

**SCHÉMAS D'INCISIONS ET DE FRACTURE DES DIFFÉRENTS
MORPHOTYPES DE DENTS ADAPTÉS AU RECUEIL
DE PULPES DENTAIRES ET À L'ANALYSE D'ADN**

**INCISION AND FRACTURE OF DIFFERENT MORPHOTYPES OF TEETH
SUITABLE FOR RECOVERY OF DENTAL PULP AND FOR DNA ANALYSIS**

A.-M. GRIMOUD ¹, C. KEYSER ², L. CALVO ¹, B. PAJOT ¹, J.-P. LODTER ¹

RÉSUMÉ

Les facteurs de risques de contaminations croisées des échantillons de tissus destinés à l'étude de l'ADN ancien sont nombreux. La pulpe dentaire étant mieux protégée mais en faible quantité, nous avons mis au point une technique de fracture des différents morphotypes de dents qui nous permet de recueillir la totalité de la pulpe dans des conditions aseptiques.

Mots-clés : pulpe dentaire, nouvelle technique d'accès, recueil aseptique optimisé, étude de l'ADN.

ABSTRACT

There are numerous risk factors for cross-contamination of tissue samples for DNA. As dental pulp is better protected but small in amount, we have developed a fracture technique for the different dental morphotypes which allows the total recovery of the pulp in aseptic conditions.

Key words: dental pulp, new method of access, improved aseptic collection, DNA study.

INTRODUCTION

Parmi les échantillons dont on dispose pour étudier l'ADN ancien, la dent représenterait une source d'ADN à l'abri des contaminations croisées (Brown, Brown, 1992 ; Hänni, 1994). Ainsi en médecine légale, pour des personnes décédées depuis trois

-
1. UMR 8555 du CNRS, 37 allées Jules Guesde, 31073 Toulouse Cedex, e-mail : ANNEMARIE.GRIMOUD@wanadoo.fr
 2. Institut de Médecine Légale, Laboratoire de biologie moléculaire de l'ADN ancien, Faculté de Médecine, 7 rue Ulmann, 67000 Strasbourg.

mois à vingt ans, le meilleur outil génétique est l'ADN dentaire (Ginther *et al.*, 1992). L'étude des pulpes dentaires permet la recherche d'ADN mitochondrial (Ohira, Yamada, 1999) et nucléaire (Schwartz *et al.*, 1991 ; Woodward *et al.*, 1994 ; Garcia *et al.*, 1996 ; Ohira, Yamada, 1999 ; Pfeiffer *et al.*, 1999 ; Sivagami *et al.*, 2000), mais également la recherche d'agents pathogènes (Drancourt *et al.*, 1998 ; Raoult *et al.*, 2000).

Le recueil des échantillons relève d'un protocole strict, excluant tout risque de contamination. Différents modes de recueil sont décrits, il s'agit essentiellement de dents broyées, sectionnées, ou trépanées (Hänni *et al.*, 1990 ; Di Benedetto *et al.*, 2000 ; Baker *et al.*, 2001 ; Pfeiffer *et al.*, 1999 ; Hummel *et al.*, 1999 ; Burger *et al.*, 1999 ; Garcia *et al.*, 1996 ; Drancourt *et al.*, 1998 ; Raoult *et al.*, 2000). Par ailleurs les recherches sur la protection de l'ADN fourni par les tissus durs de la dent ne portent que sur de l'ADN récent (Schwartz *et al.*, 1991 ; Garcia *et al.*, 1996 ; Baker *et al.*, 2001).

Le but du travail que nous présentons est, d'une part de définir des trajets de section, permettant d'exploiter les différents morphotypes de dents, en assurant quantitativement le prélèvement le plus efficace de pulpe dentaire et d'autre part, d'obtenir des échantillons non contaminés, en nous entourant lors du recueil des règles d'asepsie.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Échantillons

Origine

Les dents utilisées, au nombre de 23, pour mettre au point cette méthode, proviennent du dolmen de La Peyre, dont les fouilles ont été réalisées par B. Pajot (1994). Il s'agit de sépultures multiples dont le mobilier datable se rapporte pour l'essentiel à l'âge du cuivre soit à une période s'étendant de -3000 ans à -2300 ans av. J.-C.

Nature histologique des organes dentaires

La pulpe est une masse conjonctivo-vasculaire, qui occupe la cavité centrale de la dent, elle produit et nourrit la dentine. Comme tout tissu conjonctif, la pulpe est formée de substance fondamentale (glycosaminoglycane et glycoprotéines), de fibres de collagène et élastiques. La pulpe contient également des cellules : des fibroblastes, des fibrocytes, des cellules de défense, des cellules nerveuses et des odontoblastes.

La dentine est un tissu minéralisé d'origine mésenchymateuse, elle est composée de 12 % d'eau, 18 % de matière organique et 70 % de minéraux. Ce tissu est en rapport avec le ciment et l'émail à l'extérieur et la pulpe à l'intérieur, il n'est pas en contact avec le milieu extérieur. Sa dureté est supérieure à celle de l'os.

L'émail est composé de 97 à 98 % de minéral. Il ne contient que 1 à 2 % de matière organique et 1 à 2 % d'eau, il est complètement acellulaire. Il recouvre la portion coronaire du complexe pulpo-dentinaire. Il s'agit du tissu le plus dur de l'organisme, du fait de sa composition minérale élevée. Pourtant, l'émail reste perméable, mais sa perméabilité diminue avec l'âge.

La dent est ainsi un organe plus dense que l'os, tant au niveau minéral qu'organique. Cette particularité histologique protège l'ADN de la pulpe dentaire des contaminations. Dans cet organe, de l'ADN peut être mis en évidence dans la pulpe qui contient de nombreuses cellules et dans les tubulis dentinaires. En l'état actuel des connaissances, la mise en évidence d'ADN concerne la pulpe et l'extraction à partir de dents broyées. La dentine seule n'a pas été étudiée. Les améloblastes de l'émail ne contiennent pas d'ADN.

Méthode

Notre méthode se décompose en deux temps, tout d'abord une incision de la dent, qui nous permet de la fragiliser, suivie d'une fracture. L'originalité de ce travail est la présentation de trajets d'incision adaptés à chaque morphotype de dent et qui permettent d'accéder à la chambre et aux canaux pulpaire. Le temps nécessaire à la fracture de la dent et au prélèvement de la pulpe est d'environ 15 mn.

Matériel d'incision et de fracture des dents

L'ensemble du matériel est stérile ou à usage unique : disques carbone, mandrins, pièce à main, syndesmotome droit, sonde (*fig. 1*).

Traitement des dents

Les 23 dents qui composent l'échantillonnage ont été frottées avec une compresse stérile imprégnée d'eau bi-distillée, séchées, puis exposées sous UV pendant 30 mn sur chaque face.

Incision

L'incision doit préfigurer le trait de fracture, elle permet l'accès le plus complet possible au réseau canalaire de la dent. Les tracés d'incision sont définis selon les différents morphotypes de dents : monoradiculées et pluriradiculées. L'incision est réalisée au moyen d'un disque carbone monté sur la pièce à main à l'aide du mandrin.

– Dents monoradiculées :

Il s'agit des incisives mandibulaires et maxillaires, des canines mandibulaires et maxillaires et des prémolaires mandibulaires. L'incision est réalisée sur les faces vestibulaire et palatine (ou linguale pour les dents mandibulaires). Le trait d'incision ne doit pas atteindre la cavité pulpaire.

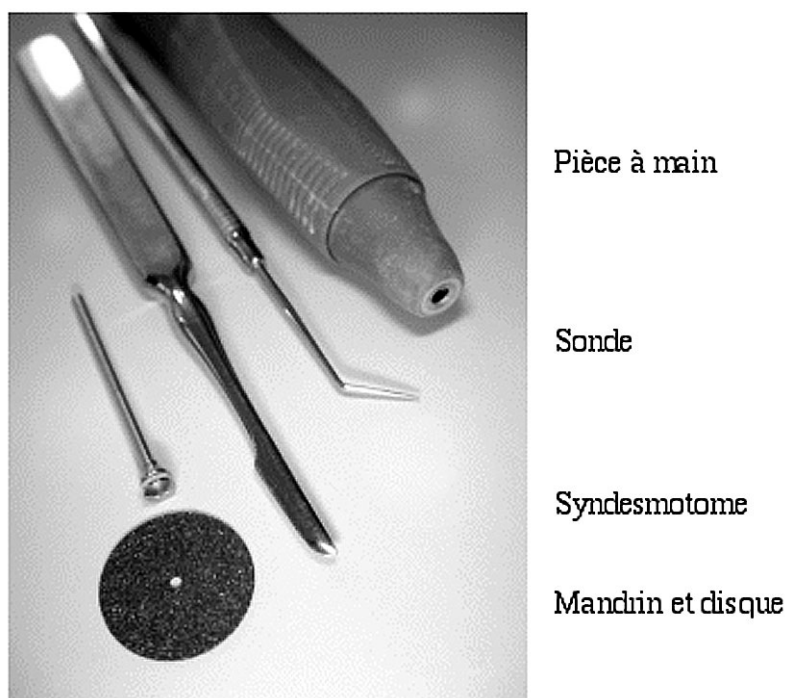


Fig. 1 - Matériel utilisé pour l'incision et la fracture des dents.

Fig. 1 - Material used for the incision and fracture of teeth.

– Dents biradiculées :

Pour les prémolaires supérieures, le tracé d'incision précédent est utilisé sur les faces vestibulaire et palatine.

– Dents pluriradiculées :

Les molaires maxillaires présentent trois racines, deux vestibulaires et une palatine ; une première incision vestibulaire passe entre les deux racines vestibulaires (*fig. 2a*) et vient entamer la racine palatine sur sa face vestibulaire, une deuxième incision est réalisée sur la face palatine (*fig. 2b*).

Les molaires inférieures présentent deux racines, la racine mésiale comporte deux canaux pulpaux, une incision mésiale passe entre ces deux canaux puis intéresse la racine distale sur ses faces mésiale et distale (*fig. 3*).



Fig. 2a - Incision vestibulaire d'une molaire maxillaire.

Fig. 2a - Vestibular incision of a maxillary molar.



Fig. 2b - Incision palatine d'une molaire supérieure.

Fig. 2b - Palatal incisions of a maxillary molar

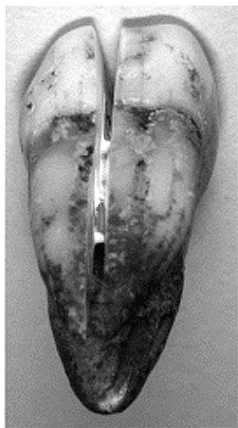
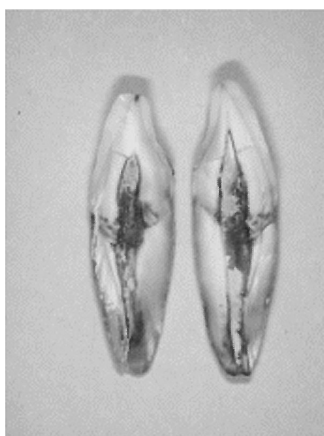


Fig. 3 - Incision de la racine mésiale d'une molaire mandibulaire sur la face mésiale, entre les deux canaux pulpaire.

Fig. 3 - Incision of the mesial root of a mandibular molar on the mesial face, between the two pulp canals.

La fracture

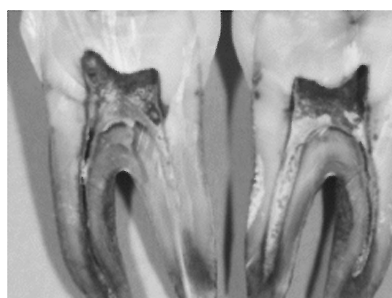
Les dents sont fracturées à l'aide d'un syndesmotome droit placé dans le trait d'incision et en réalisant un petit mouvement de luxation. Une légère pression doit être exercée simultanément afin d'assurer le partage de la dent sur toute sa longueur (fig. 4).



a) incisive
a) incisor



b) molaire maxillaire
b) maxillary molar



c) molaire mandibulaire
c) mandibular molar

Fig. 4 - Dents fracturées, exposition de la chambre pulpaire dans son plus grand volume.
Fig. 4 - Fractured teeth, exposure of the pulp chamber in its largest volume.

Recueil de la pulpe dentaire

La dent sectionnée est maintenue au-dessus d'un tube stérile. Les restes de pulpe dentaire sont recueillis à l'aide d'une sonde. La substance ainsi détachée des parois de la chambre pulpaire tombe directement dans le tube. En moyenne, nous avons récupéré 7,64 mg de poudre par dent. La sonde est un outil préférable à la curette, instrument pour lequel nous avons opté en premier lieu. La sonde, en effet, par son extrémité fine nous permet d'accéder aux anfractuosités camérales.

DISCUSSION

L'étude de l'ADN ancien à partir d'échantillons de pulpe dentaire fait appel à différents types de préparations. Une des techniques repose sur les principes de l'endodontie (Garcia *et al.*, 1996), la dent est trépanée au niveau de la couronne jusqu'à la pulpe, qui est recueillie à l'aide de racleurs. Les deux méthodes le plus souvent décrites dans la littérature pour recueillir les échantillons d'ADN pulpaire sont les dents broyées ou les dents sectionnées. Lors d'études de dents broyées, de l'ADN mitochondrial (Hänni *et al.*, 1990 ; Di Benedetto *et al.*, 2000 ; Baker *et al.*, 2001) et de l'ADN nucléaire (Burger *et al.*, 1999 ; Hummel *et al.*, 1999 ; Pfeiffer *et al.*, 1999) sont mis en évidence. L'étude de dents sectionnées consiste en la fracture des dents, soit de façon longitudinale (Garcia *et al.*, 1996 ; Drancourt *et al.*, 1998 ; Raoult *et al.*, 2000), soit selon un trait de fracture passant entre la couronne et la racine, le but étant de récupérer les restes de pulpe dentaire plus riches en cellules (Woodward *et al.*, 1994). D'après Garcia *et al.* (1996), la section des dents offre de meilleurs résultats, il s'agit de la méthode de choix si l'anatomie de la dent est préservée. L'accès à la chambre et aux canaux pulpaires par une fracture nette relève de l'acquisition de la maîtrise du geste en plaçant le syndesmotome dans le trait d'incision ; la difficulté allant croissant des dents monoradiculées aux pluriradiculées, tel que les molaires supérieures. Par ailleurs, les dents destinées à l'analyse de l'ADN doivent encore être sur la mâchoire, et extraites aseptiquement ; l'apex des racines expose la dent libre aux risques de contaminations. Les caries et les microfractures sont autant de facteurs de risques.

Le degré de dégradation de l'ADN en fonction des facteurs extérieurs sur des périodes allant de T0 à cinquante ans dépend de paramètres tels que : le temps, le pH, l'humidité, le terrain, les micro-organismes, la température (Schwartz *et al.*, 1991 ; Garcia *et al.*, 1996 ; Baker *et al.*, 2001). Il semble que les dents fournissent une excellente protection à l'ADN quelles que soient les conditions de conservation des échantillons, avec une légère augmentation de la dégradation de l'ADN pour les échantillons conservés dans l'eau (dilution, augmentation de l'hydrolyse) (Schwartz

et al., 1991 ; Garcia *et al.*, 1996). Toutefois, il est possible d'extraire de l'ADN même après incinération sévère, ce qui s'avère impossible au niveau osseux (Baker *et al.*, 2001). Il est à noter que les résultats varient plus en fonction des locus étudiés que des conditions environnementales, ainsi ils sont mauvais pour le locus D1S80 (580 paires de bases) (Garcia *et al.*, 1996), mais dans l'ensemble, l'étude des locus STR donne d'excellents résultats. Les meilleurs résultats sont obtenus pour les dents encore présentes dans les maxillaires, l'os offrant une protection au foramen apical (Garcia *et al.*, 1996). La qualité des séquences obtenues n'est pas fonction du morphotype des dents étudiées (Baker *et al.*, 2001). Les résultats paraissent influencés par différents paramètres, le volume pulpaire, l'âge au décès de l'individu et les antécédents pathologiques dentaires (Garcia *et al.*, 1996).

La maîtrise de la méthode de fracture des dents nous a permis de mettre en évidence de l'ADN dans la pulpe dentaire d'échantillons provenant de sépultures multiples du XI^e au XV^e du site de Saint Côme et de Saint Damien à Montpellier. Les premiers résultats que nous avons obtenus concernent les loci STR : D21S11, D3S1358, V WA, FGA, D7S820 et l'amélogénine du Kit AmpF-STR® Profiler Plus™, de Perking Elmer ; ils mettent en évidence la difficulté d'amplifier l'ADN ancien par PCR en raison de la présence d'inhibiteurs (Calvo *et al.*, 2002). La technique d'incision des dents que nous avons mise au point ne nous permet pas de noter de différences, quant à la qualité des fractures obtenues, en fonction de l'origine des échantillons traités.

Remerciements

À toute l'équipe du professeur B. Ludes (Laboratoire d'Anthropologie moléculaire de l'Institut de médecine légale de Strasbourg), M^{me} M. Defais et M^{me} C. Lesca (IPBS-CNRS, Toulouse) et à M^{me} S. Duchenne (UMR 8555 du CNRS, Toulouse).

BIBLIOGRAPHIE

- BAKER (L.E.), Mc CORMICK (W.F.), MATTESON (K.J.) 2001, A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth, *Journal of Forensic Sciences* 46: 126-130.
- BROWN (T.A.), BROWN (K.A.) 1992, Ancient DNA and the archeologist, *Antiquity* 66: 10-23.
- BURGER (J.), HUMMEL (S.), HERMANN (B.), HENKE (W.) 1999, DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis* 20: 1722-1728.
- CALVO (L.), GRIMOUD (A.-M.), RICAUT (F.), KEYSER (C.), LUDES (B.), CRUBÉZY (E.), LESCA (C.), LODTER (J.-P.) 2002, Étude d'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de sujets de la série ostéologique de Saint Côme et Damien, *Antropo* 1 : 21-29. www.didac.ehu.es/antropo
- DI BENEDETTO (G.), NASIDZE (I.S.), STENICO (M.), NIGRO (L.), KRINGS (M.), LANZINGER (M.), VIGILANT (L.), STONEKING (M.), PAABO (S.), BARBUJANI (G.) 2000, Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps, *European Journal of Human Genetics* 8: 669-677.
- DRANCOURT (M.), ABOUDHARAM (G.), SIGNOLI (M.), DUTOUR (O.), RAOULT (D.) 1998, Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12637-12640.
- GARCIA (A.), MUNOZ (I.), PESTONI (C.), LAREU (M.V.), RODRIGUEZ-CALVO (M.S.), CARRACEDO (P.) 1996, Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp, *International Journal of Legal Medicine* 109: 125-129.
- GINTHER (C.), ISSEL-TARVER (L.), KING (M.C.) 1992, Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth, *Nature Genetics* 2: 135-138.
- HÄNNI (C.) 1994, Archéologie et paléontologie moléculaires : application à l'étude des gisements, Thèse Doctorale, MON 20074.
- HÄNNI (I.C.), LAUDET (V.), SAKKA (M.), BÈGUE (A.), STÉHELIN (D.) 1990, Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones, *CR Acad. Sci. Paris* 310, 3 : 365-370.
- HUMMEL (S.), SCHULTES (T.), BRAMANTI (B.), HERRMANN (B.) 1999, Ancient DNA profiling by megaplex amplifications, *Electrophoresis* 20: 1717-1721.
- OHIRA (H.), YAMADA (Y.) 1999, Advantages of dental mitochondrial DNA for detection and classification of the sequence variation using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 20: 261-268.
- PAJOT (B.) 1994, le dolmen de La Peyre (Baour, Tarn), *Bulletin de la Société Archéologique de Tarn et Garonne* 119 : 7-27
- PFEIFFER (H.), HUHNE (J.), SEITZ (B.), BRINKMANN (B.) 1999, Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth, *International Journal of Legal Medicine* 112: 142-144.
- RAOULT (D.), ABOUDHARAM (G.), CRUBÉZY (E.), LARROUY (G.), LUDES (B.), DRANCOURT (M.) 2000, Molecular identification by « suicide PCR » of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 12800-12803.

- SCHWARTZ (T.), SCHWARTZ (E.), MIESZERSKI (L.), MC NALLY (L.), KOBITINSKY (L.) 1991, Characterisation of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions, *Journal of Forensic Sciences* 36: 979-990.
- SIVAGAMI (A.V.), RAJESWARAO (A.), VARSHNEY (U.) 2000, A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population, *Forensic Science International* 110: 107-115.
- WOODWARD (S.R.), KING (M.J.), CHIU (M.), KUCHAR (M.J.), GRIGGS (W.) 1994, Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues, *PCR Methods and amplification Technical Tips* 3: 244-247.