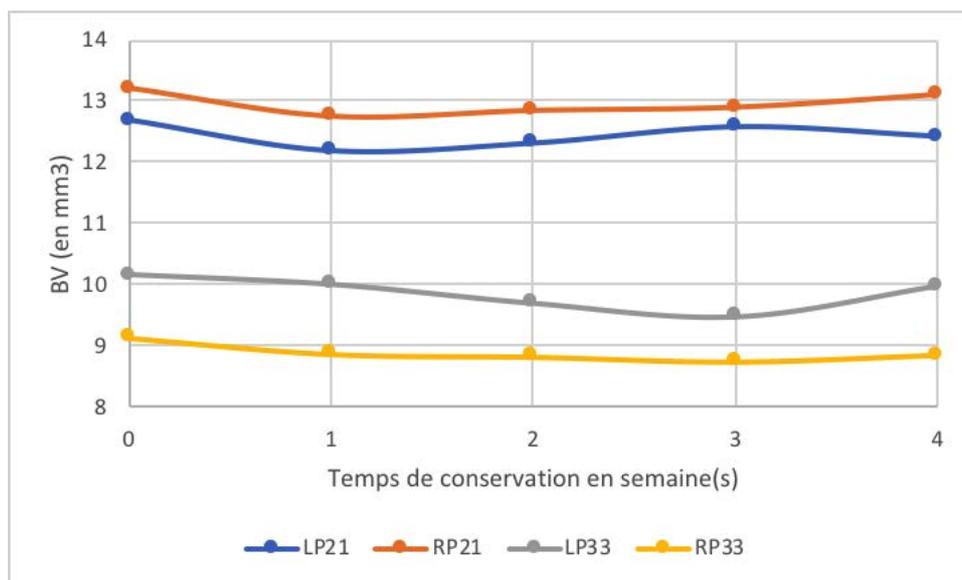


Figure IV – 3. Les variations de volume osseux (BV) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Une tendance à la diminution a également été observée pour la surface osseuse (BS) (figure IV – 4 et IV – 5) avec une différence moyenne de – 5,1 %. Ces modifications sont significatives avec un  $p < 0,0001$  lors du test d'analyse de variances pour mesures répétées (après validation du test de normalité). Pour le nombre de trabécules (TbN) (figure IV – 6 et IV – 7) il est également observé une tendance à la diminution avec une différence moyenne de – 12,35 %. Cette variation est significative avec un  $p < 0,0001$  par analyse de variance. La comparaison des temps par une analyse de Bonferroni met en évidence une différence survenant spécifiquement entre le temps 0 (celui de l'extraction) et les autres temps d'acquisition avec un  $p < 0,001$ .

L'épaisseur trabéculaire (TbTh) (figure IV – 8 et IV – 9) montre des variations. Il est observé une tendance à l'augmentation et une variation moyenne de 12,7 % entre le temps 0 (extraction) et après un mois de conservation. Cette variation est significative (Anova à mesures répétées) avec un  $p = 0,002$ .

La séparation trabéculaire moyenne (TbSp) (figure IV – 10 et IV – 11) présente une tendance à la hausse pour 3 des échantillons et une variation moyenne de 5,55 %. L'échantillon RP21 présente une tendance différente avec petite diminution et une variation de 0,8 % entre l'extraction et après un mois de conservation. Ces variations ne sont pas significatives (Anova à mesures répétées) avec un  $p = 0,092$ .

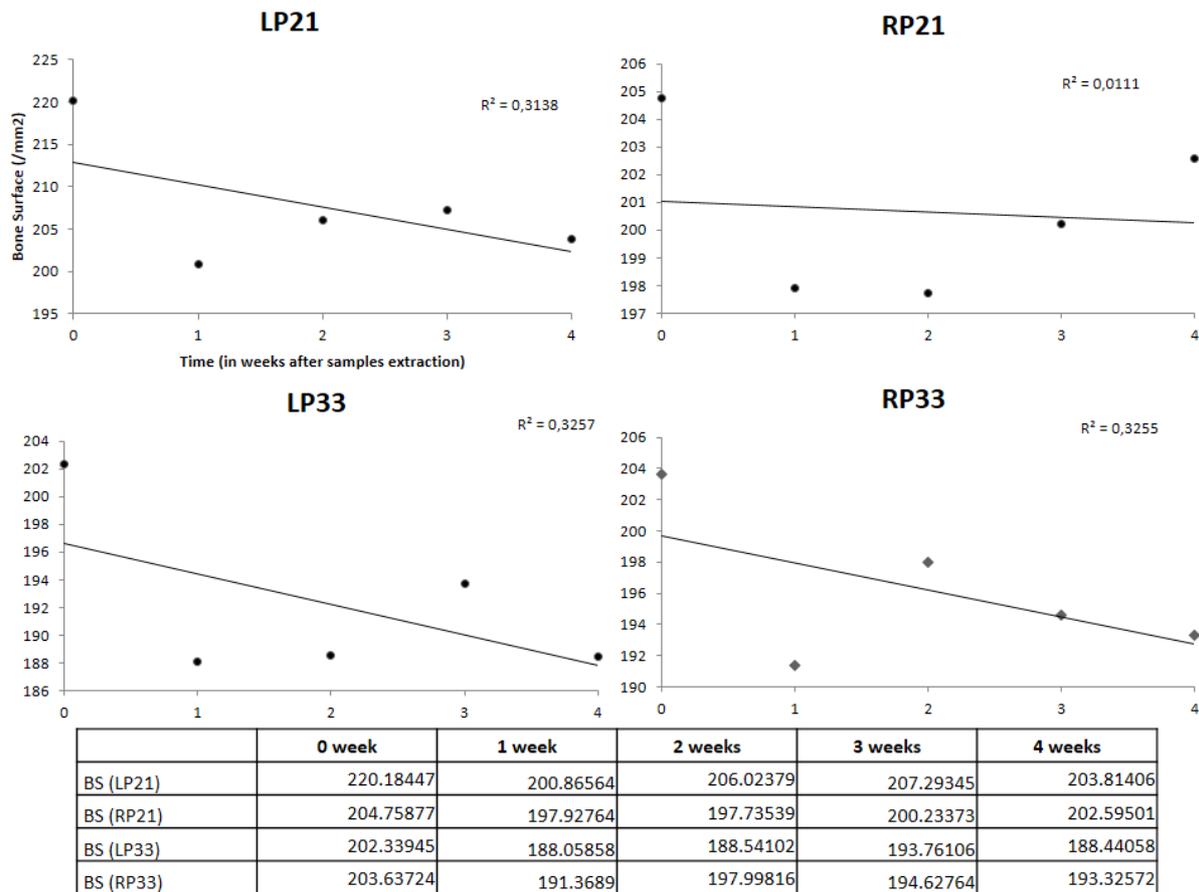


Figure IV – 4. Les variations de la surface osseux (BS) pour les 4 échantillons au cours du temps.

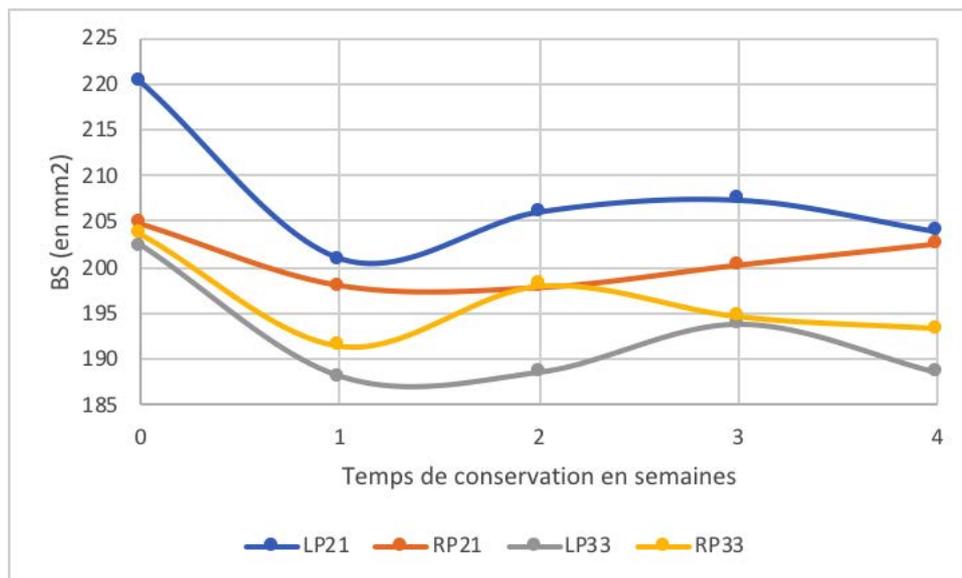


Figure IV – 5. Les variations de la surface osseuse (BS) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

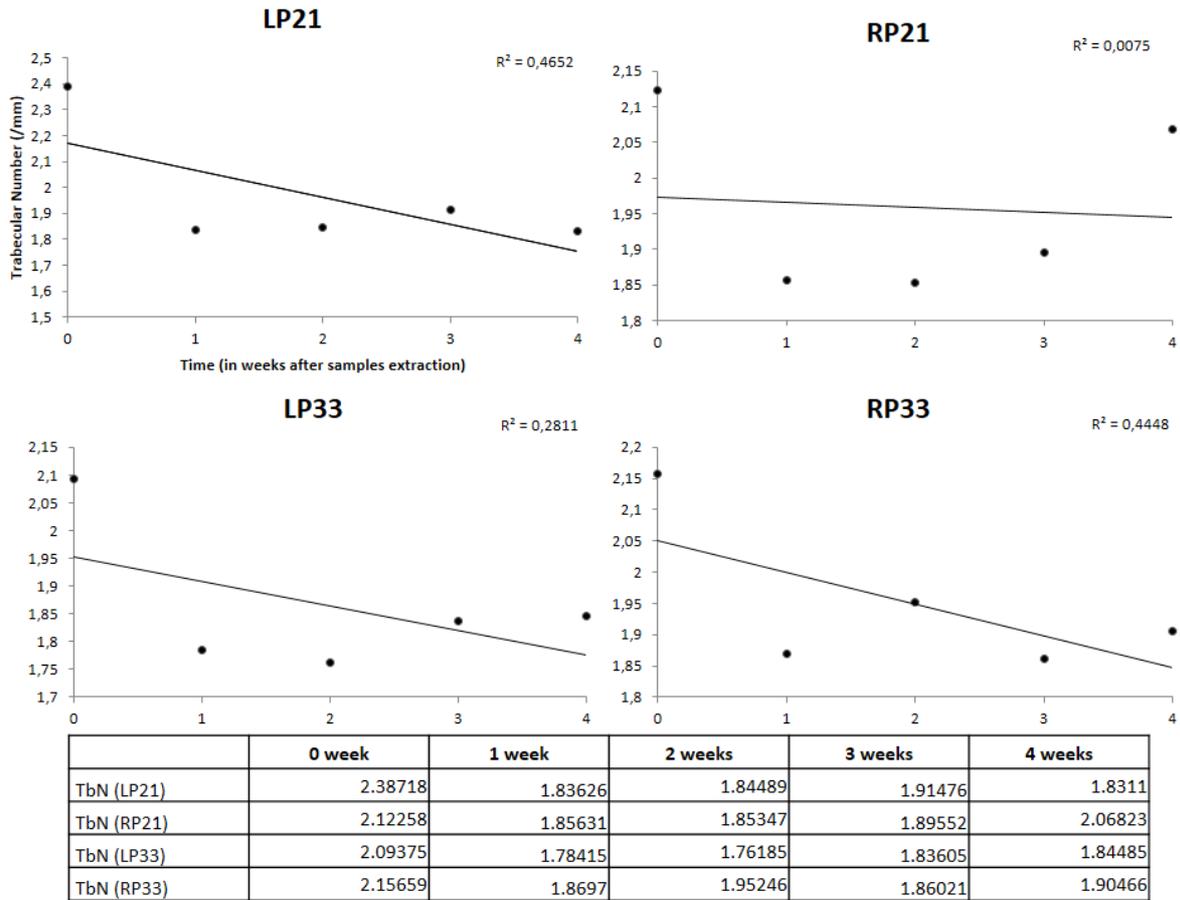


Figure IV – 6. Les variations du nombre de trabécules (TbN) pour les 4 échantillons au cours du temps.

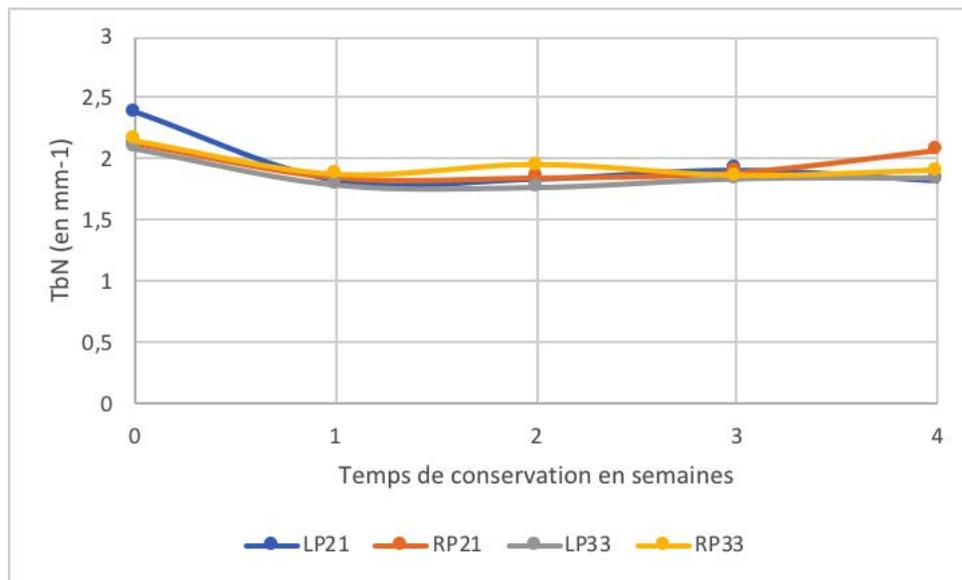


Figure IV – 7. Les variations du nombre de trabécule par millimètre (TbN) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

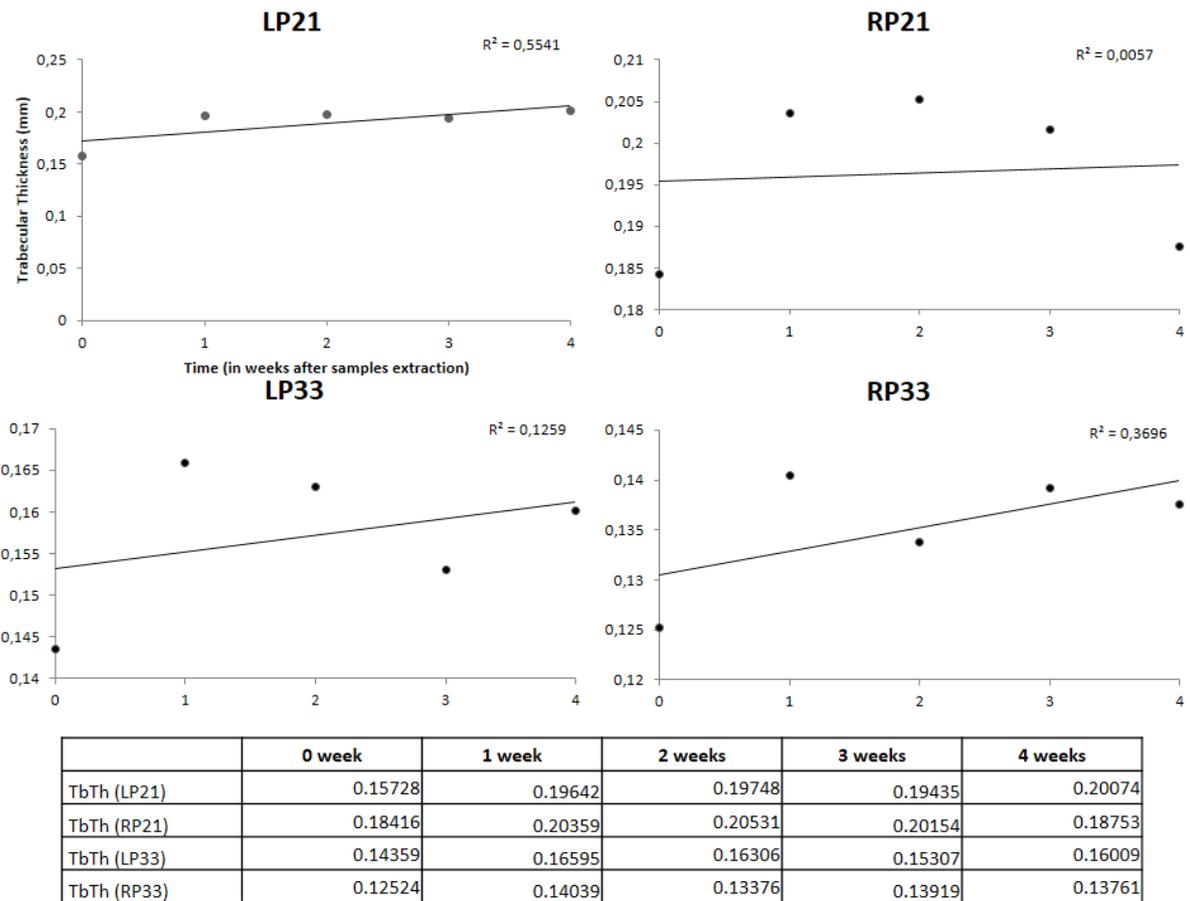


Figure IV – 8. Les variations de l'épaisseur trabéculaire (TbTh) pour les 4 échantillons au cours du temps.

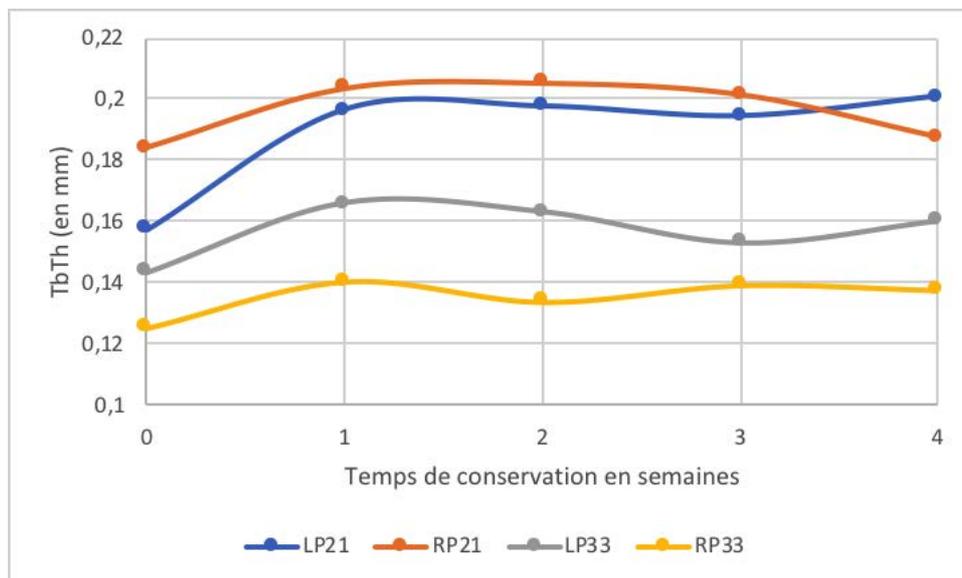


Figure IV – 9. Les variations de l'épaisseur trabéculaire moyenne (TbTh) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

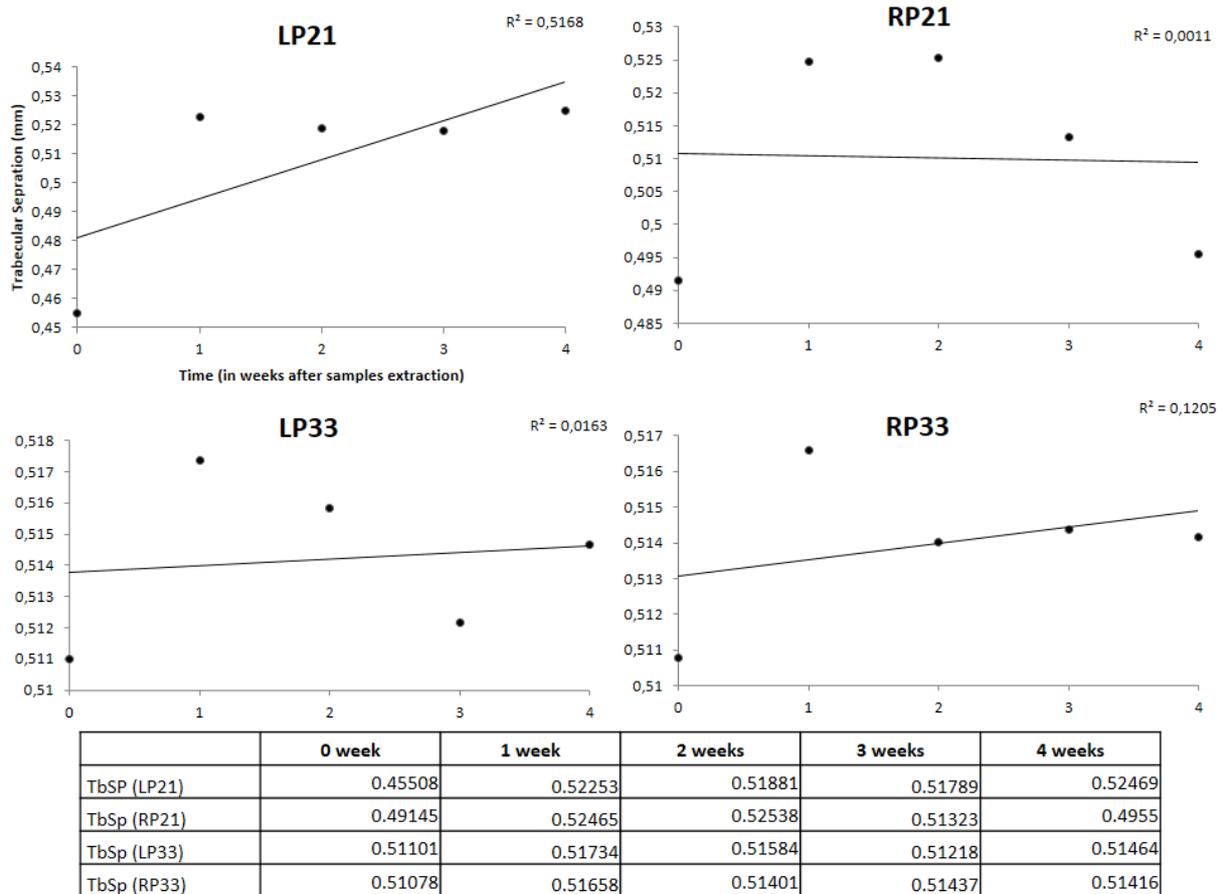


Figure IV – 10. Les variations de la séparation trabéculaire (TbSp) pour les 4 échantillons au cours du temps.

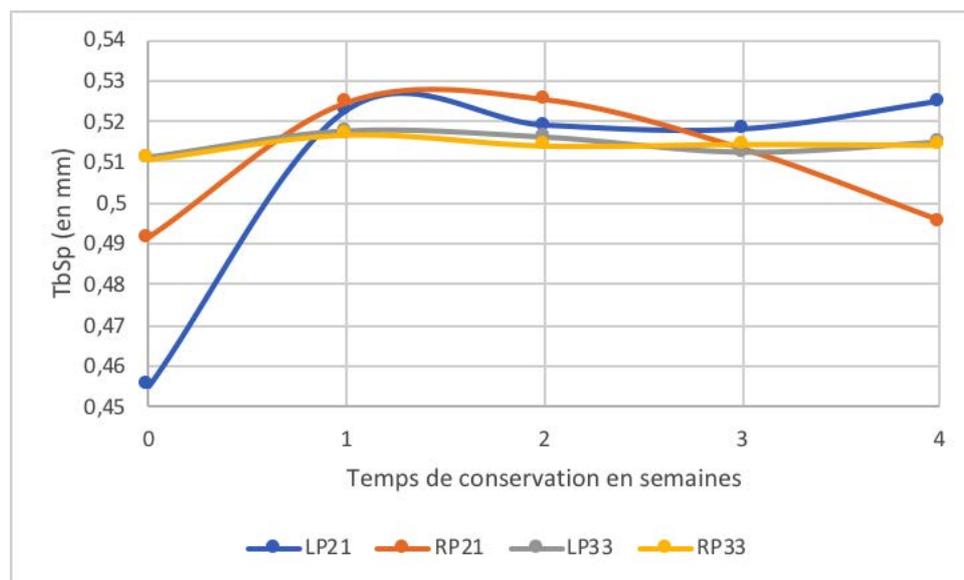


Figure IV – 11. Les variations de séparation trabéculaire moyenne (TbSp) pour les 4 échantillons sur le même graphique au cours des 4 semaines de conservation.

Notre travail a mis en évidence une diminution moyenne et significative du volume osseux (BV) au cours du premier mois de conservation en milieu dit « standard ». L'analyse au  $\mu$ CT ne permet pas de déterminer avec certitude les phénomènes liés à cette diminution. Cette observation est néanmoins concordante avec la littérature qui fait état d'une modification et d'une altération *post mortem* précoce. Cette modification survient principalement sur la partie organique de l'os (Castellano et al 1984 ; Bertoluzza et al 1997 ; McLaughlin & Lednev 2011). La déshydratation osseuse *post mortem* (Delannoy et al 2016) favorisée par la préparation de nos échantillons associée à des modifications collagéniques précoces pourraient être l'explication derrière nos constatations. Cette hypothèse est soutenue par les autres variables étudiées au  $\mu$ CT puisque la surface osseuse diminue conjointement à un espacement des trabécules qui augmente. Le nombre de trabécules diminue dans le même temps. L'augmentation de l'épaisseur trabéculaire peut ici être vue selon deux hypothèses : une augmentation réelle de l'épaisseur moyenne des trabécules ou un « recrutement » des trabécules plus épais au cours du temps au détriment des trabécules plus fins qui s'altèrent voire disparaissent. La première de ces hypothèses ne permettant pas d'être expliquée ou même étayée par la littérature, la seconde hypothèse semble pertinente. Cette seconde hypothèse permet également d'être cohérent avec les autres résultats mis en avant ici. Il est intéressant de noter que l'observation des tendances montre des variations à quasiment tous les temps d'analyse. Il est observé notamment des variations majeures entre l'extraction des échantillons et la première semaine d'acquisition. Cette observation est de nature à conforter le rôle de la déshydratation osseuse dans les modifications précoces tel que cela a déjà été décrit au travers de la perte de masse osseuse *post mortem* par Delannoy et al (Delannoy et al 2016).

Le rôle d'une possible attaque bactérienne sur ces échantillons est a priori faible puisque la préparation des fragments osseux par séparation mécanique des chairs a probablement fortement limité la population bactérienne résiduelle. Par ailleurs, la conservation dans un milieu sec avec un renouvellement d'air constant et important est également à même de limiter la prolifération bactérienne (Fiedler & Graw 2003) notamment des germes se développant en *post mortem*. Enfin, les manipulations des ossements tout comme le milieu de conservation n'ont pas favorisé un tel développement bactérien.

Plusieurs limites doivent être rapportées dans ce travail :

- les multiples modifications et manipulations de l'os ne permettent pas d'interprétation applicative au champ de la médecine légale. Notre étude est réalisée in vitro au regard de ces modifications ;

- l'absence de possibilité d'interprétation des phénomènes physico-chimiques à l'aide du  $\mu$ CT est une limite d'interprétation et de validation des hypothèses. Des analyses associées et complémentaires pourraient permettre de comprendre les phénomènes sous-jacents ;
- la résolution avec un pixel à 10  $\mu$ m a également pu constituer une limite dans le sens où des informations ont été moins collectées à cette résolution qu'avec une résolution plus fine sur l'épaisseur et le nombre de trabécule. A ce niveau, le temps pour chaque acquisition est directement corrélé à cette résolution. L'augmentation de la résolution fait croître exponentiellement le temps des expérimentations. La résolution à 10  $\mu$ m a été retenue car elle permet une étude correcte du trabécule humain (d'une taille entre 50 et 200  $\mu$ m) (Bouxsein et al 2010) ;
- l'étude a été réalisée sur un seul individu et sur 4 fragments issus de cet individu. Ce faible échantillon osseux d'un unique sujet nécessite une prudence dans l'interprétation des résultats descriptifs et analytiques (malgré la robustesse statistique des analyses de variance). Cette limite méthodologique nécessite aussi une prudence dans l'extrapolation de ces résultats. Des études complémentaires avec d'autres sujets et plus d'échantillons devront être menées. Le fait que seul des fragments de voûte du crâne aient été étudiés nécessite également de réaliser des travaux complémentaires sur d'autres os en *post mortem* pour confronter les comportements des différents types d'ossements ;
- l'âge avancé du donneur est également un facteur important de limitation de l'interprétation de nos résultats, puisque le terrain probablement ostéopénique du sujet ne permet pas d'extrapoler le comportement osseux observé à la population générale.

Malgré ces biais, ce travail montre des variations du trabécule humain *post mortem* précocement après la mort et en conservation dite « standard » au  $\mu$ CT. L'utilisation de cette technique d'imagerie permet la collecte de données histo-morphométrique sur un grand volume avec un caractère non destructeur assurant de pouvoir comparer chaque échantillon à lui-même au cours du temps. La réalisation d'étapes de contrôle de la qualité des images tel que la surperposition des images permet de s'assurer que les variations constatées sont liées à la diagénèse osseuse et non à un biais de la technique d'acquisition. Malgré les limites statistiques, la plupart des variables qui ont été analysées sont significativement modifiées, avec un test robuste s'agissant des analyses de variances pour mesures répétées.

- Conclusion :

Ce travail a montré qu'il existe des modifications trabéculaires sur des fragments de voûte crânienne humaine *post mortem* au cours du premier mois de conservation dans un environnement contrôlé en utilisant un  $\mu$ CT. Ces résultats prometteurs encouragent à réaliser de futures études permettant des analyses statistiques sur de plus grand échantillons avec des durées de conservation plus longues.

– **Étude n°2 – Fragments de voûte crânienne conservés 10 semaines en milieu dit « standard »**

- Matériels et méthode
  - Type d'os prélevé :

Nous avons collecté une voûte crânienne humaine issue d'un don du corps à la science (UTML&A EA 7367). Le corps était frais c'est à dire non formolé ni congelé.

Nous avons appliqué des critères d'exclusion comme dans les travaux précédents et dans l'étude précédemment décrite ([Le Garff et al 2016](#)), à savoir :

- le sexe féminin,
- les antécédents médicaux de maladie osseuse,
- de cancer avec métastases osseuses possibles,
- les carences nutritionnelles avérées et les pathologies endocriniennes avérées,
- les antécédents de fracture du crâne ou de chirurgie du crâne.

Ces critères d'exclusion visaient à limiter l'ostéopénie et la présence d'éléments pathologiques pouvant être à l'origine de biais d'interprétation.

Une seule voûte crânienne a été recueillie en *post mortem* immédiat. Le sujet était un homme de 88 ans. La cause du décès était une insuffisance cardiaque aiguë (sans précision). La voûte crânienne a été prélevée sur le corps douze heures après la mort.

La voûte du crâne était extraite au-dessus de la partie horizontale de l'os frontal et à un centimètre au-dessus des sutures des os pariétaux. L'os a été séparé manuellement des chairs, en prenant garde de ne pas endommager le périoste (notamment par ripage en extrayant les chairs).

Dix échantillons d'os ont été extraits de cette voûte, conformément à une cartographie créée précédemment dans notre laboratoire (décrite dans l'étude précédente et dans [Le Garff et al 2016](#)). Cette méthode permet une procédure de collecte d'échantillons systématisée

Après randomisation pour sélectionner les échantillons selon la cartographie, dix échantillons ont été extraits de l'os pariétal droit en utilisant un trépan en titane de 9 mm de diamètre. Les dix échantillons ont été étiquetés selon la cartographie comme RP 11, 13, 14, 15, 23, 31, 41, 61, 64 et 65 (figure IV - 12).

Les dix échantillons d'os ont été placés dans l'environnement de conservation.

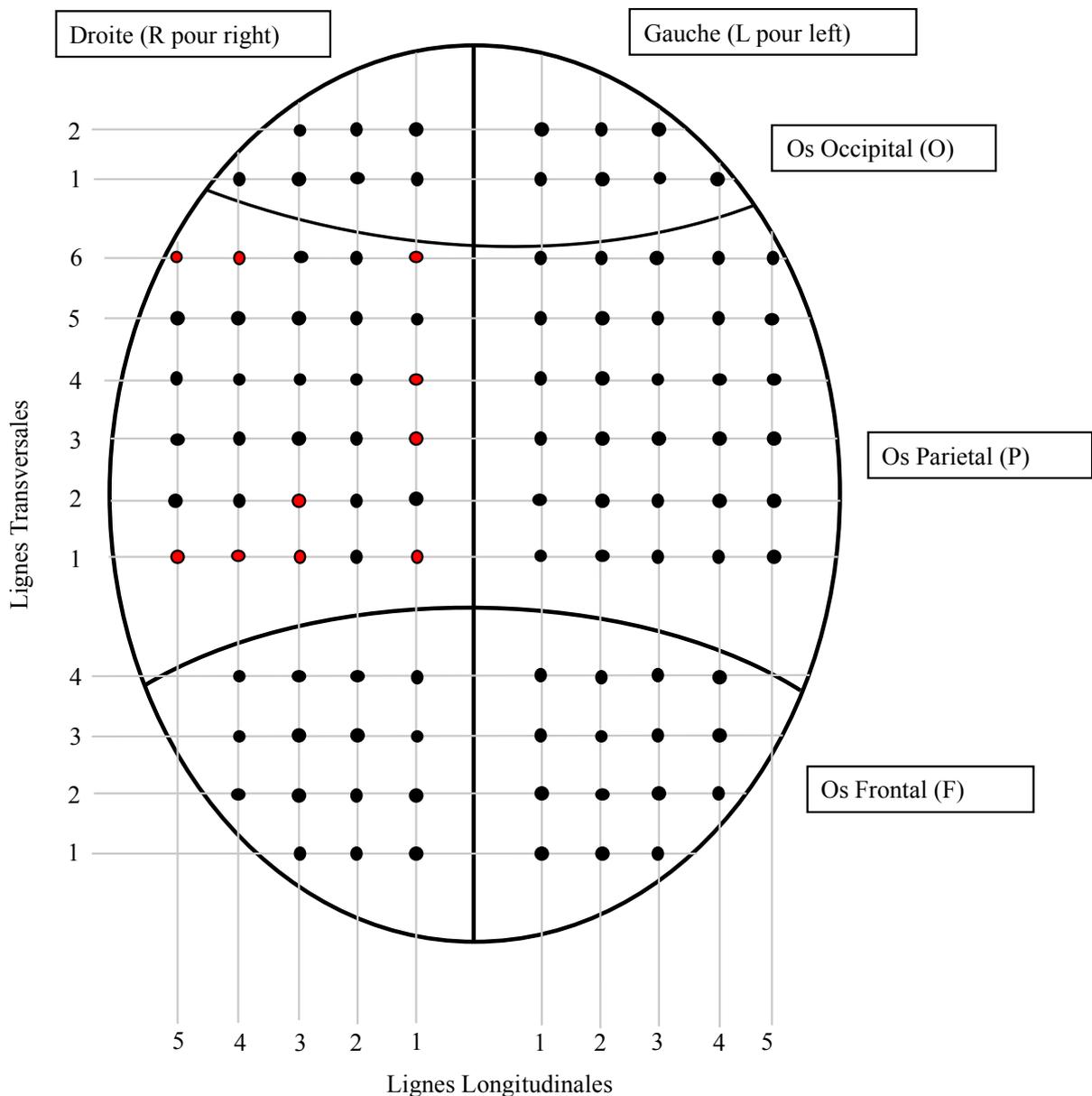


Figure IV – 12. La cartographie de pointage des échantillons au sein de laquelle la randomisation a déterminé quels échantillons allaient être prélevés. Les points rouges représentent les échantillons effectivement prélevés.

- Conditions de conservation des échantillons :

Nous avons conservé les dix échantillons dans un environnement contrôlé et stable en température et en hygrométrie tel que décrit dans l'étude précédente et [Le Garff et al 2016](#). Ce milieu est nommé milieu « standard ». Les échantillons ont été placés à la surface d'une boîte de verre dans une hotte de laboratoire à 20 °C, avec une humidité de 60% avec de la lumière naturelle entre chaque acquisition  $\mu$ CT. Les données météorologiques de l'environnement ont été contrôlées quotidiennement via une sonde climatique (Testo 445 © Sparta, New Jersey, USA). Ces conditions de conservation ont été retenues car elles correspondent à la température intérieure actuelle contrôlée et stable de notre laboratoire d'analyse en France. Il s'agit aussi de conditions facilement reproductibles en laboratoire. De plus, cela a été retenu car notre laboratoire a déjà réalisé des travaux en taphonomie osseuse dans ces conditions, permettant une comparaison entre nos observations et celles réalisées précédemment.

- Acquisitions et traitement des données au  $\mu$ CT :

Après extraction, les échantillons ont été analysés à l'aide d'un  $\mu$ CT ( $\mu$ CT haute résolution Bruker © SkyScan 1172, version matérielle 6, version logicielle 1.5) avec des paramètres constants d'acquisition, de reconstruction et d'analyse (résumés dans le tableau IV – 1) et identiques à ceux de l'étude précédemment décrite.

Chaque échantillon a été analysé toutes les deux semaines pendant 10 semaines. Une reconstruction, une superposition des images (registration) et une analyse 3D de chaque échantillon ont ensuite été effectués. Après reconstruction, les images ont été superposées au premier temps d'acquisition (temps 0). Cette registration a été réalisée comme l'étude précédente et dans [Le Garff et al 2016](#) et [Le Garff et al 2017](#).

Le volume d'intérêt était un volume cylindrique d'os trabéculaire (à l'intérieur du diamètre total de 9 mm de l'échantillon osseux) qui mesurait 6,5 mm de diamètre et 1,01 mm de hauteur. Une coupe de référence a été déterminée pour avoir un volume d'étude qui soit systématique et reproductible. D'après nos observations et expériences précédentes, la coupe ayant le plus faible

taux d'aire osseuse (BA) par rapport à l'aire totale analysée (TA) reste la même au cours du temps et lors d'acquisitions répétées d'un même échantillon. Cent coupes ont été choisies en dessous et au-dessus de cette coupe de référence.

Nous avons étudié les variables suivantes au  $\mu$ CT : le volume osseux (BV), la surface osseuse (BS), le rapport BS sur BV, le nombre de trabécules (Tb.N), l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th) et la distance moyenne entre les trabécules (Tb.Sp ). Nous avons également étudié le motif trabéculaire (TbPF) qui est un indice de connectivité inverse. TbPF est calculé en 3D, en comparant le volume et la surface du solide binarisé avant et après une seule dilatation de l'image voxel (Bouxsein et al 2010). En conséquence, un TbPF inférieur signifie que le réseau trabéculaire est très connecté tandis qu'un TbPF élevé signifie un réseau trabéculaire moins connecté. Une prédominance de cavités fermées et de surfaces concaves peut engendrer des valeurs de TbPF négatives (comme pour le SMI). Le TbPF est donc un indice relatif de la connectivité du réseau trabéculaire, la valeur absolue de cette variable n'a pas de sens ou d'interprétation stricte.

Chaque échantillon a été analysé séparément et comparé à lui-même au cours du temps. Il n'y a pas eu de comparaison entre les échantillons.

- Analyses statistiques :

Nous avons comparé les mesures osseuses et architecturales des trabécules (BV, BS, BS/BV, TbPF, TbN, TbTh, TbSp) obtenues à partir des 10 échantillons pendant les 10 semaines d'observations en utilisant un modèle linéaire mixte pour mesures répétées (modèle de covariance non structuré) avec un contraste linéaire. Cette analyse statistique a été faite pour évaluer si l'évolution dans le temps était linéaire. Des comparaisons post-hoc ont été effectuées en cas de différence significative entre les semaines d'observation. La normalité des résidus du modèle a été vérifiée via un diagramme de probabilité normal. En raison de la nature exploratoire et de la petite taille de l'échantillon dans cette étude, nous n'avons pas ajusté pour des comparaisons multiples. Les résultats actuels ne doivent être considérés que comme générant une hypothèse. Les tests statistiques ont été réalisés au niveau bilatéral  $\alpha$  de 0,05. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAS, version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

○ Résultats et discussion

Les effets statistiques des 10 semaines de conservation sont résumés dans le tableau IV – 2. Nous mettons en évidence une différence significative au cours du temps pour le rapport de la surface sur le volume osseux (BS/BV) avec un  $p = 0,046$ . Nous observons un résultat significatif pour la séparation trabéculaire (TbSp) avec un  $p < 0,001$ . Les comparaisons par paires pour les deux variables significativement différentes au cours du temps sont résumées dans le tableau IV – 3. Nous mettons en évidence des différences significatives précoces situées entre l'extraction et la première analyse de l'os et après deux semaines de conservation. Les temps d'analyses suivants ne sont pas significativement différents du temps d'analyse après 2 semaines de conservation.

Aucune autre différence significative n'a été observée pour les autres paramètres au cours des semaines de conservation.

Tableau IV – 2 : Comparaison des mesures au  $\mu$ CT après 10 semaines de conservation.

<i>Variables « osseuse » générale</i>		<i>Variables trabéculaires</i>	
<i>Variable</i>	<i>p</i>	<i>Variable</i>	<i>p</i>
BV	0,18	TbPF	0,5
BS	0,093	TbTh	0,14
BS / BV	0,046 *	TbN	0,36
		TbSp	< 0,001 *

\* Statistiquement significatif (au risque  $\alpha$  de 0,05)

Tableau IV – 3. Les tests de comparaison par paires entre les temps d'acquisition mettant en évidence pour le rapport surface / volume d'os (BS/BV) et pour la séparation trabéculaire (TbSp) des différences survenant significativement entre la première et la seconde analyse, soit après deux semaines de conservation.

Temps de conservation en semaines	p-value pour BS/BV	p-value pour TbSP
0 – 2	0,013 *	< 0,001 *
2 – 4	1	1
4 – 6	0,97	1
6 – 8	1	1
8 – 10	1	1

\* Statistiquement significatif (au risque  $\alpha$  de 0,05)

Concernant l'analyse des données, les figures IV – 13 à IV – 26 reprennent les tendances des variables étudiées pour chaque échantillon et des tendances autour de la moyenne. Concernant

le volume osseux, la tendance linéaire autour de la moyenne montre une tendance à la diminution, malgré une variation moyenne du BV après 8 semaines (figure IV – 13). Surtout, la répartition des variables est assez homogène à chaque temps d’acquisition (figure IV – 14). Cela suggère que le comportement des échantillons a été relativement stables au cours du temps. Cette répartition des variables ne suscite pas non plus d’interrogation quant à d’éventuels biais technique.

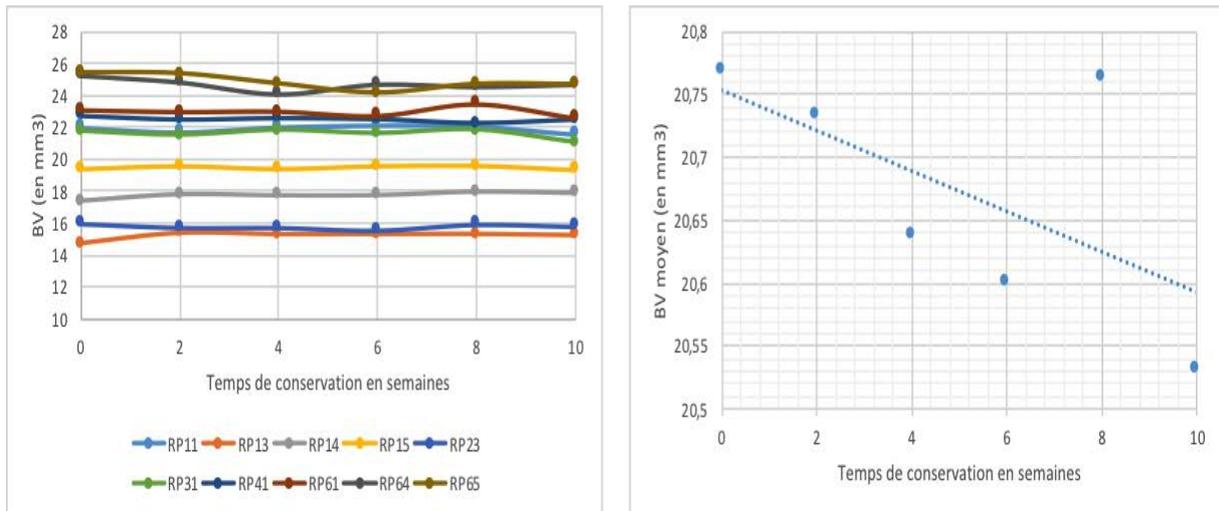


Figure IV – 13. Valeurs de volume osseux (BV en mm<sup>3</sup>) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d’acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

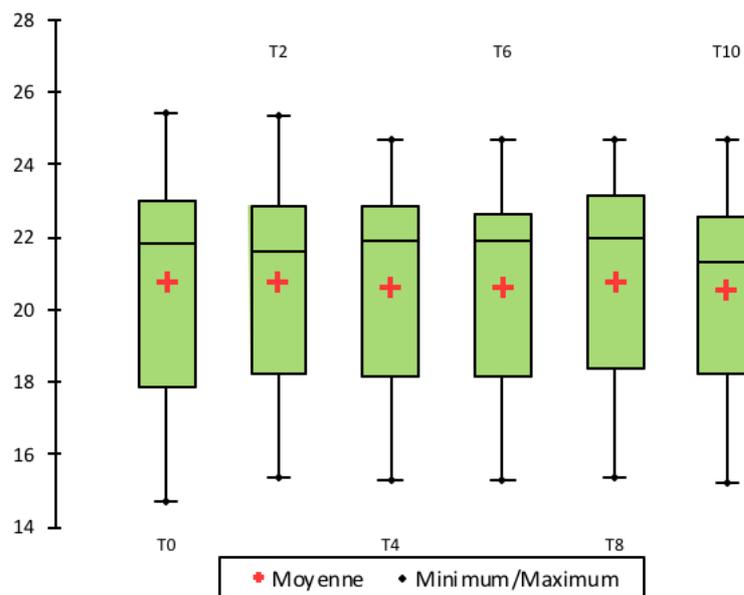


Figure IV – 14. Box plots des valeurs du volume osseux (BV en mm<sup>3</sup>) pour l’ensemble des échantillons à chaque temps d’acquisition.

S'agissant de la surface osseuse (BS – figures IV – 15 et 16), la tendance est à la diminution avec une diminution visible (figure IV – 15) sur les premières semaines de conservation. Là encore, la distribution des résultats est assez homogène (figure IV – 16). Certains échantillons montrent des variations importantes sur la 6<sup>ème</sup> et sur la 8<sup>ème</sup> semaine de conservation. Ces observations doivent faire évoquer un biais technique. Ce biais n'est cependant pas étayé par la distribution des variables au cours du temps. Un contrôle à posteriori de chaque étape, notamment de registration, n'a pas montré de biais technique identifiable pour ces temps d'analyse.

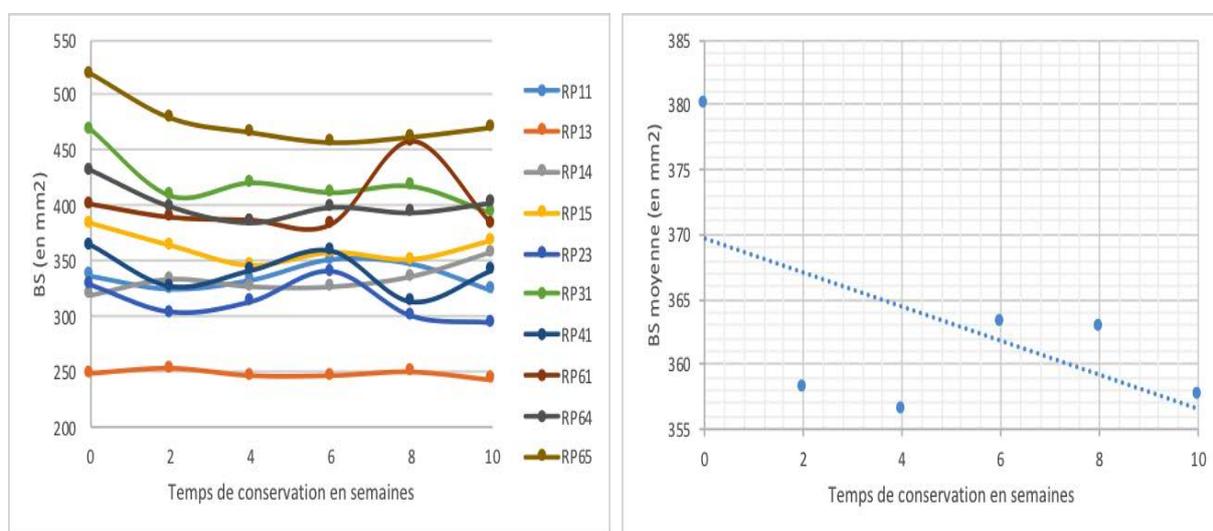


Figure IV – 15. Valeurs de la surface osseuse (BS en mm<sup>2</sup>) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

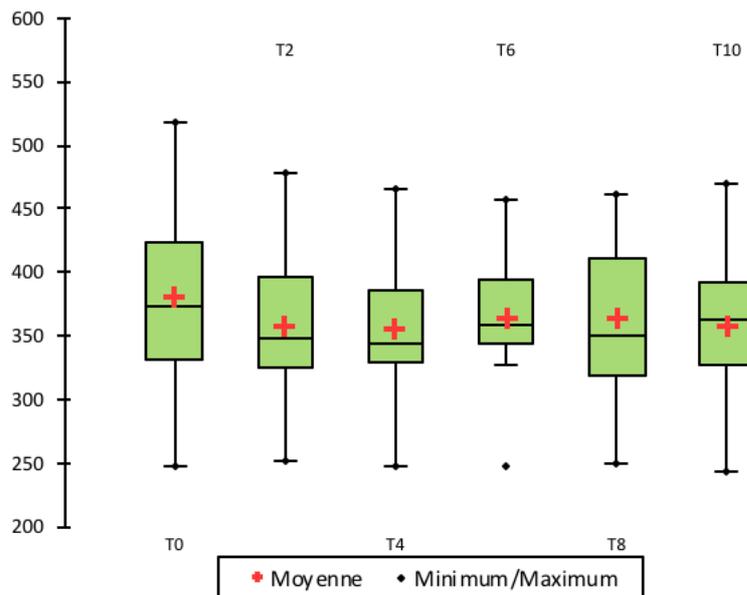


Figure IV – 16. Box plots des valeurs de la surface osseuse (BS en mm<sup>2</sup>) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Concernant le rapport surface sur volume osseux (BS/BV – figures IV 17 et 18), il varie significativement et lors des deux premières semaines d'acquisition. Il est observé une diminution moyenne de -0,99, IC 95%, [-1,61; -0,36] avec une tendance linéaire autour de la moyenne à la diminution. Il est visuellement observé une tendance nette à la diminution entre la première analyse et après 2 semaines de conservation (figure IV – 17). Il existe aussi et comme pour la BS des variations visibles entre la 6<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> semaine de conservation. La figure IV – 18 montre justement des variations plus marquées de la distribution des valeurs à chaque temps d'acquisition. Là encore, une procédure de contrôle des étapes d'analyse au  $\mu$ CT n'a pas mis en évidence d'élément constitutif d'un biais technique.

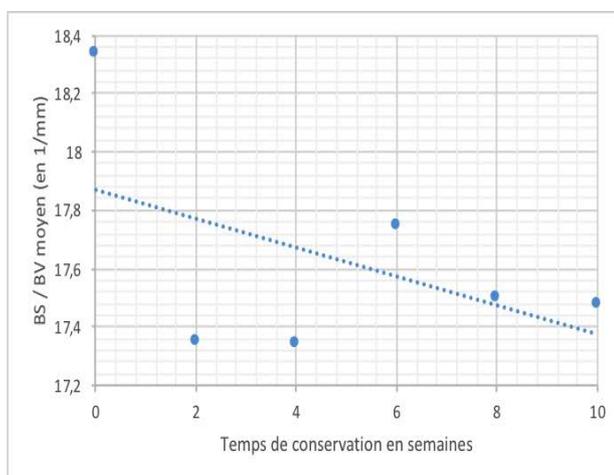
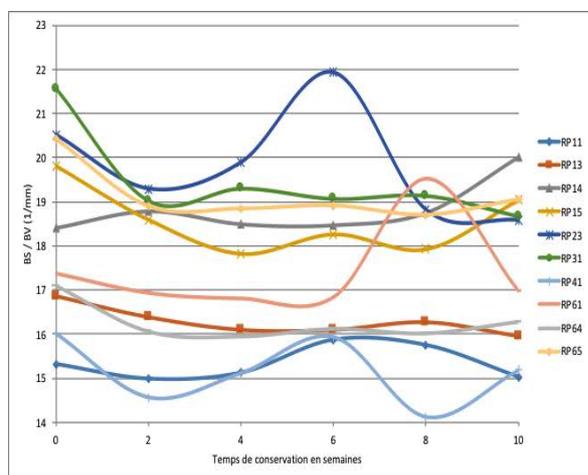


Figure IV – 17. Valeurs du rapport surface sur volume osseux (BS / BV en  $\text{mm}^{-1}$ ) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

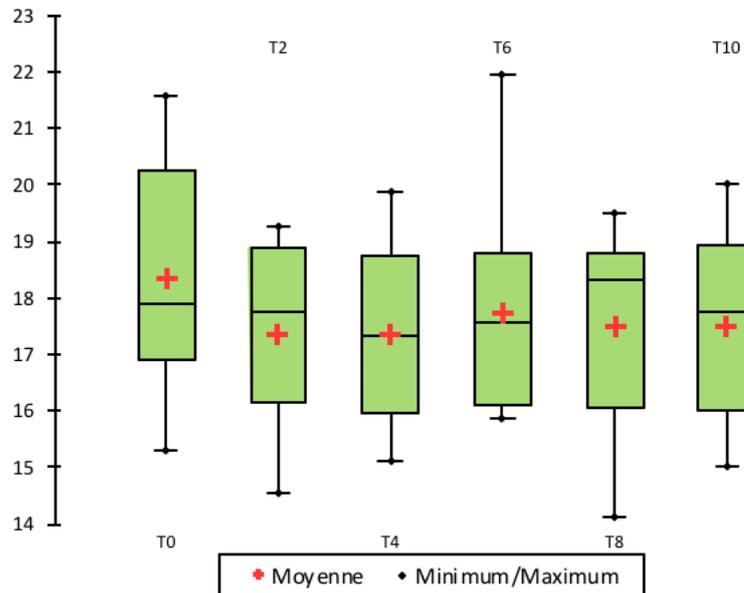


Figure IV – 18. Box plots des valeurs du rapport surface sur volume osseux (BS/BV en  $\text{mm}^{-1}$ ) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Concernant le motif trabéculaire (TbPF – figures IV – 19 et 20), il est intéressant de noter que les valeurs sont pour la plupart négative. Cela traduit une structure plutôt concave avec des cavités fermées (Bouxsein et al 2010). Les variations observées sont importantes à quasiment tous les temps d'acquisition. Ces observations suggèrent des modifications architecturales trabéculaires importantes au cours du temps et de façon continue. Par ailleurs, la tendance est à la diminution de la valeur absolue du TbPF. Cela traduit un appauvrissement du réseau trabéculaire étudié. Il faut noter la spectaculaire modification du TbPF de l'échantillon RP61 à la 8<sup>ème</sup> semaine d'analyse. Cette variation, associée à un retour à une valeur précédemment observée est fortement en faveur d'un biais d'analyse. Le contrôle des étapes de traitements des images n'a pourtant pas mis en évidence d'anomalie à ce niveau.

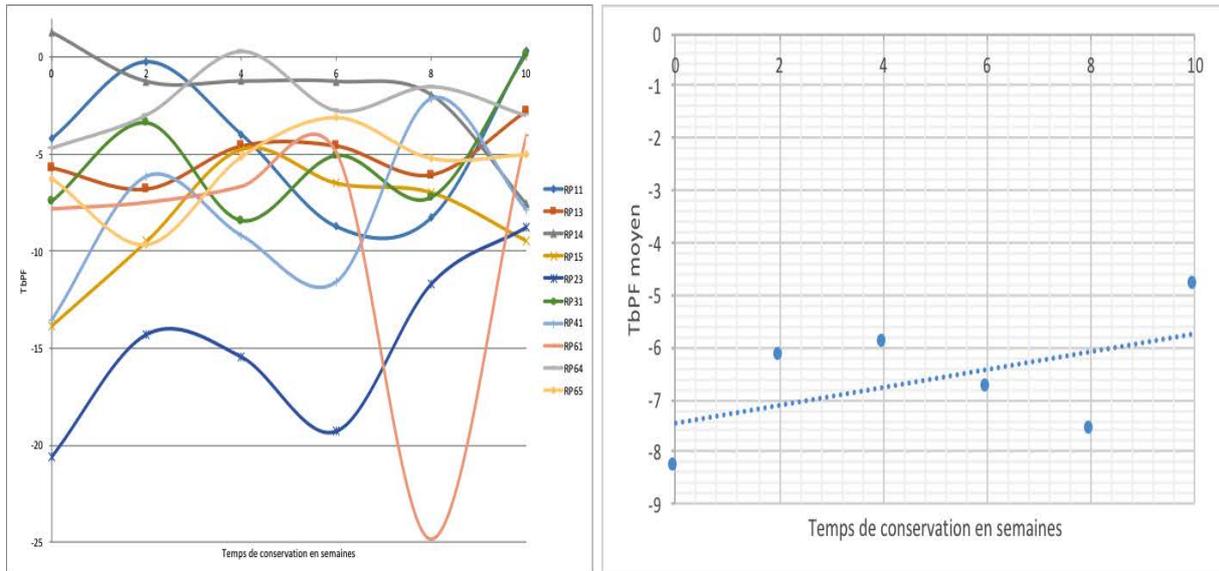


Figure IV – 19. Valeurs du motif trabéculaire (TbPF) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d’acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

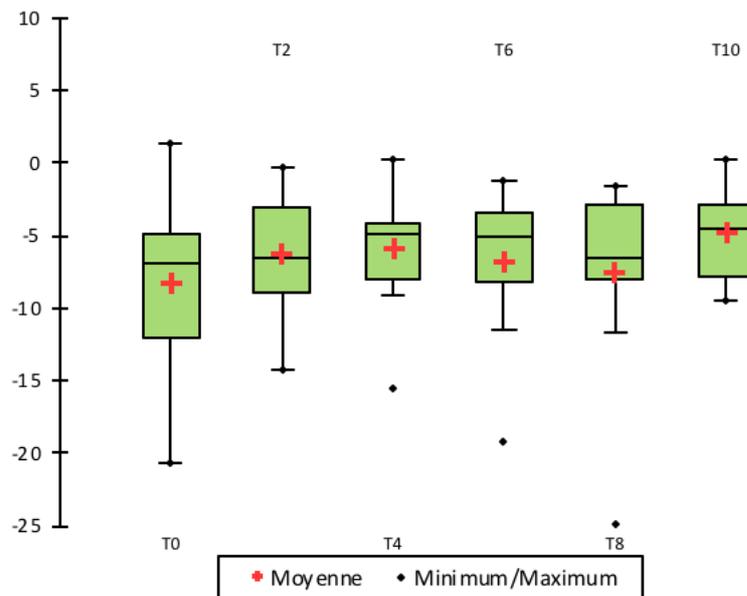


Figure IV – 20. Box plots des valeurs du motif trabéculaire (TbPF) pour l’ensemble des échantillons à chaque temps d’acquisition.

S’agissant de l’épaisseur trabéculaire (TbTh – figures IV 21 et 22), nous observons une tendance non significative à l’augmentation au cours du temps (figure IV – 21) avec des variations importantes à la 2<sup>ème</sup> semaine -et également autour de la 6<sup>ème</sup> et de la 8<sup>ème</sup> semaine de conservation. Malgré cette l’augmentation relative, les variations sont très importantes entre chaque temps et par échantillon. Il n’est donc pas possible d’interpréter précisément la tendance

observée. La distribution des valeurs à chaque temps d'analyse (figure IV – 22) est peu homogène. Cela suggère d'éventuels biais d'analyse ou alors des modifications importantes des valeurs de la TbTh au cours du temps. Le contrôle à posteriori des étapes d'analyse au  $\mu$ CT n'a pas mis en évidence d'anomalie. En l'état et sans pouvoir infirmer le biais d'analyse, nous pouvons observer que cette variable fluctue de façon importante et surtout de façon peu homogène entre les échantillons. L'échantillon RP61 varie là aussi de façon très visible autour de la 8<sup>ème</sup> semaine de conservation avec un retour à une valeur antérieure. Ce résultat particulier suggère un biais méthodologique d'autant que cet échantillon présente plusieurs variations de ses autres paramètres à ce temps d'analyse. Le contrôle des étapes d'analyse précédemment cité et l'observation de variations plus importantes que celles attendues en cas d'erreur de précision (chapitre I – précision des mesures répétées) sont deux éléments tendant à infirmer la possibilité d'un biais lié au  $\mu$ CT.

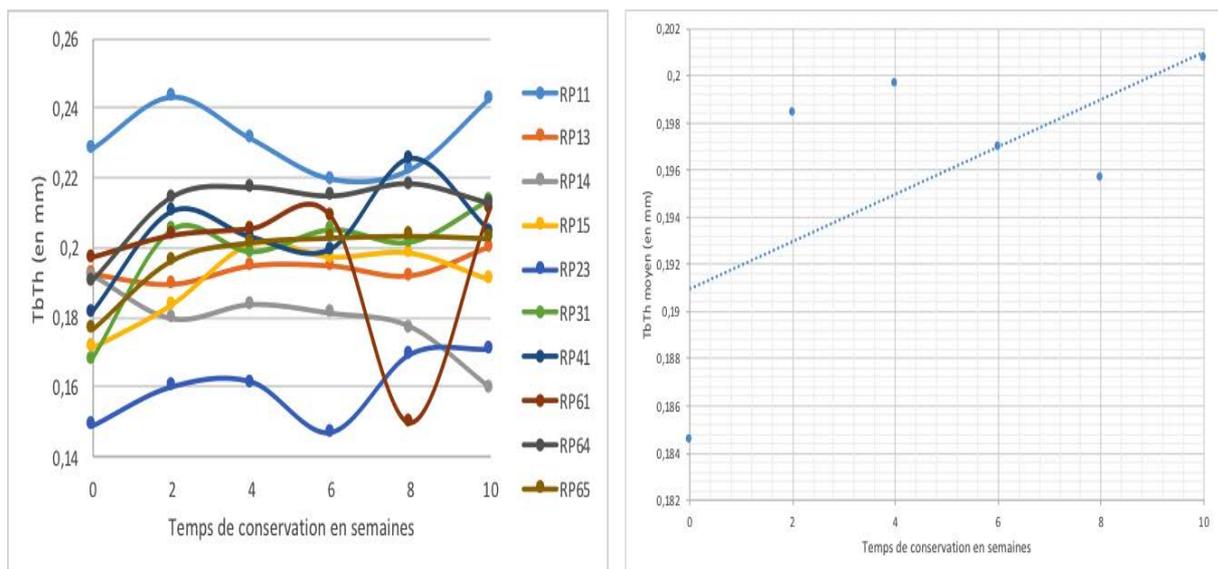


Figure IV – 21. Valeurs de l'espacement trabéculaire (TbTh en mm) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

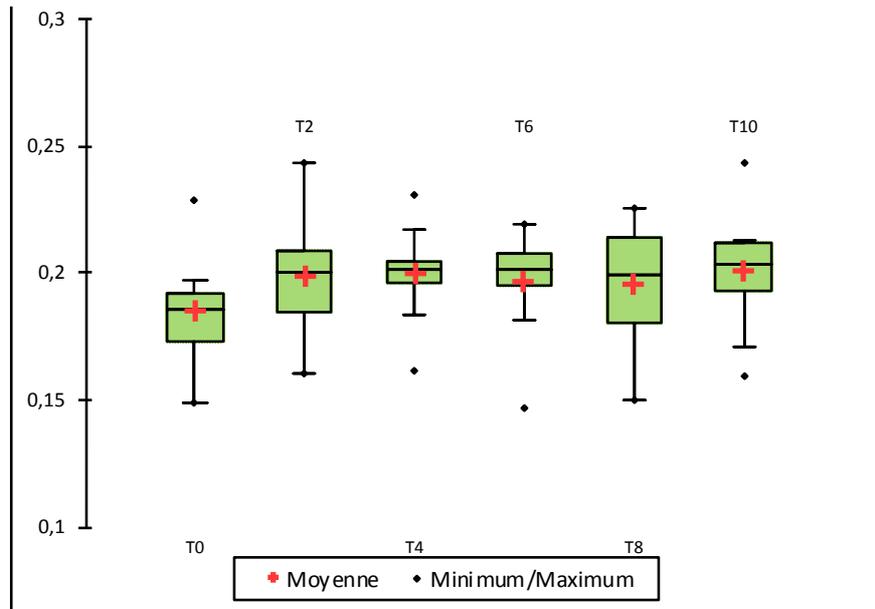


Figure IV – 22. Box plots des valeurs de l'épaisseur trabéculaire (TbTh en mm) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Pour le nombre moyen de trabécules par millimètre (TbN – figures IV – 23 et 24), nous observons une tendance à la diminution pour la plupart des échantillons au cours du temps. Cette observation est renforcée par la tendance linéaire autour de la moyenne avec une diminution du nombre de trabécules par millimètre. La distribution des valeurs de cette variable est relativement homogène à chaque temps d'acquisition. Cela permet de suggérer une stabilité de cette variable et du processus au cours du temps. Encore une fois, une forte variation est observée pour l'échantillon RP61 autour de la 8<sup>ème</sup> semaine de conservation. Cette nouvelle observation pour cet échantillon, associée à un retour à une valeur antérieure, font suggérer une erreur dans la méthodologie. Cette erreur n'a pourtant pas été retrouvée lors de contrôle des étapes de traitement des données à postériori.

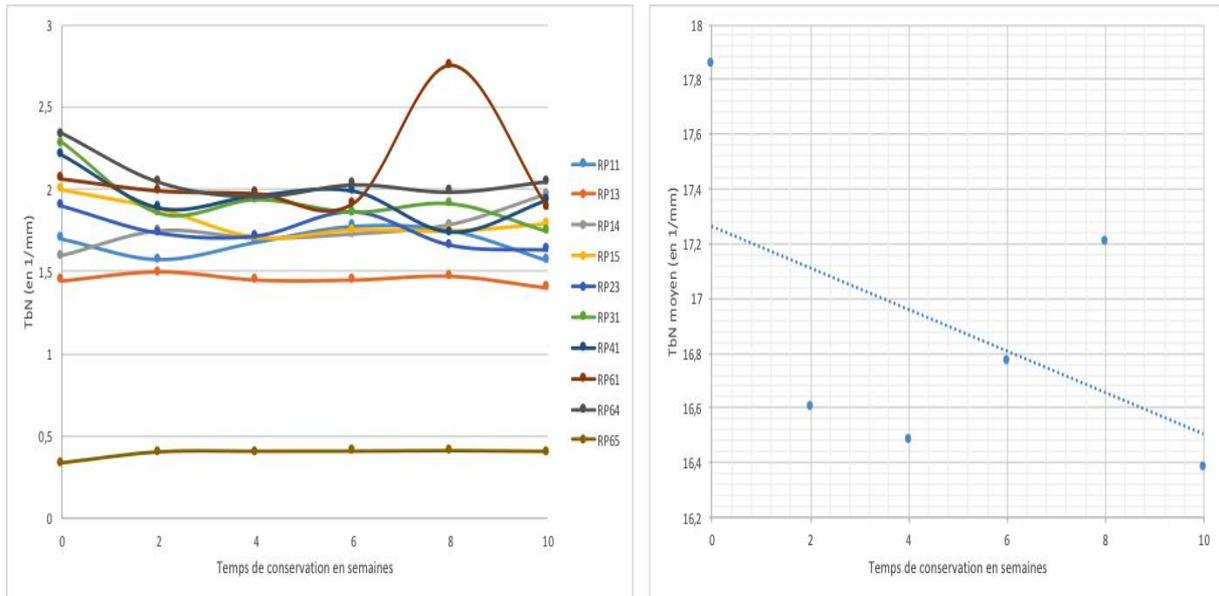


Figure IV – 23. Valeurs du nombre de trabécules par millimètre (TbN en  $\text{mm}^{-1}$ ) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

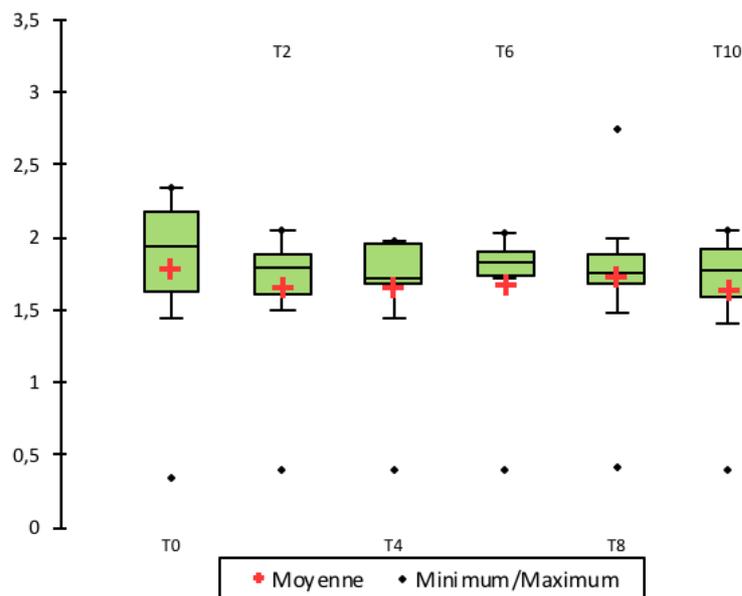


Figure IV – 24. Box plots des valeurs du nombre de trabécules par millimètre (TbN en  $\text{mm}^{-1}$ ) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition. Enfin concernant la séparation moyenne des trabécules (TbSp – figures IV – 25 et 26), nous observons (figure IV – 25) une augmentation au cours du temps. Cette augmentation moyenne est de 0,022 [-0,016; -0,028] IC95%. Elle est notamment marquée entre les 2 premières semaines de conservation. Cela a été retenu comme significatif par l'analyse statistique comme vu précédemment. L'analyse de la distribution des valeurs de cette variable montre une homogénéité à chaque temps d'analyse. Il n'est pas noté ici de modification notable autour de la 6<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> semaine d'analyse.

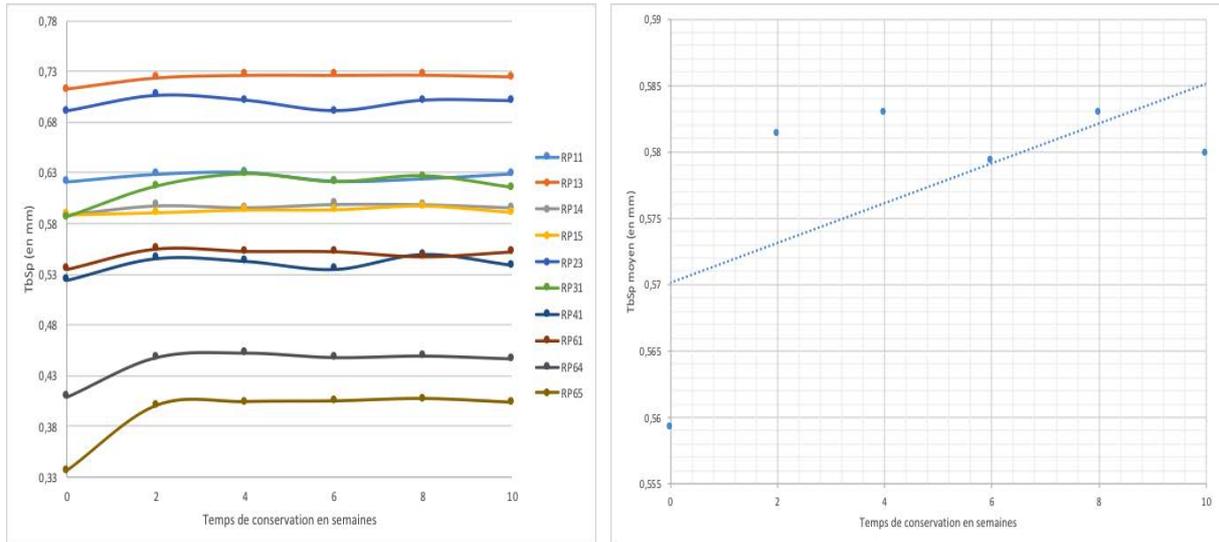


Figure IV – 25. Valeurs du nombre de séparation trabéculaire (TbSp en mm) pour chaque échantillon au cours du temps à gauche et moyenne par temps d'acquisition à droite avec la courbe de tendance en pointillé.

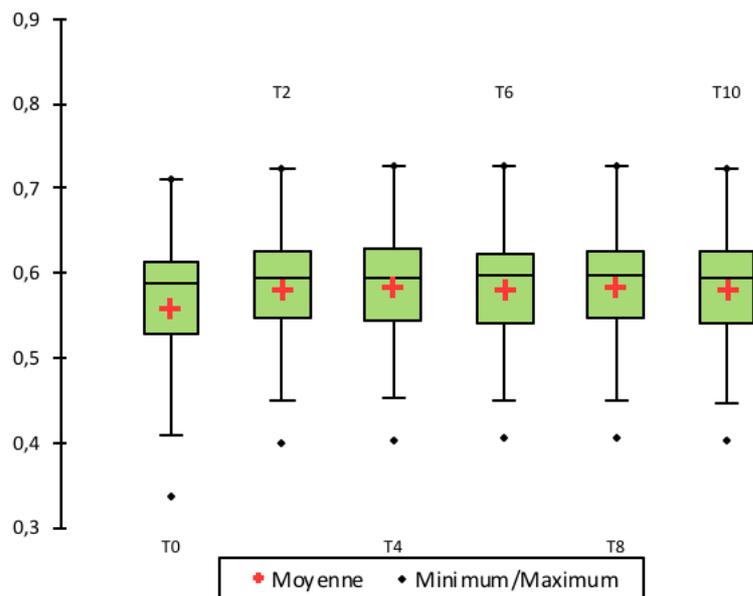


Figure IV – 26. Box plots des valeurs de la séparation trabéculaire (TbSp en mm) pour l'ensemble des échantillons à chaque temps d'acquisition.

Au total, nous observons :

- Une augmentation significative de l'espacement trabéculaire ;
- Une diminution significative du rapport de surface sur le volume osseux (traduisant une diminution plus importante du volume que de la surface) ;
- Une tendance à la diminution pour le volume et la surface de l'os ainsi que pour le nombre de trabécules par millimètre ;
- Une tendance à l'augmentation de l'épaisseur trabéculaire ;

- Une tendance à la diminution de la valeur absolue du motif trabéculaire, traduisant un appauvrissement de la connectivité osseuse.

Ces résultats sont concordants avec les observations faites dans l'étude précédente sur 4 échantillons (Le Garff et al 2016). L'hypothèse de modifications architecturales précoces *post mortem* est étayée à la fois par les indices de surface et de volume d'os qui diminuent, par le nombre moyen de trabécules qui diminue conjointement à l'espacement des trabécules qui augmente. La constatation d'une augmentation moyenne de l'épaisseur trabéculaire est en faveur d'un recrutement des plus gros trabécules à la défaveur des plus fins qui se dégradent. Cette hypothèse rejoint les constatations microscopiques sur les cristaux d'hydroxyapatite de la phase minérale. Dans cette hypothèse, les plus gros se développent au dépend des plus petits par épaissement des cristaux en cas de phénomènes de recristallisation et/ou de dissolution des plus petits cristaux (Kendall et al 2018 ; Nielsen-Marsh et al 2000 a,b ; Reiche et al 2002b ; Stiner et al 1995 ; Trueman 2013 ; Trueman et al 2004 ; Trueman et al 2008 ; Tuross et al 1989 ; Weiner & Bar-Yosef 1990 ; Wright & Schwarcz 1996). Parallèlement, nous constatons un appauvrissement de la connectivité trabéculaire via le TbPf. Ce TbPf qui a des valeurs négatives suggèrent un os présentant des concavités et des structures fermées. En tenant compte de cette donnée, la diminution du BS/BV peut s'interpréter comme une diminution plus importante du volume que de la surface osseuse. Cela peut être interprété comme une modification architecturale importante qui est concordante avec la réduction du nombre de trabécules.

Ce travail met également en évidence la survenue de modifications significatives précoces durant les 2 premières semaines de conservation. Ces résultats sont concordants avec le travail précédent (Le Garff et al 2016). Il n'est pas possible de déterminer les phénomènes sous-jacents à ces transformations. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une déshydratation intense à l'origine des modifications observées. Cela dit, l'analyse du motif trabéculaire et les fortes variations enregistrées pour les conservations après 6 et 8 semaines suggèrent qu'un autre mécanisme survient. L'hypothèse d'une atteinte bactérienne est peu probable en raison de la séparation mécanique des chairs préalable et du mode de conservation en air ambiant. L'hypothèse d'une atteinte organique précoce durant les 10 semaines est intéressante parce que le collagène est décrit comme plus sujet à modification précoce et contient une grande quantité d'eau. Il est donc le sujet idéal pour être à la fois impacté par la déshydratation et par la modification de l'environnement lié à la séparation mécanique des chairs. Il est probable que la modification du pH et de l'hygrométrie de l'environnement collagénique de l'os influence

des réactions physico-chimiques. Delannoy et al ([Delannoy et al 2017](#)) ont notamment mis en évidence une hydrolyse chimique du collagène sans intervention bactérienne. Nos observations pourraient être expliquées par un tel phénomène. Une atteinte de la partie minérale de l'os est également possible car les deux phases de l'os se protègent mutuellement ([Kendall et al 2018](#)). Les études à ce niveau évoquent des modifications minérales survenant plutôt sur des temps se comptant en décades voire siècles, ne permettant pas d'étayer franchement cette hypothèse. L'absence d'exploration physiologique avec le  $\mu$ CT ne permet pas d'aller plus loin en termes d'explication des phénomènes physico-chimiques. Il peut également être retenu que certaines variables paraissent assez « stables » dans le temps, dans le sens où les variations observées dans ce travail sont assez homogènes et cohérentes entre elles par temps d'analyse pour le BV, BS, TbN et TbSp. Ces variables peuvent donc avoir un intérêt en vue d'un outil d'estimation du délai *post mortem*.

Il a été mis en évidence des variations assez fortes pour l'échantillon RP61 entre les 6<sup>èmes</sup> et 8<sup>èmes</sup> semaines de conservation pour toutes les variables hormis le volume osseux (BV) et la séparation trabéculaire (TbSp). L'échantillon RP23 et le RP41 ont montré des variations autour de la 6<sup>ème</sup> semaine de conservation pour la surface osseuse (BS) et pour le rapport surface sur volume de l'os (BS/BV). L'observation récurrente de ce type de variation peut faire évoquer un biais technique liée à la technique d'acquisition ou de conservation des échantillons. Plusieurs éléments permettent d'infirmer cette hypothèse :

- La réalisation des étapes de superposition des images avant analyse des volumes d'intérêt et le contrôle à posteriori garantissent l'absence d'anomalie à ce niveau. L'ordre de grandeur des variations observées est bien supérieur à l'erreur de précision du  $\mu$ CT utilisé (cf chapitre II – précision des mesures au  $\mu$ CT, [Le Garff et al 2017](#)) ;
- La présence de variations importantes pour certaines variables et pas pour d'autres est un élément venant à faire douter d'un biais technique. Par exemple, une erreur de positionnement de l'échantillon ou une différence de résolution de pixel lors de l'acquisition se traduirait par une variation de tous les paramètres étudiés au  $\mu$ CT. L'absence d'homogénéité entre surface et volume osseux qui sont des variables de même nature en termes d'analyse via CtAn est un argument de plus contre le biais technique. De même pour RP61, l'absence de comportement similaire (forte variation) entre l'espacement, le nombre et l'épaisseur trabéculaire sont contre l'hypothèse du biais technique. Là encore, il s'agit de variables de même type en termes d'analyse au  $\mu$ CT ;

- Le dernier argument est temporel puisque que les fortes variations enregistrées ne sont pas aux mêmes temps de conservation. Cela est un argument supplémentaire contre le biais technique.

Il n'est pas possible de déterminer l'origine exacte de ces fortes variations. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'elles soient corrélées à la taille des échantillons. RP61 est plus latéral que RP41 et que RP23. Cet échantillon présente une taille plus importante avec une corticale externe et interne plus épaisse. Cette différence de conformation peut expliquer une différence de comportement taphonomique. Cela dit, les échantillons RP64 et RP65 présente la même conformation et n'ont pas montré de variations de ce type. Un plus grand nombre d'échantillon pourrait permettre de répondre à cette question avec la réalisation de prélèvements par groupe. Ces prélèvements pourraient être fait en fonction de la localisation et donc de la taille des échantillons. Ils permettraient de vérifier si le comportement diagénétique observable au  $\mu$ CT est corrélé à la taille de l'échantillon. Cela permettrait également de voir s'il y a un lien entre modifications taphonomiques et la répartition os cortical / os trabéculaire et celle de la phase minérale / organique comme le suggère la littérature ([Kendall et al 2018](#)).

Ce travail présente plusieurs limites qu'il convient de rappeler :

- L'utilisation d'un corps unique, limitant l'interprétation des résultats ;
- L'ostéopénie relative liée à l'âge du donneur, limitant là encore les possibilités d'extrapolation des résultats à une population générale ;
- La petite taille d'échantillon avec un temps d'analyse assez limité au regard des problématiques en anthropologie médico-légale et en archéologie ;
- L'absence de possibilité d'interprétation biologique des observations faites au  $\mu$ CT ;
- La préparation particulière des échantillons, permettant de considérer les résultats comme étant issus de test in vitro, limitant l'interprétation.

Cette étude présente plusieurs points d'intérêt et notamment celui de confirmer les premiers résultats sur 4 semaines de conservation (étude précédente, sur un sujet différent – [Le Garff et al 2016](#)). Ce travail montre l'existence de modifications après plus d'une dizaine de jours de conservation. Notre étude confirme sur un second sujet les variations des paramètres de volume, de surface et d'architecture trabéculaire au  $\mu$ CT au cours du temps. Nos statistiques sont significatives pour les 2 premières semaines ce qui conforte les études précédentes à ce niveau

(Delannoy et al 2016 ; McLaughlin & Lednev 2011). Nos observations renforcent le rôle probable de la déshydratation dans les modifications taphonomiques. Nous montrons en plus qu'il existe des variations au-delà des dix semaines de conservation avec des tendances. Si ces tendances étaient confirmées par des études futures (plus de sujets, plus d'échantillons, plus d'ossements), un outil d'estimation du délai *post mortem* pourrait être envisagé. Cette étude montre à nouveau l'intérêt du  $\mu$ CT dans son caractère non destructif permettant des études prospectives en taphonomie osseuse. La piste d'un travail ultérieur en séparant les échantillons par taille (et donc par répartition corticale / trabécule) est intéressante. Il est en effet possible que le comportement des échantillons soit corrélé à cette données, non prise en compte dans notre étude.

Notre étude renforce également l'idée d'effectuer des analyses complémentaires à celles réalisées avec le  $\mu$ CT pour essayer de comprendre les phénomènes physico-chimiques impliqués dans nos observations.

La réalisation d'études de ce type en milieu standardisé permet également de créer un référentiel de comparaison en vue d'analyses ultérieures dans des milieux de conservation plus « médico-légaux » tel que l'eau, la terre, le sable, en présence des tissus mous au contact de l'os, après exposition à la chaleur etc.

- Conclusion

Ce travail met en évidence des modifications trabéculaires architecturales précoces après 10 semaines de conservation « standard » et contrôlée sur des ossements humains *post mortem* en utilisant un  $\mu$ CT. Ces modifications surviennent précocement, notamment au cours des deux premières semaines de conservation.

Des travaux complémentaires devront être menés pour permettre une meilleure compréhension des phénomènes biologiques observés. Ces travaux pourraient permettre de créer des bases de données pour la taphonomie osseuse, en commençant par différents individus, milieux de conservation, types d'os et diverses techniques d'analyse.

- **Étude n°3 – Fragments de côtes conservés 6 mois et 36 mois en milieu dit « standard »**

- Matériels et méthode
  - Type d'ossement, provenance des ossements et préparation

Nous avons focalisé le présent travail sur des fragments de côtes humaines pour diversifier le type d'ossement étudié et confronter nos résultats précédents à d'autres données. Ce choix a été motivé par l'existence de travaux antérieurs sur ce substrat (Delannoy 2016 ; Delannoy et al 2016 ; Delannoy et al 2017). Cela a également été réalisé parce que les côtes sont utilisées en médecine légale (estimation de l'âge notamment) et fréquemment retrouvées lors des découvertes d'ossement (Quatrehomme 2015).

Les côtes ont été prélevées sur des corps frais (non formolés, non congelés) issus de dons du corps à la science auprès du laboratoire d'anatomie de la faculté de médecine de Lille (UTML & A EA 7367). Des critères d'exclusion ont été appliqués à l'identique que dans les études précédentes (délai *post mortem* de prélèvement, sexe et pathologie(s) préalable(s)).

Les sujets prélevés lors du travail de thèse étaient au nombre de deux : un individu de 80 ans mort dans le cadre d'une décompensation cardio-respiratoire dans les suites d'une infection respiratoire et d'un homme de 79 ans décédé dans le cadre d'une insuffisance cardiaque aiguë (sans précision). Les six premières côtes gauche et droite ont été désarticulées manuellement puis l'os a été séparé des chairs en prenant soin de ne pas abimer le périoste (figure VI – 27). Vingt-quatre côtes ont été prélevées au total.

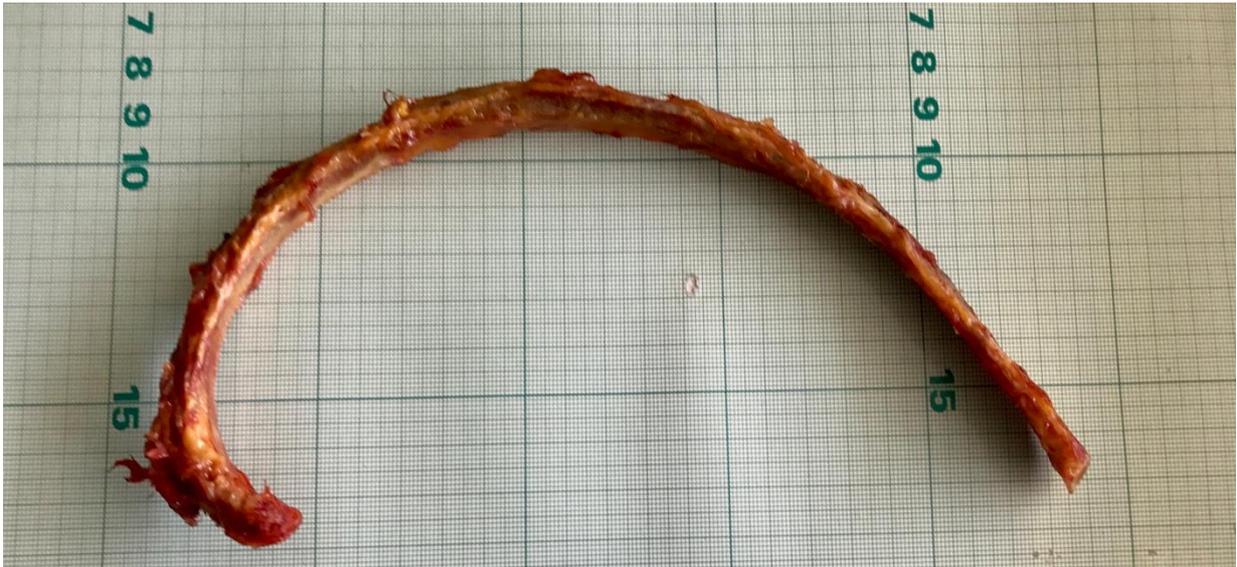


Figure IV – 27. Photographie en vue inférieure de la 4<sup>ème</sup> côte droite d'un des individus après extraction et préparation manuelle.

Nous avons pu bénéficier de quatre côtes humaines supplémentaires (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> côtes gauches) issues de deux corps qui avait préalablement été prélevées avec les mêmes critères d'exclusion et conservées pendant 36 mois dans les mêmes conditions dites standard que celles appliquées dans ce chapitre.

- Préparation des échantillons

En raison de la taille de la chambre d'analyse du  $\mu$ CT (limitée à six centimètres de hauteur), nous avons dû couper les échantillons d'os. Nous avons donc coupé les côtes en segments de cinq centimètres de hauteur à l'aide d'une scie multi-usages (Handypower® FHP 130 6/2004). En raison de la courbure des côtes, nous avons mesuré cette longueur de cinq centimètres sur la courbure la plus grande du fragment. Nous avons effectué la première segmentation à partir de l'articulation costale-sternale. Le fragment à la première extrémité (articulation costo-sternale) et le fragment postérieur (articulation costo-vertébrale) ont été exclus pour conserver la section médiale des côtes. Cette exclusion a été réalisée en raison de la teneur en cartilage dans les parties para-sternale et para-vertébrale des côtes. Cela a également été fait en raison de la différence de contenu hydrique et collagénique entre les parties médiales et les autres sections.

- Conservation des échantillons

Après avoir été coupés, les échantillons ont été placés sur la surface d'une boîte en verre dans un environnement contrôlé dit « standard » entre chaque acquisition au  $\mu$ CT. Ce milieu était une hotte de laboratoire (Seat Control ®) à 20 °C, 60% d'humidité et avec une alternance jour et nuit en lumière naturelle. Le volume de renouvellement d'air était de 485 m<sup>3</sup>/heure. La stabilité des paramètres météorologiques dans l'environnement a été contrôlée quotidiennement via une sonde climatique (Testo 445 © Sparta, New Jersey, USA). Ces conditions de conservation ont été retenues car elles correspondent à la température intérieure habituelle et contrôlée dans notre laboratoire, et parce que ces conditions sont facilement reproductibles. En outre, elles ont été sélectionnées parce que notre laboratoire a déjà réalisé des travaux en taphonomie osseuse dans ces conditions ([Delannoy 2016](#) ; [Le Garff et al 2016](#) ; [Le Garff et al 2017](#)).

- Analyse au  $\mu$ CT

Après extraction, les échantillons ont été analysés en utilisant un  $\mu$ CT haute résolution Bruker © SkyScan 1172, version matérielle 6, version logicielle 1.5 avec des paramètres d'acquisition, de reconstruction et d'analyse constants (tableau VI - 4).

Les paramètres d'acquisition ont été choisis en lien avec les travaux antérieurs et par rapport aux recommandations d'utilisation du  $\mu$ CT ([Le Garff et al 2016](#) ; [Le Garff et al 2016](#) ; [Le Garff et al 2017](#) ; [Bouxsein et al 2010](#)). Ils ont également été choisis car ils présentent le meilleur rapport entre la qualité des images et le temps moyen d'acquisition au  $\mu$ CT. Le temps moyen d'acquisition de  $\mu$ CT était de quatre heures (+/- une heure) dans notre travail

Tableau IV – 4. Paramètres d’acquisition au  $\mu$ CT

<b><math>\mu</math>CT Bruker® Skyscan HR 1172</b>	<b>Type de paramètres</b>	<b>Paramètres</b>
Acquisition (hardware version 6, software version 1.5)	Medium d’analyse	air
	Température dans la chambre d’acquisition du $\mu$ CT	27°C
	Résolution pixel	27 $\mu$ m
	Tension	80 KV
	Intensité	100 $\mu$ A
	Filtre Aluminium	0.5 mm
	Longueur Camera	Large
	Temps exposition	3275 ms
	Rotation	0.7
	Frame averaging	2
	Random mouvement	1
Reconstruction (NRecon© software, version 1.6.9.8)	Correction du Ring artifact	10
	Correction du Beam hardening	40%

Les côtes prélevées dans le travail de thèse ont été analysées à l’état frais au  $\mu$ CT après extraction. Les fragments issus des côtes gauches ont ensuite été conservés pendant 6 mois dans l’environnement contrôlé dit « standard » (décrit précédemment et dans [Le Garff et al 2016](#)) puis ré-analysées au  $\mu$ CT après cette période de conservation. Les fragments de côtes qui avaient été préalablement conservés 36 mois en milieu « standard » ont fait l’objet d’une analyse. Au total, ce travail permet de comparer des échantillons frais, après 6 mois de conservation et après 36 mois de conservation en milieu standard. Les échantillons conservés 6 mois ont pu être comparés à eux même entre l’analyse sur os frais et après les 6 mois de conservation. Après ces analyses, les os ont été utilisés dans un autre projet de laboratoire et n’ont pas pu être remis en conservation.

Une reconstruction, une superposition (telle qu’expliquée dans le chapitre II) et une analyse 3D de chaque échantillon ont ensuite été effectués. Nous avons choisi un volume d’intérêt trabéculaire (VOI) avec une procédure automatisée sur le premier balayage pour chaque échantillon. Cette procédure a commencé par une binarisation du VOI avec un algorithme d’Otsu. Cette manipulation permet à une échelle de gris de devenir une image en noir et blanc avec un seuillage automatisé ([Otsu 1979](#)). Nous avons ensuite utilisé une segmentation automatisée et un processus de filtrage sur les images 2D. Cette étape permet de distinguer l’os

du reste du volume d'étude dans les images. Suite à cela, nous avons effectué un autre processus de segmentation automatisé pour différencier l'os cortical et l'os trabéculaire. Nous avons ensuite sélectionné une région d'intérêt (ROI), focalisée sur l'os trabéculaire (Figure IV - 28). Enfin, nous avons créé un modèle du ROI en 3D en utilisant le logiciel Marching Cube 33 ® (Figure IV – 29).

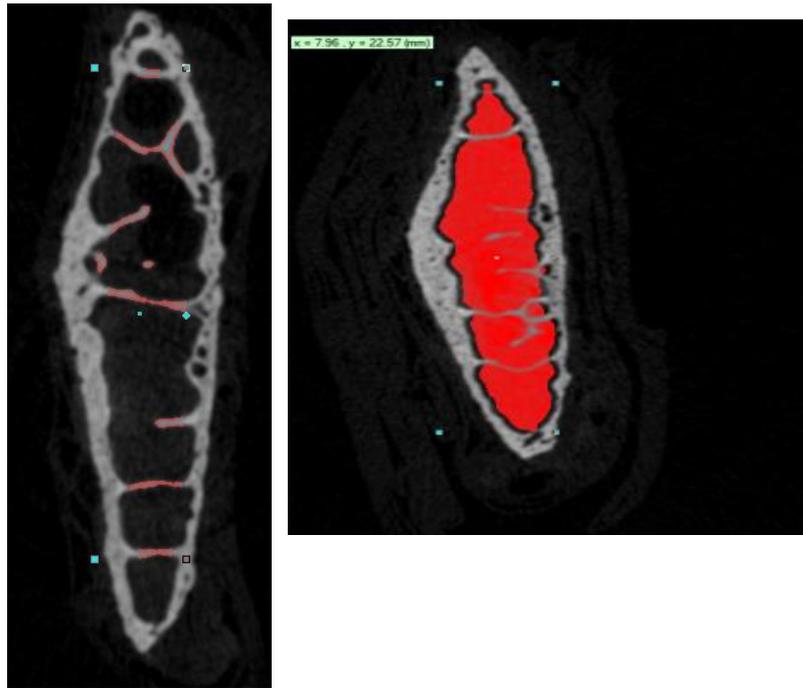


Figure IV – 28. Exemple de la sixième côte gauche après le premier balayage au  $\mu$ CT, avec l'identification des trabécules en 2D (image de gauche) après binarisation avec l'algorithme d'Otsu, suivie de la sélection automatique de la région d'intérêt de la trabécule 2D (image de droite).

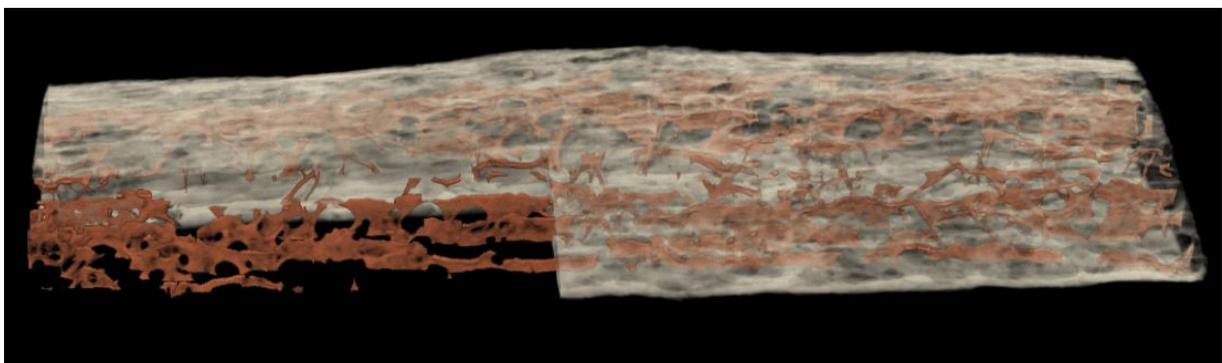


Figure IV – 29. Exemple de la région d'intérêt 3D des trabécules de la sixième côte gauche après l'utilisation de Marching Cube 33 ®.

Nous avons concentré notre analyse 3D sur les variables suivantes rapportées au volume total (TV). Cela a été réalisé en raison d'un volume d'intérêt non forcément identique entre les échantillons du fait de l'utilisation de la procédure automatique avec algorithme d'Otsu :

- Le rapport du volume osseux et du volume total (BV / TV)
- Le rapport de la surface osseuse sur le volume total (BS / TV)
- Le nombre de trabécules rapporté au volume total (TbN/TV)
- L'épaisseur trabéculaire rapportée au volume total (TbTh/TV)
- La séparation des trabécules rapportée au volume total (TbSp/TV)
- Le facteur de structure trabéculaire (TbPf).

- Analyse statistique

En plus de statistiques descriptives, l'analyse statistique a porté sur 2 aspects :

- L'influence du temps de conservation et de la provenance des fragments osseux lors que les échantillons pouvaient être comparés à eux-mêmes pour répondre à ces deux questions :
  - les fragments issus de 2 corps sont-ils comparables en termes de BV/TV ?
  - les variations éventuellement observées au cours du temps sont-elles significatives ?

Cet aspect de l'analyse statistique a pu être faite par Anova à mesures répétées (après vérification de la variance par analyse de Shapiro – Wilk) sur les échantillons analysés à l'état frais et après 6 mois de conservation. Cette analyse a été appliquée sur toutes les variables vues ci-dessus.

- La possibilité de comparer les ossements issus de corps différents en cours du temps en étudiant leur rapport de BV/TV par analyse par Anova déséquilibrée à 2 facteurs et analyse des interactions (le temps d'analyse et le corps à l'origine des ossements).

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel XIStat ® (version 2018.5).

- Résultats et discussion

Nous avons collecté 44 fragments analysés à partir des 12 côtes prélevées (6 sur chacun des 2 corps) concernant les côtes gauches analysées à l'état frais puis après 6 mois de conservation. Les 12 côtes droites issues des mêmes corps qui ont été analysées uniquement à l'état frais ont permis de collecter 44 fragments. Les 4 côtes issues d'un travail antérieur et préalablement conservées 36 mois ont permis de collecter 16 échantillons.

S'agissant des côtes conservées 6 mois, l'analyse à l'état frais et après 6 mois de conservation montre une variation significative de tous les paramètres liés au temps de conservation (tableau IV – 5). Nous mettons en évidence une différence significative liée à la provenance des échantillons pour toutes les variables hormis le volume osseux. Notre travail permet de dire que les échantillons osseux provenant de corps différents ne peuvent pas être analysés comme étant des « répliques ». Autrement dit, ils ne peuvent pas être considérés comme identiques pour ces variables. Selon nos résultats, seul le rapport du volume osseux sur le volume total (BV/TV) n'est pas influencé par l'origine des échantillons et permet donc de considérer que ces échantillons sont comparables. Cet élément nécessitait d'être évalué statistiquement pour des travaux futurs. Cela était imposé aussi par le postulat consistant à vouloir comparer des échantillons osseux entre eux après des périodes de conservation différentes. De plus, cette étude montre que les variations mises en évidence en lien avec la durée de conservation sont très significatives. L'étude des courbes moyennes par variables montre une diminution du rapport BV sur TV (figure IV – 30), du rapport TbTh sur TV (figure IV – 31), de la TbSp sur TV (figure IV – 32) au cours du temps. Nous observons une augmentation significative du rapport BS sur TV (figure IV – 33) et du rapport TbN sur TV (figure IV – 34). Enfin, nous observons des modifications significatives du TbPf avec une augmentation entre l'analyse sur os frais et après 6 mois de conservation (figure IV – 35).

Tableau IV – 5. Synthèse des résultats des analyses statistiques pour les côtes analysées à l'état frais et après 6 mois de conservation.

Variabiles	Différence entre les 2 populations – p value	Modification liée au temps de conservation – p value
BV / TV	0,125	< 0,0001 *
BS / TV	< 0,0001 *	< 0,0001 *
TbTh / TV	< 0,0001 *	< 0,0001 *
TbSP / TV	< 0,0001 *	< 0,0001 *
TbN / TV	0,007 *	0,001 *
TbPF	< 0,0001 *	< 0,0001 *

\* - significativité au risque alpha de 0,05

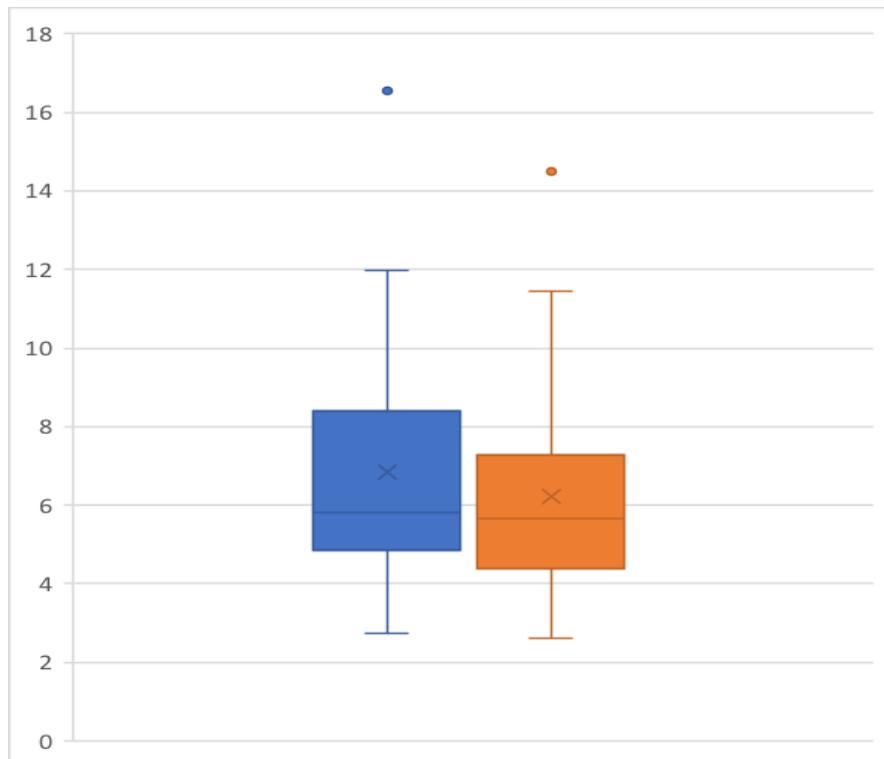


Figure IV – 30. « Box plots » des rapports BV/TV (en mm<sup>-1</sup>) à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange).

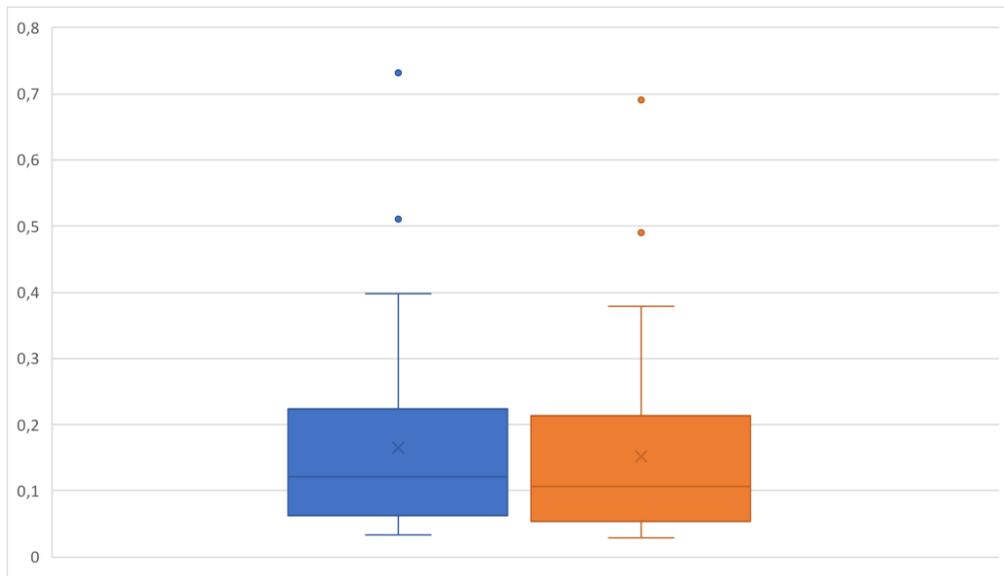


Figure IV – 31. « Box plots » des rapports TbTh/TV (en mm<sup>-2</sup>) à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange).

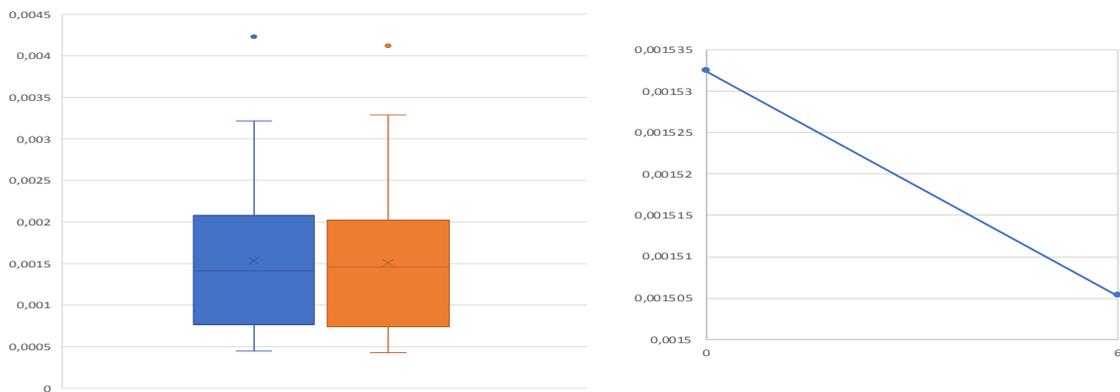


Figure IV – 32. « Box plots » des rapports TbSp/TV (en mm<sup>-2</sup>) à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

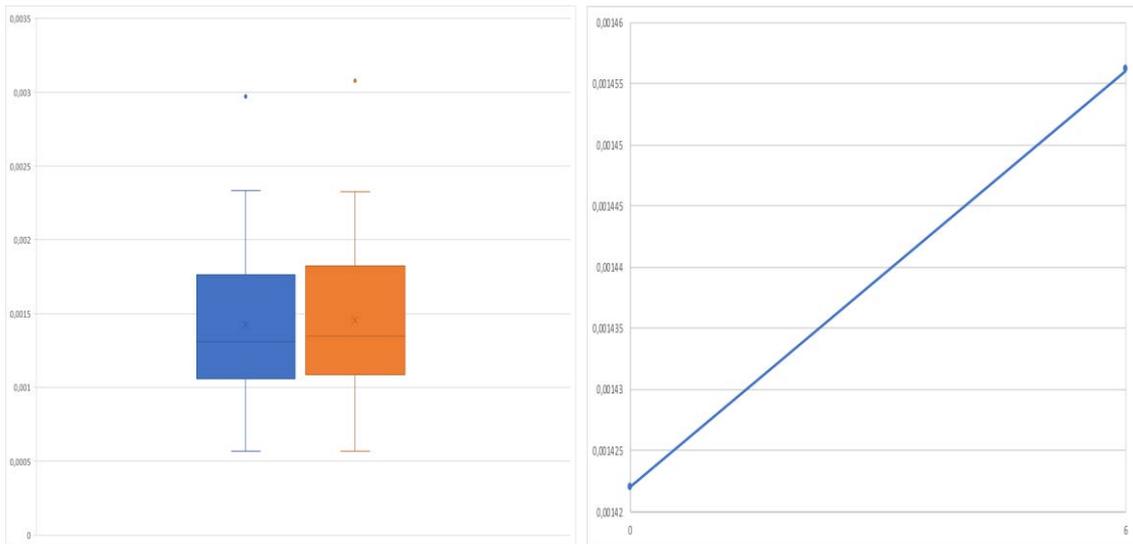


Figure IV – 33. « Box plots » des rapports BS/TV (en  $\text{mm}^{-1}$ ) à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

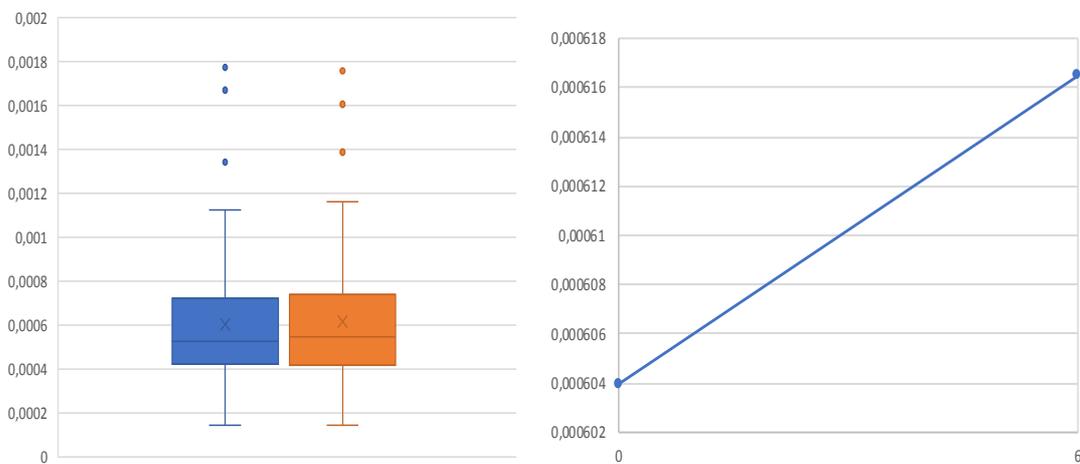


Figure IV – 34. « Box plots » des rapports TbN/TV (en  $\text{mm}^{-4}$ ) à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

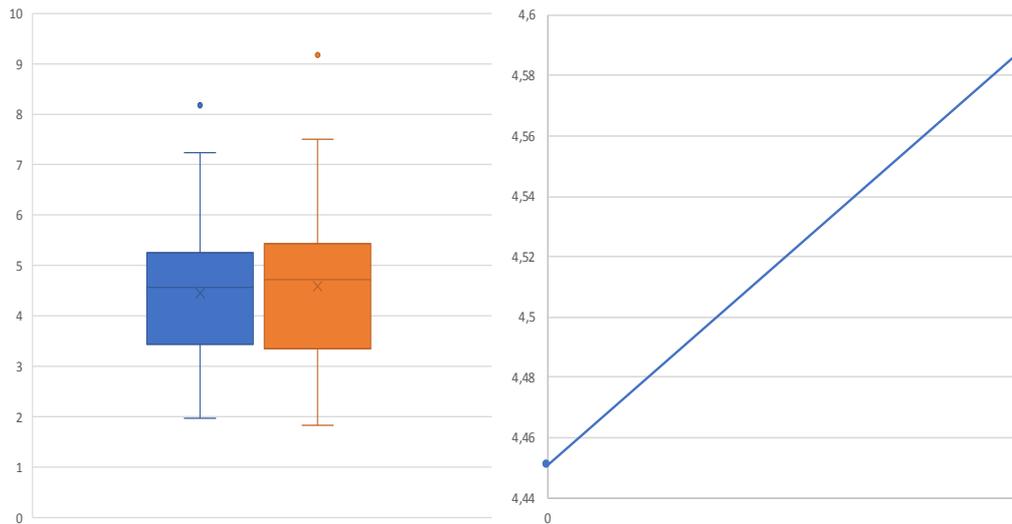


Figure IV – 35. « Box plots » du TbPf à l'état frais (en bleu) et après 6 mois de conservation (en orange) à gauche et courbe de la moyenne des mesures à 0 et 6 mois de conservation à droite.

S'agissant de la totalité des fragments de côtes, une comparaison des rapports BV sur TV a été réalisée pour chaque temps d'analyse par Anova déséquilibrée à 2 facteurs et interaction. Cette analyse a été faite pour tenir compte du facteur temps d'analyse et du facteur sujet car les échantillons osseux étant issus de corps différents. Cette analyse portant sur 149 échantillons montre une corrélation de nos résultats aux facteurs explicatif de 9% ( $R^2 = 0,09$ ) avec une différence significative entre les temps d'acquisition avec  $p = 0,022$ . L'analyse de la somme des carrés montre que cette différence n'est pas liée à la provenance des corps ( $p = 0,126$ ) mais avec le temps d'acquisition ( $p = 0,01$ ). L'analyse d'impact des facteurs explicatifs (temps et provenance des corps) montre que l'analyse à 6 mois de conservation a un impact. Cet impact est observable sous la forme d'une décroissance significative sur la variable BV/TV de  $-1,738$   $[-3,296 ; -0,18]$  IC95% avec  $p = 0,029$ . L'analyse à 36 mois de conservation dans notre étude n'a pas d'impact significatif ( $p=0,646$ ).

Nous avons montré une modification significative de l'os trabéculaire. Cette modification est visible sous la forme d'une réduction du volume de l'os et la diminution de l'épaisseur et de l'espacement trabéculaire. Nous avons observé une augmentation relative de la surface osseuse, du nombre de trabécules et une majoration du motif trabéculaire (TbPF). La diminution de volume osseux relative associée à la baisse de l'épaisseur trabéculaire semblent traduire un appauvrissement de la quantité osseuse. Nous observons cependant une diminution de

l'espacement moyen relatif des trabécules. Cela peut être interprété soit comme une formation d'os de novo soit des modifications architecturales avec une « fragmentation » / transformation de l'os trabéculaire. Cette dernière hypothèse est soutenue par l'augmentation du nombre relatif de trabécule par rapport au volume étudié. Elle permettrait d'expliquer l'augmentation de surface relative de l'os rapporté au volume d'étude. Dans cette hypothèse, l'atteinte diagénétique de l'os trabéculaire se traduirait par une fragmentation trabéculaire en trabécule de plus petites tailles, plus faiblement espacés. Cela générerait une augmentation « artificielle » de la surface osseuse. Cette modification de l'architecture trabéculaire est étayée par l'augmentation du TbPf traduisant un appauvrissement de la connectivité trabéculaire. L'étude des images acquises au  $\mu$ CT semble étayer cette hypothèse. Nous avons en effet la possibilité d'observer une réduction visible de l'épaisseur trabéculaire sur les images (figure IV – 36). Cette image montre également la perte de connectivité entre certains trabécules après 6 mois de conservation.

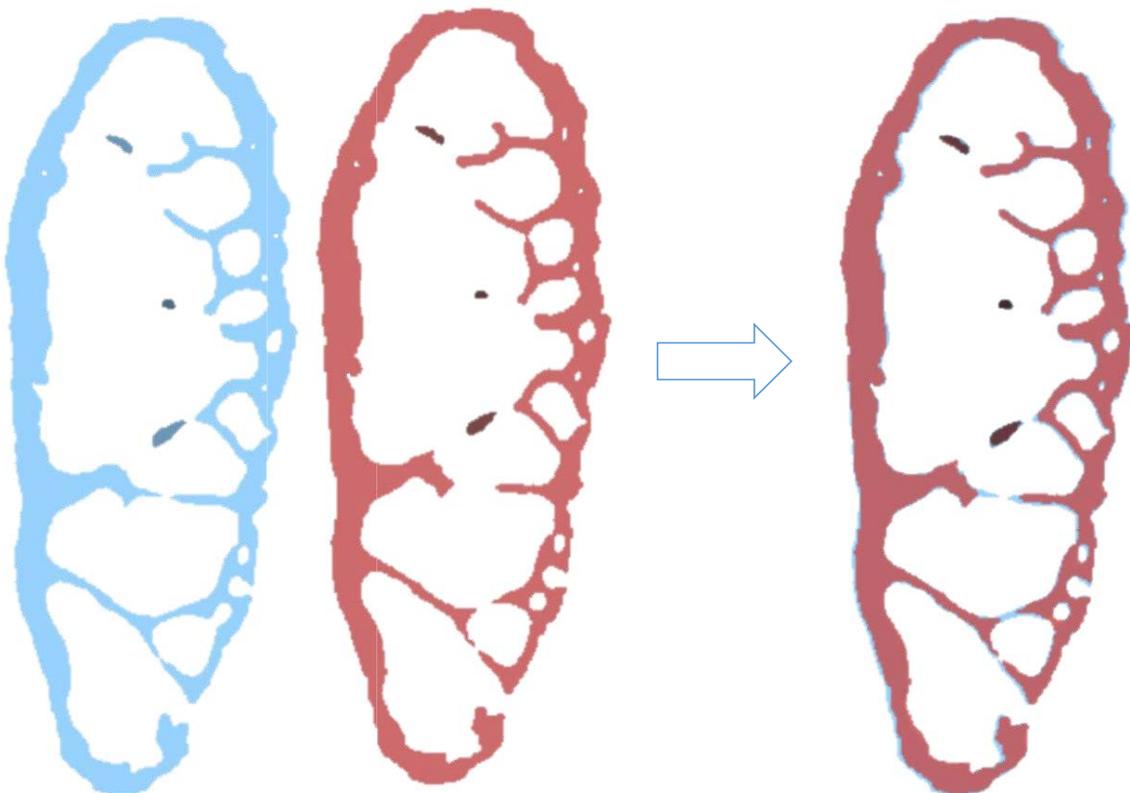


Figure IV – 36. Vue en coupe de la sixième côte gauche avant conservation (en bleu) et après six mois de conservation dans la partie gauche de la figure (en rouge). La superposition des images dans la partie droite de l'image permet de mettre en évidence les différences dans l'os trabéculaire avec mise en évidence d'une réduction de l'épaisseur trabéculaire.

Bien que significatives, les modifications mises en évidence sont très petites en termes d'ordre de grandeur. De plus, il n'est pas possible de déterminer le caractère continu ou ponctuelle de ces modifications sur les 6 mois de conservation car l'analyse s'est limitée à deux acquisitions. Nous mettons néanmoins en évidence des modifications au cours du temps sur des fragments osseux *post mortem* costaux. Les modifications sont significatives pour tous les paramètres et des modifications sont visibles directement sur les images acquises au  $\mu$ CT. Comme pour les autres études de ce chapitre, nous faisons l'hypothèse que les variations observées sont liées à une modification de la partie organique de l'os. Ces modifications seraient au moins en partie liée à la déshydratation intense précoce. Nous pouvons envisager qu'il survient également des modifications de la partie minérale de l'os, ces deux phases étant intimement liées dans l'évolution diagénétique de l'os (Kendall et al 2018). Cela peut être envisagé devant la visualisation microscopique de ces variations et sur une durée de conservation de plusieurs mois.

L'analyse des côtes à l'état frais et après 6 mois de conservation a permis de voir que les résultats pouvaient être influencés par l'origine des fragments osseux. Ces différences étaient significatives dans notre étude liée aux corps dont étaient issues les côtes. Ce travail montre que seul le rapport du volume osseux sur volume d'étude peut être utilisé pour comparer des échantillons de côtes issues de corps différents car sans effet significatif. Ce résultat n'est pas extrapolable dans le sens où seul des côtes ont été utilisées et que le nombre de sujet inclus est limité. Ce résultat présente un intérêt en termes de configuration des futures études. Les autres variables peuvent être étudiées en interindividuelles mais en tenant compte de leur différence pouvant être significative statistiquement.

Nous montrons en conséquence que la comparaison du rapport BV sur TV est possible entre échantillons sur des temps d'analyses différents sans que l'effet individuel soit significatif (étude par Anova à deux facteurs). Ce résultat est intéressant pour les futures études puisqu'il permet d'envisager la comparaison d'échantillons issus de corps différents. Ce type d'analyse a montré que le temps était faiblement lié aux variations ( $r^2$  à 9% pour une forte corrélation proche de 100% et une corrélation nulle à 0%). Il faut tenir compte de ce critère et préférer la comparaison des échantillons à eux même au cours du temps, dès que possible. Dans notre étude, le faible échantillon de fragments conservés 36 mois (12 versus 44 fragments étudiés à 6 mois et 88 à l'état frais) peut expliquer l'absence d'effet significatif par rapport aux deux autres temps. Un échantillonnage plus équilibré pourra être envisagé à l'avenir pour vérifier si la conservation à des temps plus long montre une variation significative des variables analysées au  $\mu$ CT. Il est en effet peu probable que les variations visualisées soient stoppées après 6 mois

de conservation. Il est également peu probable que ces modifications ne soient pas échelonnées sur un temps long, expliquant les modifications macroscopiques observées sur des os plus vieux voire archéologiques.

Si on compare ces résultats avec ceux mis en évidence pour les fragments de voûte crânienne, on peut observer que les modifications ne vont pas dans le même sens pour certaines variables (tableau IV – 6).

Tableau IV – 6. Tendances pour chaque variable en fonction du type d'os étudié au  $\mu$ CT.

Tendance des variables	Fragments de voûte	Fragments de côte
<i>BV (ou BV/TV)</i>	Diminution	
<i>BS (ou BS/TV)</i>	Diminution	Augmentation
<i>TbTh (ou TbTh sur TV)</i>	Augmentation	Diminution
<i>TbSP (ou TbSp sur TV)</i>	Augmentation	Diminution
<i>TbN (ou TbN sur TV)</i>	Diminution	Augmentation
<i>TbPf</i>	Augmentation	

Cette observation renforce l'utilité de travailler sur plusieurs types d'ossements humains *post mortem* puisqu'ici nous observons des tendances différentes pour la surface osseuse (BS), l'épaisseur (TbTh), le nombre (TbN) et l'espacement trabéculaire (TbSp). Cette observation suggère également que l'évolution diagénétique d'un os est dépendante de sa composition et de sa structure. Il existe des différences dans l'évolution du trabécule d'un fragment de voûte crânienne par rapport à un fragment de côte. A l'origine de ces différences de tendance, il peut être rappelé la différence d'organisation trabéculaire en fonction du site de prélèvement (dense dans la voûte crânienne et plus aéré dans les côtes) comme en témoigne le TbPf analysé au  $\mu$ CT. La différence de volume étudié peut aussi être discutée comme élément de variation puisque les fragments de côtes correspondaient à des volumes d'études compris entre 600 et 2000 mm<sup>3</sup> là où le volume des échantillons de voûte correspondaient à un volume de 1 mm<sup>3</sup>. Cette différence de volume est suffisante en soi pour limiter la comparaison des données entre voûte et côtes. Là encore, un travail complémentaire permettrait de répondre en partie à cette question avec de plus grand volumes d'étude pour des fragments de voûte. De façon plus

générale, l'équilibrage dans la quantité et le volume des échantillons est un élément à prendre en compte dans la préparation d'une étude comme en témoignent nos résultats.

Ce travail présente plusieurs limites qu'il convient de rappeler et qui sont en partie les mêmes que celles évoquées dans l'étude n°1 et l'étude n°2 de ce chapitre, à savoir :

- L'ostéopénie relative liée à l'âge du donneur, limitant les possibilités d'extrapolation des résultats à une population générale ;
- Les deux temps d'analyse, limitant la possibilité de caractériser l'évolutivité et le caractère continu et / ou stable des variations
- L'absence de suivi longitudinal de l'ensemble des fragments, notamment sur 36 mois réduit les possibilités d'interprétation, cela étant une telle durée de conservation est difficilement envisageable sur le temps d'une thèse ;
- La durée de 6 mois de conservation pour les échantillons comparés à eux-mêmes est une durée assez limitée au regard des problématiques en anthropologie médico-légale et en archéologie ;
- L'absence de possibilité d'interprétation biologique des observations faites au  $\mu$ CT ;
- La préparation particulière des échantillons, permettant de considérer les résultats comme étant issus de test *in vitro*, limitant l'interprétation.

Nous montrons des variations significatives au cours du temps sur des fragments costaux *post mortem* dans un travail original et prospectif. Nous mettons en évidence que la plupart des variables analysées au  $\mu$ CT sont significativement différentes en inter individuel. Cela signifie que l'étude prospective d'ossement doit prendre en compte cet élément et tenter de comparer chaque échantillon à lui-même au cours du temps. Nous constatons des variations significatives liées au temps et apportons de nouvelles données en milieu standard pour de futures études avec plusieurs milieux de conservation. Nous montrons enfin que les variations mises en évidence avec des fragments costaux sont différentes de celles mises en évidence sur des fragments de voûte du crâne. Cela étaye l'utilité de travailler sur de multiples ossements. La plupart des résultats bénéficient de résultats statistiques significatifs avec des tests qualifiés de « robustes ». Ces éléments sont à compléter de données supplémentaires notamment avec des techniques permettant d'explorer l'aspect biologique et physico-chimique de l'os. Bien qu'il ne soit pas encore possible de déterminer le délai *post mortem* à partir de ce travail, la constatation de

variations visibles sur les images au  $\mu$ CT après seulement 6 mois de conservation est un élément encourageant pour la suite de cette problématique scientifique.

- Conclusion

Cette étude montre des variations significatives de l'architecture trabéculaire costale *post mortem* après 6 mois de conservation en milieu dit « standard » (stable et contrôlé en température et hygrométrie) au  $\mu$ CT. Ces constatations concordent avec les éléments de la littérature suggérant une modification précoce de l'os en *post mortem*.

- **Conclusion du chapitre**

Les trois études réalisées dans le cadre d'une conservation en milieu standard ont permis de collecter des résultats originaux avec un milieu stable et reproductible. Ces résultats doivent être considérés comme *in vitro* dans la mesure où de nombreuses modifications des ossements ont été réalisées, notamment pour le passage au  $\mu$ CT. Nos résultats ne peuvent donc pas être extrapolés à la réalité médico-légale. Ces résultats doivent servir de base à des études complémentaires sur plus d'échantillons, plus de corps, sur des durées de conservation plus importantes et avec différents milieux de conservation.

Nos résultats confortent l'existence de modifications très précoces d'un point de vue anthropologique et archéologique (de quelques semaines à quelques mois). Nos données montrent aussi les différences de tendances pouvant exister entre des fragments de voûte crânienne et des fragments de côte.

Nos résultats montrent également l'influence de l'équilibrage des échantillons et soulèvent les questions de la taille des échantillons et de leur provenance (en termes de nombre et de type de corps dont l'os est issu). Ces éléments influencent les données récoltées.

Les limites du  $\mu$ CT sont à connaître notamment en termes de limite d'interprétation des phénomènes biologiques constatés. Le mode de fonctionnement du  $\mu$ CT doit aussi être appréhendé et testé notamment en termes d'erreur de précision.

A la lumière de nos résultats, le  $\mu$ CT apparaît comme une très bonne technique d'imagerie et son caractère non destructeur est très précieux. Cela dit, l'absence d'explication ou d'étayage

biologique / physico-chimique des observations représente un élément à envisager lors de son utilisation. L'anticipation de cet aspect par l'adjonction d'une technique d'analyse histologique avec marquage (histomorphométrie par exemple), d'imagerie microscopique (microscopie électronique et sonde EDX) ou de spectrométrie pourraient apporter des éléments précieux d'interprétation en complément du  $\mu$ CT. L'étude microbiologique conjointe à celle de la structure osseuse apparaît aussi comme l'avenir avec l'intérêt que suscite le microbiote cadavérique et son implication dans la détermination des causes et du moment de la mort (Mesli et al 2017).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse montre l'utilité évidente du  $\mu$ CT et des techniques d'imagerie de ce type en taphonomie osseuse.

Ce travail a mis en évidence des modifications trabéculaires précoces sur quelques semaines à quelques mois de conservation. Il a également pu mettre en évidence la nécessité de connaître la marge d'erreur de l'appareil utilisé. Il montre la nécessité de travailler sur corps frais pour des études taphonomiques.

Ce travail de thèse s'est limité à l'étude de l'os trabéculaire pour des raisons de délimitation claire de ce type d'os. Le travail sur l'os cortical sera à faire à partir des images déjà acquises et notamment sur la porosité corticale et son évolution au fil des phénomènes diagénétiques.

L'utilisation du  $\mu$ CT est facilitée par le volume d'étude important, le rapport temps d'analyse / volume d'étude avantageux et le caractère non destructeur de cette technique d'imagerie. Ces éléments sont très précieux dans le cadre taphonomique avec l'étude prospective d'un échantillon au cours du temps.

Finalement, les seules limites du  $\mu$ CT sont sa capacité d'analyse (taille de la chambre d'acquisition, résolution maximum) mais en constante progression, le coût horaire de l'analyse et surtout l'absence d'explication physico-chimique des observations.

Comme il a été précisé à plusieurs reprises dans ce travail, connaître ces limitations permet d'envisager des travaux avec des techniques d'analyses complémentaires. Il s'agit d'une piste qui sera envisagée à l'issue du travail de thèse avec notamment :

- des analyses avec un  $\mu$ CT permettant une analyse d'un os long en entier (type fémur)
- le développement d'un travail complémentaire de séquençage protéique de l'os conjointement à l'analyse au  $\mu$ CT
- le développement d'un travail histologique complémentaire pour observer les phénomènes chimiques, l'index histologique d'oxford et d'éventuelles attaques bactériennes osseuses.

Les futurs travaux seront également réalisés dans différents environnements de conservation avec la conservation des parties molles pour certains échantillons (avec d'éventuelles études microbiologiques associées).

De façon plus générale, le champ de la taphonomie osseuse est encore vaste et peu exploré. De nombreux travaux restent à réaliser et les différences environnementales nationales et

internationales ainsi que les modifications climatiques actuelles sont autant de paramètres et de différences à prendre en compte et qui garantissent l'attrait et les résultats originaux dans ce champ de recherche. L'interdisciplinarité au sein de la taphonomie osseuse semble également nécessaire au vu des limites que chaque technique d'analyse présente en médecine légale et en anthropologie médico-légale. Enfin, le peu d'études fondamentales en taphonomie osseuse à ce jour permettent de poursuivre des travaux tant en indoor qu'en outdoor. Les données collectées dans ces études restent précieuses dans tous les cas.

Si l'estimation du délai *post mortem* osseux au  $\mu$ CT n'est pas réalisée à l'issue de ce travail, les données collectées serviront de base pour construire des modèles de conservation et d'intégration des facteurs environnementaux plus complexes à l'avenir.

## REFERENCES

- Aboshi H, Takahashi T, Komuro T et al (2005) A method of age estimation based on the morphometric analysis of dental pulp in mandible first premolars by means of three-dimensional measurements taken by micro CT. *Nihon Univ. Dent. J.* 79:195–203
- Amadasi A, Cappella A, Cattaneo C et al (2017) Determination of the post mortem interval in skeletal remains by the comparative use of different physico-chemical methods: Are they reliable as an alternative to  $^{14}\text{C}$ ? *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 68:213–221
- Bartsiokas A & Middleton AP (1992) Characterization and dating of recent and fossil bone by X-ray diffraction. *J of Archaeological Sci* 19(1):63-72
- Beauthier JP (2011) *Traité de médecine légale. 2<sup>nd</sup> ed De Boeck S.A 2011*
- Bedino JH (2003) Embalming chemistry: glutaraldehyde versus formaldehyde. *Champion Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices.*649:2614–2632
- Behrensmeyer AK (1978) Taphonomic and ecologic information from bone weathering. *Paleobiology* 4:150–162
- Bell LS (1990) Palaeopathology and diagenesis: an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging. *J of Archaeological Science* 17(1):85-102
- Bell LS, Skinner MF, Jones SJ (1996) The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci Int* 82:129-140
- Berg LS (1963) The determination of bone age. In F Lundquist (ed.): *Methods of forensic Science.* New York: Wiley and Sons, 251-3
- Berg S & Specht W (1958) Studies in determination of length of time of burial of skeletal parts. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin* 47(2):209
- Bertoluzza A, Brasili P, Castri L et al (1997) Preliminary results in dating human skeleton remains by Raman spectroscopy. *Journal of Raman spectroscopy* 28(2-3):185-5
- Blum F (1896) Über Wesen und Wert der Formolhärtung. *Ann Anat.* 11:718–727
- Bonucci E (2000) Mechanical testing of the bone and the bone–implant interface. *Basic Composition and Structure of Bone.* CRC Press, Boca Raton, FL, 3-22
- Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H et al (1995) Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 16:545–551
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA et al (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 25(7):1468–86

- Brenner E (2014) Human body preservation – old and new techniques. *J Anat.* 224(3):316- 44.
- Brown MA, Bunch AW, Froome C et al (2018) Citrate Content of Bone as a Measure of Postmortem Interval: An External Validation Study. *J Forensic Sci*, 63(5):1479-1485 - doi: 10.1111/1556-4029.13716
- Cappella A, Gibelli D, Muccino E et al (2015) 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* 1–10
- Caruso V, Cummaudo M, Maderna E et al. (2018) A comparative analysis of microscopic alterations in mod-ern and ancient undecalcified and decalcified dry bones. *Am J Phys Anthropol* (165):363–369. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23348>
- Castellano MA, Villanueva EC & Von Frencke R (1984) Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *J Forensic Sci* 29(2):527-34
- Cecchetto G, Amagliani A, Giraudo C et al (2012) MicroCT detection of gunshot residue in fresh and decomposed firearm wounds. *Int J Legal Med* 126(3):377–83
- Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E et al (2005) Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 20(7):1177–84
- Chappard D, Baslé MF, Legrand E et al (2008) Trabecular bone microarchitecture: A review. *Morphologie* 92:162–70
- Chappard D, Baslé MF, Legrand E et al (2011) New laboratory tools in the assessment of bone quality. *Osteoporos Int.* 22: 2225
- Collins MJ, Nielsen–Marsh CM, Hiller J et al (2002). The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3):383-394
- Conard NJ, Walker SJ, Kindle AW (2008) How heating and cooling and wetting and drying can destroy dense faunal elements and lead to differential preservation. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.* 266:236–245
- Cook SF (1968) Dating prehistoric bone by chemical analysis. In: Heizer R, Cook SF (eds) *The application of quantitative methods in archaeology.* Viking Fund Publications in Anthropology, Chicago, pp 223–245
- Creamer JJ, Buck AM (2009) The assaying of haemoglobin using luminal chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence* 24(5):311–316
- Currey JD, Brear K, Zioupos P et al (1995) Effect of formaldehyde fixation on some mechanical properties of bovine bone. *Biomaterials.* 16:1267–1271
- Deguette C, Chappard D, Libouban H et al (2018) The contribution of Micro-CT to the evaluation of trabecular bone at the posterior part of the auricular surface in men. *Int J Legal Med* 132: 1231. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1139-1>

Delannoy Y (2016). Caractérisation de la diagenèse osseuse en anthropologie médico-légale : étude macroscopique, spectrométrique et histomorphologique. École doctorale Biologie Santé, Université de Lille

Delannoy Y, Colard T, Le Garff E et al (2016) The mechanism of the keyhole lesion reassessed: An experimental approach. *J Forensic Leg Med.* 37:1–7

Delannoy Y, Colard T, Le Garff E et al (2016) Effects of the environment on bone mass: a human taphonomic study. *Leg Med.* 20:61–67

Delannoy Y, Colard T, Cannet C et al (2017) Characterization of bone diagenesis by histology in forensic contexts: a human taphonomic study. *Int J Legal Medicine* DOI 10.1007/s00414-017-1699-y

Donley GE & Fitzpatrick LA (1998) Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization: possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends in cardiovascular medicine* 8(5):199- 206

During A, Penel G & Hardouin P (2015) Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Progress in Lipid Research*, 59:126–146

Facchini F & Pettener D (1977) Chemical and physical methods in dating human skeletal remains. *Am J Phys Anthropol* 47(1):65–70

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM et al (1989) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 4(1):3-11

Fiedler S & Graw M (2003) Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere. *Naturwissenschaften.* 90(7):291–300

Fonseca A, Cherubini K, Veeck E et al (2008) Effect of 10% formalin on radiographic optical density of bone specimens. *Dentomaxillofac Radiol* 37:137

Friedrich F, Beutel RG (2008) Micro-computed tomography and a renaissance of insect morphology, in: S.R. Stock (Ed.), *Developments in X-ray tomography VI*, Proc. SPIE 7078 70781U

Galloway A, Birkby WH, Jones AM et al (1989) Decay rates of human remains in an arid environment. *Journal of Forensic Sciences* 34:607-616

Garland AN, Janaway RC & Roberts CA (1988) A study of the decay processes of human skeletal remains from the parish church of the Holy Trinity, Rothwell, Northamptonshire. *Oxford J Archaeology* 7(2): 235-249

Gibson L (1985) The mechanical behaviour of cancellous bone. *Journal of biomechanics*, 18(5):317-328

Gleizes V, Viguier E, Féron JM (1998) Effects of freezing on the biomechanics of the intervertebral disc. *Surg. Radiol. Anat.* 20:403–407

Goh JCH, Ang EJ, Bose K (1989) Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones. *Acta Orthop.* 60:465–467

Goodyear SR, Gibson IR, Skakle JM, Wells RP & Aspden RM (2009) A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy. *Bone* 44(5):899-907

Hackett CJ (1981) Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law* 21(4):243-265

Haglund WD & Sorg MH (1996) *Forensic taphonomy. The postmortem fate of human remains.* CRC Press, Boca Raton

Hall K (1999) The role of thermal stress fatigue in the breakdown of rock in cold regions. *Geomorphology* 31:47–63

Hardouin P, Pansini V & Cortet B (2014). Bone marrow fat. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*, 81(4) :313–319

Hedges REM & Millard AR (1995) Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *J. Archaeol. Sci.* 22:155–164

Hedges RE (2002) Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44(3):319-328

Hammer N, Voigt C, Werner M et al (2014) Ethanol and formaldehyde fixation irreversibly alter bones' organic matrix. *J Mech Behav Biomed Mater.* 29:252- 8

Henry L (2006) *Approche micromécanique de l'os cortical : mesures de champs et simulation numérique.* Ecole centrale Paris, Paris, France

Hoke N, Grigat A, Grupe G et al (2013) Reconsideration of bone postmortem interval estimation by UV-induced autofluorescence *Forensic Sci Int.* 10;228(1-3):176.e1-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.013

Hopwood D (1969) Fixatives and fixation: a review. *Histochem J.* 1:323–360.

Howes JM, Stuart BH, Thomas PS, Raja S, O'Brian C (2012) An investigation of model forensic bone in soil environments studied using infrared spectroscopy. *J Forensic Sci* 57(5): 1161–1167

Introna F Jr, Di Vella G, Campobasso CP (1999) Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *J Forensic Sci* 44(3):535–538

Iqbal MA, Ueland M & Forbes SL (2018): Recent advances in the estimation of post-mortem interval in forensic taphonomy, *Australian Journal of Forensic Sciences*, DOI: 10.1080/00450618.2018.1459840

Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A et al (2011b) A pilot study on ethanol-polyethylene glycol-formalin fixation of farm animal cadavers. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124:225–227

- Jans MM, Kars H, Nielsen–Marsh C M et al (2002) In situ preservation of archaeological bone: a histological study within a multidisciplinary approach. *Archaeometry* 44(3):343-352
- Karr LP & Outram AK (2012) Tracking changes in bone fracture morphology over time: environment, taphonomy, and the archaeological record. *Journal of Archaeological Science* (39):555-559
- Kaye B, Randall C, Walsh D et al (2012) The effects of freezing on the mechanical properties of bone. *Open Bone J.* 4:14–19
- Kendall C, Høier Eriksen AM, Kontopoulos I et al (2018) Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 491:21–37
- Knight B & Lauder I (1969) Methods of dating skeletal remains. *Hum Biol* 41(3):322–341
- Knight B & Lauder I (1967) Practical methods of dating skeletal remains: a preliminary study. *Med Sci Law* 7(4):205–209
- Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA et al (1990) Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res.* 8(6):833–842
- Lan S, Luo S, Huh BK et al (2013) 3D Image Registration Is Critical to Ensure Accurate Detection of Longitudinal Changes in Trabecular Bone Density, Microstructure, and Stiffness Measurements in Rat tibiae by In vivo Micro Computed Tomography ( $\mu$ CT). *Bone.* 56(1):83–90
- Larrue A (2010) Observation et quantification tridimensionnelle de microfissures de l'os trabéculaire par micro tomographie Synchrotron. École Doctorale Électronique, Électrotechnique, Automatique. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon
- Lee W & Jasiuk I (2014) Effects of freeze-thaw and micro-computed tomography irradiation on structure-property relations of porcine trabecular bone. *J. Biomech.* 47:1495–1498
- Lefèvre E (2015) Caractérisation multimodale des propriétés de l'os cortical en croissance. Biomécanique. École doctorale Sciences du Mouvement Humain, Université Aix Marseille, France
- Le Garff E, Mesli V, Delannoy Y et al (2016) Technical note: early post-mortem changes of human bone in taphonomy with  $\mu$ CT. *Int J Legal Med* (2017) 131: 761. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1509-y>
- Le Garff E, Mesli V, Delannoy Y et al (2017) The precision of micro-tomography in bone taphonomic experiments and the importance of registration. *Forensic Sci Int* 273:161-167. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.02.005
- Le Garff E, Mesli V, Marchand E et al (2018) Is bone analysis with  $\mu$ CT useful for short postmortem interval estimation? *Int J Legal Med* 132: 269 <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1696-1>

- Lu Y, Boudiffa M, Dall'Ara E et al (2015) Evaluation of in-vivo measurement errors associated with micro-computed tomography scans by means of the bone surface distance approach. *Med Eng Phys.* 37(11):1091–7
- Lytle LT & Hedgecock DG (1978) Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains. *J Forensic Sci* 23(3):550-562
- MacLaughlin-Black SM, Herd RJM, Willson K et al (1992) Strontium-90 as an indicator of time since death: a pilot investigation. *Forensic Sci Int* 57:51-56
- MacNeil JA & Boyd SK (2008) Improved reproducibility of high-resolution peripheral quantitative computed tomography for measurement of bone quality. *Med Eng Phys.* 30(6):792–9
- Mayer RG (2012) *Embalming: History, Theory, and Practice*. New York: McGraw-Hill
- McLaughlin G & Lednev IK (2011) Potential application of Raman spectroscopy for determining burial duration of skeletal remains. *Anal Bioanal Chem* 403(8): 2511-8
- Mesli V, Neut C, Hédouin V (2017) *Postmortem bacterial translocation in Carter DO, Tomberlin JK, Benbow ME, Metcalf JL Forensic Microbiology*, Wiley
- Miller JH (2009) *The Large-Mammal Death Assemblage of Yellowstone National Park: Historical Ecology, Conservation Biology, Paleoecology (Ph.D. Dissertation)* University of Chicago, Chicago
- Miller JH (2011) Ghosts of Yellowstone: multi-decadal histories of wildlife populations captured by bones on a modern landscape. *PLoS One* 6 (3), e18057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018057>
- Miller JH (2012) The spatial fidelity of skeletal remains: elk wintering and calving grounds revealed by bones on the Yellowstone landscape. *Ecology* 93:2474–2482
- Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B et al (1998) Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone Vol.* 23:59–66
- Nazarian A, Hermannsson BJ, Muller J et al (2009) Effects of tissue preservation on murine bone mechanical properties. *J Biomech* 42:82–86
- Neis P, Hille R, Paschke M, Pilwat G, Schnabel A, Niess C, Bratzke H (1999) Strontium90 for determination of time since death. *Forensic Sci Int* 99(1):47–51
- Nielsen-Marsh CM, Hedges REM (2000a) Patterns of diagenesis in bone I: the effects of site environments. *J Archaeol Sci* 27:1139–1150
- Nielsen-Marsh CM, Hedges REM (2000b) Patterns of diagenesis in bone II: effects of acetic acid treatment and the removal of diagenetic CO<sub>2</sub>-. *J Archaeol Sci* 27:1151–1159

- Nishiyama KK, Campbell GM, Klinck RJ et al (2010) Reproducibility of bone micro-architecture measurements in rodents by in vivo micro-computed tomography is maximized with three-dimensional image registration. *Bone*. 46(1):155–61
- Ohman C, Dall'Ara E, Baleani M et al (2008) The effects of embalming using a 4% formalin solution on the compressive mechanical properties of human cortical bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 23:1294–1298
- Otsu N (1979) A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*. 9(1):62- 6
- Pascart T, Cortet B, Olejnik C et al (2016) Bone Samples Extracted from Embalmed Subjects Are Not Appropriate for the Assessment of Bone Quality at the Molecular Level Using Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 88(5):2777- 83
- Patonai Z, Maasz G, Avar P et al (2013) Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *Int J of Legal Medicine* 127(2):529-533
- Person A, Bocherens H, Saliège JF et al (1995) Early diagenetic evolution of bone phosphate: an X-ray diffractometry analysis. *J of Archaeological Sci* 22(2):211-221
- Pokines JT, King RE, Graham DD et al (2016) The effects of experimental freeze-thaw cycles to bone as a component of subaerial weathering. *Journal of Archaeological Science: Reports* 6:594–602
- Quatrehomme G (2015) *Traité d'anthropologie medico-légale*. 1<sup>st</sup> ed De Boeck Supérieur SA
- Ramsthaler F, Kreutz K, Zipp K et al (2009). Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra-and interobserver error. *Forensic science international*, 187(1):47-50
- Ramsthaler F, Ebach SC, Birngruber CG et al (2011) Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI®, and Combust® tests. *Forensic Sci Int* 209(1–3):59–63
- Reiche I, Vignaud C, Menu M (2002b) The crystallinity of ancient bone and dentine: new insights by transmission electron microscopy. *Archaeometry* 44:447–459
- Richards CS, Simonsen TJ, Abel RL et al (2012) Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography. *Forensic Sci. Int.* 220 (1-3):251-264, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forensicint.2012.03.012>
- Rougé-Maillart C, Cariou A, Jousset N et al (2016) La recherche scientifique sur les prélèvements biologiques réalisés dans le cadre des autopsies et objets de scellés judiciaires. Nécessité d'une adaptation législative. *Médecine & Droit* 2016 :4–13
- Rühli FJ, Kuhn G, Evison R et al (2007) Diagnostic value of micro-CT in comparison with histology in the qualitative assessment of historical human skull bone pathologies. *Am J Phys Anthropol*. 133(4):1099–111

- Ruppel ME, Miller LM & Burr DB (2008) The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporosis International* 19(9):1251–1265
- Rutty GN, Brough A, Biggs MJP et al (2013) The role of micro-computed tomography in forensic investigations. *Forensic Sci Int.* 225(1-3):60–6
- Schaffler MB & Burr DB (1988). Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of biomechanics* 21(1), 13-16
- Schrag B, Uldin T, Mangin P, Froidevaux P (2012) Dating human skeletal remains using a radiometric method: biogenic versus diagenetic  $^{90}\text{Sr}$  and  $^{210}\text{Pb}$  in vertebrae. *Forensic Sci Int* 220(1–3):271–278
- Schwarcz HP, Agur K, Jantz LM (2010) A new method for determination of postmortem interval: citrate content of bone, *J. Forensic Sci.* 55 (6):1516–1522
- Skedros JG, Holmes JL, Vajda EG et al (2005) Cement lines of secondary osteons in human bone are not mineral-deficient: new data in a historical perspective. *Anat. Rec. A* 286A:781–803
- Stiner MC, Kuhn SL, Weiner S et al (1995) Differential burning, re-crystallization, and fragmentation of archaeological bone. *J. Archaeol. Sci.* 22:223–237
- Suess HE (1955) Radiocarbon concentration in modern wood. *Science* 122(3166): 415-417
- Swift B (1998) Dating human skeletal remains: Investigating the viability of measuring the equilibrium between  $^{210}\text{Po}$  and  $^{210}\text{Pb}$  as a means of estimating the post-mortem interval. *Forensic Sci Int* 98(1):119-126
- Swift B, Lauder I, Black S et al (2001) An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: a radionuclide and trace element approach. *Forensic Sci Int* 117(1): 73-87
- Svidovyi VI, Riabinin IA, Vasil'ev OD (2011) [The microflora associated with anatomical embalming as a harmful factor of a working process] *Gig Sanit.* 51–53
- Tappen NC (1969) The relationship of weathering cracks to split-line orientation in bone. *Am. J. Phys. Anthr.* 31:191–198
- Tappen NC & Peske RG (1970) Weathering cracks and split-line patterns in archaeological bone. *Soc. Am. Arch.* 35:383–386
- Taylor RE, Suchey JM, Payen LA et al (1989) The use of radiocarbon ( $^{14}\text{C}$ ) to identify human skeletal materials of forensic science interest. *J Forensic Sci* 34(5):1196-1205
- Thomsen JS, Laib A, Koller B et al (2005) Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc.* 218(Pt 2):171–9

- Torimitsu S, Nishida Y, Takano T et al (2014) Effects of freezing and thawing process on biomechanical properties of the human skull. *Legal Med.* 16:102–105
- Trueman CNG, Behrensmeyer AK, Tuross N et al (2004) Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *J. Archaeol. Sci.* 31:721–739
- Trueman CN (2013) Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology* 56:475–486
- Trueman CN, Privat K, Field J (2008) Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 266:160–167
- Turner-Walker G, Nielsen-Marsh CM, Syversen U et al (2002). Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *Int J of Osteoarchaeology* 12(6):407-414
- Turner-Walker G (2011). The mechanical properties of artificially aged bone: Probing the nature of the collagen–mineral bond. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 310(1):17-22
- Tuross N, Behrensmeyer AK, Eanes ED (1989) Strontium increases and crystallinity changes in taphonomic and archaeological bone. *J. Archaeol. Sci.* 16:661–672
- Turpin C (2017) The Micro-Taphonomy of Cold: Differential Microcracking in Response to Experimental Cold-Stresses. *J Forensic Sci* 62(5):1134-1139
- Ubelaker DH, Buchholz BA, Stewart JE (2006) Analysis of artificial radiocarbon in different skeletal and dental tissue types to evaluate date of death. *J Forensic Sci* 51(3):484–488
- Ubelaker DH, Parra RC (2011) Radiocarbon analysis of dental enamel and bone to evaluate date of birth and death: perspective from the southern hemisphere. *Forensic Sci Int* 208(1–3): 103–107
- Urzel V (2014) Apport de la résonance magnétique nucléaire des solides à la caractérisation chimique et à la datation des os en anthropologie médico-légale. École doctorale science et environnement – spécialité anthropologie biologique, Université de Bordeaux
- Vandevoort F, Bergmans L, Cleynenbreugel J et al (2004) Age calculation using X-ray microfocus computed tomographic scanning of teeth. A pilot study, *J. Forensic Sci.* 49 (2004) 787– 790
- Van Haaren EH, van der Zwaard BC, van der Veen AJ et al (2008) Effect of long-term preservation on the mechanical properties of cortical bone in goats. *Acta Orthop.* 79:708–716
- Van Ruijven LJ, Mulder L & Van Eijden T (2007) Variations in mineralization affect the stress and strain distributions in cortical and trabecular bone. *Journal of biomechanics* 40(6):1211-1218

Weiner S & Bar-Yosef O (1990) States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: a survey. *J. Archaeol. Sci.* 17:187–196

Wilson SJ & Christensen AM (2017) A test of the citrate method of PMI estimation from skeletal remains *Forensic Sci Int.* 270:70-75. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.11.026

Wright LE & Schwarcz HP (1996) Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at dos Pilas, Guatemala: palaeodietary implications. *J. Archaeol. Sci.* 23:933–944

Yoshino M, Kimijima T, Miyasaka S et al (1991) Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Sci Int* 49(2):143–158

Zioupou P, Cook RB & Hutchinson JR (2008). Some basic relationships between density values in cancellous and cortical bone. *Journal of biomechanics*, 41(9):1961-1968

## ANNEXES

### Articles en lien avec le travail de thèse

1. Is trabecular bone analysis with microCT useful for short postmortem interval estimation? *Int J Legal Med* (2018) 132:269 <https://doi.org/10.1007/s00414-017-1696-1> E. Le Garff, V. Mesli, E. Marchand, H. Behal, X. Demondion, A. Bécart, V. Hédouin
2. Early post-mortem changes of human bone in taphonomy with  $\mu$ CT features. *Int J Legal Med* (2017) 131: 761. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1509-y>. E. Le Garff, V. Mesli, Y. Delannoy, T. Colard, X. Demondion, A. Bécart, V. Hédouin
3. The precision of micro-tomography in bone taphonomic experiments and the importance of registration. *Forensic Sci Int* (2016) 273:161-167. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.02.005 E. Le Garff, V. Mesli, Y. Delannoy, T. Colard, J. De Jonckheere, X. Demondion, V. Hédouin
4. Is it best to have it fresh? The influence of a formaldehyde conservation versus freezing on human bones for microCT bone taphonomy. *In prep*
5. In vitro trabecular human rib modifications after 6 and 36 months of controlled conservation. A bone taphonomy experiment with microCT. *In prep*

### Communications orales et affichées en lien avec le travail de thèse

1. Architecture osseuse humaine en taphonomie au micro-scanner : modifications sur les 10 premières semaines *post mortem* en milieu « standard ». 50<sup>ème</sup> congrès international francophone de médecine légale – 2017 – Paris. E Le Garff, V Mesli, E Marchand, X Demondion, D Gosset, A Bécart, V Hédouin.
2. Taphonomie osseuse et micro-scanner. 18<sup>ème</sup> congrès d'anthropologie médico-légale de Nice – 2015 – Nice. E Le Garff, E Marchand, V Mesli, A Bécart, V Hédouin, D Gosset
3. Étude de précision et de reproductibilité du micro-scanner en contexte taphonomique. *Société Française de Médecine Légale – 2015 – Paris*. E Le Garff, T Colard, A Bécart, X Demondion, V Hédouin, D Gosset
4. Human bone *post mortem* features in taphonomy. *Journées A Verbert – Ecole Doctorale Biologie Santé Université de Lille – 2017 – Lille*. E Le Garff, V Hédouin, A Bécart, X Demondion, D Gosset

### Encadrement en lien avec le travail de thèse – Master I Recherche Université de Lille

Nombre : 5 Soutenu : 5

- Lucie VINCENTE (Med3), juin 2016, Master I Recherche – Taphonomie : « Étude de la précision du micro-scanner sur des phalanges humaines *post mortem* »

- Marie POTIER (Med3), juin 2017, Master I Recherche – Taphonomie :  
« *Caractérisation macroscopique de fracture induite sur os frais et os sec, après une période de conservation en conditions contrôlées* »
- Laura MICHEL (Med3), juin 2017, Master I Recherche – Taphonomie :  
« *Modifications architecturales trabéculaire costales humaines au microCT après 6 mois de vieillissement en conditions contrôlées* »
- Rémi ROELAND (Med3), juin 2017, Master I Recherche – Taphonomie : « *Évolutions architecturales trabéculaires de fragments de voûtes crâniennes humaines post mortem : congélation versus formol à 1mois de conservation* »
- Alexia SAMIER (Med3), juin 2018, Master I Recherche – Taphonomie : « *Taphonomie osseuse au microCT – Influence du formol et de la congélation après 12 mois de conservation* »