

**Protocole d'extraction de l'ADN post-mortem à partir de la pulpe dentaire
Protocol of extracting of post-mortem DNA from the dental pulp****J.Ghabri¹, R.Mabrouk¹, R.Kefi², A.BANASR³, N.Frih¹.**

1 : Service de médecine dentaire, EPS Charles Nicolle, Tunis 1007.

2 : Laboratoire de Génomique Biomédicale et Oncogénétique, Institut Pasteur de Tunis.

3 : Service de médecine légale, EPS Charles Nicolle, Tunis 1007.

Correspondance : Dr Jihen Ghabri, service de médecine dentaire, EPS Charles Nicolle, Tunis 1007. Mail : jghabri@yahoo.fr**Résumé :**

Introduction : La dent est un matériel de choix pour l'étude de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) post-mortem compte tenu de ses particularités, et notamment celle de disposer d'un tissu pulpaire protégé par un émail minéralisé, dur et résistant. Le but de ce travail est de décrire la méthode de récupération de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) à partir de la pulpe dentaire et de tester l'efficacité de deux kits d'extraction d'ADN post-mortem pour une éventuelle identification génétique. **Matériel et méthodes :** Dans cette étude, nous avons récupéré les pulpes de quatre dents (34,35,36 et 37) appartenant à un cadavre, la technique utilisée a été la section longitudinale des dents, ensuite nous avons procédé à l'extraction de l'ADN à partir de ces pulpes puis à sa quantification, en utilisant deux kits : - *Le DNeasy Blood and Tissue®* et *l'InnuPrep Forensic Kit®*. **Résultats :** La pulpe récupérée était de couleur brunâtre. Le protocole utilisé a permis de récupérer de l'ADN à partir des échantillons étudiés. La quantité d'ADN obtenu avec le kit numéro 1 DNeasy Blood and Tissue® (Echantillon M1) est 3,6 ng/µl. La quantité d'ADN obtenu avec le kit numéro 2 InnuPrep Forensic Kit® (Echantillon M2) est 12,2 ng/µl. **Discussion :** Les quantités faibles d'ADN sont expliquées par la dégradation de l'ADN post-mortem et sa contamination ; en effet l'ADN subit dès le décès une dégradation rapide, par différents facteurs qui fragmentent la molécule. La possibilité d'extraire et d'amplifier de l'ADN post-mortem d'une pulpe dentaire est liée à la quantité de pulpe retrouvée au niveau de la dent, ce qui est directement en rapport avec le volume pulpaire et l'état de la pulpe au décès de l'individu.

Mots clés : ADN post-mortem, pulpe dentaire, recueil aseptique, extraction d'ADN.**Abstract****Introduction:** Teeth represent the material of choice for the study of postmortem (DNA) having the particularity of pulp tissues protected by mineralized resistant enamel.

The purpose of this work is to describe the method of recovery of (DNA) from the dental pulp and to test the efficacy of two post-mortem DNA extraction kits for possible genetic identification. **Methods:** In this study, we collected pulps of four teeth (34, 35, 36 and 37) belonging to a cadaver, the technique used was the longitudinal section of the teeth, and then we proceeded to the extraction of the DNA to from these pulps then to its quantification, using two kits: - *The DNeasy Blood and Tissue®* - *The InnuPrep Forensic Kit®*. **Results:**

The recovered pulps had brownish colors. The protocol used allowed the recovery of DNA from the samples studied. The amount of DNA obtained with the kit number 1 DNeasy Blood and Tissue® (Sample M1) is 3.6 ng / µl. The amount of DNA obtained with Kit # 2 InnuPrep Forensic Kit® (Sample M2) is 12.2 ng / µl. **Discussion:** The low amounts of DNA are explained by the degradation of post-mortem DNA and its contamination; in fact, DNA undergoes rapid degradation at the time of death, due to various factors. The possibility of extracting and amplifying post-mortem DNA from a dental pulp is related to the amount of

pulp found in the tooth, which is directly related to the pulp volume and its state upon the death of the individual.

Key words: post-mortem DNA, dental pulp, aseptic collection, DNA extraction.

Introduction : Les empreintes génétiques constituent le relevé des caractéristiques génétiques qui permettent d'identifier et de reconnaître un individu. Ces empreintes peuvent être obtenues à partir d'un corps ou des éléments biologiques retrouvés sur les objets proches de la victime à savoir une brosse à cheveux, un mégot de cigarette, une brosse à dent. ⁽¹⁾

Dans certains cas, l'organe dentaire constitue un matériel de choix utilisé à des fins d'identification. En effet, les dents sont les éléments tissulaires du corps humain qui résistent le mieux au temps, aux atteintes physico-chimiques et à la décomposition. Elles sont parfois le seul fossile utilisable présent sur les sites de fouilles archéologiques ou sur un cadavre soumis à des conditions extrêmes de conservation ⁽²⁾. L'organe dentaire est donc considéré comme un véritable réservoir de données anatomiques, morphologiques et biologiques, dont il est possible de conserver et d'archiver ^(3,4,5).

Le but de ce travail est de décrire la méthode de récupération de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) à partir de la pulpe dentaire et de tester l'efficacité de deux kits d'extraction d'ADN post-mortem pour une éventuelle identification génétique.

Matériel et méthode : Cette étude a porté sur quatre dents récupérées à partir d'un cadavre retrouvé dans une forêt à l'état de squelette et ramené par la police criminelle à l'Institut Pasteur de Tunis pour une identification génétique. Selon les résultats de l'enquête policière, Il s'agissait d'un homme dont le décès remonte à 13 ans mais son identité reste inconnue.

- **Sélection des échantillons :** Nous avons sélectionné quatre dents : 34, 35, 36, 37 présentes sur les arcades de ce cadavre (**Fig1**), selon les critères suivants : dent mature, absence : de fenestration au niveau des tables osseuses, de fissures coronaires et/ou radiculaires, de lésions carieuses ou non carieuses au niveau des bords libres ou des faces occlusales. ^(8,10)

- **Préparation des échantillons :** Avulsions des dents : Les arcades, préalablement à l'avulsion des dents, ont été bouillies puis nettoyées dans une solution détergente, séchées à l'air ambiant pendant 48 heures ^(6,7). Les avulsions ont été pratiquées par fraisage de l'os alvéolaire (**Fig2**) dans un environnement opératoire aseptique : champs, daviers, tubes et compresses stériles. Ces dents ont été conservées, après leurs nettoyages, dans des tubes stériles à une température de 4°C jusqu'au moment de recueil des pulpes dentaires.



Fig1 : Mandibule du cadavre



Fig2 : Fraisage de l'os alvéolaire pour récupération des dents.

- **Recueil de la pulpe dentaire :** Le recueil du matériel biologique a été effectué selon la technique de section longitudinale de la dent. Les encoches préfigurent le trait de fracture qui permettra l'accès le plus large possible à la chambre et aux canaux pulpaire. Elles ont été

pratiquées en regard des pulpes sans jamais atteindre les cavités pulpaire, au moyen d'une fraise diamantée montée sur turbine ^(8,9). Les dents ont été ensuite sectionnées sur toutes leurs longueurs en utilisant un syndesmotome droit placé dans les traits des encoches, les fractures ont été réalisées en exerçant simultanément un petit mouvement de luxation et une légère pression. (Fig3). La pulpe est récupérée par curetage avec un excavateur stérile, dans un tube Ependorf de 1,5 ml contenant un tampon de lyse propre pour chaque kit d'extraction. (Fig4) Nous avons regroupé les pulpes dans deux tubes : tube 1 (pulpes des 34 et 36) codifié M1, tube 2 (pulpes des 35 et 37) codifié M2.

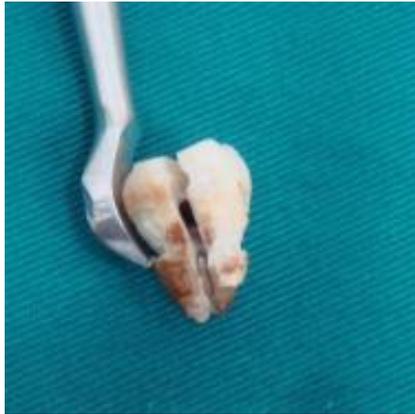


Fig3 : Section longitudinale de la dent



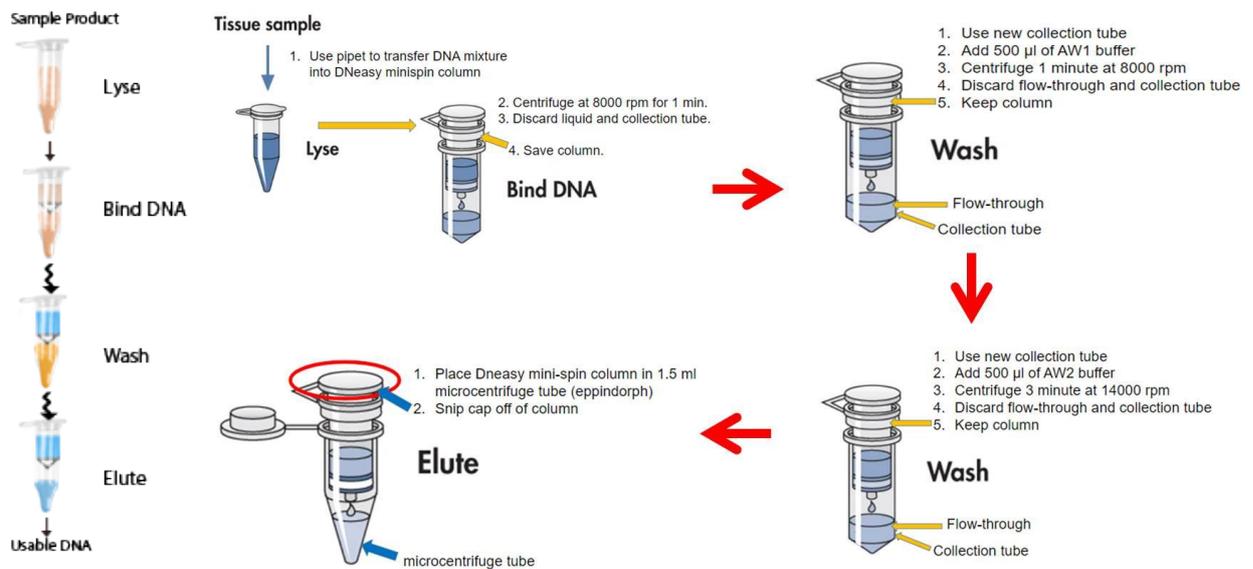
Fig4: Recueil de la pulpe dentaire

- **Protocole d'extraction de l'ADN : Kit numéro 1 : DNeasy Blood and Tissue® (Fig5) :** Ce kit a été conçu pour la purification rapide de l'ADN total à partir d'une variété de sources comprenant des échantillons de tissus animaux frais ou congelés, des cellules sanguines ou des bactéries. Il est exempt de contaminants et d'inhibiteurs d'enzyme et est particulièrement adapté pour la réaction de polymérisation en chaîne ainsi que d'autres applications.



Fig5 : Kit DNeasy Blood and Tissue®

Principe : Les solutions sont ajustées pour fournir des conditions optimales. Après la lyse, l'ADN est sélectivement lié à la membrane de silice contenue dans la colonne et les contaminants passent à travers. Les contaminants résiduels et les inhibiteurs d'enzymes sont éliminés en deux étapes de lavage et l'ADN est ensuite élué à l'eau ou un tampon prêt à l'emploi.

Protocole :(Fig6)**Figure 6 : Protocole d'extraction de l'ADN avec le Kit DNeasy Blood and Tissue®**

Kit numéro 2 : InnuPrep Forensic Kit ® : Le kit a été conçu comme un outil pour l'isolation très rapide et efficace de l'ADN génomique, à partir de petites quantités de différents types d'échantillons médico-légaux comme : les poils, les racines des cheveux, les taches de sang, la salive, le sperme, les ongles, les mégots de cigarettes, les chewing gums et les écouvillons buccaux. (Fig7)

**Fig7:
Kit InnuPrep Forensic Kit ®**

Principe : La procédure d'extraction de l'ADN, utilisant ce kit, est basée sur une nouvelle méthode qui combine une étape de lyse extrêmement rapide avec une fixation

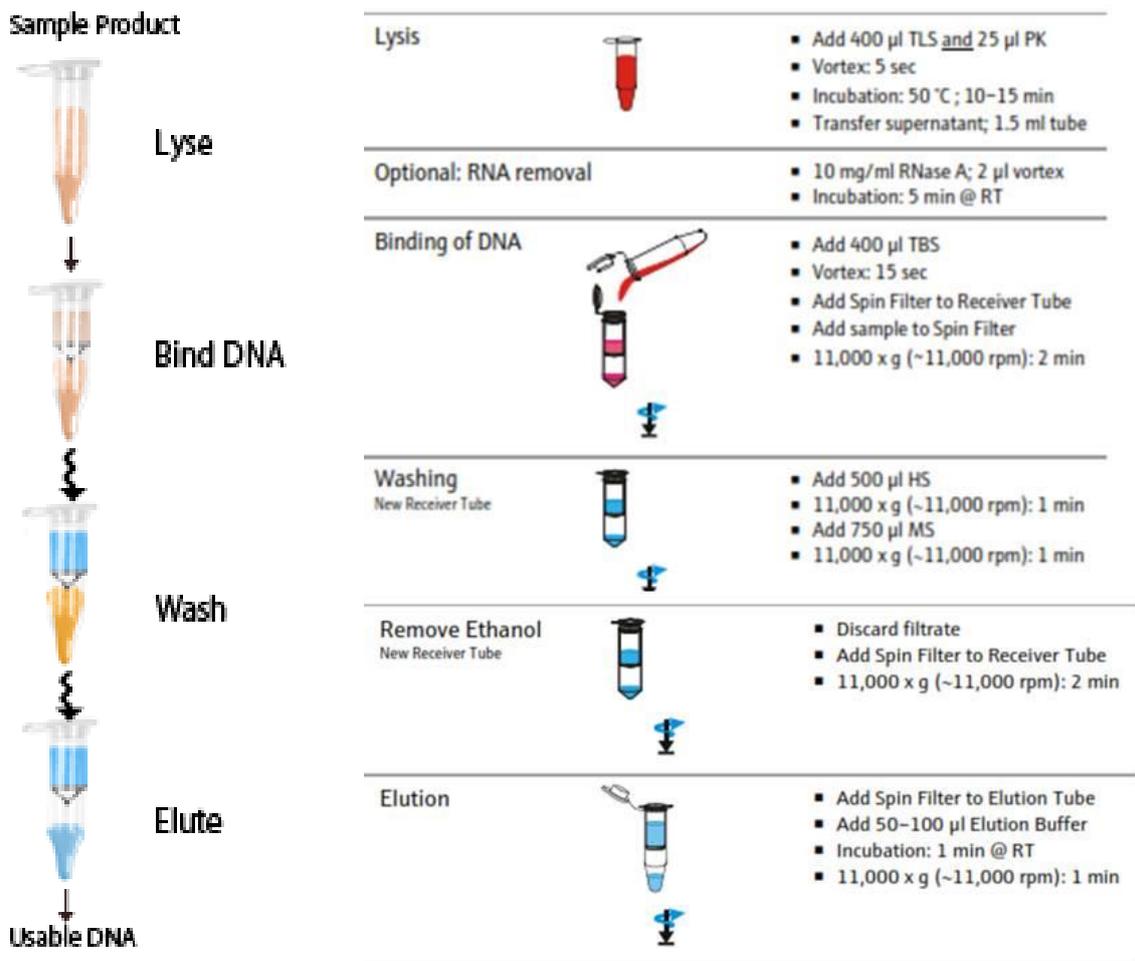
Protocole : (Fig8)

Fig 8 : Protocole de l'extraction de l'ADN avec le Kit InnuPrep Forensic Kit ®

Quantification de l'ADN et contrôle qualitatif : L'estimation de la concentration de l'ADN se fait par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm au Nanodrop. Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption en UV maximum à 260 nm.

L'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'ADN : une unité de DO à 260 nm correspond à 50ng/ml. La mesure de la DO à 280 nm, sert à détecter les éventuels contaminants protéiques.

Le rapport de pureté DO 260nm/DO 280nm doit être compris entre 1,8 et 2. Une valeur inférieure à 1,8 témoigne d'une contamination par des protéines, alors qu'une valeur supérieure à 2 témoigne d'une contamination par les sels. Ces contaminants peuvent entraîner une surestimation de la quantité de l'ADN.

Le rapport de pureté DO 260nm/DO 230nm doit être supérieur à 2 : une valeur inférieure à 2 signifie une contamination par des solvants organiques.

Résultats : Pour les quatre dents analysées, le contenu de la chambre pulpaire avait une coloration brunâtre.

La quantité de pulpe dentaire recueillie n'a pas été proportionnelle au volume de la chambre et des canaux de la dent, elle varie pour un même type de dent.

La quantité d'ADN obtenue avec le kit numéro 1 **DNeasy Blood and Tissue®** (Echantillon **M1**) est 3,6 ng/µl.

La quantité d'ADN obtenue avec le kit numéro 2 **InnuPrep Forensic Kit ®** (Echantillon **M2**) est 12,2 ng/µl.

De point de vue pureté de l'ADN, les rapports mesurés montrent :

- L'échantillon M1 présente le meilleur rapport de pureté.
- L'échantillon M2 est contaminé par des protéines.
- Tous les échantillons sont contaminés par des solvants organiques.

Tableau I : Résultat de l'extraction de l'ADN

Dents	kit utilisé	Code attribué	Quantification	Rapports de pureté de l'ADN
34 + 36	DNeasy Blood and Tissue®	M1	3,6 ng/µl	260/280=1,86 260/230=1,67
35 + 37	InnuPerp Forensic Kit®	M2	12,2 ng/µl	260/280=1,18 260/230=0,02

Discussion : L'analyse de l'ADN post-mortem est directement liée à la difficulté de recueil des échantillons à la dégradation du matériel génétique et aux risques de contamination ⁽¹⁰⁾. Pour cela nous avons choisi pour cette étude des dents qui possèdent un apex fermé et exemptes de lésions carieuses ou traumatiques sources de contaminations, et nous avons manipulé nos échantillons dans des conditions d'asepsie.

La technique de section longitudinale des dents est une technique qui nous a permis d'accéder à la totalité de la pulpe optimisant ainsi le recueil des échantillons. Lors de la fracture des dents, nous avons remarqué une coloration brunâtre des pulpes dentaires. Cette coloration est due à une exsudation de dérivés de l'hémoglobine (décomposition des globules rouges) à travers les tissus dentinaires. Mais elle ne semble en aucun cas avoir des répercussions sur la qualité des résultats comme le confirme l'étude de Raoult (Raoult et al, 2000). Les protocoles des deux kits nous ont permis d'extraire de l'ADN à partir des pulpes dentaires ; cependant ces quantités recueillies sont qualifiées de faibles, celle la plus importante est obtenue avec le kit numéro 2 : **InnuPerp Forensic Kit®**. En effet, la possibilité d'extraire et d'amplifier de l'ADN post-mortem d'une pulpe dentaire est liée à la quantité de pulpe retrouvée au niveau de la dent, ce qui est directement en rapport avec le volume pulpaire et l'état de la pulpe au décès de l'individu. Ceci confirmerait les hypothèses avancées par Garcia (Garcia et al, 1996), selon lesquelles la qualité des résultats pourrait varier en fonction de l'âge du sujet à son décès, et des antécédents pathologiques de l'organe dentaire, tout ceci ayant des répercussions sur le volume et l'état physiologique de la pulpe et donc sur le matériel génétique qu'elle contient.

D'autre part, ces quantités d'ADN faibles sont expliquées par la dégradation de l'ADN post-mortem et sa contamination ^(11,12) ; en effet l'ADN subit, dès le décès, une dégradation rapide, par différents facteurs qui fragmentent la molécule. Ce résultat va à l'encontre de ce qui est habituellement reporté dans la littérature sur les recherches d'ADN au niveau des dents. Celles-ci sont considérées comme des coffres forts pour l'ADN, le mettant à l'abri des contaminations (Scott et al, 1994). En effet, bien que la dent soit l'organe le plus dur et le plus dense de l'organisme, l'histologie démontre que cet organe n'en est pas pour autant imperméable.

Conclusion : Le protocole mis au point permet de recueillir la pulpe de différents types de dents avec un maximum d'efficacité et dans des conditions d'asepsie.

La phase d'extraction a permis d'avoir de l'ADN à partir de la pulpe dentaire, les quantités obtenues démontrent la dégradation de l'ADN dans les échantillons étudiés.

En perspectives, il serait intéressant d'amplifier cet ADN post-mortem et le séquencer afin de mettre en évidence les éventuelles variations en son sein pour pouvoir faire une comparaison génétique.

Références :

1. Divakar.K.P. Forensic Odontology: The New Dimension in Dental Analysis. Int J Biomed Sci.2017 Mar; (13)1: 1-5.
2. Sharma DG, Yadav DM, Singh DH, Aggarwal DAD, Sandhu R. Forensic Odontology: Role in Mass Disasters. . JIAFM, 2006 : 28 (2) ISSN : 0971-0973
3. Hinchliffe.J. Forensic odontology, part 1. Dental identification. British Dental Journal 2011: 210(5).
4. Ratnakar.P,Singaraju.G.S. Methods of identification in forensic dentistry. Annals and Essences of Dentistry 2010: II (1).
5. Prajapati G, Sarode SC, Sarode GS, Shelke P, Awan KH, Patil S. Role of forensic odontology in the identification of victims of major mass disasters across the world: A systematic review. PLoS ONE. 2018;13(6):e0199791
6. Calvo L, Ricaut F, Keyser C et al. Etude d'ADN ancien au niveau de la pulpe dentaire de la série ostéologique de Saint-Côme et Damien. Antropo 2001;6:21-9.
7. Calvo L, Kheyser C, Grimoud A et al. Schémas d'incision et de fracture des différents morphotypes de dents adaptés au recueil de pulpes dentaires et à l'analyse de l'ADN. Société d'Anthropologie de Paris 2002; 13:121-8.
8. Grimoud AM, Boulbet Mauger M, Lodter JP. Critères de sélection d'échantillons dentaires pour l'étude de l'ADN ancien. Antropo 2004;6:43-51.
9. Gilbert MT, Rudbeck L, Willerslev E et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. J Archaeol Sci 2005;32:785-93.
10. Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. Nat Genet 1992; 2:135-8.
11. Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, Brinkmann B. Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. Int J Legal Med 1999;112:142-4.
12. Orlando L, Hanni H. Du nouveau pour l'ADN ancien. Médecine Sciences 2000;8/9:1-9.

***Revue Méditerranéenne
d'Odonto - Stomatologie***