

CARACTÉRISATION DE L'ALTÉRATION OSSEUSE POST-MORTEM PAR HISTO-MORPHOLOGIE DANS UN CONTEXTE MÉDICO-LÉGAL : ÉTUDE TAPHONOMIQUE SUR RESTES HUMAINS

Yann DELANNOY^{*,1,2,3,4}, Catherine CANNET^{1,5}, Claire LOURIA¹,
Guillaume PENEL⁴, Thomas COLARD^{3,4}, Bertrand LUDES¹

** Auteur correspondant*

*Institut de Médecine Légale – CHRU de Lille,
rue André Verhaeghe, 59037 LILLE CEDEX, France*

Phone : + 33 320 62 35 05

Fax : +33 320 62 35 12

Mail : yann.delannoy@univ-lille2.fr

*1. Institut Médico-Légal de Paris
Université Paris Descartes Sorbonne Cité, 75000 PARIS, France*

*2. Service de médecine Légale
CHRU de LILLE, 59000 LILLE, France*

*3. EA 7367 Forensic Taphonomy Unit - Lille Forensic Institute
Université de Lille, 59000 LILLE, France*

*4. EA 4490 Physiopathologie des maladies osseuses inflammatoires
Université de Lille, 59000 LILLE, France*

*5. Laboratoire d'histomorphométrie de Médecine Légale
Faculté de Médecine, 67000 STRASBOURG, France*

Aucun conflit d'intérêt de la part des auteurs de cette publication

RESUME

L'altération d'un os en période *post-mortem*, est à l'origine d'une détérioration identifiable en histologie. La dégradation de l'os se caractérise notamment par une altération collagénique observable précocement.

Dans le but de pouvoir caractériser cette altération, deux côtes ont été prélevées sur 6 corps humains et étudiées prospectivement pendant les 2 ans suivant le décès. Chaque os a fait l'objet d'une coupe histologique étudiée après coloration au rouge Sirius afin de mettre en évidence la dégradation du collagène en fonction du temps.

Une altération osseuse temporelle a pu être mise en évidence par une dégradation architecturale de l'os lamellaire, en l'absence de toute attaque microbienne sur cette période *post-mortem*. La coloration pratiquée à l'aide du rouge Sirius a permis d'attribuer cette altération à une dégradation collagénique de type hydrolyse chimique en raison de l'affinité de ce colorant pour les acides aminés Lysine, Hydroxylysine et Arginine.

Notre travail a permis d'affirmer que des échantillons osseux humains étudiés en environnement contrôlé, et analysés pendant 24 mois, subissent une trajectoire diagénétique dont l'élément principal est l'hydrolyse collagénique.

Mots-clés : médecine légale ; anthropologie ; diagénèse ; hydrolyse du collagène

ABSTRACT

The diagenesis of a bone in the post-mortem period causes an identifiable deterioration in histology. More particularly, the degradation of the bone is characterized by a collagenous alteration which is observable very early.

In order to be able to characterize this alteration, two ribs collected from 6 human bodies were studied prospectively during 2 years. Each bone was studied after staining with red Sirius in order to demonstrate the degradation of collagen as a function of time.

A temporal bone alteration could be demonstrated by an architectural degradation of the lamellar bone in the absence of any microbial attack on this post-mortem period. The coloring carried out using red Sirius correlated this alteration to a collagenic degradation by chemical hydrolysis because the affinity of this colorant to the amino acids Lysine, Hydroxylysine and Arginine.

Our work asserts that human bone samples studied in controlled environment, and analyzed for 24 months, undergo a diagenetic trajectory whose main element is collagen hydrolysis.

Keywords : forensic medicine ; anthropology ; diagenesis ; collagen hydrolysis

INTRODUCTION

L'altération *post-mortem* d'un os est influencée par son environnement. Du matériel exogène venant de ce milieu va en effet être incorporé dans l'os et ce dernier va relarguer ses composants endogènes vers le milieu extérieur (1). Pour illustrer les phénomènes d'incorporation ou de relargage entre l'os et son environnement, 5 types de mesures reconnues dans la littérature ont été définies pour couvrir l'ensemble du processus de diagénèse (1,2) : la perte de collagène ; la modification de la cristallinité ; les modifications de porosité ; la teneur en carbonates ; l'index de préservation histologique. Ce dernier est établi à la suite de coupes histologiques examinées au microscope optique ou en microscopie électronique à balayage (3-5). Une bonne préservation histologique permet notamment l'identification des ostéons, de l'os interstitiel, et des trabécules de l'os spongieux. Une mauvaise préservation montrera des lacunes osseuses associées à des remplacements de structures par de la matière minérale appelée « nodules hyperminéralisés » qui à terme disparaissent pour faire place à des porosités. Cette altération structurelle est en partie à mettre en relation avec des attaques microbiennes (3).

L'index de préservation histologique peut être classé selon 6 stades numérotés de 0 à 5. Un autre index de préservation histologique a été défini sur des coupes plus fines par Garland *et al.*, puis adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques (6,7) caractérisées par :

- Des destructions focales microscopiques (MFD) ou tunnels (3), correspondant à des pertes collagéniques et d'hydroxyapatite ;
- Des inclusions de matériel exogène inclus dans les espaces osseux (dépôts fongiques, du sable, de la pyrite...) ;
- Des infiltrations de matériel exogène ferreux (colorés par la réaction de Perls) et/ou des cristaux d'hydroxyapatite altérés ;
- Des fissures envahissant le système harversien ou restreintes aux ostéons (microfissures). Leurs différences de tailles sont liées à leurs causes, à savoir l'influence de l'environnement (humidité, température) pour les fissures larges et le remodelage lié aux altérations organo-minérales pour les microfissures ;
- L'intensité de la biréfringence examinée en lumière polarisée sur les ostéons.

Cette étude taphonomique souhaitait s'inscrire dans une temporalité « précoce » à l'échelle de l'anthropologie. L'hypothèse principale de ce travail était constituée par une dégradation organique de l'os sous la forme d'une dégradation collagénique observable très précocement et prospectivement. L'objectif était également de mettre en évidence le mode d'altération organique incriminé.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Les prélèvements osseux ont été réalisés à partir de cadavres issus du don de corps testamentaires à la science.

Notre travail a été effectué sur six sujets humains (quatre hommes âgés de 72, 82, 87 et 88 ans et deux femmes âgées de 80 et 92 ans), exempts de pathologie osseuse connue. Pour chaque individu, deux côtes ont été prélevées le jour du décès (1^{ère} et 4^{ème} côte droite) et les tissus mous environnants (tendons et muscle) ont été immédiatement retirés manuellement sans qu'aucun traitement chimique ne leur soit appliqué, afin d'éliminer de potentiels biais de traitement. Ces côtes étaient ensuite placées dans le milieu de vieillissement. Pour chaque sujet, le choix des os étudiés s'est orienté vers les côtes n°1 et 4, étant donné que celles-ci ont un intérêt médico-légal reconnu, notamment en vue de la détermination de l'âge au décès (12,13) et que leur large surface d'échange associée à la finesse de leur corticale leur confère la particularité d'être très sujettes à la diagénèse (14).

Ces côtes ont été placées dans un milieu extérieur et les données météorologiques ont été relevées quotidiennement par MétéoFrance©. Trimestriellement pendant une année et enfin, ponctuellement à 24 mois, les côtes étaient extraites de leur milieu de conservation, sectionnées transversalement sur une épaisseur de 5 mm au disque diamanté en vue d'une recoupe histologique, et enfin, les côtes étaient replacées dans leur milieu de vieillissement.

Méthodes

Les fragments de côtes osseuses ont été fixés dans du formol à 10% tamponné à pH 7,2 pendant 21 jours, dans le but de stabiliser les structures tissulaires. Une fois fixés, les fragments osseux ont été décalcifiés. La solution de décalcification employée est le liquide de Kristensen, composé d'acide formique et de formate de sodium (15). Cette méthode de décalcification utilise un acide faible, de ce fait, elle est moins agressive pour le tissu osseux. Les temps de décalcification ont été de 17 heures pour l'ensemble des côtes, à l'exception d'un des six sujets, dont le temps de décalcification nécessaire a été de 28 heures. A l'issue de la décalcification, les fragments ont été rincés pendant 2 heures sous eau courante, puis déshydratés selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100%, puis xylène), et enfin inclus en paraffine. De nombreux protocoles de coloration du collagène existent en pratique histologique à visée médicale. Pour exemples, on peut citer la coloration de van Gieson, les trichromes de Masson, Mallory et Heidenhain, mais surtout, la coloration au rouge Picro-Sirius (PS) dont le colorant est le rouge Sirius F3B qui est la plus spécifique et sensible de ces méthodes (16). Le rouge Sirius colore sélectivement les collagènes de type I et III, et est spécifique des acides aminés Lys, Arg et Hydroxylysine. La coloration est d'autant plus marquée que son observation se fait en lumière polarisée. En effet, les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène et augmentent leur biréfringence. Ainsi, des coupes de 5µm ont été faites et les colorations suivantes réalisées :

- Hématoxyline et Eosine (H&E) pour l'étude de la morphologie générale ;
- Rouge Picro-Sirius (PS) pour la mise en évidence des fibres de collagène observées en lumière polarisée (18).

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

- D'un microscope Axioscope A1 (Zeiss®) équipé d'un tube trinoculaire, d'une tourelle 6 positions avec les objectifs EC Plan-Neofluar (2,5X, 5X, 10X, 20X, 40X), d'un système de polarisation orientable de 0° à 90°, ainsi que d'un objectif 10X muni d'un coulisseau DIC et d'une platine encodée ;
- D'une station d'acquisition d'images, équipée d'une caméra CCD 2 millions de pixels, pour fond clair et polarisation, des logiciels Microvision Instruments® :

Archimed© pour la base de données d'images et l'acquisition, et Histolab© pour la cartographie de grandes coupes tissulaires et la quantification de structures tissulaires (nombre, surface, angles, longueur, couleur...) ;

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

- Une observation classique des tissus en microscopie à fond clair ;
- Une observation en lumière polarisée ;
- Une observation avec le «Nomarski Interference Contrast» (NIC), qui permet de visualiser la bio-érosion osseuse (4,19).

Tout d'abord, chaque coupe histologique a été colorée par l'H&E puis cartographiée sur fond clair en utilisant un grossissement x2,5. La cartographie de grandes coupes tissulaires, réalisée par le logiciel Histolab© dans des délais très courts, permet d'obtenir une vue d'ensemble de la coupe et de localiser avec précision toute lésion, même minime présente sur le tissu. Elle nous a ainsi permis de localiser au sein de chaque coupe la position des structures osseuses altérées. A partir de ces cartographies, il a été possible de différencier les zones osseuses altérées des zones non altérées (7). Puis, chaque structure dégradée a été observée sur fond clair, en lumière polarisée, ou en NIC, en utilisant un grossissement x40 sur la coloration PS. Cela nous a permis une meilleure observation des caractéristiques de la dégradation collagénique.

RESULTATS

Au niveau des ostéons non dégradés (à 0 mois post-mortem), nous avons observé un aspect continu des lamelles osseuses concentriques parallèles. Elles ne présentent aucune altération architecturale. De plus, la biréfringence est très visible au niveau ostéonique sous la forme d'une croix de Malte (**Figure 1**). A partir de 6 mois (systématiquement) et jusque 24 mois *post-mortem*, on observe une désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse. Jusque 12 mois *post-mortem*, ce sont les ostéons qui montrent une érosion de leur partie la plus centrale, témoin de la dégradation osseuse autour du canal de Havers (**Figure 2, tableau 1**). Cette dégradation semble se faire de manière centrifuge, du centre vers la périphérie. A 24 mois *post-mortem*, cette dégradation ostéonique se poursuit et s'associe

à une dégradation de la partie située surtout en région la plus externe de l'os cortical, où la désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse apparaît. Cette altération de l'architecture lamellaire ne présente pas les caractéristiques d'une altération de type lacunaire (par des tunnels) liée à des microorganismes. Ces tunnels sont, le cas échéant, habituellement de taille plus importante et bordés de zones hyperminéralisées.

Une réduction de la biréfringence est également observée à partir de 3 mois *post-mortem* avec disparition progressive qui se poursuit jusque 24 mois et témoigne d'une dégradation du collagène.

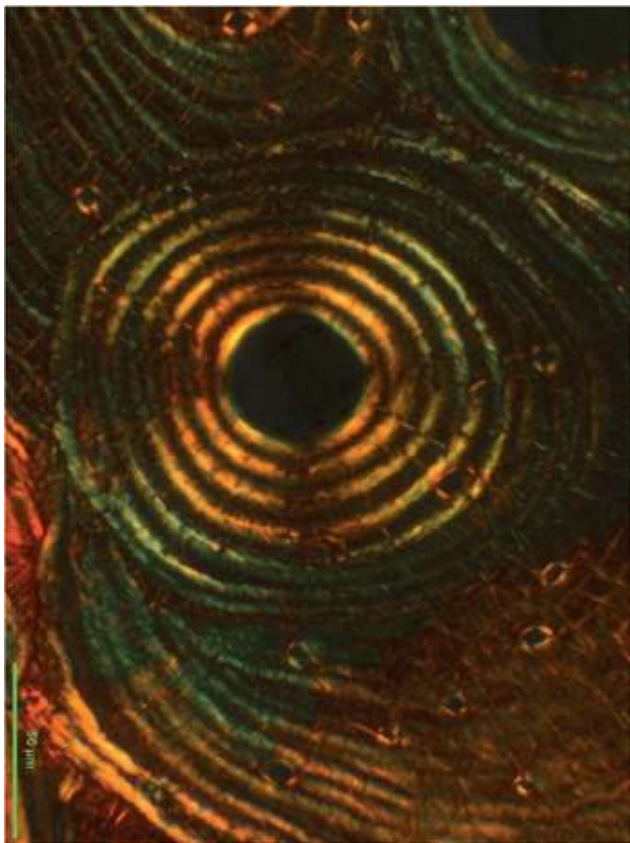


Figure 1 : Aspect microscopique des ostéons présentant une organisation concentrique des lamelles osseuses centrées sur le canal de Havers et montrant une forte intensité de la biréfringence à 0 mois DPM - Coloration au PS visualisée en polarisation.

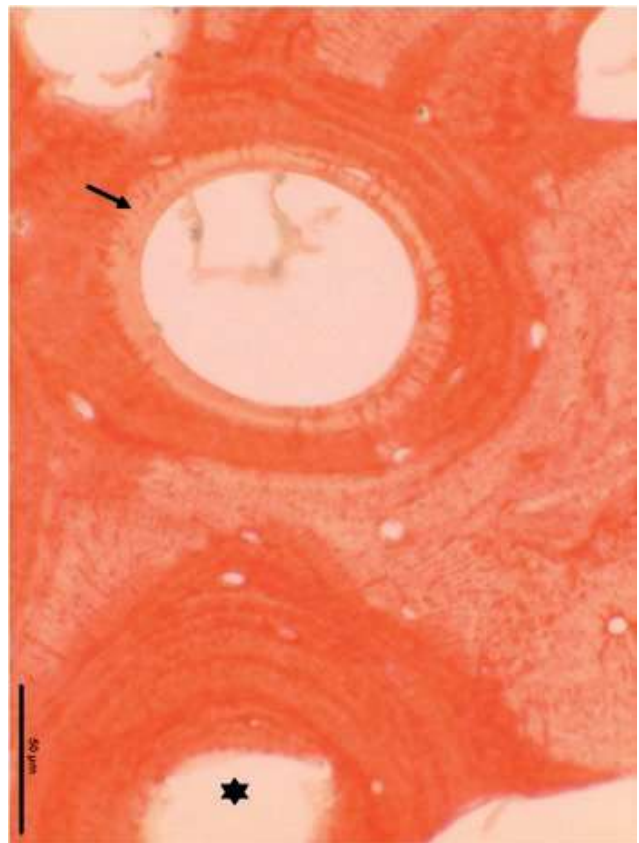


Figure 2 : Aspect microscopique de la bioérosion des ostéons à 12 DPM : perte de la fixation du rouge Sirius en périphérie du canal de Havers (flèche) et comparaison avec un ostéon ne présentant pas de dégradation de la même région (étoile) - Coloration au PS.

N° Sujet	Côte	Temps	Nombre d'ostéons dégradés	Nombre de zones de dégradation des lamelles interstitielles	Nombre de zones de dégradation des lamelles périphériques
709	C4	T0	0	0	0
		T3	N/A	0	0
		T6	0	0	0
		T9	3	0	0
		T12	5	0	0
		T24	6	1	1
715	C4	T0	0	0	0
		T3	1	0	0
		T6	1	0	0
		T9	4	0	0
		T12	8	0	0
		T24	14	2	2
721	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	1	0	0
		T9	2	0	0
		T12	5	0	0
		T24	10	2	4
722	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	0	0	0
		T9	3	0	0
		T12	8	0	0
		T24	10	0	3
746	C4	T0	0	0	0
		T3	2	0	0
		T6	1	0	0
		T9	5	0	0
		T12	10	0	0
		T24	19	2	5
747	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	2	0	0
		T9	5	0	0
		T12	10	0	0
		T24	15	2	4

Tableau 1 : Dénombrement des zones osseuses dégradées en fonction des temps d'étude (exemple de la côte C4).

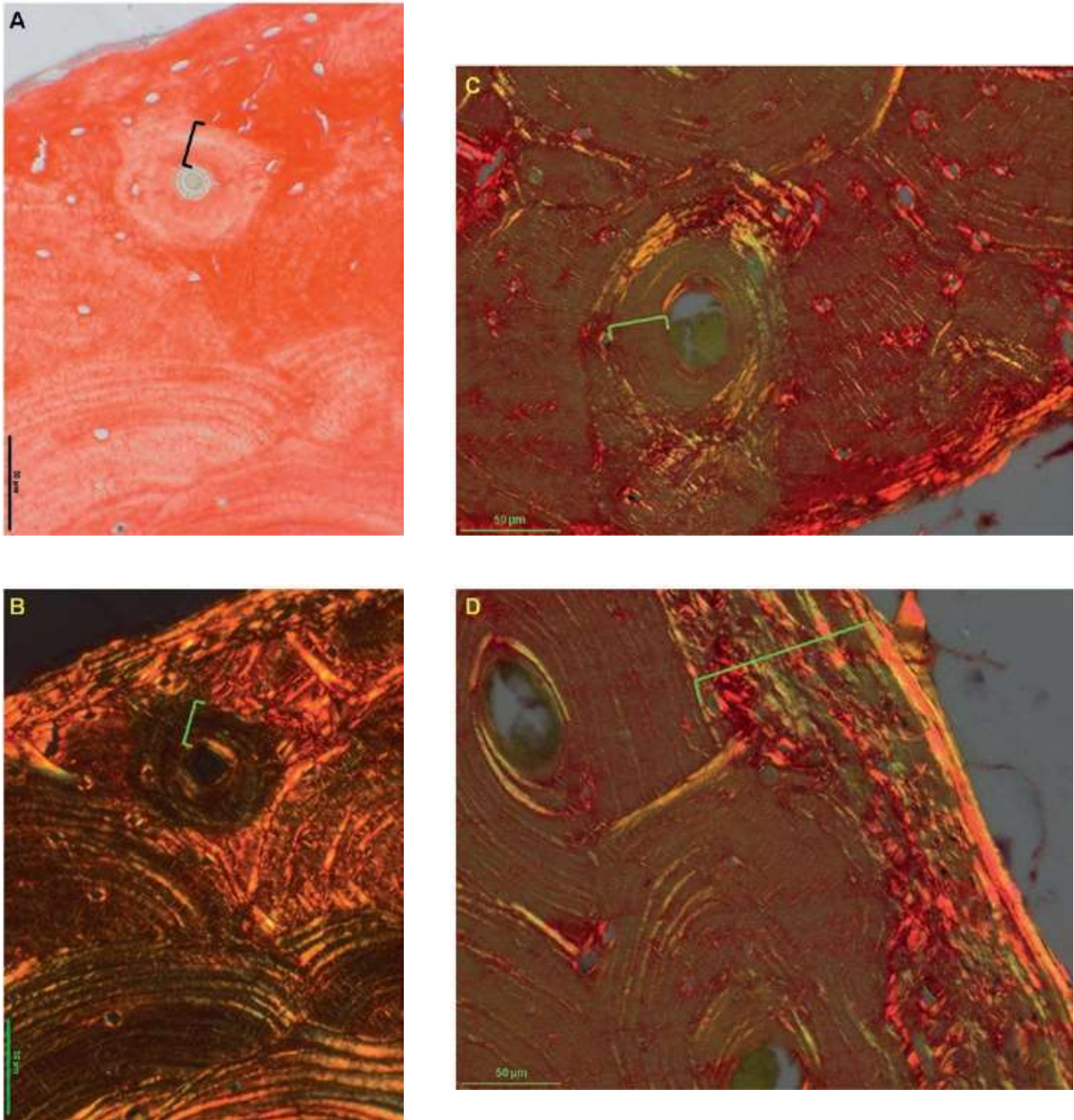


Figure 3 : Aspect microscopique de la dégradation architecturale : Extension de la perte de fixation du rouge Sirius à la totalité de quelques ostéons et disparition quasi totale de la biréfringence des lamelles ostéoniques (crochets) déjà observable à 12 mois DPM - A : PS et B : même zone visualisée en polarisation. A 24 mois, la perte de l'architecture lamellaire se poursuit avec disparition de la biréfringence des lamelles ostéoniques (crochet). Parallèlement, la dégradation des lamelles osseuses apparaît en périphérie de l'os cortical (crochet), sans qu'il ne soit observé de tunnels ou de lacunes de types bactériens - C et D : Ps visualisé en polarisation.

DISCUSSION

Notre travail, réalisé sur une période de 2 ans, a permis de mettre en évidence une altération osseuse par une étude microscopique histologique qui a montré l'absence de toute attaque microbienne sur cette période *post-mortem*. Ceci pose la question du mécanisme d'altération organique collagénique mis en cause.

Outre l'index de préservation histologique classiquement décrit où les atteintes osseuses bactériennes sont individualisées en coupes sous formes de lacunes (1), un autre index de préservation histologique a été défini sur coupes fines par Garland *et al.*, et adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques identifiables (6,7). Notre travail histomorphologique n'ayant pas mis en évidence de lacunes (ou tunnels ou MFD) évocatrices d'altérations bactériennes, les autres modifications osseuses diagénétiques mesurables selon les travaux de Garland et Jans ont été explorées afin d'identifier le mécanisme en cause dans la dégradation osseuse que nous avons observée. Ainsi, deux de ces modifications histologiques ont été recherchées dans notre travail : l'une qualitative via la modification de l'intensité de biréfringence, et l'autre quantitative par la comptabilisation des lésions architecturales (microfissures).

Quand des sections osseuses sont examinées en lumière polarisée, un patron de biréfringence peut être identifié et se présente sous la forme d'une alternance de bandes lumineuses brillantes et de bandes sombres. Pour l'architecture lamellaire des ostéons, ce patron s'exprime par un aspect en « croix de Malte ». L'intensité de la biréfringence est notamment dépendante de la quantité et de l'orientation des fibres de collagène, mais également de l'épaisseur de la coupe étudiée. Une réduction de cette intensité (voire une absence) peut s'interpréter comme liée à la détérioration du collagène (20). Dans notre travail, cette biréfringence était visible lors des premières coupes à 0 mois *post-mortem*, elle se réduisait à 3, 6 et 9 mois, pour complètement disparaître à 12 et 24 mois. Cette disparition de la biréfringence montre donc une dégradation du collagène sur cet intervalle *post-mortem* « court », sans signe d'altération bactérienne initiale de l'os.

La quantification des microfissures est établie le plus souvent, selon une unité structurelle formée par un ostéon. Dans notre travail, nous avons dénombré les ostéons altérés et montré qu'à partir de 6 mois, des dégradations étaient présentes sur chaque sujet, et qu'elles étaient quantitativement plus nombreuses à 9 mois,

puis à 12 mois et enfin à 24 mois. Bien que nous n'ayons pas visuellement observé ces microfissures, la désorganisation architecturale lamellaire osseuse a été particulièrement mise en évidence sur nos échantillons au pourtour des canaux de Havers jusque 12 mois *post-mortem*, puis s'est associée une désorganisation de la zone corticale la plus externe. Cette observation confirme les données de la littérature s'agissant d'études osseuses prospectives sur de courtes périodes *post-mortem*. L'étude de Peretschner montrait qu'aucune microfissure n'était expérimentalement produite sur l'os interstitiel (21) et que celles-ci peuvent être temporellement longues à observer en microscopie. C'est ce qui semble être le cas dans notre travail alors qu'elles expliqueraient parfaitement la perte de l'architecture lamellaire que nous visualisons. Ces microfissures sont attribuées dans la littérature (7) aux altérations diagénétiques organo-minérales de l'os, et plus particulièrement au gonflement provoqué par une gélatinisation du collagène (altération collagénique responsable d'une augmentation de sa solubilité) (21).

La coloration pratiquée secondairement à l'aide du rouge Sirius (absence de fixation sur ces zones altérées) a permis d'attribuer cette altération à une probable dégradation collagénique de type hydrolyse chimique en raison de l'affinité de ce colorant aux acides aminés Lysine, Hydroxylysine et Arginine. L'hypothèse que ces microfissures responsables de la perte de l'architecture osseuse lamellaire soient rattachées à une dégradation organique de type chimique est vraisemblable.

CONCLUSION

Notre travail permet donc d'affirmer que des échantillons osseux humains étudiés en environnement contrôlé, et analysés pendant 24 mois, subissent une trajectoire diagénétique évoluant au 2^{ème} stade défini par la littérature (22-25), à savoir celle qualifiée de « accelerated collagen hydrolysis », dans laquelle l'index histologique d'Oxford classiquement décrit reste élevé (1). Ces éléments indiquent que la dégradation organique observée dans notre étude n'était pas provoquée par des bactéries, mais plutôt en rapport avec une hydrolyse chimique. Cette hypothèse représente une des voies de recherche à poursuivre sur une temporalité plus longue, en multipliant les échantillons et les milieux de vieillissement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HEDGES R. E., & MILLARD A. R. Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *Journal of Archaeological Science*, 1995, **22**(2), 155-164.
2. NIELSEN-MARSH C. M., & HEDGES R. E. Patterns of diagenesis in bone I : the effects of site environments. *Journal of Archaeological Science*, 2000, **27**(12), 1139-1150.
3. HACKETT C. J. Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law*, 1981, **21**(4), 243-265.
4. GARLAND A. N. A histological study of archaeological bone decomposition. In (A. Boddington, A. N. Garland & R. C. Janaway, Eds) *Death, Decay and Reconstruction*. Manchester: Manchester University Press, 109–126, 1985.
5. BELL L. S. Palaeopathology and diagenesis: an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging. *Journal of Archaeological Science*, 1990, **17**(1), 85-102.
6. GARLAND A. N., JANAWAY R. C., & ROBERTS C. A. A study of the decay processes of human skeletal remains from the parish church of the Holy Trinity, Rothwell, Northamptonshire. *Oxford Journal of Archaeology*, 1988, **7**(2), 235-249.
7. JANS M. M. E., KARS H., NIELSEN-MARSH C. M., SMITH C. I., NORD A. G., ARTHUR P., & EARL N. In situ preservation of archaeological bone : a histological study within a multidisciplinary approach. *Archaeometry*, 2002, **44**(3), 343-352.
8. WARNER S. E., SHEA J. E., MILLER S. C., & SHAW J. M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcified tissue international*, 2006, **79**(6), 395-403.
9. DUCHER G., TOURNAIRE N., MEDDAHI-PELLÉ A., BENHAMOU C. L. & COURTEIX D. Short-term and long-term site-specific effects of tennis playing on trabecular and cortical bone at the distal radius. *Journal of bone and mineral metabolism*, 2006, **24**(6), 484-490.
10. MICHALSKY M., NORRISUAREZ K., BETTICA P., PECILE A., & MORO L. Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, **192**(3), 1281-1288.
11. MORKO J., KIVIRANTA R., HURME S., RANTAKOKKO J., & VUORIO E. Differential turnover of cortical and trabecular bone in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Bone*, 2005, **36**(5), 854-865.

12. IŞCAN M. Y., LOTH S. R. & WRIGHT R. K. Metamorphosis at the sternal rib end: a new method to estimate age at death in white males. *American journal of physical anthropology*, 1984, **65**(2), 147-156.
13. KUNOS C. A., SIMPSON S. W., RUSSELL K. F. & HERSHKOVITZ I. First rib metamorphosis: its possible utility for human age-at-death estimation. *American Journal of Physical Anthropology*, 1999, **110**(3), 303-323.
14. KING C. L., TAYLES N. & GORDON K. C. Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *Journal of Archaeological Science*, 2011, **38**(9), 2222-2230.
15. KRISTENSEN H. K. An improved method of decalcification. *Stain technology*, 1948, **23**(3), 151-154.
16. WHITTAKER P., KLONER R. A., BOUGHNER D. R., & PICKERING J. G. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic research in cardiology*, 1994, **89**(5), 397-410.
17. STEPHENSON B. A modified Picro-Sirius Red (PSR) staining procedure with polarization microscopy for identifying collagen in archaeological residues. *Journal of Archaeological Science*, 2015, **61**, 235-243.
18. JUNQUEIRA L. C. U., BIGNOLAS G. & BRENTANI R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 1979, **11**(4), 447-455.
19. BROMAGE T. G., GOLDMAN H. M., MCFARLIN S. C., WARSHAW J., BOYDE A. & RIGGS C. M. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *The Anatomical Record Part B : The New Anatomist*, 2003, **274**(1), 157-168.
20. GIRAUD-GUILLE M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified tissue international*, 1988, **42**(3), 167-180.
21. PERETZSCHNER H. U. Collagen gelatinization: the key to understand early bone-diagenesis. *Palaeontographica Abteilung A*, 2006, 135-148.
22. HEDGES R. E. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 2002, **44**(3), 319-328.
23. TURNER-WALKER G., NIELSEN-MARSH C. M., SYVERSEN U., KARS H. & COLLINS M. J. Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 2002, **12**(6), 407-414.

24. SMITH C. I., NIELSEN-MARSH C. M., JANS M. M. E. & COLLINS M. J. Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. *Journal of Archaeological Science*, 2007, **34**(9), 1485-1493.
25. NIELSEN-MARSH C. M., SMITH C. I., JANS M. M. E., NORD A., KARS H. & COLLINS M. J. Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. *Journal of Archaeological Science*, 2007, **34**(9), 1523-1531.