UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

L'INVESTIGATION DES BIOMARQUEURS PRODUITS LORS DE LA DÉGRADATION DES LIPIDES EN TANT QU'INDICATEURS DE L'INTERVALLE POST-MORTEM

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR

GABRIELLE HARVEY

SEPTEMBRE 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

<u>Avertissement</u>

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche n'aurait jamais pu voir le jour sans l'aide d'une multitude de personnes exceptionnelles. Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice Dre Shari Forbes. Grâce à son support et sa confiance inestimable, j'ai eu la chance de travailler sur ce projet dont je rêvais depuis le début de mon baccalauréat. Je remercie aussi mon directeur Dr Benoit Daoust pour son soutien et son accueil chaleureux dans son laboratoire à la mi-parcours de mon projet. Je ne pourrai jamais vous dire combien je me considère chanceuse d'avoir pu travailler avec vous. Un grand merci au Dre Agathe Ribéreau-Gayon, au M. Sc. Darshil Patel et au Dr Simon Ricard pour leur implication dans différents aspects de ma recherche. Un merci particulier au Dr Luca Maestrini pour son aide considérable pour tout le volet statistique de cette étude. Je voudrais aussi remercier M. Francis Lafontaine et M. Jocelyn Bouchard pour leur aide ainsi que tous mes collègues du laboratoire Daoust et tous les autres membres de l'UQTR m'ayant aidé de près ou de loin.

Je tiens aussi à remercier les organismes et partenaires qui ont contribué au soutien financier de ce projet : la Chaire de Recherche Canada 150 en Thanatologie Forensique [C150-2017-12], le programme de subventions à la découverte du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) [RGPIN-2019-06098] et la Fondation UQTR. Un grand merci à Antirouille Métropolitain et à la Fondation UQTR pour les bourses d'études.

Il m'est impossible d'écrire ces lignes sans remercier les hommes et femmes ayant fait don de leur corps au laboratoire d'anatomie de l'UQTR ainsi que leur famille sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Je tiens d'ailleurs à remercier tout le personnel du laboratoire d'anatomie pour leur aide. Un merci spécial aussi à mes collègues et amis du site de RESTES pour l'entraide, le partage de connaissance, les fous rires et les liens créés avec vous.

Enfin, je veux remercier ma famille et mes amis pour leur support durant ces trois années de travail. Merci à mes parents et ma sœur pour le soutien et surtout pour avoir fait semblant de comprendre ce que je faisais. Merci à Annick et Clodie de m'avoir écouté chialer contre mes appareils dysfonctionnels, d'avoir rendu l'étude et la rédaction moins pénible, de m'avoir supporté tout au long de ce processus et j'en passe. Merci aussi à mon ami l'gros Paquin pour avoir rendu mes journées de labo plus supportable à certains moments, pour les discussions profondes et pour nos niaiseries. Merci à mes amis et collègues Darshil et Rushali pour tout ce que vous m'avez appris et la nourriture. Merci à Mylène pour les blitz de rédaction. Un merci particulier à mon amie et coloc Sophie pour trop de choses. Merci d'avoir cuisiné pour moi, d'avoir fait le party avec moi, d'avoir rendu les journées de travail plus divertissantes, d'avoir réalisé plusieurs de mes rêves, bref d'avoir rempli ma maîtrise d'incroyables souvenirs. Enfin, merci à Ariane, Pierre-Louis, Valérie, Amélie, Francis, Olivier, Daphné, Melizandre, Sarah-Jane et Pierre-Luc d'être d'aussi bons amis. Je vous aime.

DÉDICACE

Science... never solves a problem without creating ten more.

- George Bernard Shaw

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS		ii
DÉDICACE		iv
LISTE	E DES FIGURES	ix
LISTE	E DES TABLEAUX	xiv
LISTE	E DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xvi
LISTE	E DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xix
RÉSU	JMÉ	xxi
ABST	IRACT	xxii
CHA	PITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1	La taphonomie forensique: définition et principes	1
1.2	La chimie de la décomposition	2
	1.2.1 Autolyse	3
	1.2.2 Putréfaction	3
	1.2.3 Liquéfaction	4
	1.2.4 La décomposition avancée ou squelettisation	4
	1.2.5 Autres phénomènes taphonomiques (momification et adipocire)	5
1.3	Biomarqueurs chimiques	6
	1.3.1 Protéines	6
	1.3.2 Glucides	7
	1.3.3 Acides nucléiques	7
	1.3.4 Lipides	7
1.4	Facteurs influençant la composition des lipides dans le corps humain	10
1.5	Facteurs influençant la décomposition	11
	1.5.1 Facteurs intrinsèques	11
	1.5.2 Facteurs extrinsèques	12
1.6	Estimation de l'intervalle post-mortem (IPM)	14
	1.6.1 Méthodes thanatologiques d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM)	14
	1.6.2 Méthodes anthropologiques d'évaluation de la décomposition	16
	1.6.3 Entomologie forensique	17
1.7	La taphonomie humaine au Canada : état des connaissances	18
1.8	Buts et objectifs de l'étude	20

CHA	PITRE 2 MÉTHODOLOGIE	21
2.1	 Travaux de terrain sur le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]) 2.1.1 Aménagement du site REST[ES] 2.1.2 Donneurs étudiés sur le site REST[ES] 	21 21 22
2.2	Échantillonnage des tissus mous des donneurs	27
2.3	Préparation des échantillons en laboratoire	29
2.4	Analyse par chromatographie gazeuse (GC)	31
	2.4.1 GC x GC-TOF-MS	33
	2.4.2 GC-MS	34
2.5	Traitements des resultats	35
CHA	PITRE 3 OPTIMISATION ET VALIDATION DE LA MÉTHODE	37
3.1	Développement et optimisation de méthode d'analyses par chromatographie gazeuse (GC) à l'aide d'acides gras standard	37
	3.1.1 Acides gras saturés et insaturés ciblés	37
	 3.1.2 Séparation des acides gras par chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS). 3.1.3 Séparation des acides gras par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de 	41
	 3.1.3 Separation des acides gras par chromatographie gazeuse couplee a la spectrometrie de masse (GC x MS) 3.1.4 Choix de l'appareil pour l'analyse des tissus mous 	45 50
3.2	Validation de la méthode GC-MS	51
	3.2.1 Limite de détection, limite de quantification et coefficient de variation	51
<u></u>	3.2.2 Courbes d'etaionnage	53
5.5	validation de la methode d'extraction et d'analyse par GC-IVIS avec le modèle porcin	55
CHA	PITRE 4 ANALYSES QUALITATIVES	56
4.1	Températures et précipitations	56
4.2	Stades de décomposition	59
	4.2.1 Donneur 1	59 60
	4.2.3 Donneur 3	62
	4.2.4 Donneur 4	63
	4.2.5 Donneur 5	65 66
	4.2.7 Comparaison des stades de décomposition de tous les donneurs	67
СНА	PITRE 5 ANALYSES QUANTITATIVES	71
5.1	Échantillons analysés	71
5.2	Concentrations observées des acides gras	75
5.3	Variations des concentrations dans le temps	76

	5.3.1 Donneur 1	76
	5.3.2 Donneur 2	79
	5.3.3 Comparaison entre les donneurs 1 et 2	81 87
	5.3.5 Donneur 4	90
	5.3.6 Comparaison des donneurs 3 et 4	93
	5.3.7 Donneur 5	99
	5.3.8 Donneur 6	102
	5.3.9 Comparaison des donneurs 5 et 6	105
	5.3.10 Discussion	111
5.4	Graphiques d'interactions	113
	5.4.1 Donneurs 1 et 2	113
	5.4.2 Donneurs 3 et 4	116
	5.4.3 Donneurs 5 et 6	118
5.5	Analyse en composantes principales (PCA)	120
	5.5.1 Donneur 1 et 2	121
	5.5.2 Donneurs 3 et 4	127
	5.5.3 Donneurs 5 et 6	134
ГC	5.5.4 Tous les donneurs (1 à 6)	142
5.6	Analyses de variance (ANOVA)	146
5.7	Discussion générale	149
СНА	PITRE 6 CONCLUSION	152
6.1	Objectifs et sommaires des résultats	152
6.2	Apports et applications de l'étude	155
6.3	Limitations de l'étude	155
6.4	Perspectives de recherche	156
ANN	EXE A CALCULS DES LIMITES DE DÉTECTION, DE QUANTIFICATION ET DU COEFFICIENT DE	
VAR	IATION	157
ANN	EXE B COURBES D'ÉTALONNAGE	158
ANN	EXE C DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 1	159
ANNEXE D DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 2 160		160
ANNEXE E DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 3 16		161
ANNEXE F DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 4 16		162
ANNEXE G DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 5 163		163

ANNEXE I TESTS DE SHAPIRO-WILK ET DE LEVENE (SECTION 5.1)	165
ANNEXE J ÉCHANTILLONS ANALYSÉS EN GC-MS	166
ANNEXE K TESTS DE SHAPIRO-WILK ET DE LEVENE (SECTION 5.6)	167
ANNEXE L TESTS POST-HOC DE L'ANOVA ROBUSTE	168
RÉFÉRENCES	169

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Schéma d'un triglycéride composant les lipides du corps humain	8
1.2	Exemple de la réaction d'hydrolyse des triglycérides conduisant à la formation d'un glycérol et de trois acides gras libres	9
1.3	Exemple de la réaction d'hydrogénation de l'acide myristoléique conduisant à la formation de 'acide gras saturé correspondant, l'acide myristique	9
1.4	Exemple de la réaction d'oxydation d'un acide gras conduisant à la formation des acides gras hydroxy (hydratation) et oxo (déshydrogénation)	10
2.1	Entrée sécurisée du site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] REST[ES]) et sa clôture électrique	22
2.2	Cage anti-charognards déposée sur un donneur pour éviter la perturbation de la décomposition par les charognards vertébrés	23
2.3	Schéma présentant les différentes zones de collecte de tissus mous; AD) abdomen droit; AG) abdomen gauche; CD) cuisse droite et CG) cuisse gauche	. 27
2.4	Équation de la dérivatisation des acides gras en leur esters triméthylsilylés	30
2.5	Schéma simplifié d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse (GC-MS)	32
2.6	Schéma simplifié d'un chromatographe en tandem couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS)	33
3.1	Agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte de tous es acides gras TMS cibles : acide laurique (1), acide myristoléique (2), acide myristique (3), acide palmitoléique (4), acide palmitique (5), acide linoléique (6), acide oléique (7), acide stéarique (8)) à 'exception de l'acide arachidique TMS. La ligne rouge est causée par la perte de phase stationnaire « column bleeding »). Elle n'est pas prise en considération dans l'analyse des chromatogrammes.	. 44

3.2	Agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte des acides inoléique TMS (1), oléique TMS (2) et stéarique TMS (4) en plus du standard interne (nonadécanoate de méthyle (3)). La ligne rouge est causée par la perte de phase stationnaire (« column bleeding »). Elle n'est pas prise en considération dans l'analyse des chromatogrammes	45
3.3	Agrandissement du chromatogramme résultant de l'analyse d'une solution dérivatisée onstituée d'acide linoléique TMS (1), oléique TMS (2) et de nonadécanoate de méthyle (SI) (3)	49
3.4	Agrandissement du chromatogramme résultant de l'analyse d'une solution dérivatisée onstituée de nonadécanoate de méthyle (SI) (1) et d'acide stéarique TMS (2)	50
3.5	Chromatogramme obtenu suivant l'analyse des tissus mous d'une épaule de porc après dérivatisation chimique : 1) acide laurique 2) acide myristique 3) acide palmitoléique 4) acide palmitique 5) acide linoléique 6) acide oléique 7) nonadécanoate de méthyle (SI) 8) acide stéarique 9) cholestérol-d ₇ (SI)	54
4.1	Températures quotidiennes moyennes et total des précipitations quotidiennes pour l'ensemble de la durée de l'étude des six donneurs; a. Donneurs 1 et 2 installés sur le site en août 2020, b. Donneur 3 installé sur le site en septembre 2020, c. Donneur 4 installé sur le site en octobre 2020, d. Donneur 5 installé sur le site en mai 2021, e. Donneur 6 installé sur le site en juin 2021	57
4.2	Durée des stades de décomposition (en ADD) observés chez les donneurs 1 et 2 lors de leur étude sur le site de REST[ES] d'août à novembre 2020	60
4.3	Durée des stades de décomposition (en ADD) observés chez les donneurs 3 et 4 lors de leur étude sur le site de REST[ES] de septembre 2020 à août 2021	63
4.4	Durée des stades de décomposition (en ADD) observés chez les donneurs 5 et 6 lors de leur étude sur le site de REST[ES] de mai à août 2021	66
4.5	Durée des stades de décomposition (en ADD) observés pour les six donneurs lors de leur étude espective sur le site de REST[ES] de août 2020 à août 2021	68
5.1	Graphiques d'interaction des acides gras du donneur 1 des quatre zones de prélèvement, soit e côté droit et gauche du torse et la cuisse	72
5.2	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 1	77
5.3	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 2	80

5.4	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse sur toute l'étude pour les donneurs 1 et 2 (été 2020)	82
5.5	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la uisse sur toute l'étude pour les donneurs 1 et 2 (été 2020)	85
5.6	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 3	88
5.7	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 4	91
5.8	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse sur toute l'étude pour les donneurs 3 et 4 (automne 2020 et printemps 2021)	94
5.9	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la uisse sur toute l'étude pour les donneurs 3 et 4 (automne 2020 et printemps 2021)	97
5.10	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute l'étude pour le donneur 5	100
5.11	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse (To) et de la cuisse (Cu) sur l'étude pour le donneur 6	103
5.12	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du orse sur toute l'étude pour les donneurs 5 et 6 (printemps et été 2021)	106
5.13	Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la uisse sur toute l'étude pour les donneurs 5 et 6 (printemps et été 2021)	109
5.14	Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 1 et 2 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu)	114
5.15	Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 3 et 4 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu)	117
5.16	Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 5 et 6 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu)	119
5.17	« Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse (To) et de la cuisse gauche (Cu) des donneurs 1 et 2 installés sur le site de REST[ES] à l'été 2020	122

5.18	« Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 1 et 2 installés sur le site de REST[ES] à l'été 2020	125
5.19	« Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 3 et 4 installés sur le site de REST[ES] à 'automne 2020	128
5.20	« Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 3 et 4 installés sur le site de REST[ES] à l'automne 2020	131
5.21	« Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 5 et 6 installés sur le site de REST[ES] au printemps 2021	135
5.22	« Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 5 et 6 installés sur le site de REST[ES] au printemps 2021	139
5.23	« Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs (1 à 6) installés sur le site de REST[ES] d'août 2020 à août 2021	143
5.24	« Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs (1 à 6) installés sur le site de REST[ES] d'août 2020 à août 2021	145
B.1	Courbes d'étalonnage des neufs acides gras étudiés dans le cadre de ce projet réalisées à partir de solutions standards	158
C.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 1 installé sur le site de REST[ES] en août 2020; a) Frais (JE 0; 20,95 ADD) b) Gonflement de l'abdomen vu de côté (JE 6; 151,65 ADD) c) Gonflé et actif (JE 8; 188,02 ADD) d) Dessiccation (JE 18; 355,13 ADD) f) Desscication et squelettique (JE 70; 965,48 ADD; dernier jour d'échantillonnage)	159
D.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 2 installé sur le site de REST[ES] en août 2020; a) Frais (JE 0; 20,95 ADD) b) Gonflé et actif (JE 7; 170,82 ADD) c) Gonflé et actif avec activité entomologique élevée (JE 8; 188,02 ADD) d) Dessiccation et squelettique (JE 15; 313,61 ADD) f) Dessiccation et squelettique (JE 70; 965,48 ADD; dernier jour d'échantillonnage)	160

E.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 3 installé sur le site de REST[ES] en septembre 2020; a) Frais (JE 0; 19,54 ADD) b) Gonflé (JE 10; 130,28 ADD) c) Gonflé et actif (JE 24; 244,04 ADD) d) Gonflé, actif et début de dessiccation (JE 50; 366,65 ADD; dernier jour d'échantillonnage de l'automne 2020) f) Dessiccation (JE 226; 821,37 ADD; premier jour d'échantillonnage au printemps 2021).	161
F.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 4 installé sur le site de REST[ES] en octobre 2020; a) Frais (JE 0; 10,47 ADD) b) Frais et dessiccation (JE 35; 228,04 ADD; dernier jour d'échantillonnage de l'automne 2020) c) Dessiccation (JE 219; 730,67 ADD; premier jour d'échantillonnage au printemps 2021) d) Actif et dessiccation/exemple de l'apparence « dégonflé » (JE 252; 578,48 ADD) f) Dessiccation (JE 324; 2740,81 ADD; dernier jour d'échantillonnage).	162
G.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 5 installé sur le site de REST[ES] en mai 2021; a) Frais (JE 0; 9,04 ADD) b) Gonflé et actif (JE 10; 173,51 ADD) c) Gonflé, actif et dessiccation (JE11; 196,12 ADD) d) Dessiccation et squelettique/exemple de l'apparence « dégonflé » (JE 51; 913,38 ADD) f) Dessiccation et squelettique (JE 106; 2030,21 ADD; dernier jour d'échantillonnage)	163
H.1	Évolution des stades de décomposition du donneur 6 installé sur le site de REST[ES] en juin 2021; a) Frais (JE 0; 14,65 ADD) b) Gonflé et actif (JE 6; 144,70 ADD) c) Gonflé et actif (JE 10; 216,95 ADD) d) Gonflé et actif (JE 11; 196,12 ADD) f) Dessiccation et Squelettique (JE 63; 1153,30 ADD; dernier jour d'échantillonnage)	164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Stades de décomposition et modifications taphonomiques leur étant associées, présentés par ordre chronologique selon leur ordre d'apparition observé sur les corps	. 24
2.2	Informations personnelles relatives aux six donneurs étudiés	. 26
2.3	Paramètres et conditions expérimentales utilisés pour l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS)	. 34
2.4	Paramètres et conditions expérimentales utilisés pour l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	. 35
3.1	Acides gras saturés et insaturés ciblés pour ce projet suivant leur dérivatisation chimique (triméthylsilylé)	. 39
3.2	Temps de rétention (t_R) des acides gras cibles et du standard interne choisi en utilisant les paramètres optimisés de la méthode sur GC x GC-TOF-MS	. 41
3.3	Standards internes utilisés pour l'optimisation de la méthode GC x GC-TOF-MS après dérivatisation chimique	. 42
3.4	Paramètres de température optimaux pour la séparation des acides gras à l'aide d'un GC x GC-TOF-MS	. 43
3.5	Temps de rétention (t_R) des acides gras cibles et des standards interne en utilisant les paramètres de la méthode optimisée sur GC-MS	. 47
3.6	Paramètres de température optimaux pour la séparation des acides gras à l'aide d'un GC-MS	. 47
3.7	Résultats des tests de validation de la méthode développée à l'aide d'un GC-MS : les limites de détection (LD), les limites de quantification (LQ) et les coefficients de variation (CV)	. 52
5.1	Résultats d'une ANOVA classique à deux facteurs pour les échantillons de tissus mous des quatre zones de prélèvement du donneur 1	. 74
5.2	Résultats de l'ANOVA classique à deux facteurs et de l'ANOVA robuste à deux facteurs	. 147

I.1	Résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk du jeu de données des échantillons du torse (droit et gauche) et de la cuisse (droite et gauche) du donneur 1	165
1.2	Résultats du test d'homogénéité de variance de Levene du jeu de données des échantillons du torse (droit et gauche) et de la cuisse (droite et gauche) du donneur 1	165
J.1	Échantillons analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour chaque donneur	166
K.1	Résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs	167
К.2	Résultats du test d'homogénéité de variance de Levene du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs	167
L.1	Résultats des tests post-hoc du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs	168

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AD	Abdomen droit
ADD	Accumulated-degree-days
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Adbomen gauche
ANOVA	Analysis of variance (Analyse de la variance)
ARN	Acide ribonucléique
АТР	Adénosine triphosphate
BSTFA	N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
CD	Cuisse droite
CDI	Cadaver decomposition island (Ilot de décomposition)
CG	Cuisse gauche
Cu	Cuisse
CV	Coefficient de variation
ÉU	États-Unis
F	Femelle
GC	Gas chromatography (Chromatographie gazeuse)
GC x GC	Two-dimensional gas chromatography (Chromatographie gazeuse en tandem)
GC x GC-TOF-MS	Two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry (Chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol)

GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry (Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)		
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Chromatographie liquide haute performance)		
IE	Impact électronique		
IMC	Indice de masse corporelle		
IPM	Intervalle post mortem		
IPM _{min}	Intervalle post mortem minimal		
JE	Jour expérimental		
k	Facteur de confiance		
LD	Limite de détection		
LQ	Limite de quantification		
Μ	Mâle		
MS	Mass spectrometry (Spectrométrie de masse)		
MTD	Minimum time since death (Temps minimal depuis la mort)		
n	Nombre d'échantillons/sujet		
NIST	National Institute of Standards and Technology		
OHFA	Hydroxy fatty acid (Acide gras hydroxylés)		
OXOFA	Oxo fatty acid (Acide gras oxo)		
РСА	Principal component analysis (Analyse en composantes principales)		
PTFE	Polytétrafluoroéthylène		
R ²	Coefficient de détermination		

REST[ES]	Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales]
SCELERA	Sous-comité d'éthique du laboratoire d'enseignement et de recherche en anatomie
SI	Standard interne
TBS	Total body score
TMCS	Trimethylchlorosilane (Chlorure de triméthylsilyle)
TMS	Triméthylsilylé
То	Torse
TOF-MS	Time of flight mass spectrometry (Spectromètre de masse à temps de vol)
t _R	Temps de rétention
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Marque déposée R Pi π Pour cent % ß Bêta Accumulated-degree-days ADD °C Degré Celsius °C/min Degré Celsius par minute cm Centimètre Électron-volt eV Gramme g g/mol Gramme par mole h Heure Kilogramme kg km Kilomètre Mètre m Mètre par seconde m/s Masse sur charge m/z mbar Millibar Milligramme mg

min	Minute
mL	Millilitre
mL/min	Millilitre par minute
mm	Millimètre
ppm	Partie par million
S	Seconde
spectres/s	Spectres par seconde
μL	Microlitre
μm	Micromètre
W/m ²	Watt par mètre carré

RÉSUMÉ

La décomposition d'un corps humain est influencée par de nombreux paramètres parmi lesquels l'environnement joue un rôle majeur. D'importantes variations peuvent donc être rencontrées d'une zone géographique à l'autre et complexifier l'estimation de l'intervalle post-mortem (IPM) fondée sur l'évaluation de l'état de décomposition du corps. Il apparaît alors nécessaire d'entreprendre des recherches dans différents environnements pour adapter ou développer des méthodes d'estimation de l'IPM appropriées aux conditions environnementales locales. Ce travail de recherche a pour but d'étudier la décomposition des lipides en tant qu'indicateur de l'IPM dans le climat froid et tempéré du sud du Québec. Il s'agit de l'une des premières recherches réalisées sur la décomposition de corps humains au Canada. Pour ce faire, la décomposition de six donneurs a été étudiée sur le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]), le premier site de recherche taphonomique extérieur dédié à l'étude de la décomposition humaine au Canada. Des échantillons de tissus mous (p. ex. peau, gras et muscle) ont été collectés jusqu'à liquéfaction complète de ceux-ci afin d'analyser les variations de concentrations des acides gras saturés et insaturés contenus dans les lipides sur l'ensemble de la période d'étude. Pour ce faire, une méthode d'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été utilisée. Les variations de concentrations mesurées ont ensuite été comparées aux stades de décomposition observés visuellement sur le terrain pour chaque donneur. Cette analyse a mis en évidence des corrélations intéressantes entre les concentrations mesurées et l'IPM. Il a été possible d'identifier la transition du stade frais vers les stades gonflé et actif grâce à l'hydrolyse des triglycérides menant à la libération d'une importante quantité d'acides gras libres. Pour certains donneurs, il a aussi été possible d'observer la transition vers des stades de décomposition avancée (dessiccation et squelettique) par l'hydrogénation graduelle des acides gras insaturés conduisant à la formation de leurs analogues saturés. Les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique sont ceux ayant été identifiés comme présentant le plus grand potentiel à titre de biomarqueurs pour l'estimation de l'IPM parmi les acides gras étudiés dans ce mémoire. Cette étude constitue une contribution importante à l'état des connaissances actuelles sur la décomposition humaine et, plus généralement, le domaine de la thanatologie forensique, en développement au Canada. Ce travail de recherche ouvre également des perspectives encourageantes pour l'utilisation potentielle des lipides comme biomarqueurs pour estimer l'IPM dans le futur.

Mots-clés : Décomposition humaine, climat froid et tempéré, intervalle post-mortem (IPM), acides gras saturés et insaturés, chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

ABSTRACT

Human decomposition is strongly influenced by the environment in which decomposition occurs. Significant variations in the decomposition process can be encountered from one environment to another and complicate the postmortem interval (PMI) estimation. It is therefore necessary to undertake research in different climates to adapt or develop appropriate methods to evaluate the PMI. This project aimed to study lipid decomposition as potential biomarkers for estimating PMI in the cold and temperate climate of southern Québec. It is one of the first studies to be conducted using human donors in a forensic context in Canada. The decomposition of six donors was studied at the site for Research on Experimental and Social Thanatology (REST), the first outdoor taphonomic research facility dedicated to the study of human decomposition in Canada. Soft tissue samples (e.g. skin, fat and muscle) were collected until their complete liquefaction in order to analyze the variations in the concentrations of saturated and unsaturated fatty acids contained in lipids over the entire PMI. The samples were analyzed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) after being derivatized. The variations in the concentrations measured could then be compared to the stages of decomposition observed for each donor for the duration of this study. Notable correlations between the measured concentrations and the PMI were discovered. It was possible to observe the transition from the fresh stage to the bloat and active stages through the hydrolysis of triglycerides because of the release of a large quantity of free fatty acids. For some donors, it was also possible to observe the transition to advanced decomposition stages by the gradual hydrogenation of unsaturated fatty acids leading to the formation of their saturated analogues. Importantly, all the fatty acids studied do not have the same potential as biomarkers for estimating PMI. Palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids have been identified with the highest potential for correlation. This study added to the limited knowledge base of human decomposition in Canada and established a foundation for the potential use of lipids as biomarkers for the estimation of PMI in the future.

Keywords : Human decomposition, cold climate, postmortem interval (PMI), saturated and unsaturated fatty acids, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La décomposition du corps humain est un processus complexe impliquant une multitude de réactions biochimiques menant à la désintégration des tissus mous (p. ex. peau, muscles, gras, organes) et durs (p. ex. os). Bien qu'il s'agisse d'un phénomène de mieux en mieux compris, chaque environnement dans leguel un corps est retrouvé présente des particularités qui auront un impact sur la décomposition (Cockle et Bell, 2017). Il devient donc parfois difficile de déterminer certains éléments cruciaux suivant la découverte d'un corps telle l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) qui contribue à l'identification de la victime et, potentiellement, de son meurtrier en cas d'homicide. Plusieurs méthodes ont été développées au cours des dernières décennies afin de déterminer le temps écoulé depuis la mort. Les méthodes de thanatologie médico-légale suivies, de l'entomologie forensique sont généralement utilisées lors des premières semaines suivant le décès (Janaway et al., 2009; Vass et al., 2002). Cependant, ces méthodes ne peuvent pas toujours être appliquées par exemple, en l'absence d'insectes ou dans le cas de décomposition avancée du corps. Ce genre de situation est d'ailleurs courante dans le climat canadien où les insectes sont absents pendant près de la moitié de l'année. L'utilisation de biomarqueurs chimiques pourrait pallier ce problème. L'analyse de la dégradation des lipides est l'une des méthodes proposées (Castellano et al., 1984). En effet, les acides gras composant les tissus adipeux sont de bons biomarqueurs dus à leur propriété hydrophobe. N'étant pas solubles dans l'eau, ils conservent généralement leur position initiale sur le corps (Schoenen et Schoenen, 2013). Récemment, Ueland et al. (2021) ont d'ailleurs observé que certains acides gras saturés et insaturés seraient des indicateurs pertinents lorsque l'IPM est court (< 2 mois). Malheureusement, le climat australien, dans leguel cette étude a été menée, est peu comparable au climat canadien, objet de la présente étude. Le but de cette recherche est donc de déterminer s'il existe une corrélation entre la décomposition des lipides et l'ensemble de l'IPM, et ce, pour les quatre saisons du climat québécois. Tout le processus de décomposition sera étudié afin de prendre en considération non seulement un IPM plus court (< 2 mois), mais bien l'entièreté de celui-ci soit jusqu'à la décomposition complète des tissus mous (\geq 2 mois).

1.1 La taphonomie forensique: définition et principes

Le terme taphonomie, provenant du grec *taphos* (enfouissement) et *nomos* (loi), est une discipline provenant de la paléontologie (Schotsmans *et al.*, 2017). Le scientifique russe Efremov (1940), à l'origine de cette discipline, a introduit la taphonomie comme étant l'étude du passage d'un organisme de la

biosphère à la lithosphère. Plusieurs autres disciplines telles que la science forensique ont par la suite intégré ce terme et ont introduit leur propre définition. Haglund et Sorg (1997) définissent la taphonomie forensique comme:

[...] the use of taphonomic models, approaches and analyses in forensic contexts to estimate the time since death, reconstruct the circumstances before and after decomposition, and discriminate the products of human behavior from those created by the earth's biological, physical, chemical and geological subsystems.

Récemment, Schotsmans *et al.* (2017) ont défini cette discipline comme l'étude interdisciplinaire de ce qui est arrivé à un organisme entre son décès et sa découverte. Quelle que soit la définition utilisée, les objectifs principaux de cette discipline sont de servir le système judiciaire, d'identifier des restes humains non identifiés, d'estimer l'IPM, de déterminer les circonstances du décès (notamment diagnostiquer les causes de la mort) et, éventuellement, de réunir des indices pouvant mener à la personne ayant commis le crime (Schotsmans *et al.*, 2017; Haglund et Sorg, 1997).

1.2 La chimie de la décomposition

La décomposition des tissus humains est un processus complexe au cœur de la taphonomie forensique qui implique une variété de réactions chimiques et biologiques. La décomposition débute environ 4 minutes après la mort (Vass, 2001). Il s'agit du procédé par lequel les tissus mous du corps se dégradent jusqu'à ce qu'il ne reste que les os (Haglung et Sorg, 2002). La décomposition est un continuum qui comprend plusieurs phases que différents auteurs ont tenté de catégoriser. Plusieurs visions et terminologies sont donc associées à ce processus. Payne (1965) a divisé la décomposition en cinq stades : frais, gonflé, décomposition active, décomposition avancée, sec et restes. Ceux-ci sont initialement basés sur les changements visuels observés dans le cadre d'une étude entomologique. En thanatologie médico-légale et en pathologie, la décomposition est plutôt décrite par les changements physiques, chimiques et biologiques rencontrés durant le processus. La décomposition est alors séparée en quatre phases, soit l'autolyse, la putréfaction, la liquéfaction et la squelettisation (Janaway, 1996; Forbes, 2008; Vass, 2001). Cependant, il est important de noter que la décomposition est un processus dynamique où plusieurs stades/phases peuvent se produire au même moment sur différentes régions du corps (décomposition différentielle) (Megyesi *et al.*, 2005).

1.2.1 Autolyse

Dès les premiers instants où le cœur cesse de pomper le sang dans le corps et donc au moment où le transport d'oxygène s'arrête, les cellules sont soumises au processus d'autolyse. Il s'agit de l'autodestruction des cellules par autodigestion enzymatique (Gill-King, 1997). L'augmentation du niveau de dioxyde de carbone dans le sang, inhérent au manque d'oxygène, entraîne la production d'acide carbonique (H₂CO₃), donc une diminution du pH et l'accumulation de déchets dans le réseau sanguin qui « empoisonne » les cellules. Simultanément, les diverses enzymes cellulaires telles les lipases, protéases et amylases, débutent l'autodigestion cellulaire jusqu'à la rupture de leurs membranes (Vass, 2001). Ce phénomène se produit généralement en premier dans les cellules et tissus les plus métaboliquement actifs tels l'estomac, les intestins et le cœur ou ceux riches en eau comme le cerveau (Gill-King, 1997; Simmons et Cross, 2012). Les tissus adipeux et les muscles sont donc les derniers à subir l'autolyse de leurs cellules (Gill-King, 1997). Ces réactions microscopiques mènent graduellement à des changements visuellement observables sur le corps quelques jours après le décès. Le détachement intercellulaire conduit, entre autres, au phénomène de « skin slippage »; il s'agit du détachement de l'épiderme laissant le derme visible (Simmons et Cross, 2012; Pinheiro, 2006). C'est aussi durant l'autolyse que les phénomènes d'algor, livor et rigor mortis se produisent soit respectivement l'acclimatation du corps à la température ambiante, le drainage du sang vers les régions inférieures et la rigidification des muscles du corps (Janaway et al., 2009; Forbes, 2008). Ces modifications visibles sur le corps marquent la fin du stade frais et le début de la putréfaction.

1.2.2 Putréfaction

La putréfaction se produit lorsqu'une quantité suffisante de fluides riches en nutriments devient disponible à la suite de la rupture des cellules lors de l'autolyse (Vass *et al.*, 2002). Ces fluides sont une source d'énergie importante pour les microorganismes (bactéries, champignons et protozoaires) responsables de la putréfaction (Vass, 2001). La diminution rapide du potentiel redox des tissus lors de la décomposition limite la croissance des bactéries aérobies (Janaway *et al.*, 2009). Un environnement majoritairement anaérobie est créé dans le corps favorisant une croissance rapide des bactéries du colon, majoritairement anaérobies (de 96 à 99 %) (Gill-King, 1997). Les bactéries peuvent par la suite accéder au reste du corps via les systèmes lymphatiques et musculaires (Janaway *et al.*, 2009). Elles engendrent une dégradation rapide des glucides, protéines et lipides de leur environnement immédiat. Ces macromolécules sont alors converties en divers acides, gaz et autres sous-produits qui sont à l'origine de plusieurs changements visibles sur le corps. Le premier changement externe observable est le

« marbling » de la peau ou marbrures. Il s'agit d'une réaction entre le sang et du sulfure d'hydrogène générée par des bactéries qui produit une coloration verte/noire des vaisseaux sanguins à la surface de la peau (Forbes, 2008; Clark *et al.*, 1997; Simmons et Cross, 2012). Par la suite, une distension du corps se produit (« bloating »), due à la formation de gaz produits lors de la fermentation anaérobie qui débute dans les intestins (Gill-King, 1997; Forbes, 2008).

1.2.3 Liquéfaction

La liquéfaction des tissus mous, engendrée par les bactéries du tractus gastro-intestinal, est l'une des conséquences du processus de putréfaction. Plus la décomposition avance, plus les quantités de fluides sont importantes. Ceux-ci, ainsi que d'autres fluides corporels, sont par la suite relâchés dans l'environnement immédiat du corps soit par les orifices naturels (p. ex. cavité orale, anus, vagin) ou par rupture de l'abdomen, marquant un terme au stade gonflé (« bloating ») et indiquant le début de la décomposition active (Gill-King, 1997; Clark *et al.*, 1997).

Les produits de liquéfaction sont composés d'une grande quantité d'eau, de divers minéraux et des produits de dégradation des principales macromolécules qui compose le corps humain; les protéines, les lipides et les glucides (Forbes *et al.*, 2017, Janaway *et al.*, 2009). Les fluides transférés dans le sol environnant créent un « îlot de décomposition » (« cadaver decomposition island (CDI) ») qui a un impact sur la composition du sol et sur les différents organismes vivants (Tibbett et Carter, 2008; Forbes *et al.*, 2017). Lorsque la majorité des tissus mous a été soit liquéfiée soit consommée par des charognards vertébrés et invertébrés, un ralentissement de la décomposition est observé (Payne, 1965; Goff, 2009), marquant la fin de la décomposition active et le début de la décomposition avancée.

1.2.4 La décomposition avancée ou squelettisation

Lorsque tous les tissus mous ont été dégradés, les os deviennent alors visibles. La squelettisation peut être partielle lorsque seuls quelques os sont exposés ou totale lorsque tous les tissus mous ont été éliminés. La décomposition graduelle des ligaments et tendons conduit, avec le temps, à la perte de connexions anatomiques, soit la désarticulation du corps. Généralement, la désarticulation procède de la tête vers les pieds et du centre du corps vers les périphéries (médial vers distal) (Rodriguez et Bass, 1985).

Les os peuvent se décomposer lentement par un processus appelé la diagenèse (Vass, 2001). La décalcification et la dissolution dans l'eau ou dans les sols acides conduisent à la dégradation des

composés organiques (collagène) et inorganiques (calcium, magnésium, apatite, hydroxyapatite) des os (Clark *et al.*, 1997; Vass, 2001). Avec le temps, ils deviendront légers, secs et cassants (Hamilton et Green, 2017).

1.2.5 Autres phénomènes taphonomiques (momification et adipocire)

L'environnement dans lequel un corps se trouve joue un rôle clef dans le processus de décomposition, ainsi différents phénomènes peuvent perturber la trajectoire de décomposition « attendue » (Section 1.5). La momification et la formation d'adipocire sont deux exemples couramment rencontrés qui entrainent un ralentissement, voire une préservation du corps (Saul *et al.*, 2002; Janaway *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2004).

La momification consiste en la déshydratation et la dessiccation des tissus mous qui tend à préserver naturellement le corps. La peau momifiée a un aspect sec et friable généralement de couleur brune/noire évoquant du cuir (Janaway *et al.*, 2009). Ce type de phénomène est normalement rencontré dans des environnements secs, ventilés et chauds favorisant l'évaporation des fluides corporels (Pinheiro, 2006; Makristathis *et al.*, 2002; Micozzi, 1991). À l'inverse, un environnement glacial et sec peut aussi entrainer la momification d'un corps dû au phénomène de sublimation ou de lyophilisation (Micozzi, 1991). Dans ce type d'environnement, la sécheresse de l'air et l'inhibition de la croissance bactérienne sont responsables de la momification. Dans tous les cas, la momification préserve certaines parties du corps, voire le corps dans son intégralité et peut ainsi faciliter l'identification de la victime (Pinheiro, 2006).

La formation d'adipocire (ou saponification) peut également contribuer à la préservation d'un corps (Forbes et al., 2004). Lorsque frais, l'adipocire peut avoir un aspect crémeux et gras de couleur blanchâtre. Avec le temps, cette substance arbore plutôt une croûte solide et friable de couleur grise blanche (Ubelaker et Zarenko, 2011). L'adipocire est produite par la conversion des tissus adipeux en un matériel solide constitué essentiellement d'acides gras saturés (Mant et Furbank, 1957; Forbes *et al.*, 2004; Forbes *et al.*, 2002). Ces derniers se retrouvent libérés dans le corps par la décomposition des lipides (Section 1.3.4) et se lient à des ions de sodium ou de potassium présents dans les fluides de décomposition pour former l'adipocire (Gill-King, 1997). Ces ions peuvent par la suite être remplacés par du calcium lorsque le corps se retrouve dans un environnement riche en minéraux permettant la solidification de l'adipocire (Gill-King, 1997). Des acides gras 10-hydroxy et 10-oxo, produits par certaines enzymes bactériennes spécifiques, sont aussi des constituants importants des adipocires (Takatori et Ishiguro, 1984; Takatori *et al.*, 1986).

Le manque d'oxygène, nuisant à la dégradation microbienne des acides gras, est à l'origine de la formation des adipocires (Schoenen et Schoene, 2013). Des conditions particulières sont donc requises pour que l'adipocire se produise, tels que des températures chaudes, un milieu anaérobie et un taux d'humidité élevé (Mellen *et al.*, 1993; Forbes *et al.*, 2005).

1.3 Biomarqueurs chimiques

Le corps humain est approximativement composé de 61 % d'eau, 17 % de protéines, 17 % de gras, 1 % de glucides et 4 % de minéraux (Pocock *et al.*, 2013). Lors de l'autolyse, des hydrolases mènent à la dénaturation de molécules et de membranes cellulaires, soit la perte de leur conformation tridimensionnelle normale (Branden et Tooze, 2012), entrainant la « digestion » de la majorité des macromolécules du corps. Durant la putréfaction ce sont plutôt les bactéries qui engendrent la dégradation de ces mêmes macromolécules (Forbes, 2008).

1.3.1 Protéines

Les protéines du corps sont dégradées par des enzymes spécifiques; les protéases. La protéolyse conduit à la formation de protéoses, de peptones, de polypeptides et, enfin, à des acides aminés. De plus, des gaz tels que le dioxyde de carbone et le méthane sont produits lors de ces réactions (Forbes, 2008; Janaway *et al.*, 2009). Les acides aminés produits peuvent subir différentes réactions subséquentes. Par exemple, des endoenzymes bactériennes peuvent les désaminer ou les décarboxyler (Gill-Kill, 1997). La décarboxylation de deux diamines toxiques (ornithine et lysine) est d'ailleurs à l'origine de la formation de la putrescine et la cadavérine, deux sous-produits de la décomposition. Les acides aminés comportant un atome de soufre peuvent aussi être réduits par désulfuration et ainsi former de l'ammoniac, des thiols, des sulfures, de l'acide pyruvique et du sulfure d'hydrogène (Forbes, 2008; Gill-King, 1997). Ces derniers sont, entre autres, responsables du phénomène de « marbling » mentionné à la section 1.2.1 ainsi que de la formation de précipités colorés à la surface de la peau (Forbes, 2008).

La dégradation des protéines, comme tous les aspects de la décomposition, est influencée par différentes variables environnementales telles que la température, l'humidité et l'activité bactérienne (Janaway *et al.*, 2009). De plus, certains tissus et organes sont dégradés plus rapidement par protéolyse lors de la putréfaction ; par exemple, la membrane de revêtement du tractus gastro-intestinal et de l'épithélium pancréatique, le cerveau, le foie et les reins. À l'inverse, les protéines contenues dans les muscles sont plus résistantes à la dégradation ainsi que la kératine qui est plus difficile à dégrader (Forbes, 2008).

1.3.2 Glucides

Les glucides sont composés d'un polysaccharide complexe, le glycogène. Ce dernier est décomposé par des microorganismes, formant des monomères de glucose. Ceux-ci peuvent être complètement oxydés en dioxyde de carbone ou partiellement décomposés en différents alcools et acides organiques (Janaway *et al.*, 2009). L'environnement dans lequel se trouve un corps peut aussi exercer une influence sur la décomposition des sucres. En effet, dans un environnement aérobie, les sucres sont dégradés en acides glucuronique, citrique et oxalique par des champignons. À l'inverse, dans un environnement anaérobie, ils seront décomposés par des bactéries, formant les acides lactique, butyrique et acétique. De plus, d'autres produits de fermentation peuvent découler de la décomposition des glucides comme des alcools, l'acétone et certains gaz comme le méthane, l'hydrogène et le sulfure d'hydrogène (Forbes, 2008).

1.3.3 Acides nucléiques

Les deux principaux acides nucléiques retrouvés dans les cellules sont l'acide ribonucléique (ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il s'agit de très longs polymères linéaires composés d'une série de monomères appelés nucléotides qui sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiesters (Blackburn *et al.*, 2006). Lors de la décomposition, les acides nucléiques seront attaqués par des enzymes spécifiques à leur dégradation appelés nucléases. Il y aura alors formation de nucléotides et nucléosides. Un nucléoside est formé par l'association d'une base hétérocyclique azotée (purines et pyrimidines) à un sucre pentose. Un nucléotide est par la suite formé par la combinaison d'un nucléoside à un résidu phosphate (Blackburn *et al.*, 2006). Les nucléotides et nucléosides seront alors décomposés en sucre, en phosphate et en base hétérocyclique azotée. Les sucres obtenus pourront ensuite être dégradés de la même manière que les glucides. Le phosphore produit ne se dégrade pas aussi simplement. Il peut se retrouver sous différentes formes en fonction des conditions environnementales. Enfin, les base purines seront quant à elles dégradées pour former de la xanthine et de l'hypoxanthine. L'azote présent dans les cycles de ces bases peut aussi être libéré dans le sol environnant et entrer dans le cycle de l'azote (Forbes *et al.*, 2017).

1.3.4 Lipides

Les tissus adipeux du corps sont composés essentiellement d'eau, de protéines et, en majeure partie, de lipides (60-85 %) qui sont eux-mêmes composés de 90 à 99 % de triglycérides (Dent *et al.*, 2003). Les triglycérides sont donc des macromolécules présentes en quantité importante dans le corps humain. Ceux-ci sont composés d'un glycérol lié à trois chaînes d'acides gras saturés ou insaturés (entre 12 et

24 carbones) (Figure 1.1). Une liaison ester est formée entre les alcools du glycérol et le groupement carboxylique des aides gras (Stillwell, 2016a, 2016b).



Figure 1.1 Schéma d'un triglycéride composant les lipides du corps humain.

Il existe une grande variété d'acide gras pouvant se retrouver dans les triglycérides. Cependant, certains d'entre eux sont retrouvés en quantité plus importante tels l'acide linoléique (18:2), l'acide oléique (18:1), l'acide palmitotéique (16:1), l'acide stéarique (18:0) et l'acide palmitique (16:0) (Forbes, 2008; Kingbury *et al.*, 1960). Les acides laurique (12:0), myristique (14:0), myristoléique (14:1) et arachidique (20:0) sont aussi couramment retrouvés dans les triglycérides (Arab, 2003). Les nombres entre parenthèses correspondent à la nomenclature biochimique des acides gras (C:D) où C représente le nombre d'atomes de carbone et D le nombre de doubles liaisons (Stillwell, 2016a).

Lors de la décomposition des lipides, les triglycérides sont hydrolysés par des enzymes bactériennes ou des lipases intrinsèques qui clivent la liaison ester entre le glycérol et les acides gras (Figure 1.2). Conséquemment, les quantités d'acide gras libre et de glycérol augmentent alors que celles des triglycérides diminuent jusqu'à leur hydrolyse complète (Forbes *et al.*, 2004). Cela est seulement possible lorsqu'une quantité suffisante d'humidité est présente. La survie des bactéries et le bon déroulement du processus d'hydrolyse requièrent une quantité suffisante d'eau (Sledzik et Micozzi, 1997). Généralement, les tissus adipeux sont suffisamment humides pour initier la réaction d'hydrolyse. Si un niveau adéquat d'humidité et l'activité enzymatique sont maintenus tout au long de la décomposition, les tissus adipeux seront entièrement réduits en une masse d'acides gras (Forbes, 2008).



Figure 1.2 Exemple de la réaction d'hydrolyse des triglycérides conduisant à la formation d'un glycérol et de trois acides gras libres.

En plus de l'hydrolyse du lien ester des triglycérides, les acides gras libres peuvent être soumis à d'autres réactions chimiques. L'une d'elles est l'hydrogénation des acides gras insaturés formant les acides gras saturés correspondants (Figure 1.3). L'hydrogénation de ces doubles liaisons est possible grâce à des lipases retrouvées dans le corps, mais aussi certaines enzymes bactériennes (Forbes, 2008; Forbes *et al.*, 2017; Dent *et al.*, 2003). Puisque le potentiel redox des tissus mous diminue lors de la décomposition, cela limite la présence de micro-organismes aérobies. Les bactéries anaérobies seront donc favorisées (Forbes *et al.*, 2017). L'hydrogénation des acides myristoléique et palmitoléique conduit respectivement à la formation des acides myristique.



Figure 1.3 Exemple de la réaction d'hydrogénation de l'acide myristoléique conduisant à la formation de l'acide gras saturé correspondant, l'acide myristique.

Les acides gras insaturés peuvent subir un processus d'hydrogénation, mais aussi d'oxydation entraînant la formation d'acides gras hydroxy (hydroxy fatty acid (OHFA)) et oxo (oxo fatty acid (OXOFA)). Ceux-ci sont bio synthétisés par des enzymes provenant de bactéries aérobies conduisant à la formation des composés 10-hydroxy et 10-oxo. L'insaturation des acides doit donc être à la position 9 (Takatori *et al.*, 1987). De plus, cette conversion ne peut être réalisée que par des microorganismes spécifiques. Par exemple, plusieurs sont en mesure de convertir l'acide oléique en acide 10-hydroxy stéarique. Cependant, seulement quelques bactéries peuvent produire l'acide 10-oxo stéarique (Takatori *et al.*, 1986). Ces molécules sont couramment retrouvées dans les adipocires. Par ailleurs, la formation des composés hydroxy et oxo est unidirectionnel. Les acides gras insaturés sont d'abord hydratés pour former les hydroxy. Ils peuvent ensuite être oxydés pour former les composés oxo (Figure 1.4). Les réactions inverses ne sont pas possibles (Gotouda *et al.*, 1988; Takatori, 2001).



Figure 1.4 Exemple de la réaction d'oxydation d'un acide gras conduisant à la formation des acides gras hydroxy (hydratation) et oxo (déshydrogénation).

Enfin, les acides gras, sous forme d'acyl-CoA, peuvent être dégradés par la respiration microbienne appelée la β -oxydation. Il s'agit d'une séquence réactionnelle en quatre étapes conduisant à la libération d'un acétyl-CoA (unité de deux carbones liée à la coenzyme A). Cette séquence se répétera jusqu'à la dégradation complète de l'acide gras. Les groupes d'acétyl-CoA libérés seront par la suite oxydés en dioxyde de carbone et en eau via le cycle de l'acide citrique (Schoenen et Schoenen, 2013; McMurry et Begley, 2006).

1.4 Facteurs influençant la composition des lipides dans le corps humain

Bien que les tissus adipeux d'un corps humain aient une composition similaire et donc que les acides gras principaux retrouvés y soient généralement les mêmes, les pourcentages de ceux-ci peuvent varier.

D'abord, pour un même individu, les répartitions des acides gras peuvent varier en fonction de la zone étudiée. Il existe une différence importante entre la composition des tissus adipeux sous-cutanés superficiels et ceux retrouvés près des organes. Cette variation est expliquée par l'activité métabolique des tissus adipeux (Malcom *et al.*, 1989). La vitesse de métabolisation et la synthèse endogène des acides gras sont en partie responsables de ces différences. Malcom *et al.* (1989) ont aussi démontré qu'il y a, non seulement une variation entre les sites sous-cutanés (abdomen et région glutéale). L'activité métabolique des tissus adipeux sous-cutanés dépendrait donc de la région du corps considérée. Calder *et al.* (1992) ont, quant à eux, démontré qu'il existe une différence entre différents sites au sein d'un même corps, mais seulement pour certains acides gras tels que les acides palmitoléique, oléique et stéarique. Cependant, Makristathis *et al.* (2002) ont rapporté qu'il n'y aurait pas de différence significative entre les diverses régions échantillonnées sur des corps momifiés. Les variations observées dans leur étude

seraient plutôt dues aux conditions environnementales. Il en va de même pour Ueland *et al.* (2021) qui n'ont pas observé de différence significative entre trois régions anatomiques chez un même individu (poitrine, abdomen et cuisses). Il ne semble donc pas y avoir de consensus clair.

Cependant, il existe un consensus sur l'existence de variations dans la composition des tissus adipeux entre deux individus distincts. En effet, plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle dans la composition des acides gras principaux retrouvés dans les triglycérides tels l'âge (Bolton-Smith *et al.*, 1997) et le sexe (Heffernan, 1964; Bolton-Smith *et al.*, 1997). La différence entre les hormones sexuelles et la limitation de certains phénomènes métaboliques liée à l'âge entrainent des variations dans les concentrations en acide gras (Bolton-Smith *et al.*, 1997).

L'alimentation d'un individu a aussi un impact direct sur la composition des acides gras présents dans les tissus adipeux (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1992; Baylin *et al.*, 2002). Les personnes ayant une alimentation faible en gras saturés et plus élevée en gras mono-insaturés présenteraient un plus grand pourcentage d'acide oléique (18:1) dans leurs tissus adipeux (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1992). Un autre exemple important en ce qui a trait à l'alimentation est l'acide linoléique (18:2) qui est l'un des acides gras n'étant pas synthétisé par le corps. Il provient donc directement de la diète (Malcom *et al.*, 1989). Les quantités retrouvées dans le corps peuvent donc grandement varier et sont propres à chaque individu. Le régime alimentaire d'un individu est donc un facteur important dans la distribution des acides gras saturés et insaturés présents dans les triglycérides.

1.5 Facteurs influençant la décomposition

La décomposition est un processus dynamique influencé par divers facteurs qui peuvent perturber la vitesse de décomposition d'un corps. Deux principaux types de facteurs entraînent ces perturbations; les facteurs intrinsèques et les facteurs extrinsèques. Les premiers sont liés directement aux caractéristiques personnelles d'un individu alors que les seconds sont plutôt liés au milieu dans lequel le corps est retrouvé (Ribéreau-Gayon, 2019).

1.5.1 Facteurs intrinsèques

Il existe une variété de facteurs intrinsèques pouvant affecter la vitesse de la décomposition qui doivent être pris en considération lors de l'évaluation de l'intervalle post mortem (IPM). L'âge, le sexe, la masse corporelle, la présence de plaies/blessures et la cause du décès sont également des éléments à prendre en compte (Zhou et Byard, 2011; Mann *et al.*, 1990; Simmons et Cross, 2012). Cependant, il n'existe pas de consensus clairs dans la littérature concernant l'impact de ces facteurs sur la vitesse de la décomposition. Par exemple, selon plusieurs études (Ferreira et Cunha, 2013; Zhou et Byard, 2011; Spicka *et al.*, 2011; Matuszewski et Konwerski, 2014), une masse corporelle élevée ralentirait la décomposition alors qu'une masse corporelle faible accélérerait la décomposition. Roberts *et al.* (2017), ont démontré dans leur étude que la masse corporelle d'un individu aurait peu voire aucun effet sur la vitesse de la décomposition.

Des observations contradictoires ont aussi été réalisées en ce qui a trait aux blessures perimortem. La présence de plaies et traumatismes sur un corps favoriserait l'entrée de bactéries extérieures et la colonisation des insectes (Zhou et Byard, 2011), conduisant ainsi à une décomposition plus rapide (Mann *et al.*, 1990). Cependant, selon Cross et Simmons (2010), les blessures causées par une arme à feu n'affecteraient pas la vitesse de la décomposition.

Enfin, il en va de même pour les causes du décès qui peuvent affecter de manière différente la vitesse de décomposition. Par exemple, les gens décédés des suites d'une maladie infectieuse verront leur décomposition accélérée étant donnée la présence plus élevée de bactéries ante mortem et la préexistence de bactéries dans le sang et les organes (Janaway *et al.*, 2009; Zhou et Byard, 2011). À l'inverse, certaines maladies comme le cancer retarderaient la décomposition (Ferreira et Cunha, 2013). En somme, les facteurs intrinsèques ont été moins étudiés que les facteurs extrinsèques et donc sont moins bien compris. Il est cependant clair qu'ils ne peuvent pas être négligés dans l'estimation de l'IPM (Ribéreau-Gayon, 2019).

1.5.2 Facteurs extrinsèques

Plusieurs variables externes peuvent retarder ou accélérer la décomposition. Parmi celles-ci, le pH du sol (Gill-King, 1997), les précipitations (Mann *et al.*, 1990), l'humidité (Barton *et al.*, 2013; Cockle et Bell, 2017; Mann *et al.*, 1990), la température (Barton *et al.*, 2013; Cockle et Bell, 2017; Gill-King, 1997; Mann *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 2017; Schotsmans *et al.*, 2017; Zhou et Byard, 2011; Janaway *et al.*, 2009) et l'activité des charognards (Barton *et al.*, 2013; Mann *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 2017; Janaway *et al.*, 2009) sont celles les plus souvent mentionnées. L'humidité, la température et l'activité des charognards sont considérées comme ayant un rôle déterminant sur la vitesse de la décomposition (Cockle et Bell, 2017; O'Brien *et al.*, 2017).

La température ambiante est considérée comme un facteur majeur dans la mesure où elle influence directement les processus microbiens internes et externes (Mann *et al.*, 1990). Dans un climat chaud et tempéré, la décomposition peut commencer aussi rapidement que 4 minutes après la mort (Vass, 2001). Cependant, lorsque les températures sont plus froides, la décomposition est ralentie et peut nécessiter 4 à 7 jours (Mann, 1987). L'impact majeur des températures froides sur le processus de décomposition est la préservation des tissus mous qui se produit lorsque le corps gèle. La putréfaction peut être ralentie lorsqu'un corps est exposé à des températures inférieures à 4 °C (Micozzi, 1991). La prolifération des bactéries responsables de la décomposition est grandissante et les différents processus chimiques et biochimiques qui se produisent dans le corps peuvent être réalisés. Cependant, Vass *et al.* (2002) ont démontré que la décomposition pourrait se poursuivre à des températures inférieures à 0 °C dû à l'augmentation des concentrations en sels dans le corps lors de la décomposition. L'impact biologique de températures froides de la décomposition est alors divid donc faire l'objet de davantage d'études expérimentales.

L'humidité influence également la vitesse de décomposition. Lorsque le niveau d'humidité est bas, par exemple dans un désert aride, le corps est soumis au processus de momification rendant les restes humains beaucoup moins attrayants pour la colonisation des insectes. Il en va de même pour les corps momifiés durant l'hiver (Mann *et al.*, 1990). L'absence de charognards invertébrés comme les insectes ralentit considérablement le processus de décomposition.

L'activité des charognards vertébrés et invertébrés (p. ex. insectes) a aussi un impact important sur la décomposition d'un corps. Les plus gros animaux comme les félins, les canidés, les rongeurs et les oiseaux se nourrissent des tissus mous et des os (Mann *et al.*, 1990). De plus, la taille des animaux charognards semble être corrélée à leur capacité à dégrader les corps. Plus les animaux sont gros, plus la décomposition sera accélérée (O'Brien *et al.*, 2017). Ils peuvent aussi disperser les ossements (Janaway *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2017). Les insectes jouent également un rôle prépondérant dans la vitesse de la décomposition. D'importantes masses d'insectes et/ou de larves peuvent coloniser le corps et consommer une partie des tissus mous (Mann *et al.*, 1990; Simmons et Cross, 2012; Anderson *et al.*, 2002).

Étant donné l'importance de l'activité des charognards sur la vitesse de décomposition, il convient d'évaluer adéquatement leur impact. L'activité entomologique varie substantiellement en fonction de la
localisation géographique et des espèces animales présentes sur le territoire (O'Brien *et al.*, 2017). De plus, les populations de charognards invertébrés sont aussi influencées par la température. Des températures quotidiennes moyennes inférieures à 0 °C peuvent causer la mort de certaines larves d'insectes, provoquant un ralentissement de la décomposition (Campobasso *et al.*, 2001).

1.6 Estimation de l'intervalle post-mortem (IPM)

L'estimation du temps écoulé depuis la mort, aussi appelée intervalle post-mortem (IPM), est un des éléments déterminants dans les enquêtes policières impliquant la découverte d'un corps ou de restes humains non identifiés. L'estimation de l'IPM répond à un double objectif ; présenter une estimation du moment du décès aux enquêteurs et permettre de confirmer ou d'infirmer les alibis d'éventuels suspects (Madea et Henssge, 2015). Plusieurs méthodes ont été développées au cours des dernières années afin de déterminer l'IPM. Cependant, étant donnée l'influence de l'environnement sur la décomposition, chaque méthode doit être revue et modifiée pour s'appliquer à une région particulière. D'ailleurs, la méthode dite « universelle » élaborée par Vass (2011) s'est avérée non concluante lorsqu'appliquée à différents types d'environnement (Cockle et Bell, 2015; Marhoff-Beard *et al.*, 2018).

1.6.1 Méthodes thanatologiques d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM)

Dans les premières heures suivant le décès, l'utilisation des méthodes de thanatologie, réalisées par un médecin légiste, est priorisée lors de l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM). Ces méthodes se fondent sur l'examen visuel et somatique du cadavre, notamment *livor, rigor* et *algor mortis*. L'apparition et la disparition de ces phénomènes au cours du temps sont bien documentées dans la littérature et permettent d'estimer l'IPM. Cependant, plusieurs variables environnementales peuvent affecter l'apparition et la disparition de ces trois phénomènes, telles la température et la diversité microbienne (Janaway *et al.*, 2009).

Lorsque le cœur cesse de battre, la circulation sanguine est aussi arrêtée, entrainant la stagnation du sang dans les vaisseaux sanguins (Forbes, 2008). Le sang est drainé vers les régions inférieures du corps dû à la gravité (Janaway *et al.*, 2009; Simmons et Cross, 2012). À ce moment, un changement de couleur de la peau est observé alors que les surfaces supérieures du corps deviennent translucides et les sections inférieures deviennent violacées. La perte d'oxygène dans le sang (dissociation entre l'oxygène et l'hémoglobine des globules rouges) est responsable de ce changement de couleur alors qu'il passe du rouge au violet foncé; pigment caractéristique de la déoxyhémoglobine. (Clark *et al.*, 1997, Forbes, 2008).

14

Ces changements de couleur observés sur la peau sont nommés lividités cadavériques (*livor mortis*) (Janaway *et al.*, 2009, Forbes, 2008). Ce phénomène est observable une à deux heures après la mort. Cependant, la fixation de la lividité cadavérique se produit seulement de huit à douze heures après le décès (Di Maio et Di Maio, 2001). Le phénomène de fixation de la lividité est engendré par le refroidissement du corps solidifiant des gras contenus dans le derme entourant les vaisseaux sanguins et donc la coagulation du sang dans les vaisseaux (Clark *et al.*, 1997). De ce fait, les *livor mortis* sont un indicateur, parmi d'autres, de l'IPM. Suivant la fixation, le sang stagne à l'endroit où il a été fixé, et ce même lorsque le corps est bougé. La localisation des lividités sur le corps peut donc aussi aider à déterminer si le corps a été déplacé après la mort (Forbes, 2008; DiMaio et DiMaio, 2001).

La rigidité cadavérique, aussi appelée *rigor* mortis, est un second changement visuel généralement observé 2 à 3 heures suivant le décès (Forbes, 2008). À ce moment, les muscles et les articulations se rigidifient et deviennent immobiles dû à la gélification du cytoplasme engendré par l'augmentation de l'acidité du corps (Vass, 2001). La détérioration de l'adénosine triphosphate (ATP) et la formation d'acide lactique dans les tissus musculaires sont les principaux responsables de ce phénomène (Janway *et al.*, 2009). La rigidité cadavérique est observable dans tout le corps dans les 12 premières heures suivant le décès jusqu'à 24 à 48h (Janway *et al.*, 2009; Forbes, 2008; Di Maio et Di Maio, 2001). L'apparition et la disparition de la rigidité cadavérique peuvent toutefois varier selon différents facteurs environnementaux. À des températures plus froides par exemple, la *rigor mortis* est accélérée et peut être prolongée alors que les températures plus chaudes retardent son apparition (Gill-King, 1997). Il faut donc prendre en compte ces différents facteurs pour s'appuyer sur la *rigor mortis* aux fins d'évaluation de l'intervalle post mortem (Forbes, 2008).

Le troisième phénomène utilisé en thanatologie est celui le plus couramment utilisé pour estimer l'intervalle post mortem (IPM). Il s'agit du principe de refroidissement du corps après la mort appelé *algor mortis*. La température moyenne d'un corps est d'environ 37,0 °C (DiMiao et DiMiao, 2001). Après la mort, la température corporelle d'un individu s'abaisse graduellement jusqu'à atteindre la température ambiante (Forbes, 2008; Simmons et Cross, 2012). Bien que ce phénomène dépende également des conditions environnementales, il est estimé qu'un corps de taille moyenne refroidira à une vitesse de 0,8 °C par heure dans un climat tempéré (entre 20 et 25 °C) (Janway *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2019; Dix et Graham, 1999).

15

1.6.2 Méthodes anthropologiques d'évaluation de la décomposition

Afin d'offrir une méthode quantitative, plutôt que qualitative, d'estimation de l'intervalle post-mortem (IPM), Megyesi *et al.* (2005) ont développé une approche fondée sur l'utilisation des températures quotidiennes moyennes couplée à une version modifiée du système de pointage initialement développé par Galloway *et al.* (1989). Il s'agit respectivement de l'utilisation des « accumulated-degree-days » (ADD) et du « total body score » (TBS).

Les ADD proviennent originalement de la biologie végétale et ont été adaptés à l'étude de la décomposition humaine par Vass *et al.* (1992). Ils représentent les unités d'énergie thermique disponibles pour engendrer les réactions biologiques comme la croissance bactérienne et larvaire (Megyesi *et al.*, 2005). Bien qu'il n'y ait pas de consensus clair au niveau de la température à laquelle les processus biologiques et donc la décomposition sont inhibés (Vass *et al.*, 1992; Micozzi, 1991), la température minimale considérée dans le calcul des ADD est de 0 °C. Celle-ci est considérée comme étant la température de base, soit celle à laquelle les processus biologiques sont arrêtés. Pour déterminer la valeur de ADD d'un corps, il convient d'additionner les valeurs de températures quotidiennes moyennes à partir du décès jusqu'à la découverte du corps, de manière rétrospective. Toutes les valeurs inférieures à zéro doivent être considérées comme étant zéro (Megyesi *et al.*, 2005).

Le TBS est une méthode de pointage de la décomposition globale d'un corps à partir d'observations visuelles. Le pointage est réalisé selon trois régions anatomiques distinctes pour tenter de prendre en compte les différences de modes et de vitesses de décomposition selon la région considérée. Les régions anatomiques sont les suivantes : la tête et le cou incluant les vertèbres cervicales, le tronc y compris le thorax, la ceinture pectorale, l'abdomen et le bassin et enfin les membres incluant les mains et les pieds. Un nombre de points est attribué à chacune des régions en fonction des changements visuels observés produisant ainsi trois « body scores ». La somme de ceux-ci est ensuite calculée pour obtenir le TBS. Des tableaux ont été mis sur pied pour chaque région anatomique afin d'associer une valeur de pointage aux observations visuelles effectuées (Megyesi *et al.*, 2005).

Afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM) à l'aide de la valeur du TBS calculée, la formule mathématique suivante a été élaborée par Megyesi *et al.* (2005):

$$ADD = 10^{(0,002*TBS*TBS+1.81)} \pm 388.16$$

Grâce au TBS, il est possible de déterminer la valeur de l'ADD. Il suffit par la suite d'obtenir les valeurs de températures quotidiennes moyennes des jours/semaines précédant la découverte du corps et d'additionner les valeurs en commençant par la journée de la découverte jusqu'à égaliser la valeur de ADD obtenue (Megyesi *et al.*, 2005).

L'utilisation de l'ADD, bien que controversée dans la littérature scientifique (Marhoff-Beard *et al.*, 2018), est commune à plusieurs études surtout dans le développement de nouvelles méthodes d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM).

1.6.3 Entomologie forensique

L'entomologie forensique est l'une des méthodes d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) les plus utilisées lorsque les méthodes de thanatologie ne sont plus applicables soit environ 72 h après le décès (Vass *et al.*, 2002). Cette branche des sciences forensiques peut être définie comme la collecte et l'analyse de différentes informations biologiques provenant des insectes retrouvés sur un cadavre afin d'aider les enquêtes policières (Gennard, 2012, chap. 1; Amendt *et al.*, 2011; Erzinçlioglu, 2003). Il existe deux méthodes généralement utilisées afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM) à l'aide des insectes (Catts et Goff, 1992; Gennard, 2012; Amendt *et al.*, 2011; Erzinçlioglu, 2003; Amendt, 2018; Amendt *et al.*, 2004).

Une première méthode d'estimation de l'IPM se fonde sur le calcul de l'âge des larves colonisant le corps permettant de déterminer le temps minimum depuis le décès (MTD) (Amendt *et al.*, 2011; Erzinçlioglu, 2003). Généralement, les insectes nécrophages sont rapidement attirés par un corps frais. Les premiers arrivés sont normalement les mouches (Diptera), plus précisément les Caliliphoridea qui viennent pondre leurs œufs (Amendt *et al.*, 2011; Catts et Goff, 1992; Amendt *et al.*, 2004). En estimant l'âge de l'insecte le plus âgé se développant sur le corps au moment de sa découverte, il est possible de calculer le moment approximatif de la colonisation du corps (première ponte d'œufs) et, donc le moment du décès. Cette estimation permet d'obtenir un intervalle post mortem minimal (IPM_{min}). Il est important de noter qu'il ne s'agit pas nécessairement du réel temps depuis la mort (Amendt *et al.*, 2011; Amendt *et al.*, 2004). Un autre facteur important à prendre en considération avec cette technique d'estimation de l'intervalle post mortem est la température. Il est primordial de reconstituer les températures moyennes sur la scène de crime avant la découverte du corps (Amendt *et al.*, 2011; Erzinçliogle, 2003). De plus, il est aussi important d'identifier adéquatement les espèces retrouvées sur un corps puisque leur rythme de

17

développement peut grandement varier (Anderson et Cervenka, 2002; Amendt *et al.*, 2011). Cette méthode d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) peut donc être influencée par une multitude de facteurs.

Une autre méthode consiste en l'analyse de l'ensemble des insectes sur un corps lors de sa découverte en se fondant sur la succession des insectes au cours du temps. Différents types d'insectes sont attirés par un cadavre à différents moments lors de la décomposition (Amendt et al., 2011; Erzinçliogle, 2003). Certains insectes vont coloniser le corps afin de se nourrir des tissus alors que d'autres seront attirés par les insectes sur le corps à titre de prédateur produisant ainsi ce qu'on appelle la succession d'insectes (Amendt et al., 2011; Catts et Goff, 1992; Amendt et al., 2004). Cette méthode permet d'obtenir un intervalle post-mortem minimal (IPM_{min}) et non la date exacte du décès. Les limitations de cette approche doivent toutefois être mentionnées. La première est l'impact majeur de l'environnement sur la succession des insectes. Chaque environnement présente des insectes différents et l'ordre d'arrivée des insectes voire le type d'insectes peut varier d'un endroit à un autre. Il est donc capital d'avoir une connaissance précise des données entomologiques propres à l'environnement considéré, dans le cadre d'une enquête criminelle. D'autres paramètres tels que la manière dont le corps a été disposé (enterré ou non, intérieur vs extérieur), la période de l'année, etc. exercent aussi une influence importante sur les espèces colonisant un corps (Amendt et al., 2011; Gennard, 2012). Cette méthode d'estimation de l'IPM doit donc être utilisée avec précaution et de manière combinée à d'autres approches, telles que l'anthropologie forensique, la microbiologie et la chimie.

1.7 La taphonomie humaine au Canada : état des connaissances

Le processus de décomposition d'un corps dans le climat froid canadien n'est pas bien compris (Cockle et Bell, 2017). La majorité des études disponibles dans la littérature ont été menées dans des environnements où le climat est beaucoup plus chaud qu'au Canada (p. ex. Tennessee aux É.-U. et New South Wales en Australie). Il y a actuellement 12 sites de recherche sur la décomposition humaine dans le monde. Parmi ceux-ci, neuf se trouve aux États-Unis, un en Australie, un aux Pays-Bas et un au Canada. Ce dernier est situé au Québec dans la région administrative du Centre-du-Québec. Ce site, le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]), a ouvert en août 2020. Il s'agit du premier à permettre la recherche sur la décomposition de corps humains au Canada, mais aussi dans un climat froid et tempéré (Pecsi *et al.*, 2020). Ce site vise à pallier les lacunes dans l'état des connaissances actuelles sur les études menées dans ce type d'environnement.

Des études rétrospectives de cas à partir de photos de corps et/ou de rapports d'autopsie ont été réalisées dans les dernières années afin d'évaluer la décomposition humaine au Canada. L'une des premières études de ce genre a été menée par Komar (1998) où 20 cas ont été analysés. Cependant, cette étude comporte un certain nombre de limites. Tout d'abord, 18 des 20 cas inclus dans l'étude ont été retrouvés dans l'eau, ce qui porte à réfléchir sur la pertinence des résultats de l'étude concernant des scénarios terrestres. D'autres études rétrospectives ont été réalisées par la suite en se concentrant exclusivement sur la décomposition en milieu aquatique (Hobischak et Anderson 1999; Petrik et al. 2004). Récemment, Cockle (2013) et Cockle et Bell (2015, 2017) ont publié des études rétrospectives de scènes de crime dans plusieurs endroits au Canada pour tenter de mieux appréhender la décomposition terrestre du pays. Dans l'ensemble, ces études ont permis de démontrer le manque flagrant de connaissance dans le domaine en plus de mettre en lumière des différences importantes entre la décomposition de corps humains au Canada et celle rapportée dans des climats différents. Par exemple, le début de la putréfaction serait retardé en comparaison à d'autres régions du monde étudiées (Cockle, 2013; Cockle et Bell, 2017). De plus, Cockle et Bell (2015) ont estimés que les techniques dites « universelles » ne s'appliqueraient pas au climat canadien et ont démontrés que des méthodes régionales d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) devaient être développées afin de tenir compte des variations environnementales et climatiques des différentes régions au sein du Canada.

Plusieurs études sur des modèles animaux non humains, notamment des cochons (*Sus scrofa domesticus*), ont en revanche été réalisées. La majorité de ces études ont cependant trait à l'entomologie forensique plutôt qu'à l'étude des tissus humains (Cockle, 2013). À ce jour, une seule étude sur la dégradation des lipides a été conduite au Canada. Comstock (2014) a analysé la présence d'acide gras dans les tissus et les fluides produits lors de la décomposition de carcasses de cochon en présence et absence d'insectes. Aucun acide gras pertinent n'a été identifié dans cette étude comme pouvant constituer un indicateur de l'IPM. Des études expérimentales avec des corps humains ont été recommandées pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus (Comstock, 2014). De plus, l'utilisation de cochons comme analogue aux humains est de plus en plus critiquée. Les carcasses de cochons se décomposent de manière différente aux corps humains dans un même environnement en raison des variations entre les bactéries gastro-intestinales et les charognards (Dautartas *et al.*, 2018; Connor *et al.*, 2018).

19

Les connaissances limitées sur la décomposition humaine au Canada soulignent la nécessité de développer des méthodes d'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) fiables et précises fondées sur des études utilisant des corps humains, c'est pourquoi la présente étude a été menée sur le site de REST[ES].

1.8 Buts et objectifs de l'étude

Afin de pallier les problématiques soulevées, cette étude sur la décomposition de corps humain a été mise sur pied. Le but principal de celle-ci est d'évaluer le potentiel des lipides en tant que biomarqueurs pour estimer l'intervalle post mortem (IPM) dans le climat continental froid avec un été tempéré du sud du Québec (Berteaux *et al.*, 2014). Ce but a permis de soulever les quatre questions de recherche suivantes :

- Quelle est l'influence du climat québécois sur la décomposition des tissus adipeux humains (p. ex. peau, muscles, gras)? (Chapitre 4)
- 2. Quelles sont les concentrations des acides gras saturés et insaturés retrouvées dans les tissus adipeux durant les différents stades de décomposition? (Chapitre 5)
- Existe-t-il une corrélation entre les concentrations mesurées et l'intervalle post-mortem (IPM)? (Chapitre 5)
- 4. Si une telle corrélation existe, quels sont les acides gras pouvant être utilisés à titre de biomarqueurs afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM)? (Chapitre 5)

Dans le but de répondre à ces questions, la décomposition de six donneurs a été étudiée sur le site de REST[ES]. Tout d'abord, l'évolution de la décomposition des donneurs et plus particulièrement des tissus mous a été évaluée par la prise de notes et de photographies de tous les changements visuels observés. Des échantillons de tissus mous (p. ex. peau, muscles, gras) ont aussi été collectés et subséquemment analysés en laboratoire en chromatographie gazeuse (« Gas chromatography » (GC)). Les concentrations en acides gras saturés et insaturés ont ainsi pu être mesurées. Enfin, des analyses statistiques ont permis de mettre en lumière la présence de corrélations entre les données recueillies en plus de permettre l'identification d'acides gras ayant un potentiel pour l'estimation de l'IPM.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

Ce projet de recherche est divisé en deux sections distinctes, soit les travaux réalisés sur le terrain afin d'étudier le processus de décomposition des corps humains (Sections 2.1 et 2.2), et ceux effectués en laboratoire pour l'analyse des tissus humains prélevés (Sections 2.3 à 2.5).

2.1 Travaux de terrain sur le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES])

Toutes les recherches sur des corps humains de ce projet ont été réalisées sur le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]) sur une période d'un an, soit d'août 2020 à août 2021, où six donneurs ont été étudiés. Ce projet a été approuvé par le sous-comité d'éthique du laboratoire d'enseignement et de recherche en anatomie (SCELERA) de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR) (Numéro de certificat : CER-09-148-06.05).

2.1.1 Aménagement du site REST[ES]

Le site de REST[ES] est situé dans le parc industriel et portuaire de Bécancour à Bécancour, Québec, Canada à environ 12 km du campus de l'UQTR. Le terrain sur lequel le site est situé est composé d'une jeune forêt tempérée mixte (30 à 50 ans) dominée par des érables et des épinettes blanches (Pecsi *et al.*, 2020). Le site est donc partiellement ombragé. Le sol a une texture sablo-limoneuse et présente une faible pente ($\leq 2 \%$). Le site, de 40 m x 40 m, est délimité par une clôture anti-escalade de 2 mètres de haut, équipée de fil de fer barbelé, d'une toile d'ombrage bloquant la vue ainsi que d'une clôture électrique (Figure 2.1). Cette installation permet de bloquer l'accès à tout individu non autorisé, mais aussi aux animaux de grande et moyenne taille qui pourraient être attirés par les corps comme les ours et les coyotes (Pecsi *et al.*, 2020).



Figure 2.1 Entrée sécurisée du site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]) et sa clôture électrique.

Une station météorologique HOBO équipée d'un enregistreur de données Hobo U30 No Remote Communication (OneTemp) est installée à l'intérieur du site afin d'enregistrer la température ambiante quotidienne (°C), les précipitations (mm) (pluie seulement), l'humidité relative (%), la radiation solaire (W/m²), la vitesse (m/s) et la direction du vent chaque heure. Seules la température et les précipitations ont été prises en considération pour la présente étude. Les valeurs de température ont été transformées en ADD (Section 1.6.1). L'utilisation des ADD est particulièrement utile afin de comparer la décomposition durant différentes saisons (Megyesi *et al.*, 2005; Michaud et Moreau, 2011).

2.1.2 Donneurs étudiés sur le site REST[ES]

Tous les donneurs ont d'abord été reçus au laboratoire d'anatomie de l'UQTR. La procédure de don de corps y est supervisée par le personnel du laboratoire. Suivant le décès d'un individu, celui-ci a rapidement été transporté au laboratoire d'anatomie où la prise de données et des tests sérologiques ont été réalisés. Durant cette période, les corps ont été conservés dans le réfrigérateur du laboratoire afin de limiter la décomposition. Les corps ont ensuite été transportés au site de REST[ES] par le salon funéraire mandaté par l'UQTR. Une fois arrivé sur le site, les corps ont immédiatement été positionnés sur le sol aux endroits désirés sur des parcelles de terrain de 3 m x 3 m. Tous les corps étudiés dans la présente étude étaient nus et déposés sur le dos. Seule une cage anti-charognards (Figure 2.2) a été placée par-dessus les corps dans

le but de préserver leur intégrité en empêchant l'accès, la consommation et l'éventuelle dispersion des membres ou restes osseux par les charognards (Pecsi *et al.*, 2020). Cette cage permet cependant aux insectes d'accéder aux corps pour ne pas interférer avec le processus naturel de décomposition dans lequel les insectes jouent un rôle majeur (Section 1.5.2).



Figure 2.2 Cage anti-charognards déposée sur un donneur pour éviter la perturbation de la décomposition par les charognards vertébrés.

Lors de chaque visite sur le site pour la collecte d'échantillons (Section 2.2), les changements visuels observés sur chaque donneur ont été compilés via la prise de notes et de photographies afin de suivre l'évolution de la décomposition au cours du temps. Ces observations incluent tout changement de couleur, le gonflement ou « dégonflement » du corps, la présence de ruptures post mortem de la peau et l'exposition d'ossements. La présence, le type et l'abondance des insectes ont aussi été compilés à chaque visite. Toutes autres informations pertinentes pouvant permettre de suivre l'évolution de la décomposition aux donneurs (décomposition différentielle). L'attribution des stades a été effectuée par un consensus d'au moins deux personnes pour chaque jour d'échantillonnage. Le tableau 2.1 présente les cinq stades de décomposition utilisés et leurs caractéristiques respectives qui ont été mis en place pour cette étude. Ces stades ont été développés en se basant sur la littérature scientifique (Payne, 1965; Gill-King, 1997; Clark *et al.*, 1997; Megyesi *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2007; Forbes, 2008; Janaway *et al.* 2009; Ribereau-Gayon, 2019) et ont été adaptés aux observations de terrain faites durant cette étude.

Tableau 2.1 Stades de décomposition et modifications taphonomiques leur étant associées, présentés par ordre chronologique selon leur ordre d'apparition observé sur les corps

Stades de décomposition	Modifications taphonomiques	Descriptions des modifications taphonomiques		
	Autolyse	Autodestruction des cellules par autodigestion enzymatique		
Frais	Livor mortis	Fixation du sang dans les vaisseaux sanguins		
	Rigor mortis	Rigidification des muscles et des articulations		
	Algor mortis	Refroidissement du corps après le décès		
Gonflé	Putréfaction	Dégradation des macromolécules du corps par l'action de bactéries anaérobies		
	« Marbling »	Coloration verte/noire des vaisseaux sanguins		
	Décoloration	Changement de couleur de la peau pouvant passer du vert au bleu/mauve		
	« Bloating »	Gonflement des tissus mous suivant l'accumulation de gaz internes		
	« Purging »	Relâchement de fluides corporels par les orifices naturelles (bouche, oreilles et anus)		
Actif	« Blistering » et « skin slippage »	Détachement des premières couches de peau (épiderme), sous forme de bulles d'abord (« blistering ») puis par « lambeaux » (« skin slippage »)		
	Activité entomologique*	Consommation des tissus mous par les insectes (larves et adultes)		
	Liquéfaction	Liquéfaction des organes internes et des tissus mous		

Stades de décomposition	Modifications taphonomiques	Descriptions des modifications taphonomiques		
	Assèchement	Tissus mous d'apparence sèche et déshydraté		
Dessiccation	Décoloration	Tissus de couleur allant de l'orange au brun/noir, semblable à du cuire		
	Momification	Déshydration complète des tissus mous qui engendre la préservation du corps		
	Exposition d'os	Partielle ou complète, selon la présence ou l'absence de tissus mous		
Squelettisation	Squelette articulé	Maintien des connexions anatomiques par les ligaments et tendons		
	Squelette désarticulé	Pertes des connexions anatomiques par dégradations des ligaments et tendons		

* L'activité entomologique n'est pas une modification taphonomique du corps, mais plutôt un indicateur du stade de décomposition « actif » à des températures supérieures au point de congélation. De plus, les insectes ont été inclus dans ce tableau puisqu'ils jouent un rôle moteur dans la décomposition.

Les corps de six donneurs ont été étudiés pour ce projet de recherche. Ils ont été placés sur le site de REST[ES] à différents moments : donneurs 1 et 2 à l'été 2020, donneurs 3 et 4 à l'automne 2020 et donneurs 5 et 6 au printemps 2021. Il est possible de diviser les six donneurs en trois catégories distinctes (été 2020, automne 2020 et printemps 2021) qui permettront d'évaluer l'influence de ces trois saisons sur la décomposition. Toutes les informations personnelles et médicales pertinentes pour chacun des donneurs sont présentées dans le tableau 2.2.

ldentifiant du donneur	Date du décès (jj/mm/aaaa)	Date d'arrivée du corps sur le site de RESTES (jj/mm/aaaa)	Âge (ans)	Sexe	Poids (kg)	Taille (m)	Indice de masse corporel (IMC)	Cause du décès
1	05/08/2020	10/08/2020	55	м	68	1,72	22,9	Asphyxie par pendaison
2	07/08/2020	10/08/2020	71	М	70	1,73	23,3	Cirrhose hépatique, insuffisance rénale anurique
3	27/09/2020	28/09/2020	69	F	54	1,65	19,8	Syndrome parkinsonien
4	04/10/2020	05/10/2020	79	F	79,4	1,52	34,1	STEMI inférieure [infarctus aigu du myocarde inférieur avec élévation du segment ST], Démence vasculaire, Multiples AVC [accident vasculaire cérébral], MCAS [maladie coronarienne athérosclérosante]
5	10/05/2021	11/05/2021	77	М	79,5	1,77	25,2	Mélanome métastatique de stade IV pulmonaire, cérébral, osseux, musculaire, surrénal et hépatique
6	21/06/2021	23/06/2021	91	М	80	1,70	27,6	Cancer métastatique du poumon et de la prostate

Tableau 2.2 Informations personnelles relatives aux six donneurs étudiés

2.2 Échantillonnage des tissus mous des donneurs

Deux régions anatomiques ont été ciblées pour ce projet, soit l'abdomen (A) et les cuisses (C). Cela a pour but d'évaluer l'impact de ces régions sur la distribution des acides gras contenus dans le corps. Celles-ci ont été choisies pour comparer le haut et le bas du corps et pour leur importante abondance de tissus mous. De plus, pour chacune des régions, des prélèvements à gauche et à droite du corps ont été effectués (droite et gauche de l'abdomen et cuisse droite et gauche) pour un total de quatre échantillons par donneur (Figure 2.3) par jour d'échantillonnage.



Figure 2.3 Schéma présentant les différentes zones de collecte de tissus mous; AD) abdomen droit; AG) abdomen gauche; CD) cuisse droite et CG) cuisse gauche.

Pour l'échantillonnage des cuisses, les prélèvements de tissus mous ont été réalisés à l'extérieur des cuisses (antérolatéral) pour les donneurs 1, 2, 4 et 5. Seuls les donneurs 3 et 6 ont dû être échantillonnés à l'intérieur des cuisses (antéromédial) en raison de la position de leurs jambes qui ne permettaient pas la collecte d'échantillon sur l'extérieur des cuisses.

L'échantillonnage des tissus mous pertinents pour la présente étude, soit le gras et les muscles, a été réalisé à l'aide d'une aiguille de biopsie. Pour ce faire, un instrument Bard[®] Magnum[®] (Bard Care, Baltimore, É.-U.) muni d'aiguilles jetables Bard[®] Magnum[®] (14 g x 10 cm) (Bard Care, Baltimore, É.-U.) a été utilisé. Il s'agit d'une méthode peu invasive qui permet le prélèvement d'une quantité adéquate de tissus mous (~ 25 mg) pour leur analyse ultérieure en laboratoire (Sections 2.3 et 2.4). Cette méthode permet de limiter au maximum les dommages engendrés au corps susceptibles de perturber la décomposition. L'utilisation d'une aiguille de biopsie permet aussi de collecter des échantillons à différentes profondeurs et dans plusieurs directions permettant l'accès aux tissus ciblés qui varie en

fonction des donneurs et de la région anatomique échantillonnée. Par exemple, lorsque la couche de gras sous-cutané est plus épaisse (p. ex. personne obèse), il est tout de même possible d'obtenir une certaine quantité de muscle en effectuant un prélèvement plus profond avec l'aiguille. De plus, l'épaisseur des couches de gras peut varier au cours de la décomposition due à la liquéfaction des tissus mous. L'aiguille de biopsie permet donc de pallier ces variations inter- et intra-individuelles et d'obtenir des échantillons contenant tous les tissus mous pertinents pour l'étude.

Avant le premier échantillonnage, une incision ~ 1 cm a été réalisée sur la surface de la peau du donneur (épiderme et derme) à l'aide d'un scalpel. L'aiguille de biopsie a ensuite été insérée jusqu'aux tissus adipeux (hypoderme) et muscles en vue d'effectuer les prélèvements. Afin de s'assurer de la représentativité de l'échantillon, un total de trois prélèvements consécutifs a été réalisé pour chaque incision et mis dans un vial dument identifié. Par la suite, l'aiguille de biopsie a été nettoyée avec de l'acétone entre chaque région anatomique. Des aiguilles différentes ont été utilisées pour chaque donneur afin de limiter le risque de contaminations croisées. Les échantillonnages ultérieurs ont été effectués dans la même incision lorsque possible. Dans les cas où cette dernière n'était plus utilisable (p.ex. décomposition trop avancée dans la région étudiée), une nouvelle incision a été réalisée dans un rayon de moins de 5 cm de la première.

Des échantillons ont été collectés quotidiennement pour tous les donneurs du jour 0 au jour 14. Des échantillons ont ensuite été prélevés tous les deux jours pour les deux semaines suivantes (jours 15 à 28). Par la suite, selon l'évolution de la décomposition, la fréquence des prélèvements a été diminuée à une fois par semaine ou toutes les deux semaines, en fonction de la quantité restante de tissus mous. Les derniers échantillonnages ont été réalisés jusqu'à ce qu'il ne reste plus de tissus mous. Pour les donneurs 1, 2, 3, 4 et 6, ces prélèvements ont respectivement été réalisés aux jours 70, 70, 282, 324 et 63, suivant leur arrivée sur le site. Pour les donneurs 3 et 4, des échantillons ont été collectés à l'automne 2020 et au printemps 2021. Les corps ont passé l'hiver sous la neige, sans intervention humaine, afin d'observer l'évolution de la décomposition durant cette saison. Pour le donneur 3, le dernier prélèvement pour l'automne 2020 a eu lieu au jour 50 suivant son arrivée sur le site REST[ES]. Le premier prélèvement au printemps a, quant à lui, eu lieu au jour 226. Pour le donneur 4, cela correspondait aux jours 43 et 219 respectivement. Enfin, pour le donneur 5, les derniers échantillons pour les deux régions anatomiques n'ont pas été effectués au même moment, soit au jour 78 pour l'abdomen et 106 pour les cuisses en raison de la décomposition plus rapide de l'abdomen de ce donneur.

28

2.3 Préparation des échantillons en laboratoire

Les échantillons de tissus mous collectés sur le site de REST[ES] ont été apportés au laboratoire de la Chaire de recherche du Canada 150 en thanatologie forensique de l'UQTR et conservés dans un congélateur à – 18 °C dans des vials en verre. Les échantillons ont par la suite été lyophilisés moins de deux semaines après leur collecte. La lyophilisation permet d'éliminer l'eau contenue dans les tissus mous par sublimation et ainsi ralentir la poursuite de la décomposition (Shoffner et Brittingham, 2013). Pour ce faire, les échantillons ont été mis dans l'azote liquide pendant 10 secondes. Par la suite, ils ont été installés sur un lyophilisateur Labcono FreeZone 4.5 (Labcono, Kansas City, É.-U.) à une pression de 0,120 mbar et une température de – 55 °C pendant 48 h. Une fois lyophilisés, les échantillons ont été conservés au réfrigérateur (4 °C) jusqu'à leur analyse par chromatographie gazeuse (GC).

Avant d'être injectés dans un chromatographe en phase gazeuse (GC), les échantillons ont subi un processus de dérivatisation des acides gras. Le protocole appliqué présente quelques modifications par rapport à celui proposé par Luong *et al.* (2017). Tout d'abord, pour chaque échantillon, 6 mg de tissus mous préalablement lyophilisés ont été ajoutés à 2 mL de *n*-hexane de grade HPLC (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) (solution mère). L'échantillon a ensuite été plongé dans un bain ultrason pendant 20 minutes. Cette solution a été analysée en triplicata. Pour chaque répliqua, 500 µL de la solution mère ont été filtrés à travers un filtre de seringue en PTFE de 0,2 µm (Thermo Fisher Scientific, Walthman, É.-U.) et ajoutés dans un vial de GC. À ce filtrat a été ajouté un standard interne, soit 0,25 mL d'une solution de 100 ppm de cholestérol-d₇ (Avanti Polar Lipids, Birmingham, É.-U.) préparé dans le *n*-hexane. Cette solution fille a ensuite été séchée à 40 °C sous un faible jet d'azote pendant environ 10 minutes. Une fois sec, l'échantillon a été reconstitué dans 40 µL de l'agent de silylation BSTFA+ 1% TMCS (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) et 10 µL d'acétonitrile de grade HPLC (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). La solution a été passée au vortex pour assurer un mélange adéquat et chauffé pendant 30 minutes à 100 °C dans un vial bouché pour compléter la dérivatisation. Une fois refroidi, l'échantillon a été transféré dans un insert de vial GC et analysé en chromatographie gazeuse (GC).

La dérivatisation chimique est une réaction essentielle de cette méthode d'analyse. Elle permet de modifier les caractéristiques chimiques des acides gras à l'aide d'un agent actif. Il est alors possible d'analyser les composés d'intérêt par chromatographie gazeuse. La dérivatisation des acides gras permet, entre autres, d'augmenter leur volatilité, en limitant les interactions dipôle-dipôle, d'augmenter leur stabilité thermique et de diminuer leur réactivité en les rendant moins polaires. De plus, la dérivatisation

29

chimique permet d'améliorer considérablement la forme des pics chromatographiques permettant l'obtention d'une meilleure résolution dans les chromatogrammes (Michel, 2010; Sigma-Aldrich Co., 1997). L'utilisation du BSTFA + 1% TMCS dans cette méthode permet de silyler les acides gras (RCOOH) afin de former les esters triméthylsilylés (RCOOTMS) correspondants (Figure 2.4).



Figure 2.4 Équation de la dérivatisation des acides gras en leur esters triméthylsilylés.

Lors de la silylation, l'hydrogène actif des acides gras (-COO<u>H</u>) est remplacé par un groupement silylé (- COOSiMe₃) via une attaque nucléophile bimoléculaire (S_N2) (Michel, 2010). La dérivatisation sera complète si la basicité du groupement partant du composé silylé (X⁻) est plus faible que celle du groupement entrant (-COO⁻). Le groupement partant doit aussi être en mesure de stabiliser une charge négative dans l'état de transition et n'avoir peu ou pas tendance à faire des liaisons π avec l'atome de silicium. L'ajout de TMCS agit comme catalyseur en permettant d'augmenter la réactivité du BSTFA. Enfin, l'ajout d'une faible quantité d'acétonitrile permet de faciliter la réaction (Sigma-Aldrich Co., 1997).

Des standards d'acides gras ont aussi été utilisés d'abord dans le but de développer une méthode de détection et d'identification des acides gras par chromatographie gazeuse en tandem couplé à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS) et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les standards d'acides gras ont ensuite permis de réaliser des courbes d'étalonnage permettant la quantification des acides gras dans les échantillons collectés sur le site de REST[ES]. La méthode de dérivatisation présentée ci-dessus a aussi été utilisée pour toutes les analyses effectuées avec ces standards. Les acides gras standards suivants ont été utilisés : l'acide laurique, l'acide palmitoléique (Acros Organics, New Jersey, É.-U.), l'acide myristoléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide arachidique (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) et l'acide myristique (TCI America, Portland, É.-U.).

2.4 Analyse par chromatographie gazeuse (GC)

Des analyses en chromatographie gazeuse (GC) ont été réalisées afin d'étudier les acides gras pertinents de cette étude. Deux chromatographes gazeux différents ont été utilisés et une méthode de séparation et d'identification des acides gras a été développée avec chacun d'eux (Section 3.2.1).

Le premier appareil utilisé est un chromatographe gazeux en tandem couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS) alors que le second est un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse (GC-MS). Le principe général de ces deux appareils est le même soit la séparation de composés volatils ou semi-volatils constituant un échantillon (liquide ou gazeux) (Niessen, 2001). Pour ce faire, les composés sont d'abord vaporisés dans la chambre de vaporisation du port d'injection de l'appareil avant d'entrer dans la colonne chromatographique. Un gaz porteur (usuellement l'hélium), faisant office de phase mobile, permet l'élution (c.-à-d. le transport) des composés à travers la colonne. Il s'agit généralement d'une colonne capillaire dont un mince film de liquide (quelques dixièmes de micromètres d'épais) tapisse les parois. Il s'agit de la phase stationnaire. Celle-ci permet la séparation des composés grâce à leur interaction avec les constituants de la phase stationnaire contenue dans la colonne capillaire (Skoog et al., 2013). Plus les affinités entre un analyte et la phase stationnaire sont grandes, plus l'analyte est retenu dans la colonne. Ces différences d'affinité permettent ainsi de séparer les constituants d'un échantillon. Chaque composé a un temps de rétention (t_R) qui lui est propre en fonction du type de colonne utilisé et des paramètres instrumentaux (température du four, débit du gaz porteur, etc.) (Niessen, 2001). Chaque composé est ensuite introduit dans un détecteur, généralement un spectromètre de masse (MS). En résultante, une représentation graphique constituée de plusieurs pics, aussi appelée chromatogramme, est obtenue. L'intensité de chaque pic est représentative de la concentration du soluté en fonction du temps d'élution de chaque constituant de l'échantillon initial (Skoog et al., 2013). En combinant la chromatographie gazeuse (GC) à la spectrométrie de masse (MS) (Figure 2.5), les constituants d'un échantillon, préalablement séparés en GC, seront subséquemment analysés en MS où ils seront ionisés dans la source d'ionisation puis séparés par des analyseurs. Le spectre de masse de chaque analyte sera alors obtenu et ceux-ci pourront ainsi être adéquatement identifiés notamment grâce à la mesure de leur rapport masse sur charge (m/z) (Niessen, 2001).



Figure 2.5 Schéma simplifié d'un chromatographe gazeux couplé à un spectromètre de masse (GC-MS).

La principale différence rencontrée dans le fonctionnement d'un GC x GC-TOF-MS est la présence d'une seconde colonne capillaire avant l'entrée des analytes dans le MS (chromatographie gazeuse bidimensionnelle). Les deux colonnes utilisées ont des phases stationnaires (polarité) différentes et séparent les constituants d'un échantillon de manière indépendante (séparation orthogonale) (Skoog *et al.*, 2013). Un modulateur de température ou de débit est retrouvé à la sortie de la première colonne afin de contrôler le débit des analytes entrant dans la seconde colonne. La température du modulateur peut être ajustée tout comme celle du four secondaire dans lequel se trouve la deuxième colonne. Une fois sorties de la colonne secondaire, les analytes peuvent être introduits dans le spectromètre de masse (Figure 2.6). Le chromatogramme résultant est quant à lui représenté en trois dimensions considérant que chaque constituant d'un échantillon a un temps de rétention pour chaque colonne (dimension 1 et 2) (Liu et Phillips, 1991). L'avantage principal de la chromatographie gazeuse bidimensionnelle (GC x GC) est la séparation de composés qui co-éluent (pics superposés) en chromatographie gazeuse à une dimension (GC) (Patrushev, 2015).

Une autre différence importante rencontrée pour le GC x GC-TOF-MS est le type d'analyseur de cet appareil. Les spectromètres de masse d'un GC-MS sont généralement munis d'un analyseur à balayage, soit le quadripôle. Il est constitué de quatre électrodes cylindriques qui créent un champ quadripolaire linéaire de radiofréquences. Ce champ permet de séparer les ions en fonction de la stabilité de leur trajectoire qui est directement liée à leur rapport m/z. Dans le cas d'un GC x GC-TOF-MS, un analyseur à temps de vol (TOF) est plutôt utilisé. Un faisceau ionique pulsé entre dans l'analyseur et les ions sont séparés en fonction du temps requis pour que ceux-ci parcourent une distance fixe jusqu'au détecteur. Puisque les ions entrent dans l'analyseur ont la même énergie cinétique ($E=1/2mv^2$), le temps de vol de ces derniers est inversement proportionnel à leur masse (Skoog *et al.*, 2013). Les TOF-MS ont pour avantages d'être simples et robustes, d'avoir une gamme de masse quasi illimitée et d'offrir une vitesse de balayage très rapide. Ces caractéristiques permettent ainsi de mesurer un plus grand domaine de masse par unité de temps, ce qui est particulièrement important en GC × GC, car le modulateur produit des pics étroits en grande quantité et le détecteur doit être efficace pour balayer ces pics à une vitesse adéquate. Pour ces raisons, le GC × GC-TOF-MS est souvent utilisé pour surmonter les limites d'un GC-MS pour l'analyse d'échantillons complexes contenant une large gamme dynamique de composés (Skoog *et al.*, 2013; Brais *et al.*, 2021).







2.4.1 GC x GC-TOF-MS

Une première méthode d'analyse des acides gras a été développée à l'aide d'un chromatographe gazeux en tandem couplé à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS) Pegasus[®] BT 4D (LECO, Mississauga, Canada) avec modulateur thermique muni d'un système d'injection automatique Agilent Technologies (Santa Clara, É.-U.). Les colonnes capillaires Rxi-624Sil MS (30 m x 0,25 mm x 1,4 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.) et Stabilwax (2 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek, Bellefonte, É.-U.) ont été utilisées pour la première et seconde dimension, respectivement. La première a une polarité moyenne alors que la seconde à une polarité élevée. L'appareil employé possède aussi une source d'ionisation par impact électronique (EI) et un analyseur à temps de vol. Les paramètres utilisés pour les analyses sont présentés dans le tableau 2.3. La rampe de température optimisée est présentée à la section 3.1.2. Tableau 2.3 Paramètres et conditions expérimentales utilisés pour l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS)

	Paramètres	Conditions
	Volume d'injection	5,0 μL
Injecteur	Type d'injection	Split
injectedi	Ratio du « split »	50
	Débit du « split »	50 mL/min
	Gaz porteur	Hélium
	Débit	1,00 mL/min
	Temps dans la seconde dimension	3 s
	Durée de la pulsation chaude	1,20 s
	Durée de la pulsation froide	0,30 s
GC X GC	Température initiale du four primaire	250 °C
	Rampe de température du four primaire	Voir section 3.1.2
	« Offset » de température du four secondaire	+ 5 °C
	« Offset » de température du modulateur	+ 15 °C
	Température de la ligne de transfert	260 °C
	Énergie d'ionisation	70,0 eV
TOF-MS	Vitesse d'acquisition	200 spectres/s
	Gamme de masses	30 à 550 m/z
	Délai de solvant	120 s

2.4.2 GC-MS

Le second chromatographe utilisé est un chromatographe gazeux Agilent 6890N GC (Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.) couplé à un spectromètre de masse 5973 inert MSD (Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.) munit d'un injecteur automatique Agilent 7683B Series (Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.). Une colonne capillaire DB-5ms Ultra Inert (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, É.-U.) a été utilisée. Le spectromètre de masse utilisé possède une source d'ionisation par impact électronique (EI) et un analyseur quadripolaire. Les paramètres d'analyse sont présentés dans le tableau 2.4. La rampe de températures optimisée est présentée à la section 3.1.2.

Tableau 2.4 Paramètres et conditions expérimentales utilisés pour l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

	Paramètres	Conditions
	Volume d'injection	1,0 μL
Injecteur	Type d'injection	Splitless
	Température d'injection	300 °C
	Gaz porteur	Hélium
GC	Débit	1,2 mL/min
	Température initiale du four	155 °C
	Rampe de températures du four	Voir section 3.1.2
	Énergie d'ionisation	70,0 eV
NAC	Mode acquisition	Scan
1015	Gamme de masses	50 à 800 m/z
	Délai de solvant	6 min

2.5 Traitements des résultats

Les valeurs de ADD ont été calculées à l'aide d'un tableur Excel (version 16.59, Microsoft[®] Excel) en additionnant les températures quotidiennes moyennes (°C) (obetenues à l'aide des mesures prises par la station météorologique HOBO) en commençant au jour expérimental zéro (JE 0). Toutes les températures inférieures ou égales à 0 °C ont été considérées comme étant zéro.

Pour le GC x GC-TOF-MS, le logiciel ChromaTOF[®] (version 5.51.6.0; LECO) a été utilisé pour le traitement des chromatogrammes (aire des pics) et l'analyse des spectres de masse. La bibliothèque de spectres de masse du National Institute of Standards and Technology (NIST) a été utilisée pour comparer les spectres de masse des composés à des spectres de masse de référence avec un seuil de similarité de 80 %. L'utilisation de standard d'acide gras a aussi permis de déterminer leurs temps de rétention (t_R) à titre de référence avec la méthode développée.

Pour le GC-MS, le logiciel MSD ChemStation (version D.02.00.275, Agilent Technologies) a été utilisé pour le traitement des chromatogrammes (aires des pics) et l'analyse des spectres de masse. La bibliothèque de spectres de masse du National Institute of Standards and Technology (NIST) a été utilisée pour comparer les spectres de masse des composés à des spectres de masse de référence avec un seuil de similarité de 80 %. L'utilisation de standard d'acide gras a aussi permis de déterminer leur temps de rétention (t_R) à titre de référence avec la méthode développée.

Un tableur Excel a aussi été utilisé afin de tracer les courbes de calibration des neuf acides gras pertinents pour cette étude. Pour ce faire, l'aire du pic d'intérêt d'un chromatogramme a été divisée par l'aire du pic du standard interne. Les courbes d'étalonnage représentent les ratios des aires des pics en fonction des concentrations. Les équations des droites (y = ax + b) obtenues à la suite de la création de ces courbes d'étalonnage ont permis de déterminer les concentrations des échantillons inconnus. Le ratio de l'aire d'un pic d'intérêt sur l'aire du standard interne permet d'obtenir la concentration de l'acide gras contenue dans l'échantillon par l'isolation de la variable x. Les concentrations moyennes des triplicata réalisés ont ensuite été calculées à l'aide de la fonction MOYENNE dans Microsoft Excel. Le logiciel Excel a aussi permis de réaliser les graphiques de températures moyennes et de précipitations, de durée des stades de décomposition et de variation des concentrations des acides gras dans le temps.

Le logiciel RStudio (version 4.1.1, RStudio) a permis de réaliser la majorité des analyses statistiques. Des graphiques d'interactions ont permis l'analyse préliminaire des acides gras afin de détecter toute différence entre les quatre régions échantillonnées sur un même donneur. Le même type de graphiques a par la suite été appliqué afin de détecter la présence de variations inter-individuelles (entre les donneurs) et intra-individuelles (entre les régions anatomiques d'un même donneur). Le test de normalité Shapiro-Wilk et le test d'homogénéité de variance de Levene ont aussi été effectués à l'aide de l'environnement R. Ces tests ont permis de choisir les types d'analyse de la variance (ANOVA) les mieux adaptés aux différents jeux de données. Une ANOVA classique à deux facteurs a d'abord été effectuée pour déterminer s'il y avait une différence significative des concentrations en acides gras entre les quatre régions échantillonnées sur un même donneur. Une ANOVA classique à deux facteurs avec correction de type III et une ANOVA robuste à deux facteurs ont ensuite été réalisées à l'aide du logiciel RStudio. Celles-ci ont permis de déterminer s'il y avait des différences significatives des concentrations des acides gras entre les six donneurs et les deux régions anatomiques étudiés. Des tests post-hoc ont été effectués afin de détecter si certaines paires de donneurs présentaient des différences statistiquement significatives entre leurs moyennes de concentrations des acides gras. Enfin, des analyses en composantes principales (PCA) ont été réalisées pour étudier les groupements et les séparations sous-jacents dans les jeux de données. Pour ce faire, le logiciel Unscrambler (version 11.0, CAMO Analytics) a été utilisé.

CHAPITRE 3

OPTIMISATION ET VALIDATION DE LA MÉTHODE

Afin d'analyser les tissus mous collectés sur le site de RESTES, le protocole de dérivatisation des acides gras proposé par Luong *et al.* (2017) a été testé et optimisé à l'aide d'acides gras standards et de tissus mous porcins. La méthode d'analyse par chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS) a quant à elle dû être développée et optimisée puisqu'aucune méthode préexistante n'a pu être utilisée. Aucune méthode n'avait été élaborée pour le type d'acide gras formés (triméthylsilylés (TMS)) ainsi que l'appareil et la combinaison de colonnes utilisées pour ce projet. Pour la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), l'optimisation et la validation d'une méthode existante (Forbes *et al.*, 2003, Harvey et Trudel, 2019) ont été effectuées. Des standards d'acides gras ont aussi permis la réalisation de courbes d'étalonnage permettant la quantification des acides gras contenus dans les échantillons provenant des donneurs déposés sur le site de RESTES.

3.1 Développement et optimisation de méthodes d'analyses par chromatographie gazeuse (GC) à l'aide d'acides gras standard

Des acides gras saturés et insaturés standards ont d'abord été utilisés dans le but de développer une méthode de détection, de séparation et d'identification de ces derniers à l'aide de la chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS). Suivant la rencontre de plusieurs difficultés avec la GC x GC-TOF-MS, une méthode d'analyse plus simple a été utilisée, soit la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les mêmes acides gras standards ont été utilisés afin d'élaborer une méthode par GC-MS ayant les mêmes objectifs que l'utilisation de la GC x GC-TOF-MS soit la détection, la séparation et l'identification des acides gras TMS pertinents.

3.1.1 Acides gras saturés et insaturés ciblés

Pour ce projet, les principaux acides gras saturés et insaturés constituant les triglycérides du corps humain ont été ciblés (Section 1.3.4). Le tableau 3.1 présente ces acides gras une fois dérivatisés (triméthylsilylés). Ceux-ci peuvent par la suite être détectés en chromatographie gazeuse (GC). Le groupement -Si(CH₃)₃ remplace l'atome d'hydrogène du groupement -COOH des molécules de base. Tous les échantillons analysés par chromatographie gazeuse (GC) ont préalablement subi le processus de dérivatisation présenté à la section 2.3. Les standards d'acides gras ont été solubilisés dans l'hexane à des concentrations variables. Ces solutions n'ont pas eu à être filtrées. Le standard interne était directement ajouté à 500 μ L de la solution, puis le mélange était séché à 40 °C sous un faible jet d'azote. La suite de la méthode était la même.

Туре	Nom	Formule	Masse molaire (g/mol)	Structure	C:D
	Acide laurique, TMS	$C_{15}H_{32}O_2Si$	272,4989	Si.o	12:0
Saturés	Acide myristique, TMS	$C_{17}H_{36}O_2Si$	300,5520	Si.o	14:0
	Acide palmitique, TMS	$C_{19}H_{40}O_2Si$	328,6052	Si.o	16:0
	Acide stéarique, TMS	$C_{21}H_{44}O_2Si$	356,6584	Si. 0	18:0
	Acide arachidique, TMS	$C_{23}H_{48}O_2Si$	384,7115	Si.o	20:0
Incaturác	Acide myristoléique, TMS	C ₁₇ H3 ₄ O ₂ Si	298,5361	Si. O	14:1
Insaturés	Acide palmitoléique, TMS	$C_{19}H_{38}O_2Si$	326,2641	Si.o	16:1

Tableau 3.1 Acides gras saturés et insaturés ciblés pour ce projet suivant leur dérivatisation chimique (triméthylsilylé)

Туре	Nom	Formule	Masse molaire (g/mol)	Structure	C:D
lassturás	Acide oléique, TMS	$C_{21}H_{42}O_2Si$	354.6425	Si. 0	18:1
Insaturés	Acide linoéique, TMS	$C_{21}H_{40}O_2Si$	352,6266	Si. 0	18:2
Standard interne	Cholestérol-d ₇ , TMS	C ₃₀ H₅₄OSi	458,8347	H. H	_

3.1.2 Séparation des acides gras par chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS)

Tout d'abord, une première méthode de séparation et d'identification des acides gras d'intérêts a été développée à l'aide de la chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS).

Au départ, des solutions contenant un seul acide gras standard ont été analysées pour le développement d'une méthode de base. Des solutions d'acides gras de 1 ppm dans l'hexane ont été préparées et subséquemment dérivatisées. Cependant, aucun standard interne n'a été ajouté pour ces injections à cette étape. La détection des standards internes a été faite ultérieurement. À cette étape, l'objectif était simplement de vérifier s'il était possible de détecter et d'identifier chaque acide gras. Une fois cet objectif atteint, des solutions mixtes ont été analysées afin d'optimiser la séparation des acides gras TMS ayant des temps de rétention similaires (Tableau 3.2). Les principaux paramètres modifiés sur le GC x GC lors des différentes injections ont été le « split ratio », la programmation de température et la durée des pulsations chaude et froide (« hot and cold pulse »). Pour le TOF-MS, les modifications principales ont été reliées au délai de solvant pour masquer les pics du BSTFA (en excès) et les pics du solvant et des sous-produits de réaction.

Туре	Composés	Temps de rétention 1 (s)	Temps de rétention 2 (s)
	Acide laurique, TMS	608,97	0,68
	Acide myristique, TMS	959,95	0,75
Saturés	Acide palmitique, TMS	1517,91	0,94
	Acide stéarique, TMS	2294,86	1,04
	Acide arachidique, TMS	-	-
	Acide myristoléique, TMS	947,95	0,84
la seturi é s	Acide palmitoléique, TMS	1466,91	0,95
insatures	Acide oléique, TMS	22091,87	1,07
	Acide linoléique, TMS	2192,87	1,13
Standard interne	Nonadécanoate de méthyle	2246,86	1,13

Tableau 3.2 Temps de rétention (t_R) des acides gras cibles et du standard interne choisi en utilisant les paramètres optimisés de la méthode sur GC x GC-TOF-MS

Suivant l'injection individuelle des standards d'acides gras et de solutions mixtes, une identification et une séparation adéquate de tous les acides gras (à l'exception de l'acide arachidique) ont été obtenues. L'acide arachidique étant le plus lourd, il est possible que les colonnes utilisées ne fussent pas adaptées à sa détection. La température maximale pouvant être atteinte avec les colonnes utilisées était de 260 °C. Cette température pourrait être trop faible pour permettre la détection de l'acide arachidique. En effet, plus les composés à analyser sont lourds, moins ils seront volatils. Des températures plus élevées devront être utilisées pour qu'ils puissent « sortir » des colonnes et être détectés en spectrométrie de masse. Puisque l'acide arachidique n'est pas l'un des acides gras en plus grand pourcentage dans les triglycérides du corps humain (Section 1.3.4), il a été décidé qu'il serait exclu des analyses par GC x GC-TOF-MS.

Cette même observation a été faite avec les standards internes utilisés au départ, soit l'acide stéarique-d₃₅ et le cholestérol-d₇. Qu'ils aient été injectés seuls ou en combinaison aux acides gras standards, il n'a jamais été possible de détecter ces standards internes. En observant les masses de ceux-ci (Tableau 3.3), il est possible de constater que l'acide stéarique-d₃₅ TMS et le cholestérol-d₇ TMS ont des masses plus élevées que l'acide arachidique TMS (384,3424 g/mol). Ces constatations ont permis de conclure que les colonnes utilisées ne permettaient pas de détecter ces composés ayant des masses élevées. L'acide gras triméthylsilylé le plus lourd pouvant être détecté avec la méthode mise au point était l'acide stéarique TMS (356,3111 g/mol).

Composés	Formule	Masse molaire (g/mol)	Structure
Cholesterol-d7, TMS	C ₃₀ H ₄₇ D ₇ OSi	465,878	B D D D D D D D D D D D D D D D D D D D
Acide stéarique-d35, TMS	$C_{21}H_9D_{35}O_2Si$	391,871	
Nonadécanoate de méthyle	$C_{20}H_{40}O_2$	312,53	

Tableau 3.3 Standards internes utilisés pour l'optimisation de la méthode GC x GC-TOF-MS après dérivatisation chimique

Devant l'impossibilité d'utiliser les standards internes mentionnés dans le protocole de dérivatisation proposé par Luong *et al.* (2017), le nonadécanoate de méthyle a été envisagé comme standard interne. Ce dernier a été choisi puisqu'il avait préalablement été utilisé dans un projet similaire à titre de standard interne pour l'analyse d'acides gras triméthylsilylés par GC-MS (Forbes *et al.*, 2003, Harvey et Trudel, 2019) et qu'il était disponible en laboratoire. Sa masse étant inférieure à celle de l'acide stéarique TMS (Tableaux 3.1 et 3.3), il a été possible de le détecter. Malgré des temps de rétention similaires à ceux des acides oléique TMS, linoléique TMS et stéarique TMS (Tableau 3.2), ces quatre composés ont pu être séparés adéquatement. Le nonadécanoate de méthyle a donc été utilisé comme standard interne pour les analyses en GC x GC-TOF-MS.

Tous les acides gras cibles, sauf l'acide arachidique, ainsi que le nonadécanoate de méthyle (standard interne) ont pu être adéquatement identifiés par le logiciel de l'appareil (ChromaTOF[®] (version 5.51.06.0.64572, LECO)) avec un niveau de confiance d'au moins 80 %. L'identification faite par ce dernier a été confirmée par la comparaison des spectres de masse des pics correspondant aux acides gras TMS à des spectres de masse de références. Suivant l'ajustement des paramètres de l'appareil (Section 2.4.1), ces analytes ont aussi pu être séparés. La rampe de température optimale est présentée au tableau 3.4. La durée totale d'une analyse est de 47,26 minutes.

Tableau 3.4 Paramètres de température optimaux pour la séparation des acides gras à l'aide d'un GC x GC-TOF-MS

Chauffage/rampe (°C/min)	Température désirée (°C)	Durée (min)
Initiale	135	0,2
25	210	0,2
0,7	240	1

*Les températures désirées du four secondaire sont incrémentées de 5 °C par rapport à celles du four primaire et de 15 °C pour le modulateur.

La figure 3.1 présente un agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte de tous les acides gras TMS cibles (sauf l'acide arachidique TMS) avec la méthode optimisée sans ajout de standard interne. Une séparation adéquate de tous les acides gras a été atteinte. Seuls les acides linoléique TMS et oléique TMS présentent un peu de recouvrement, mais il s'agit de la séparation optimale obtenue avec les colonnes utilisées.



Figure 3.1 Agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte de tous les acides gras TMS cibles : acide laurique (1), acide myristoléique (2), acide myristique (3), acide palmitoléique (4), acide palmitique (5), acide linoléique (6), acide oléique (7), acide stéarique (8)) à l'exception de l'acide arachidique TMS. La ligne rouge est causée par la perte de phase stationnaire (« column bleeding »). Elle n'est pas prise en considération dans l'analyse des chromatogrammes.

À la figure 3.2, il est possible d'observer un agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte des acides linoléique, oléique et stéarique auquel le standard interne choisi (nonadécanoate de méthyle) a été ajouté lors de la dérivatisation. Le standard interne a pu être efficacement séparé des acides gras. Tous les temps de rétention (t_R) associés aux différents acides gras et au standard interne sont présentés au tableau 3.2.



Figure 3.2 Agrandissement du chromatogramme obtenu suivant l'injection d'une solution mixte des acides linoléique TMS (1), oléique TMS (2) et stéarique TMS (4) en plus du standard interne (nonadécanoate de méthyle (3)). La ligne rouge est causée par la perte de phase stationnaire (« column bleeding »). Elle n'est pas prise en considération dans l'analyse des chromatogrammes.

3.1.3 Séparation des acides gras par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC x MS)

Une seconde méthode de détection, d'identification et de séparation des acides gras cibles à ce projet a été développée en utilisant cette fois un GC-MS. Différents problèmes techniques avec l'utilisation de la GC x GC-TOF-MS ont conduit au développement d'une méthode à l'aide de cet instrument. La section suivante (Section 3.1.4) aborde plus en détail les difficultés rencontrées. Pour le GC-MS, une méthode existante a été optimisée. Il s'agissait d'une méthode ayant été utilisée avec le même type d'analyte (acides gras triméthylsilylés), d'appareil et de colonne (Forbes *et al.*, 2003, Harvey et Trudel, 2019). Il s'est donc avéré beaucoup plus rapide d'optimiser cette seconde méthode pour obtenir une bonne identification et séparation des acides gras et des standards internes. Ceux-ci ont pu être identifiés par le logiciel (Agilent ChemStation (version D.02.00.275)) et confirmés par une comparaison avec des spectres de masse de référence. De plus, le logiciel de l'appareil a détecté chaque acide avec un niveau de confiance de plus de 80 %.

L'optimisation de la méthode a été réalisée de la même manière que pour la GC x GC-TOF-MS, soit par l'injection de solutions d'acides gras de 1 ppm dans l'hexane subséquemment dérivatisées (Section 3.1.1). Les acides gras standards seuls et des solutions mixtes ont été analysés. Le seul paramètre modifié a été le programme de température qui a dû être ajusté pour obtenir une bonne séparation de tous les acides. De plus, la colonne utilisée pour les analyses permettait l'atteinte de températures plus élevées rendant possible l'observation d'un pic pour l'acide arachidique TMS. Les neuf acides gras triméthysilylés cibles de départ étaient donc identifiables et séparables par GC-MS.

Considérant la possibilité d'observer l'acide arachidique TMS, les standards internes d'acide stéarique-d₃₅ TMS et de cholestérol-d₇, qui avaient été exclus de la méthode par GC x GC-TOF-MS, ont été testés. Il s'est avéré possible d'identifier le cholestérol-d₇, mais l'acide stéarique-d₃₅ TMS n'a jamais été détecté. Le nonadécanoate de méthyle a lui aussi été analysé. Son temps de rétention étant similaire à ceux des acides oléique TMS, linoléique TMS et stéarique TMS (Tableau 3.5), une optimisation de cette zone du chromatogramme a dû être réalisée pour éviter toute co-élution. En l'absence d'une seconde dimension, il s'est avéré un peu plus complexe de séparer ces pics. En somme, il a été possible de séparer et d'identifier tous les acides gras triméthylsilylés d'intérêts ainsi que deux standards internes potentiels, soit le cholestérol-d₇ et le nonadécanoate de méthyle. La rampe de température optimisée est présentée au tableau 3.6. Le temps total pour une analyse est de 59,75 minutes.

Tableau 3.5 Temps de rétention (t_R) des acides gras cibles et des standards interne en utilisant les paramètres de la méthode optimisée sur GC-MS

Туре	Composé	Temps de rétention (min)
	Acide laurique, TMS	7,929
	Acide myristique, TMS	12,848
Saturés	Acide palmitique, TMS	20,081
	Acide stéarique, TMS	28,035
	Acide arachidique, TMS	36,746
	Acide myristoléique, TMS	12,453
Insaturés	Acide palmitoléique, TMS	19,266
	Acide oléique, TMS	26,691
	Acide linoléique, TMS	26,364
Standard interne	Nonadécanoate de méthyle	27,257
	Cholestérol-d ₇ , TMS	55,010

Tableau 3.6 Paramètres de température optimaux pour la séparation des acides gras à l'aide d'un GC-MS

Chauffage/rampe (°C/min)	Température (°C)	Durée (min)
Initiale	155	4
4	180	5
4	200	5
2	225	0
5	250	5
5	300	2

Les figures 3.3 et 3.4 présentent respectivement des agrandissements des chromatogrammes résultants de l'analyse d'une solution mixte des acides linoléique TMS et oléique TMS (10 ppm) et de nonadécanoate de méthyle (100 ppm) (standard interne (SI)) et d'une solution composée d'acide stéarique TMS (10 ppm) et du nonadécanoate de méthyle (100 ppm). Il est possible de constater qu'il y a une bonne séparation de tous les analytes. Cependant, les temps de rétention des trois acides gras TMS et du nonadécanoate de méthyle étant près les uns des autres (Tableau 3.5), il a été décidé que le standard interne utilisé pour l'analyse des échantillons provenant du site de RESTES serait le cholestérol-d₇. Les échantillons réels pouvant présenter des pics supplémentaires provenant d'autres acides gras triméthylsilylés et des isomères *cis-trans* des différents acides gras insaturés TMS, les risques de co-élution étaient plus grands que pour le cholestérol-d₇ TMS. Cette théorie a d'ailleurs été confirmée par la suite par des tests avec le modèle porcin (Section 3.3). De plus, le cholestérol-d₇ subit lui aussi une dérivatisation lors de la préparation des échantillons en même temps que les acides gras contrairement au nonadécanote de méthyle qui est déjà sous forme d'ester. Il est recommandable que le standard interne subisse les mêmes modifications chimiques que les analytes d'intérêt (McNair *et al.,* 2019). Il s'agissait donc du choix le plus logique malgré son temps de rétention plus important que tous les acides gras étudiés.



Figure 3.3 Agrandissement du chromatogramme résultant de l'analyse d'une solution dérivatisée constituée d'acide linoléique TMS (1), oléique TMS (2) et de nonadécanoate de méthyle (SI) (3).


Figure 3.4 Agrandissement du chromatogramme résultant de l'analyse d'une solution dérivatisée constituée de nonadécanoate de méthyle (SI) (1) et d'acide stéarique TMS (2).

3.1.4 Choix de l'appareil pour l'analyse des tissus mous

Suivant le développement et l'optimisation de ces deux méthodes, l'une d'elles a été sélectionnée pour l'analyse des échantillons collectés sur le site de REST[ES] soit la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Tout d'abord, la présence d'une seconde dimension n'apportait pas de valeur ajoutée considérable à la séparation des acides gras triméthylsilylés. En effet, la chromatographie gazeuse en tandem (GC x GC) a pour avantage de permettre une séparation de haute résolution,

de distinguer des composés structurellement similaires et de permettre la séparation d'analyte qui élus simultanément en chromatographie gazeuse conventionnelle (Skoog et al., 2013). Cependant, la dérivatisation chimique des acides gras a permis l'affinement des pics chromatographiques et l'amélioration de la résolution limitant ainsi la co-élution de certains acides gras TMS. Il a alors été possible de séparer adéquatement tous les acides gras TMS d'intérêt en GC-MS à une dimension. La seconde dimension n'apportait donc pas d'avantages supplémentaires. Aussi, la colonne utilisée pour le GC-MS était mieux adaptée à l'analyse des acides gras TMS. Il a été possible d'analyser tous les acides gras TMS à l'inverse des colonnes utilisées en chromatographie gazeuse en tandem couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC x GC-TOF-MS) avec lesquelles l'acide arachidique TMS ne pouvait pas être étudié. Un changement de colonnes dans le GC x GC-TOF-MS a été envisagé, mais cela s'avérait assez complexe considérant que l'appareil devait être utilisé en alternance avec d'autres étudiants. Aussi, plusieurs problèmes techniques ont été rencontrés avec le GC x GC-TOF-MS empêchant l'avancement des travaux. Ayant un GC-MS fonctionnel et disponible avec une méthode préexistante d'identification et de séparation des acides gras TMS cibles au projet, le choix s'est tourné vers cet appareil. Enfin, il s'agit d'un appareil beaucoup plus accessible et plus simple à utiliser si cette technique d'évaluation de l'intervalle post-mortem (IPM) venait à être utilisé couramment.

Aucune validation de la méthode par GC x GC-TOF-MS n'a été effectuée. Cependant, la méthode développée en GC x GC-TOF-MS peut être utilisée et des validations avec les analytes d'intérêt peuvent être réalisées. Seule la méthode d'analyse des acides gras triméthylsilyle par GC-MS a été testée et validée pour chacun des analytes cibles.

3.2 Validation de la méthode GC-MS

Suivant le développement d'une méthode analytique et le choix du chromatographe gazeux à utiliser, une validation de la méthode GC-MS a été effectuée.

3.2.1 Limite de détection, limite de quantification et coefficient de variation

Tout d'abord, les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de chaque acide gras TMS ont été déterminées (Tableau 3.7). Pour ce faire, des solutions de 2,5 ppm dans l'hexane ont été préparées pour tous les acides gras. Il s'agit de la plus faible concentration des courbes d'étalonnage de chaque acide gras (Section 3.2.2). Un total de 10 répliquas ont été dérivatisés et injectés dans le GC-MS afin d'obtenir les limites de détection (LD) ainsi qu'estimer les limites de quantification (LQ) (Annexe A).

Tableau 3.7 Résultats des tests de validation de la méthode développée à l'aide d'un GC-MS : les limites
de détection (LD), les limites de quantification (LQ) et les coefficients de variation (CV)

		Limite de	Limite de	Coefficient de
Туре	Acides gras TMS	détection (LD)	quantification (LQ)	variation (CV)
		(ppm)	(ppm)	(%)
Saturés	Acide laurique	0,08	0,3	1,0
	Acide myristique	0,04	0,1	0,6
	Acide palmitique	0,06	0,2	0,8
	Acide stéarique	0,05	0,2	0,6
	Acide arachidique	0,04	0,1	0,6
Insaturés	Acide myristoléique	0,2	0,6	2,3
	Acide palmitoléique	0,1	0,4	1,6
	Acide oléique	0,1	0,4	1,8
	Acide linoléique	0,05	0,2	0,6

Les mesures des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont démontré que des concentrations supérieures à 0,6 ppm peuvent être quantifiées pour les neuf acides gras pertinents à cette étude. De plus, pour les limites de détection, un niveau de confiance de 98,3 % est attribué aux valeurs calculées grâce au facteur de confiance (k = 3) utilisé dans les calculs (Annexe A). Le GC-MS utilisé peut donc être considéré comme sensible pour la détection et la quantification des acides gras TMS de cette étude, et ce même à de faibles concentrations. Les valeurs comprises dans le domaine de linéarité des différentes courbes d'étalonnage soit de 2,5 ppm à 100 ppm (150 ppm pour les acides oléique et linoléique) (Section 3.2.2) pourront donc être détectées et quantifiées.

Le tableau 3.7 présente aussi les valeurs du coefficient de variation (CV) de chaque acide gras TMS. Ces derniers permettent d'évaluer la précision instrumentale. Le coefficient de variation a été évalué par l'entremise de cinq injections successives d'une solution standard de 2,5 ppm préalablement dérivatisé pour chaque acide gras (Annexe A). Les acides gras saturés présentent des valeurs \leq à 1 % alors que leurs analogues saturés présentent des valeurs un peu plus élevées (\leq à 2,3 %). La présence d'insaturations dans les acides gras pourrait possiblement diminuer la précision instrumentale. Compte tenu du nombre limité d'acides gras étudiés, il n'est pas possible de déterminer si les insaturations exercent bel et bien une influence sur la précision instrumentale ou s'il s'agit seulement d'une observation aléatoire. En somme, les valeurs de CV obtenues sont toutes inférieures à 5 % indiquant une bonne précision instrumentale.

3.2.2 Courbes d'étalonnage

Afin de quantifier adéquatement chacun des acides gras d'intérêts, des courbes d'étalonnage ont été construites. Pour ce faire, des solutions étalons de chaque acide gras ayant des concentrations de 2,5, 10, 25, 50, 75 et 100 ppm dans l'hexane ont été dérivatisés puis analysé en GC-MS. Pour les acides oléique et linoléique, un point supplémentaire, à une concentration de 150 ppm, a été ajouté sur leur courbe d'étalonnage respective. Des concentrations plus élevées étaient attendues pour ces deux acides gras insaturés considérant leur abondance plus importante dans les tissus mous (Section 1.3.4).

En mettant en relation les concentrations de chaque solution à leur valeur respective du ratio de l'aire du pic de l'analyte sur l'aire du pic du standard interne (cholestérol-d₇ TMS), il a été possible d'obtenir les courbes d'étalonnage présentées à l'annexe B. L'équation des droites ainsi que le coefficient de détermination (R²) associé à chacune d'elle sont présentés directement sur les graphiques.

En plus de permettre la quantification des acides gras dans les échantillons provenant des donneurs, les courbes d'étalonnage ont aussi permis de vérifier la linéarité de la relation entre les signaux du GC-MS et les concentrations. Les coefficients de détermination (R²) de chaque courbe d'étalonnage avaient des valeurs supérieures à 0,99. Il fut donc possible d'affirmer que la relation entre la concentration et les ratios des aires des pics des analytes sur celui du pic du standard interne était linéaire et précise sur l'ensemble de l'écart dynamique pour tous les acides gras.

3.3 Validation de la méthode d'extraction et d'analyse par GC-MS avec le modèle porcin

Bien que différents du modèle humain, les tissus mous du modèle porcin contiennent les acides gras pertinents à ce projet (Section 3.1.1). Les méthodes d'extraction et d'analyse ont donc pu être validées par l'utilisation de gras et de muscle de porc. Cela a permis de s'assurer de l'efficacité du processus d'extraction des acides gras et de valider le choix du standard interne (Section 3.1.3).

Suivant la dérivatisation des tissus mous préalablement lyophilisés d'une épaule de porc (Section 2.3), le chromatogramme présenté à la figure 3.5 a été obtenu. Il est à noter que le choix du standard interne n'avait toujours pas été fait à ce moment. C'est pourquoi ceux-ci sont tous deux présents.



Figure 3.5 Chromatogramme obtenu suivant l'analyse des tissus mous d'une épaule de porc après dérivatisation chimique : 1) acide laurique 2) acide myristique 3) acide palmitoléique 4) acide palmitique 5) acide linoléique 6) acide oléique 7) nonadécanoate de méthyle (SI) 8) acide stéarique 9) cholestérol-d₇ (SI).

Suivant l'évaluation de plusieurs chromatogrammes obtenus à la suite de l'analyse de tissus mous porcins, plusieurs conclusions ont pu en être tirées. Tout d'abord, il fut possible de constater que la majorité des pics des chromatogrammes étaient attribuables aux acides gras TMS d'intérêts et aux standards internes. La méthode d'extraction s'est donc avérée efficace pour extraire et dérivatiser les acides gras, mais aussi pour limiter la présence de tous autres composés pouvant co-éluer avec les acides gras cibles. Seuls les acides myristoléique TMS et arachidique TMS n'ont pas été observés dans les échantillons de porc. En revanche, aucun pic n'a été observé avec des temps de rétention similaire (Tableau 3.5) diminuant donc les risques de co-élution pour les échantillons provenant des donneurs installés sur le site de RESTES.

Un second élément important constaté lors de l'analyse des chromatogrammes provenant des échantillons de porc fut l'élution des deux standards internes par rapport à celle des acides gras TMS. Tout d'abord, pour le nonadécanoate de méthyle, une co-élution avec l'acide oléique TMS était observable. Malgré plusieurs tentatives de séparation en modifiant le programme de température, il n'a pas été possible de séparer adéquatement ceux-ci. De plus, les pics observés étaient généralement de faibles intensités. En présence de concentrations plus importantes, une co-élution des pics aurait été inévitable. Pour le cholestérol-d₇ TMS, il ne semblait pas y avoir de co-élution majeure avec le cholestérol retrouvé naturellement dans les tissus mous de porc ni tous autres composés. Ces observations ont donc validé le choix du choletérol-d₇ comme étant le mieux adapté pour cette étude. Le choix final s'est arrêté sur celui-ci.

En somme, en combinant l'utilisation des standards chimiques suivie du modèle porcin, la validité chimique de la méthode et sa reproductibilité ont pu être établies avant son application aux restes humains afin d'éviter de gaspiller l'importante contribution des donneurs humains à l'optimisation de la méthode. Il en va de même pour le développement, l'optimisation et la validation de la méthode analytique par GC-MS.

CHAPITRE 4

ANALYSES QUALITATIVES

Avant l'analyse des échantillons de tissus adipeux collectés sur les donneurs disposés sur le site de REST[ES], l'évolution individuelle de leur décomposition a été évaluée. Les stades de décomposition, la durée de ces derniers et les particularités observées sont présentés dans ce chapitre. Des comparaisons entre les donneurs étudiés durant une même période (Tableau 2.2) ont aussi été effectuées afin d'évaluer les similitudes et différences rencontrées. Enfin, une comparaison entre tous les donneurs a été effectuée dans le but d'évaluer l'impact des saisons sur la décomposition des corps.

4.1 Températures et précipitations

La décomposition est grandement influencée par l'environnement dans lequel le corps se trouve et, plus particulièrement, le climat (Section 1.5.2). Il s'agit donc d'un facteur primordial à considérer afin d'évaluer adéquatement l'intervalle post mortem (IPM). Les donneurs, ayant été déposés sur le site de REST[ES] à des périodes différentes, ont été soumis à des conditions météorologiques différentes. Les températures quotidiennes moyennes et les précipitations quotidiennes sur l'ensemble de la période d'échantillonnage ont été transposées graphiquement pour chaque donneur. La figure 4.1a présente ces deux variables pour les donneurs 1 et 2 dont la période d'échantillonnage est identique. Pour les donneurs 3, 4, 5 et 6, des graphiques individuels ont été réalisés puisque leur période d'échantillonnage était différente (début et/ou fin variable). Ceux-ci sont présentés aux figures 4.1b à 4.1e respectivement.



Figure 4.1 Températures quotidiennes moyennes et total des précipitations quotidiennes pour l'ensemble de la durée de l'étude des six donneurs; a. Donneurs 1 et 2 installés sur le site en août 2020, b. Donneur 3 installé sur le site en septembre 2020, c. Donneur 4 installé sur le site en octobre 2020, d. Donneur 5 installé sur le site en mai 2021, e. Donneur 6 installé sur le site en juin 2021.

La température moyenne pour l'ensemble de l'expérience pour les donneurs 1 et 2 (70 jours expérimentaux (JE)) est de 13,60 °C avec un minimum et un maximum atteint de 4,69 °C et 24,44 °C respectivement. Le total des précipitations est quant à lui de 157,76 mm. La majorité des précipitations ont d'ailleurs été enregistrées dans les dernières semaines, soit durant l'automne. De plus, il est possible d'observer la diminution graduelle des températures due à la transition de l'été vers l'automne sans atteindre des valeurs inférieures à 0 °C.

Les donneurs 3 et 4 présentent des températures moyennes et des minimums très différents des deux premiers donneurs soient, respectivement, 3,89 °C (minimum de -19,47 °C et maximum de 27,57 °C) et 6,22 °C (minimum de -19,47 °C et maximum de 27,57 °C). Cela s'explique principalement par l'étude des corps sur une période plus longue (282 et 324 JE), incluant la saison hivernale. Il est d'ailleurs possible d'observer la baisse des températures pour les premiers mois avec des valeurs situées nettement sous le point de congélation suivi d'une augmentation des températures durant les derniers mois de l'expérience correspondant au printemps et à l'été 2021. Le total des précipitations (pluie seulement) est aussi beaucoup plus élevé par rapport aux donneurs 1 et 2, soit 556,60 mm pour le donneur 3 et 501,00 mm pour le donneur 4. Pour le donneur 3, des précipitations ont eu lieu sur l'ensemble de la période d'étude alors qu'une diminution importante des précipitations a eu lieu dans les derniers jours expérimentaux pour le donneur 4. Ceux-ci correspondent au mois de juillet et août 2021. Les données sur les précipitations de neige ne sont pas incluses dans cette étude, car la station météorologique installée sur le site de REST[ES] ne permet pas d'obtenir ce type d'informations.

Enfin, pour les donneurs 5 et 6, les températures moyennes pour l'ensemble de leurs périodes d'études (106 et 63 JE) sont, respectivement, 18,97 °C (minimum de 7,48 °C et maximum de 27,57 °C) et 20,35 °C (minimum de 14,65 °C et maximum de 25,69 °C). De plus, à l'exception du jour expérimental 14 pour le donneur 5, les précipitations étaient très faibles sur l'ensemble des périodes d'observations. Un total de 76,40 mm et 15,80 mm a été enregistré pour les donneur 5 et 6, respectivement. Ces deux donneurs ont été déposés au printemps 2021; mi-mai pour le donneur 5 et à la fin du mois de juin pour le donneur 6. Les faibles taux de précipitations et les températures moyennes plus élevées que celles des autres donneurs sont donc expliqués par la transition vers la saison estivale durant laquelle les donneurs ont été étudiés. D'ailleurs les mois de mai et juin présentaient des normales de saisons légèrement plus élevées que les normales de saisons (Développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques, 2015).

Dans l'ensemble, chaque paire de donneurs (donneurs 1 et 2, donneurs 3 et 4 et donneurs 5 et 6) présente des températures moyennes similaires sur l'ensemble de leurs périodes d'étude respectives. Cela a permis de comparer les paires, notamment pour mettre en évidence des similarités et/ou différences au sein d'une même paire (intrapaire). Des comparaisons entre les paires ont aussi été réalisées afin de mettre en lumière les particularités de chaque saison (interpaire).

4.2 Stades de décomposition

Bien que la décomposition du corps humain soit un continuum, il est tout de même possible de distinguer plusieurs changements physico-chimiques et phénomènes biologiques avec des moments d'apparition distincts. Il est ainsi possible d'identifier plusieurs grandes phases au sein du processus de décomposition qui sont généralement divisés en stades de décomposition dont la subjectivité est toutefois à prendre en compte (Schoenly et Ried, 1987). Le tableau 2.1 (Chapitre 2), présentant cinq stades de décomposition, a été mis en place pour cette étude afin de décrire l'évolution de la décomposition des donneurs dans le climat étudié. Il est à noter que la décomposition est un processus dynamique qui ne se déroule pas uniformément sur l'ensemble du corps (décomposition différentielle), faisant en sorte que plusieurs stades de décomposition peuvent être observés simultanément sur un même corps. Afin de tenir compte de ce phénomène, le début et la fin des stades de décomposition sont présentés en jour expérimentaux (JE) et en « accumulated-degree days » (ADD) pour chaque région anatomique (tête et cou, tronc et membres inférieurs et supérieurs). Les stades de décomposition globaux attribués à un donneur débutent dès que l'une des régions anatomiques considérées présente les premières caractéristiques d'un stade de décomposition et se termine lorsqu'aucune région anatomique ne présente de signe du stade en question. La décomposition détaillée de chaque donneur est présentée dans les sous-sections suivantes.

4.2.1 Donneur 1

Au JE 0 (21,0 ADD), le corps était au stade frais. Cependant, ce donneur présentait déjà des signes de décomposition lors de son arrivée sur le site de REST[ES]. En effet, en raison de la cause du décès de ce donneur (asphyxie par pendaison) et son arrivée sur le site 5 jours après son décès (Tableau 2.2), des signes de *rigor, algor* et *livor mortis* étaient déjà visibles. De plus, du « marbling » était présent sur les membres inférieurs, élément caractéristique du stade gonflé (Tableau 2.1). En revanche, dans cette étude, le début du stade gonflé a officiellement été considéré au JE 3 (89,9 ADD) où l'apparition d'un léger gonflement de l'abdomen a été observée. Un niveau de gonflement maximal a été atteint au JE 8 (188,0 ADD). Le stade gonflé a ensuite subsisté jusqu'au JE 18 (355,1 ADD). La décomposition active a été observée au niveau de la tête dès le JE 3 (89,9 ADD) par la présence d'activité entomologique. La décomposition active a ensuite été observée sur les parties génitales au JE 5 (130,9 ADD) suivies du thorax au JE 6 (151,7 ADD). La totalité du corps a atteint son niveau de décomposition active maximale au JE 8 (188,0 ADD). Les régions anatomiques où les premiers signes de décomposition active ont été observés sont aussi les premières où le stade de dessiccation a été observé, soit la tête au JE 10 (218,8 ADD). L'ensemble du corps était au stade de dessiccation au JE 17 (340,3 ADD). À partir de ce moment, un important ralentissement de la

décomposition a été observé pour le reste de la période d'échantillonnage. De plus, dès le JE 11 (253,9 ADD), le stade squelettique a été observé à la tête, manifesté par l'exposition de la mandibule (mâchoire inférieure) et du maxillaire (mâchoire supérieure). Au dernier jour d'échantillonnage (JE 70; 965,5 ADD), la perte des connexions anatomiques (os normalement articulés qui se trouvent séparés) au niveau de certaines articulations et l'exposition de la clavicule, la scapula (omoplate) et la tête humérale ont été observées. Le reste du corps était momifié. La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement à la figure 4.2. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe C.



Figure 4.2. Durée des stades de décomposition (en ADD) observés chez les donneurs 1 et 2 lors de leur étude sur le site de REST[ES] d'août à novembre 2020.

4.2.2 Donneur 2

Le donneur 2 était au stade frais au JE 0 (21,0 ADD). Un léger gonflement de l'abdomen a d'abord été observé au JE 4 (110,2 ADD) avant d'atteindre un niveau de gonflement maximal au JE 7 (170,8 ADD). Le gonflement s'est complètement résorbé au JE 10 (218,8 ADD). La tête a présenté les premiers signes de

décomposition active dès le JE 3 (89,9 ADD) suivie des membres supérieurs au JE 4 (110,2 ADD). Cette décomposition rapide des membres supérieurs est probablement due à des blessures ante mortem (avant la mort) aux avant-bras du donneur. La rupture de la peau offre aux insectes un endroit optimal pour la ponte des œufs et aux larves pour consommer des tissus mous et, de ce fait, cela accélère le processus de décomposition du corps. Le niveau maximal de décomposition active pour l'ensemble du corps a été atteint au JE 8 (188,0 ADD). Au JE 10 (218,8 ADD), la tête est entrée au stade de dessiccation suivie de l'ensemble du corps au JE 16 (327,6 ADD). Toujours au JE 10 (218,8 ADD), les premiers signes du stade squelettique étaient visibles sur le visage et l'avant-bras gauche, manifesté par l'exposition du radius et de l'ulna. L'intensité de l'activité des insectes dans ces régions anatomiques est principalement responsable de l'atteinte rapide du stade squelettique. Un ralentissement de la décomposition a ensuite été observé durant le reste de l'étude, soit jusqu'au JE 70 (965,5 ADD). À ce moment, le corps était momifié avec l'exposition d'os, dont la mandibule (mâchoire inférieure), le radius et l'ulna (avant-bras). La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement à la figure 4.2. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe D.

L'analyse de la durée des stades de décomposition des donneurs 1 et 2 présentée dans la figure 4.2 permet de constater que le début et la durée des stades sont similaires. En effet, à l'exception du stade frais qui est un plus long et le stade gonflé qui est plus court pour le donneur 2, tous les autres stades débutent et terminent à des valeurs de ADD comparables. La durée plus courte du stade frais du donneur 1 peut être expliquée par les signes de décomposition déjà apparents lors de son arrivée sur le site de REST[ES]. Malgré cela, la décomposition des donneurs 1 et 2 peut être considérée comme comparable visuellement. Ces deux donneurs ayant été déposés sur le site au même moment, ils ont tous deux étés soumis aux mêmes conditions environnementales tout au long de l'étude. Les légères variations observées peuvent alors difficilement être attribuées à des facteurs exogènes (p. ex. environnementaux). Toutefois, il est envisageable que des différences endogènes entre les donneurs, telles que la cause du décès et l'âge (Tableau 2.1) ou encore leur état de santé global et traitement médicamenteux, puissent avoir exercé une influence sur la décomposition sans qu'il soit toutefois possible en l'état des connaissances scientifiques actuelles de l'évaluer pleinement. Il serait d'ailleurs intéressant de mener des études complémentaires sur l'impact des variations interindividuelles sur les modes et vitesses de décomposition, en complément de l'étude de l'impact des facteurs extrinsèques. L'objectif de la présente étude est d'établir un état de l'art sur l'évolution de la décomposition dans le climat canadien, sujet peu exploré jusque-là dans la littérature scientifique.

4.2.3 Donneur 3

Au JE 0 (19,5 ADD), le donneur 3 était au stade de décomposition frais. Un léger gonflement a été observé au JE 19 (205,1 ADD) pour le cou et au JE 21 (231,2 ADD) pour l'abdomen, et ce jusqu'au JE 29 (267,5 ADD). Cependant, le début du stade gonflé a été considéré au JE 5 dans cette étude (79,7 ADD) en raison de l'apparition de décolorations verdâtres sur l'abdomen qui s'est étendu graduellement à tout le corps et a persisté jusqu'au JE 50 (366,7 ADD). La décomposition active a débuté dans le visage au JE 11 (137,8 ADD), suivis des parties génitales au JE 24 (244,0 ADD). Au JE 38 (281,7 ADD), le haut du thorax et les bras ont commencé à présenter de légers signes de décomposition active. Le visage est entré dans le stade de dessiccation à partir du JE 42 (323,6 ADD). Au dernier jour d'échantillonnage à l'automne 2020 (JE 50; 366,7 ADD), le corps présentait une variété de stades de décomposition concomitants. Le visage se trouvait au stade de dessiccation alors que le reste du corps présentait les stades gonflé et actif. Aucune observation visuelle ni collecte d'échantillon n'a été effectuée durant l'hiver afin d'éviter toute perturbation des corps et d'évaluer l'influence de la neige sur la décomposition, de la manière la plus naturelle possible. Au JE 197 (566,9 ADD), suivant la fonte des neiges, le corps était en dessiccation complète. Lors de la première collecte d'échantillons au printemps 2021 (JE 226; 821,4 ADD), le corps était toujours au stade de dessiccation et un début de squelettisation a été observé sur le visage (maxillaire) et la cuisse gauche (fémur). Au dernier jour d'échantillonnage (JE 282; 1820,22 ADD), le corps était momifié, caractérisé par l'exposition d'os aux endroits précédemment mentionnés. La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement à la figure 4.3. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe E.



Figure 4.3 Durée des stades de décomposition (en ADD) observés chez les donneurs 3 et 4 lors de leur étude sur le site de REST[ES] de septembre 2020 à août 2021.

4.2.4 Donneur 4

Le donneur 4 était au stade frais au JE 0 (10,5 ADD). Ce stade a perduré jusqu'au JE 16 (147,6 ADD) soit au moment où le visage commençait à présenter des signes d'assèchement caractéristique du stade de dessiccation. Cela pourrait avoir été causé par le froid extérieur conduisant à l'assèchement des tissus mous par les phénomènes de sublimation ou de lyophilisation (Micozzi, 1991). L'inhibition ou du moins l'important ralentissement de la croissance bactérienne peut aussi avoir joué un rôle dans la dessiccation des tissus mous du visage (Pinherio, 2006). Le reste du corps était frais jusqu'au JE 22 (179,1 ADD). À partir de ce moment et jusqu'au dernier jour d'échantillonnage à l'automne 2020 (JE 43; 278,3 ADD), le visage, le thorax et les membres inférieurs se sont graduellement asséchés, mais plusieurs parties du corps demeuraient encore fraîches, phénomène caractéristique de la décomposition différentielle. Aucun signe des stades gonflé et actif n'a été observé durant l'automne chez ce donneur. Le corps ne présentait aucun signe de liquéfaction des tissus mous et une activité entomologique très faible. Seules quelques larves

ont été observées dans les cavités nasales du JE 12 au JE 14 (152 à 162 ADD). Tout comme le donneur 3, aucune étude n'a été réalisée durant l'hiver. Au JE 168 (337,0 ADD), soit suivant la fonte des neiges, le corps était au stade de dessiccation dans son ensemble. Au premier jour d'échantillonnage au printemps 2021 (JE 219; 730,7 ADD), le corps était davantage asséché, sans liquéfaction des tissus mous. À partir du JE 244 (1139,5 ADD) jusqu'au JE 253 (1312,4 ADD), la majorité des organes et des tissus mous semblait s'être liquéfiés selon l'apparence « dégonflée » du corps (Annexe F). Ce phénomène est caractéristique du stade actif. Par la suite, aucun autre changement extérieur n'a été observé jusqu'au dernier jour d'échantillonnage (JE 324; ADD 2740,8). Le corps était alors au stade de dessiccation sans signe de squelettisation. La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement dans la figure 4.3. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe F.

Contrairement aux donneurs 1 et 2 (Sections 4.2.1 et 4.2.2), la décomposition des donneurs 3 et 4 est peu comparable (Figure 4.3). À l'exception du stade frais qui est similaire au donneur 3, l'absence des stades gonflé et squelettique et la brève transition vers le stade actif du donneur 4 marquent une différence importante dans l'évolution de leurs trajectoires de décomposition respectives. Cette différence pourrait être expliquée par les conditions environnementales. Bien que le donneur 4 ait été déposé sur le site seulement huit jours après le donneur 3, les températures moyennes cumulées (ADD) sont très différentes pour une même période. Effectivement, durant les huit premiers jours suivant l'arrivée du donneur 3, un total de 98,9 ADD ont été calculés alors que seuls 73,2 ADD ont été obtenus pour cette même période suivant l'arrivée du donneur 4. Les températures rencontrées au moment où le donneur 4 a été déposé sur le site ont rarement dépassé les 10 °C pour rapidement descendre sous 0 °C (Figure 4.1). Cette baisse des températures pourrait être à l'origine de la décomposition particulière du donneur 4. De plus, suivant la fonte des neiges, les membres inférieurs de ce donneur étaient complètement submergés dans l'eau durant deux semaines. Les membres inférieurs et le tronc ont eu aussi été en contact avec l'eau. Il s'agit là d'une autre particularité importante de la décomposition de ce donneur qui peut avoir eu un impact sur la décomposition de celui-ci. Effectivement, Stuart et Ueland (2017) affirment que la décomposition dans un milieu aquatique est totalement différente de la décomposition terrestre. Enfin, d'autres facteurs endogènes, propres à chacun des donneurs, tels que l'IMC et l'âge (Tableau 2.2) peuvent aussi avoir eu un impact sur la décomposition. Le donneur 4 présentait d'ailleurs un indice de masse corporel (IMC) beaucoup plus élevé que le donneur 3 pouvant grandement influencer le processus de décomposition et mener à l'observation de ces importantes différences.

Cependant, une similarité majeure en ce qui concerne l'évolution de la décomposition des deux donneurs a été observée après l'hiver. Dans les deux cas, les corps présentaient de légers signes de dessiccation, principalement sur le visage, alors que plusieurs régions anatomiques (thorax-abdomen, membres supérieurs et inférieurs pour les deux donneurs) étaient toujours relativement fraîches lors du dernier échantillonnage à l'automne 2020. Suivant la fonte des neiges au printemps 2021, les deux donneurs étaient en dessiccation complète. Ces observations indiquent que la saison hivernale aurait donc un impact important sur le processus de décomposition en « perturbant » la séquence d'apparition/disparition des stades de décomposition qui sont généralement observés à des températures plus chaudes (Tableau 2.1). Au lieu de préserver le corps dans à un certain stade de décomposition, comme l'on pourrait s'y attendre, les températures froides de l'hiver et la couverture de neige conduisent ultimement à la modification de la trajectoire de décomposition. Le stade observé au printemps est alors bien différent de celui observé à l'automne précédent. La décomposition qui suit la décongélation est alors totalement différente. Des études sur un plus grand nombre de sujets comparables (n > 2) devront être réalisées afin de valider cette théorie.

4.2.5 Donneur 5

Au JE 0 (9,0 ADD), le donneur 5 était au stade frais. Ce stade a perduré jusqu'au JE 8 (130,8 ADD) pour l'ensemble du corps et au JE 17 (282,7 ADD) pour le bas des membres inférieurs. Le visage et le cou ont présenté des signes de gonflement au JE 10 (173,5 ADD) qui se sont étendus à l'abdomen au JE 12 (212,6 ADD) pour finalement se résorber au JE 20 (316,0 ADD) sur l'ensemble du corps. Le stade de décomposition actif a débuté au JE 8 (130,8 ADD) sur le visage alors que le thorax et les parties génitales sont entrés dans ce stade au JE 11 (196,1 ADD). Le stade actif a atteint un niveau maximal au JE 13 (225,5 ADD) pour l'ensemble du corps et s'est terminé au JE 27 (456,5 ADD). Le visage a été la première région à entrer dans le stade de dessiccation, au JE 17 (282,7 ADD), combiné à la squelettisation manifestée par l'exposition du maxillaire. Les membres supérieurs et le tronc (thorax et abdomen) sont, quant à eux, entrés au stade de dessiccation au JE 27 (456,5 ADD) et la dessiccation de l'ensemble du corps a été atteinte au JE 31 (534,5 ADD). À la fin de la période d'étude de terrain (JE 106; 2030,2 ADD), la majorité du corps était momifiée avec l'exposition d'os (squelettisation) dans plusieurs régions anatomiques (visage, membres supérieurs et inférieurs). La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement dans la figure 4.4. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe G.





4.2.6 Donneur 6

Le donneur 6 était au stade frais lors de son arrivée sur le site au JE 0 (14,7 ADD). Les premiers signes de gonflement ont été observés sur la tête et le cou au JE 5 (120,6 ADD). L'abdomen s'est, quant à lui, trouvé au stade gonflé au JE 8 (185,3 ADD) qui a perduré jusqu'au JE 43 (843,1 ADD). Il s'agit d'un élément caractéristique de la décomposition de ce donneur qui est difficilement explicable à ce stade des connaissances en thanatologie dans le climat du sud du Québec. Ce stade a duré plus longtemps que le stade de décomposition active qui a débuté d'abord au niveau du visage et des parties génitales au JE 5 (120,6 ADD) et s'est terminé au JE 18 (361,2 ADD) pour l'ensemble du corps. D'ailleurs, aucune liquéfaction apparente des tissus mous de l'abdomen n'a été observée pour ce donneur et l'activité entomologique a été très faible. Des larves ont principalement été observées dans le visage et les membres inférieurs. Au JE 8 (185,3 ADD), la décomposition active a atteint son niveau maximal pour l'ensemble du corps à l'exception du visage. La tête et le cou sont entrés au stade de dessiccation dès le JE 8 (185,3 ADD).

Un ralentissement de la décomposition a ensuite été observé sur l'ensemble du corps au JE 19 (361,8 ADD) jusqu'à la fin de la période d'échantillonnage au JE 63 (1302,2 ADD). Le stade squelettique a été observé au JE 10 (217,0 ADD) sur le visage. Il est à noter que la squelettisation a seulement été observée dans cette région durant l'ensemble de l'étude. Au dernier jour d'échantillonnage (JE 63; 1302,2 ADD), l'ensemble du corps était au stade de dessiccation avec exposition de la mandibule et du maxillaire. La durée (en ADD) de chaque stade de décomposition est représentée graphiquement dans la figure 4.4. En complément, des photographies prises à chaque stade de décomposition de ce donneur sont présentées à l'annexe H.

Le début des stades de décomposition des donneurs 5 et 6 est comparable. Les différences observées se situent plutôt dans la durée des stades. Pour le donneur 5, le stade frais fut particulièrement long dû aux membres inférieurs qui ont maintenu une apparence relativement fraîche durant plusieurs jours. Il est difficile d'émettre une hypothèse afin d'expliquer cette particularité. Il semble difficile d'envisager que ce phénomène puisse être dû à des facteurs extrinsèques, comme la température, puisque les impacts auraient été observés sur l'ensemble du corps. Des facteurs intrinsèques pourraient donc être à l'origine de ce phénomène. Il est à noter que les températures étaient tout de même plus froides lors de l'arrivée du donneur sur le site comparativement à celle du donneur 6. Cependant, le stade gonflé est beaucoup plus court chez le donneur 5 que chez le donneur 6. Dans l'ensemble, malgré le dépôt sur le site à plus d'un mois d'écart, l'utilisation des valeurs de ADD permet d'observer que la décomposition a progressé de manière relativement similaire chez les deux donneurs. Les différences observées peuvent, ici aussi, être dues à de nombreux facteurs intrinsèques outre les facteurs extrinsèques.

4.2.7 Comparaison des stades de décomposition de tous les donneurs

À l'issue de la comparaison des stades de décomposition des trois paires de donneurs, une comparaison des six donneurs entre eux est présentée dans la figure 4.5.



Figure 4.5 Durée des stades de décomposition (en ADD) observés pour les six donneurs lors de leur étude respective sur le site de REST[ES] de août 2020 à août 2021.

La figure 4.5 met en évidence le caractère comparable des stades de décomposition des donneurs 1, 2, 3, 5 et 6. Seul le développement plus lent du stade squelettique chez le donneur 3 et celui plus long du stade gonflé chez le donneur 6 diffèrent. Globalement, les stades commencent à des valeurs de ADD similaires et connaissent des durées semblables malgré l'installation des donneurs sur le site de REST[ES] à des saisons différentes. Il est donc intéressant de constater que malgré l'observation de caractéristiques différentes chez chacun des donneurs, les stades de décomposition semblent évoluer de manière comparable et selon une certaine séquence, à des moments relativement précis.

En ce qui concerne le donneur 4, l'évolution de sa décomposition se démarque par rapport à celle des autres donneurs principalement par l'absence de deux stades (gonflé et squelettique) et la relativement courte durée du stade actif. Ce dernier, en plus d'être bref, ne suit pas le même ordre d'apparition que chez les autres donneurs. Cette importante différence au sein du processus de décomposition pourrait être liée aux températures plus froides qui ont pu modifier l'évolution « attendue » de la décomposition telle que décrite à la section 4.2.4. Les températures froides peuvent expliquer en partie les observations rapportées dans cette étude, mais d'autres facteurs importants pourraient être à l'origine des différences observées. En effet, le donneur 3 a lui aussi été soumis à des températures froides et pourtant sa décomposition globale est comparable à celle des autres donneurs. Deux éléments majeurs peuvent avoir affecté le processus de décomposition du donneur 4 outre les températures. D'abord, suivant la fonte des neiges, ce donneur s'est retrouvé dans l'eau pendant deux semaines en raison de son positionnement topographique sur le site. Les membres inférieurs étaient alors complètement submergés et les membres supérieurs ainsi que le tronc ont aussi été en contact avec l'eau. Comme mentionné (Section 4.2.4), la décomposition en milieu aquatique n'est pas comparable à celle en milieu terrestre (Stuart et Ueland, 2017). Il est donc possible que l'immersion temporaire de ce donneur ait eu un impact significatif sur les modes et vitesses de décomposition. Le second élément particulier au donneur 4 était son indice de masse corporelle (IMC) (Tableau 2.2). Ce donneur présentait une obésité, cas isolé au sein des donneurs analysés dans cette étude. Comme discuté à la section 1.5.1, une masse corporelle élevée pourrait ralentir la vitesse de décomposition d'un individu selon plusieurs études (Ferreira et Cunha, 2013; Zhou et Byard, 2011; Spicka et al., 2011; Matuszewski et Konwerski, 2014) ce qui est d'ailleurs observé pour ce donneur. Cependant, aucun consensus clair n'a été émis à ce sujet. En bref, les températures froides, la décomposition partielle dans l'eau ainsi que l'IMC élevé du donneur 4 sont trois éléments importants qui distinguent la décomposition de ce donneur de celle des autres donneurs de cette étude (1, 2, 3, 5 et 6). Les multiples différences observées chez le donneur 4 pourraient donc être attribuables à une combinaison complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Cette observation souligne encore davantage l'importance de mener des études complémentaires sur la décomposition dans le climat canadien, et particulièrement dans le sud du Québec, sur un plus grand éventail de donneurs afin d'être en mesure d'émettre des conclusions claires et de valider ou invalider les hypothèses soulevées dans cette étude.

CHAPITRE 5

ANALYSES QUANTITATIVES

Suivant l'élaboration, l'optimisation et la validation des méthodes d'extraction et d'analyse des acides gras par GC-MS (Chapitre 3), les échantillons de tissus mous collectés à l'aide d'une aiguille de biopsie dans le torse et les cuisses des donneurs disposés sur le site de REST[ES] ont été analysés. Les résultats et les conclusions obtenus sont présentés dans ce chapitre. La chimiométrie a d'ailleurs été appliquée aux jeux de données obtenues afin d'évaluer les similitudes et les différences entre les paires (donneurs étudiés lors d'une même saison (Tableau 2.2)), mais aussi entre les six donneurs étudiés. Enfin, rappelons que pour rendre les acides gras suffisamment volatils, ces derniers ont été transformés en esters silylés d'acide gras. Afin d'alléger la lecture, les acides gras triméthylsylilés (TMS) seront désignés par « acides gras » dans l'ensemble du chapitre.

5.1 Échantillons analysés

Au total, plus de 600 échantillons ont été collectés, soit une centaine par donneur. Considérant la quantité importante de matériel à analyser, des tests ont été réalisés afin de réduire la quantité d'échantillons tout en permettant d'observer les variations de concentrations des acides gras.

Tout d'abord, les concentrations en acide gras mesurées entre les tissus mous provenant des côtés droit et gauche du torse et des cuisses du donneur 1 ont été comparées afin d'évaluer l'homogénéité de distribution des acides gras. Un total de 12 échantillons a été analysé soit trois par zone d'échantillonnage couvrant l'ensemble des stades de décomposition rencontrés (Torse : Jours 0, 14 et 42; Cuisses : Jours 0, 14 et 32). Les concentrations moyennes pour chaque acide gras ont permis la réalisation de graphiques d'interactions (Figure 5.1). Ce type de graphique permet de comprendre la relation entre deux variables catégoriques et une mesure continue (Scherrer, 2007). Ces graphiques permettent l'identification rapide des interactions entre les variables et l'identification de tendances (« patterns ») et différences. Pour les graphiques présentés à la figure 5.1, la zone d'échantillonnage (To = Torse; Cu = Cuisse), en abscisses, et le côté échantillonné (Droit = rouge; gauche = bleu), représentées par les couleurs, ont été étudiées afin d'évaluer les éventuelles différences. L'ordonnée représente les valeurs de concentrations mesurées (ppm).



Figure 5.1 Graphiques d'interaction des acides gras du donneur 1 des quatre zones de prélèvement, soit le côté droit et gauche du torse et la cuisse.

En observant les graphiques d'interaction produits, il est possible de conclure qu'il n'y a pas de différence importante entre les régions anatomiques (To et Cu) et les côtés (droit et gauche) pour le donneur 1. À l'exception de l'acide laurique (cuisses (Cu) seulement), les valeurs moyennes des concentrations sont similaires pour tous les acides gras. La proximité, voire la superposition des lignes de chaque graphique d'interaction présenté à la figure 5.1, témoigne de cette similarité. Effectivement, lorsque les lignes sont parallèles, il y a peu ou pas d'interaction. À l'inverse, plus les lignes se croisent et/ou ont des pentes abruptes, plus les interactions sont fortes (Scherrer, 2007). Dans le cas de l'acide laurique, la différence se situe principalement pour les échantillons droits et gauches des cuisses. Pour le torse, les moyennes de chaque côté sont presque superposées indiquant une similitude des concentrations des échantillons provenant de ces deux sites de prélèvements (torse droit et gauche). Il est donc possible d'affirmer qu'il n'y a globalement pas de différence significative entre les six échantillons de tissus mous analysés pour le donneur 1, et ce pour tous les acides gras étudiés. La distribution des acides gras contenus dans les triglycérides des lipides du corps semble donc homogène autant pour le côté que la région anatomique étudiée. Afin de valider ces conclusions, des tests statistiques supplémentaires ont été réalisés.

Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée afin de confirmer les conclusions tirées des graphiques d'interactions de la figure 5.1. Ce type d'analyse statistique permet, entre autres, de déterminer si les moyennes de différents groupes diffèrent significativement (Rutherford, 2011). Concrètement, il a été possible d'évaluer la présence de différences entre les concentrations moyennes des échantillons provenant des régions anatomiques (torse et cuisses), des côtés (droit et gauche) et même les interactions entre les régions anatomiques et les côtés. Afin de sélectionner le type d'ANOVA le mieux adapté au jeu de données, des tests doivent être réalisés pour s'assurer que celui-ci répond aux hypothèses sur lesquelles s'appuie l'ANOVA. Des tests de normalité et d'homogénéité de variance ont donc été effectués. En premier lieu, le test de normalité Shapiro-Wilk a été effectué. Ce type de test permet de vérifier la distribution normale des données. Les valeurs de p obtenues pour sept des neuf acides gras sont supérieures à 0,05 (Annexe I) indiquant la normalité dans la distribution des données pour la majorité des acides gras. Un second test a été effectué avec le même jeu de données, soit le test d'homogénéité de variance de Levene. Celui-ci permet d'évaluer si la variance observée dans un groupe est statistiquement significativement différente. Pour tous les acides gras, les valeurs de p obtenues sont supérieures à 0,05 (Annexe I) indiquant l'homogénéité de la variance des données. Suivant les résultats de ces tests, il est possible de confirmer que le jeu de données respecte les hypothèses sur lesquelles une ANOVA classique à deux facteurs est fondée (Tableau 5.1).

Acide gras	Côté	Région	Côté: Région		
Acides gras saturés					
Acide laurique	0,6763	0,7834	0,7483		
Acide myristique	0,8009	0,8917	0,9674		
Acide palmitique	0,8390	0,8255	0,9596		
Acide stéarique	0,9795	0,7883	0,9738		
Acide arachidique	0,9805	0,9412	0,9845		
Acide gras insaturés					
Acide myristoléique	0,9077	0,880	0,9680		
Acide palmitoléique	0,8354	0,5508	0,8557		
Acide oléique	0,8765	0,7585	0,9747		
Acide linoléique	0,7945	0,8554	0,8515		

Tableau 5.1 Résultats d'une ANOVA classique à deux facteurs pour les échantillons de tissus mous des quatre zones de prélèvement du donneur 1

Pour ce type d'ANOVA, les valeurs de p inférieures ou égales à 0,05 démontrent la présence de différences statistiquement significatives. Toutes les valeurs de p dans le tableau 5.1 sont supérieures à ce seuil, indiquant qu'il n'y a pas de différence significative entre les régions anatomiques (torse et cuisses) ni entre les côtés (gauche et droit). Ces résultats confirment les conclusions issues de l'analyse des graphiques d'interactions. La répartition des acides gras dans les tissus mous des quatre zones d'échantillonnage du donneur 1 peut être considérée comme homogène, et ce tout au long du processus de décomposition. Cette constatation a également été observée pour tous les autres donneurs lors de l'analyse des tissus mous collectés (Sections 5.4 et 5.6).

Suivant ces tests statistiques, il a été décidé que les échantillons prélevés n'allaient pas tous être analysés. Pour chaque jour expérimental (JE) étudié, deux des quatre échantillons prélevés ont été analysés. Malgré l'homogénéité apparente de la distribution des acides gras dans les tissus mous, il semblait plus judicieux d'analyser au moins deux échantillons par jour de collecte en raison du nombre limité d'échantillons (n = 12) analysés pour effectuer les tests statistiques et l'extrapolation des résultats provenant d'un seul donneur à tous les autres donneurs. Considérant que la distribution anatomique des gras dans le corps peut varier d'une personne à l'autre et qu'un corps n'est pas toujours retrouvé dans son ensemble, l'étude de deux régions anatomiques (torse et cuisse) a été favorisée à celle des côtés (gauche et droit). Le côté gauche a arbitrairement été sélectionné pour tous les donneurs. Bien que ce processus ait permis de réduire de moitié le nombre total d'échantillons à analyser, l'analyse de plus de 50 échantillons par donneur aurait représenté une durée d'étude et des coûts supérieurs aux contraintes temporelles et budgétaires de ce projet de recherche. Une approche d'analyse complémentaire a donc été mise en place pour réduire davantage le nombre d'échantillons à analyser. L'analyse d'échantillons par intervalle a été choisie et des analyses complémentaires ont par la suite été effectuées lorsque des valeurs différaient nettement de la valeur mesurée juste avant et de celle mesurée juste après (valeurs aberrantes). Par exemple, lorsque des concentrations très basses étaient mesurées alors qu'une tendance à la hausse était observée dans un certain intervalle. Si des valeurs semblant aberrantes étaient rencontrées, elles n'étaient pas exclues pour autant. Effectivement, le processus de décomposition étant variable et grandement influencé par une multitude de facteurs (Section 1.5), aucune valeur ne fut exclue. Celles-ci font partie intégrante du phénomène et doivent donc être prises en considération.

Le tableau J.1 de l'annexe J présente les échantillons analysés pour chaque donneur. En moyenne, une vingtaine d'échantillons ont été analysés par donneur en s'assurant de couvrir chaque stade de décomposition (Tableau 2.1). À noter que le dernier échantillon prélevé au niveau du torse pour le donneur 5 est différent de celui pour la cuisse en raison de la liquéfaction complète des tissus mous du torse et/ou de leur dégradation par les charognards invertébrés. La fin de la période d'échantillonnage est la même pour les deux régions anatomiques de tous les autres donneurs.

5.2 Concentrations observées des acides gras

Suivant l'analyse par GC-MS des tissus mous collectés, certaines conclusions générales ont pu être réalisées en ce qui a trait aux concentrations de chaque acide gras. Pour tous les donneurs, certains acides gras sont retrouvés en plus grande quantité. Pour les acides gras saturés, il s'agit des acides palmitique et stéarique. Les acides palmitoléique, oléique et linoléique sont les plus importants chez les acides gras insaturés. Les valeurs de concentrations maximales observées sont supérieures à 100 ppm et atteigne jusqu'à 800 ppm pour les acides palmitique et oléique chez certain donneur. Il s'agit d'ailleurs des mêmes acides gras que ceux identifiés dans la littérature comme étant les plus abondants dans les triglycérides des tissus adipeux (Notter *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1960). De plus, bien que les unités de mesure utilisées soient différentes, les tendances observées quant à l'abondance des différents acides gras sont les mêmes que celles rapportées par Ueland *et al.* (2021).

Les concentrations observées pour tous les acides gras entre chaque individu sont similaires de manière générale. Bien entendu, les acides gras présentant les concentrations les plus élevées sont aussi ceux où les variations les plus importantes sont rencontrées entre les donneurs. Cependant, les concentrations en acides gras peuvent être considérées comme étant assez semblables d'un individu à l'autre considérant les différents facteurs intrinsèques rencontrés tels le sexe, l'âge, le poids et la cause du décès (Tableau 2.2). Les quelques dissimilitudes observées peuvent aussi être expliquées par des différences en ce qui a trait au processus de décomposition. Cette similarité entre les donneurs est aussi observée entre les régions anatomiques d'un même individu. Bref, cette similitude des concentrations des acides gras est un élément important pour l'utilisation potentielle de ceux-ci à titre de biomarqueurs de l'IPM. Ces observations générales seront présentées en détail dans les sections suivantes lors de l'étude des variations des concentrations dans le temps et grâce à la chimiométrie.

5.3 Variations des concentrations dans le temps

Les tissus mous échantillonnés sur le site de REST[ES] ont été analysés en laboratoire afin d'évaluer les concentrations en acide gras contenues dans ceux-ci tout au long du processus de décomposition. Pour ce faire, des graphiques de concentrations dans le temps ont été produits afin de mettre en évidence les variations de concentrations et ainsi potentiellement identifier la présence de tendances (« patterns ») en fonction de l'IPM. L'axe des abscisses présente les valeurs de ADD alors que les concentrations en ppm sont retrouvées sur l'axe des ordonnées. Les résultats obtenus sont présentés dans la section suivante. Les donneurs ont une fois de plus été séparés en paire selon les saisons (donneurs 1 et 2, donneurs 3 et 4 et donneurs 5 et 6). Des analyses individuelles et des comparaisons entre donneurs seront présentées.

5.3.1 Donneur 1

Tout d'abord, les échantillons provenant du donneur 1 ont été analysés. Les graphiques obtenus pour les deux régions anatomiques à l'étude sont présentés à la figure 5.2.



Figure 5.2 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 1.

En observant les concentrations des acides gras contenus dans les tissus mous provenant du torse, la majorité présente une augmentation significative de leur concentration vers 300 ADD (JE 14). Seuls les acides arachidique et myristoléique font exception, avec une augmentation de concentration à des valeurs de ADD plus basses (200 ADD; JE 9). La valeur de 300 ADD (JE 14) correspond à la fin des stades gonflé et actif, tout juste avant le stade de dessiccation. Cette augmentation rapide des concentrations est représentative de la libération des acides gras suivant l'hydrolyse des triglycérides. Cette réaction biochimique est généralement attendue lors des stades gonflé et actif (Pfeiffer *et al.*, 1998). Par la suite, les concentrations augmentent jusqu'à atteindre un sommet à 660 ADD (JE 42) pour tous les acides gras. Cette valeur correspond aux stades de dessiccation et squelettique (seulement pour le visage). L'hydrolyse se poursuivrait donc durant ces stades de décomposition. Par la suite, une diminution des concentrations est observée pour tous les acides gras. Elle est d'autant plus importante pour les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique. Il est donc possible que ce moment marque la fin de la liquéfaction interne des tissus mous.

La diminution des concentrations pour tous les acides gras provenant du torse est aussi un signe qu'il ne semble pas y avoir eu d'hydrogénation des acides gras insaturés. En effet, suivant l'hydrolyse des triglycérides, les concentrations de tous les acides gras devraient augmenter puis une diminution des concentrations pour les acides gras insaturés devrait être observée en raison de l'augmentation des concentrations pour leurs analogues saturés (p. ex., l'hydrogénation des acides oléique et linoléique menant à la formation de l'acide stéarique). Ce phénomène n'est pas observé sur les graphiques présentés. Dans l'ensemble, les courbes pour tous les acides gras sont similaires. Certains acides gras présentent cependant des variations de concentrations plus importantes tels les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique. À ce titre, ceux-ci pourraient potentiellement être de meilleurs indicateurs de l'IPM.

Concernant les acides gras provenant des tissus mous de la cuisse gauche du donneur 1, les courbes présentées à la figure 5.2 sont similaires à celles du torse. Cependant, l'augmentation rapide des concentrations ainsi que les concentrations maximales ont été atteintes plus rapidement à l'exception de l'acide myristique. À 200 ADD (JE 9), soit au moment où les stades de décomposition gonflé et actif étaient à leur maximum, les concentrations des acides gras ont subi une augmentation très nette. Il s'agit d'un élément particulier puisque ces stades de décomposition se développent généralement plus rapidement

pour l'abdomen. Les concentrations maximales ont par la suite été atteintes entre 550 et 600 ADD (JE 31 et 36). À ce moment, le corps était au stade de dessiccation dans son ensemble.

Un des éléments importants des courbes de la cuisse gauche est l'observation du phénomène d'hydrogénation des acides gras insaturés. Suivant une diminution des concentrations après l'atteinte d'un sommet autour de 600 ADD (JE 36), les acides gras saturés, plus particulièrement l'acide palmitique et stéarique, présentent une seconde augmentation de leur concentration. La concentration de leurs analogues insaturés (p. ex. les acides palmitoléique, oléique et linoléique) diminue de manière importante. L'acide stéarique présente même sa valeur de concentration la plus élevée à la fin de la période d'étude (965 ADD; JE 70). Considérant que l'hydrogénation de deux acides gras insaturés mène à la formation de l'acide stéarique, il semble logique que les concentrations soient plus élevées.

Malgré les quelques différences observées entre les deux régions anatomiques (torse et cuisse), les deux courbes pour chaque acide gras sont relativement similaires au niveau des concentrations. De plus, une augmentation importante est observée au départ, signe de l'hydrolyse des triglycérides durant les stades gonflé et actif. Par la suite, un sommet est atteint avant une diminution des concentrations. La différence majeure est la seconde augmentation des concentrations pour les acides gras saturés des échantillons collectés dans la cuisse, indiquant l'hydrogénation des acides gras saturés qui n'est pas observée pour les échantillons provenant du torse.

5.3.2 Donneur 2

Les échantillons de tissus mous collectés dans le torse et la cuisse gauche du donneur 2 ont aussi été analysés afin d'évaluer les concentrations de chaque acide gras cible. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 5.3.



Figure 5.3 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 2.

Pour les échantillons provenant du torse, une première augmentation des concentrations est observée à 200 ADD (JE 9) correspondant à la fin du stade gonflé et au maximum du stade actif. Les concentrations maximales pour la majorité des acides gras sont atteintes autour de 330 ADD (JE 16), soit au moment où l'ensemble du corps était au stade de dessiccation. Par la suite, les acides présentent soit une faible augmentation jusqu'à la fin de l'étude ou l'atteinte d'un plateau. Il n'y a donc pas d'indication d'hydrogénation des acides gras insaturés.

Pour les échantillons provenant de la cuisse, une augmentation rapide des concentrations est présente à 200 ADD (JE 9) soit au même moment que les échantillons du torse. Par la suite, les concentrations diminuent graduellement après l'atteinte des concentrations maximales autour de 300 ADD (JE 14), soit vers la fin du stade actif. Il n'y a pas non plus de signe d'hydrogénation pour ces acides gras insaturés.

Dans l'ensemble, les concentrations pour chaque acide gras sont comparables entre les régions anatomiques. De plus, l'hydrolyse des triglycérides semble s'être produite au même moment pour le torse et la cuisse. Bien que les courbes présentent certaines dissimilitudes entre elles pour une même région anatomique, elles sont relativement similaires pour un même acide gras provenant des deux régions (torse et cuisse). La différence principale réside dans la diminution des concentrations pour la cuisse alors que l'on observe plutôt l'atteinte de plateaux pour le torse suivant l'augmentation des concentrations à 200 ADD (JE 9). Dans les deux cas, certains acides gras semblent être des biomarqueurs potentiels plus intéressants, soit les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique étant données leurs variations de concentration plus importantes dans le temps.

5.3.3 Comparaison entre les donneurs 1 et 2

Suivant l'analyse individuelle des concentrations des acides gras présents dans les tissus mous des deux régions anatomiques (torse et cuisse) des donneurs 1 et 2, une comparaison peut être réalisée. Celle-ci a permis d'identifier d'éventuelles similitudes entre deux donneurs déposés durant une même saison (été 2020). Pour ce faire, les courbes de chaque acide gras cible retrouvé dans les tissus du torse des donneurs 1 et 2 ont été rassemblées en un même graphique présenté à la figure 5.4. Le même exercice a été réalisé avec les courbes produites suivant l'analyse des tissus mous de la cuisse gauche de chaque donneur (Figure 5.5).



Figure 5.4 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse sur toute l'étude pour les donneurs 1 et 2 (été 2020).

En observant les graphiques présentés à la figure 5.4, la différence principale est le moment où l'hydrolyse des triglycérides se produit. L'augmentation des concentrations pour le donneur 2 est plus rapide (200 ADD; JE 9) que pour le donneur 1 (300 ADD; JE 14) à l'exception des acides arachidique et myristoléique qui se produisent au même moment pour les deux donneurs. Cette différence est d'autant plus surprenante puisque les deux donneurs ont atteint les stades gonflé et actif quasi simultanément soit autour de 100 ADD (Figure 4.2). Le donneur 1 avait même atteint le stade gonflé un peu plus tôt que le donneur 2. Il en va de même pour les concentrations maximales qui sont atteintes à des valeurs de ADD beaucoup plus élevées pour le donneur 1 (600 ADD; JE 35) en comparaison au donneur 2 (330 ADD; JE 16).

Une seconde différence se retrouve dans les valeurs de ADD plus élevées. D'abord, pour le donneur 1, les courbes présentent toutes l'atteinte d'un seul sommet de concentrations au même moment (600 ADD; JE 35) suivi d'une diminution des concentrations. Cela n'est cependant pas observé pour le donneur 2. La présence de deux plus petits sommets de concentrations à des valeurs de ADD plus ou moins similaires est plutôt observée. Par la suite, les concentrations des acides gras ont légèrement augmenté ou stagné et atteint un plateau. Ces différences contrastent avec la similitude observée visuellement lors de la décomposition de ces deux donneurs (Sections 4.2.1 et 4.2.2).

Malgré ces différences importantes entre les courbes des acides gras, il semble y avoir quelques éléments similaires entre les deux donneurs. L'un des premiers éléments intéressants est l'augmentation des concentrations des acides arachidique et myristoléique qui se produisent au même moment pour les deux donneurs (200 ADD). Les concentrations passent de zéro à leur valeur de concentration maximale très rapidement. Ce moment pourrait donc être le signe du début de l'hydrolyse des triglycérides. De plus, à 200 ADD (JE 9 pour les deux donneurs), les donneurs présentaient les stades de décomposition gonflé et actif qui sont généralement associés au processus d'hydrolyse. Ces deux acides gras pourraient donc être pertinents pour identifier le début de l'hydrolyse des triglycérides and cêtre de triglycérides.

Un autre élément similaire entre les deux donneurs est la concentration des acides gras. En effet, bien qu'il s'agisse de deux individus différents, les concentrations mesurées pour tous les acides sont similaires tant pour les valeurs de départ que les concentrations maximales atteintes. Il est donc possible que les concentrations en acides gras d'individus d'un même sexe soient semblables malgré des facteurs intrinsèques différents tels l'âge, le poids et la cause du décès (Tableau 2.2).

En somme, malgré les différences rencontrées, la tendance (« pattern ») d'évolution des concentrations des acides gras dans le temps en fonction des stades de décomposition observés est similaire. Une augmentation rapide de la concentration des acides gras se produit suivant l'hydrolyse des triglycérides durant les stades de décomposition gonflé et actif jusqu'à l'atteinte d'un sommet durant le stade de dessiccation. Les concentrations sont aussi dans le même ordre de grandeur pour chaque acide gras étudié et varient de manière similaire. Considérant qu'il s'agisse de tissus mous provenant de deux individus différents, les différences observées ne sont pas majeures.



Figure 5.5 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la cuisse sur toute l'étude pour les donneurs 1 et 2 (été 2020).
Concernant les échantillons provenant de la cuisse gauche des donneurs 1 et 2, des conclusions similaires peuvent être tirées. Dans le cas des courbes présentées à la figure 5.5, les similitudes sont d'autant plus marquées que celles de la figure 5.4. En effet, l'hydrolyse des triglycérides semble avoir eu lieu au même moment pour la majorité des acides gras (laurique, palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique) soit autour de 200 ADD (JE 9) pour les deux donneurs. Cette augmentation est suivie de l'atteinte d'un sommet puis d'une diminution des concentrations. Les acides palmitique et stéarique font exception à cette dernière observation pour le donneur 1 où une seconde augmentation se produit possiblement dû à l'hydrogénation des acides gras insaturés. Ce phénomène n'est pas observé chez le donneur 2.

Un autre élément intéressant entre les deux courbes de chaque acide gras est la présence d'un pic d'augmentation des concentrations autour de 640 ADD (JE 39), observé chez les deux donneurs qui est présent au même moment pour tous les acides gras. L'identification de ce phénomène n'a pas été possible en raison de l'état limité des connaissances actuelles sur le sujet. À ce moment, les deux donneurs étaient aux stades de dessiccation et squelettique.

Enfin, les concentrations sont une fois de plus dans le même ordre de grandeur à l'exception de l'acide palmitoléique où une différence majeure est observée potentiellement dues aux concentrations différentes trouvées dans les triglycérides de chaque individu.

Dans l'ensemble, les courbes des acides gras de chaque donneur sont similaires pour les deux régions anatomiques étudiées et particulièrement pour la cuisse. La décomposition biochimique des triglycérides est donc comparable entre les donneurs de l'été 2020 tout comme les changements morphologiques extérieurs observés lors de la décomposition. Certains acides gras semblent ainsi être plus intéressants que d'autres afin d'estimer l'IPM. Par exemple, les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique pourraient être utiles à titre de biomarqueurs pour l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) vu les variations de concentrations importantes observées. Les acides arachidique et myristoléique peuvent quant à eux être utilisés pour déterminer le début de l'hydrolyse des triglycérides et donc le passage d'un corps vers les stades gonflé et actif. Le manque de variations dans les concentrations des acides laurique et myristique les rend moins intéressants à titre de biomarqueurs pour estimer l'IPM.

5.3.4 Donneur 3

Suivant l'analyse des variations de concentrations des acides gras contenus dans les tissus mous des donneurs 1 et 2 déposés sur le site de REST[ES] à l'été 2020, la même approche a été effectuée pour le donneur 3, l'un des deux donneurs déposés à l'automne 2020. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 5.6.



Figure 5.6 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 3.

En observant les courbes des acides gras provenant des tissus mous du torse, une première augmentation des concentrations vers 100 ADD (JE 7) est visible. À ce moment, le corps était au début du stade gonflé caractérisé par l'apparition d'une coloration verte sur l'abdomen. Le début de l'hydrolyse des triglycérides aurait donc eu lieu à ce moment. Un premier maximum des concentrations a été atteint à environ 270 ADD (JE 33) soit durant le stade gonflé et au début du stade actif pour le thorax et l'abdomen. Une diminution des concentrations est par la suite observée jusqu'au dernier jour d'échantillonnage à l'automne 2020, soit à 367 ADD (JE 50), pour tous les acides gras. Aucun échantillon n'a été prélevé durant l'hiver (Section 4.2.3).

Une seconde augmentation des valeurs de concentrations est ensuite observée à 821 ADD (JE 226) correspondant à la première collecte d'échantillon au printemps 2021. Les concentrations sont soit égales ou supérieures aux valeurs maximales atteintes à l'automne. À ce moment, le corps était aux stades de dessiccation et squelettique. Il semble donc que l'hydrolyse des triglycérides et, de manière générale, le processus de décomposition se soient poursuivis sous la neige, durant l'hiver. Cependant, une différence de plus de 450 ADD est observée entre la dernière collecte d'échantillons à l'automne 2020 et la première au printemps 2021. Il est donc possible que l'hydrolyse des triglycérides se soit produite entre la fonte des neiges et la première collecte au printemps. Il n'est donc pas possible d'affirmer que l'hydrolyse des triglycérides s'est poursuivie lorsque les températures ambiantes étaient inférieures à zéro degré Celsius.

Par la suite, les courbes présentent une légère augmentation de leur concentration jusqu'à la fin de l'étude. Une augmentation plus importante est observée à 1690 ADD (JE 275), mais celle-ci pourrait être liée à la faible quantité d'échantillons analysés durant cette période (3 échantillons de 1400 à 1800 ADD). Il pourrait donc s'agir d'une valeur aberrante qui fait partie intégrante de la décomposition étant donnée, la nature non contrôlée des facteurs influençant la décomposition. En somme, les concentrations mesurées au printemps 2021 sont restées relativement constantes pour tous les acides gras (atteinte de plateaux). Cela concorde aussi avec les phénomènes observés visuellement puisque le corps n'a pas changé de stade ni d'apparence de manière significative suivant la première collecte d'échantillons au printemps 2021. Enfin, aucun signe d'hydrogénation n'a été observé pour les acides gras insaturés.

Concernant les acides gras présents dans les tissus mous de la cuisse gauche du donneur 3, les mêmes conclusions peuvent être tirées. De manière générale, les courbes de ces deux régions anatomiques sont assez similaires. Les concentrations et l'allure des courbes sont comparables pour chaque acide gras.

5.3.5 Donneur 4

Les courbes représentant les variations de concentrations dans le temps des acides gras retrouvés dans les tissus mous du torse et de la cuisse gauche du donneur 4 sont présentées à la figure 5.7.



Figure 5.7 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute la période d'étude pour le donneur 4.

En observant les courbes des acides gras contenus dans les tissus mous du torse du donneur 4, il est possible de constater un léger pic des concentrations entre 0 et 280 ADD (JE 0 et JE 43) pour la majorité d'entre eux. Cette faible augmentation des concentrations sur l'ensemble de la période d'échantillonnage de l'automne 2020 concorde avec l'observation d'un stade frais relativement long et l'absence de signe visuel caractéristique des stades gonflé et actif. Un faible maximum des concentrations est atteint à 180 ADD (JE 25), soit lors du début de la dessiccation du thorax et des jambes du donneur. L'hydrolyse pourrait donc avoir débuté quelques jours avant cette période bien que les stades gonflé et actif n'aient pas été visuellement observés.

De plus, les concentrations de l'acide arachidique, qui semblent généralement être un bon indicateur du début du processus d'hydrolyse, ne révèle aucune augmentation des concentrations durant cette période. Elle a plutôt eu lieu entre la dernière collecte d'échantillons à l'automne 2020 (278 ADD; JE 43) et la première collecte au printemps 2021 (731 ADD; JE 219). Une augmentation majeure des concentrations de tous les autres acides gras est d'ailleurs observée au même moment. Cette différence importante entre les concentrations pourrait indiquer la poursuite de la décomposition durant l'hiver. Cependant, une différence de plus de 450 ADD a été notée. La décomposition pourrait donc s'être produite durant les premières journées du printemps plutôt qu'à des températures inférieures à zéro degré Celsius. Il n'est donc pas possible de déterminer si l'hydrolyse des triglycérides s'est produite durant la période hivernale.

Enfin, l'augmentation des concentrations se poursuit graduellement jusqu'à atteindre un sommet autour de 2140 ADD (JE 296). Ce moment correspond d'ailleurs au stade de dessiccation, mais aussi au moment où la liquéfaction des tissus mous semblait achevée (corps d'apparence « dégonflé »). Les concentrations de tous les acides gras diminuent par la suite. Il n'y a donc pas de signe d'hydrogénation des acides gras insaturés.

Pour les acides gras provenant des tissus mous de la cuisse, certaines courbes présentent une faible augmentation des concentrations entre 0 et 280 ADD (JE 0 et JE 43), alors que d'autres présentent des augmentations plus importantes ou nulles. Il est donc difficile de déterminer si l'hydrolyse des triglycérides a effectivement commencé durant la période de collecte d'échantillon à l'automne 2020. L'un des éléments pouvant indiquer l'absence d'hydrolyse est l'acide arachidique dont les concentrations sont passées de zéro à environ 35 ppm entre l'automne 2020 et le printemps 2021. Le début du processus d'hydrolyse aurait donc potentiellement eu lieu entre 278 ADD (JE 43) et 731 ADD (JE 219) comme pour le

torse. Une fois de plus, cette dégradation des triglycérides n'a pas nécessairement eu lieu durant l'hiver, mais peut s'être produite au début de printemps 2021, avant les premières collectes d'échantillons.

Les concentrations mesurées lors de la première collecte d'échantillon au printemps 2021 (731 ADD; JE 219) sont plus élevées ou égales à celles à l'automne 2020 à l'exception des acides myristoléique et palmitoléique. Ces deux derniers acides gras présentent d'ailleurs des courbes distinctes des autres. Cela pourrait entre autres être expliqué par la nature imprévisible de l'étude de matériel biologique. Une augmentation graduelle des concentrations est ensuite observée jusqu'à l'atteinte d'un sommet des concentrations à 1730 ADD (JE 275), soit au moment où la décomposition active s'est terminée (Figure 4.3). Par la suite, une petite diminution suivie d'une augmentation sont observées sans signe d'hydrogénation des acides gras insaturés.

Dans l'ensemble, en comparant les courbes des acides gras de chaque région anatomique, les concentrations mesurées sont dans un même ordre de grandeur. De plus, l'allure des courbes est assez semblable, soit une augmentation graduelle des concentrations jusqu'à la fin de la période d'échantillonnage avec l'atteinte d'un sommet au moment où la liquéfaction complète des tissus semble avoir eu lieu. Seules les courbes de l'acide myristoléique présentent des différences plus importantes surtout au début de l'étude (entre 0 et 500 ADD) qui peut être expliquée par la variabilité inhérente à l'étude de tissus humains.

5.3.6 Comparaison des donneurs 3 et 4

Une comparaison de l'évolution des concentrations des acides gras contenus dans les tissus mous des donneurs 3 et 4 a été réalisée. Les courbes des acides gras du torse et celles de la cuisse gauche sont présentées dans les figures 5.8 et 5.9, respectivement.



Figure 5.8 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse sur toute l'étude pour les donneurs 3 et 4 (automne 2020 et printemps 2021).

Tout d'abord, en observant les courbes des acides gras contenus dans les tissus mous des donneurs 3 et 4, il est possible d'affirmer que l'hydrolyse des triglycérides s'est produite beaucoup plus tôt pour le donneur 3. En effet, en observant tous les acides gras et plus particulièrement l'acide arachidique, une augmentation claire est présente à 150 ADD (JE 12). Les premiers signes d'hydrolyse pour le donneur 4 sont quant à eux beaucoup plus tardifs, soit vers 731 ADD (JE 219). Il s'agit d'une différence d'environ 600 ADD. Le début de l'hydrolyse pourrait cependant avoir eu lieu plus tôt pour le donneur 4 puisque la valeur de 731 ADD (JE 219) correspond au premier échantillonnage au printemps. Tel que mentionné précédemment (donneur 4), ce processus biochimique pourrait avoir débuté avant le premier échantillonnage au printemps 2021.

En excluant le premier pic d'augmentation des concentrations observé pour le donneur 3 à 270 ADD (JE 33), les courbes de chaque acide gras ont une allure similaire entre les donneurs. Une différence majeure des concentrations entre les derniers échantillons collectés à l'automne 2020 et les premiers au printemps 2021 est apparente. Cela est suivi d'une augmentation graduelle des concentrations se terminant par une petite diminution à la fin de la période d'échantillonnage. De plus, aucun signe d'hydrogénation des acides gras insaturés n'est observable pour les deux donneurs.

L'évolution similaire des concentrations des acides gras présents dans les tissus mous du torse des donneurs 3 et 4 contraste avec leur décomposition visuelle respective. En effet, le donneur 3 a rencontré tous les stades de décomposition dans l'ordre présenté au tableau 2.1. Pour le donneur 4, les stades gonflé et squelettique n'ont jamais été observés pendant la durée de l'étude et le stade actif s'est produit bien après le début du stade de dessiccation. Cependant, l'un des éléments similaires dans la trajectoire de décomposition de ces deux donneurs est le passage complet des corps au stade de dessiccation après l'hiver. C'est d'ailleurs à ce moment que les courbes évoluent de manière semblable (821 ADD; JE 226 pour le donneur 3 et 730 ADD; JE 219 pour le donneur 4). Leur processus de décomposition après le dégel serait donc semblable visuellement et biochimiquement malgré les différences observées à l'automne.

Les concentrations sont aussi dans les mêmes ordres de grandeur à l'exception des acides laurique et palmitique. Cela pourrait être attribuable aux différences dans la composition des triglycérides entre deux individus. D'ailleurs, en considérant le poids et l'âge de ces donneurs (Tableau 2.2), il est surprenant d'obtenir des concentrations aussi similaires vues les écarts importants. À première vue, l'âge, le poids,

la cause du décès et les régions anatomiques ne semblent donc pas avoir d'impact significatif sur la distribution des acides gras dans les triglycérides.

Enfin, il est, ici aussi, possible d'identifier certains acides gras pertinents. Les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique varient en concentration de manière plus importante durant le processus de décomposition. Il pourrait donc s'agir de potentiels biomarqueurs pour estimer l'intervalle post mortem (IPM). L'acide arachidique semble, quant à lui, être utile pour marquer le début de l'hydrolyse des triglycérides. Normalement, cela indiquerait donc la transition d'un corps vers les stades gonflé et actif, mais cela ne s'avère pas toujours le cas comme constaté avec le donneur 4. Les changements biochimiques internes ne sont pas nécessairement corroborés par des changements morphologiques extérieurs clairs.



Figure 5.9 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la cuisse sur toute l'étude pour les donneurs 3 et 4 (automne 2020 et printemps 2021).

La figure 5.9 présente les courbes des acides gras provenant des tissus mous de la cuisse des donneurs 3 et 4. Une fois de plus, l'hydrolyse des triglycérides a débuté beaucoup plus tôt chez le donneur 3 soit vers 100 ADD (JE 7). Pour le donneur 4, le début de cette réaction biochimique aurait donc potentiellement eu lieu entre 280 ADD (JE 43) et 731 ADD (JE 219) tel que mentionné lors de l'analyse des graphiques du donneur 4. Une différence allant de 200 ADD à plus de 600 ADD est donc observée entre ces deux donneurs.

Bien que les courbes présentées à la figure 5.9 soient assez différentes en apparence, il est tout de même possible d'observer une augmentation graduelle des concentrations pour les échantillons collectés au printemps 2021. Effectivement, en comparant les concentrations mesurées lors du premier échantillonnage au printemps 2021 (821 ADD; JE 226 pour le donneur 3 et 731 ADD; JE 219 pour le donneur 4), elles sont égales ou supérieures aux concentrations mesurées à l'automne 2020 (367 ADD; JE 50 pour le donneur 3 et 278 ADD; JE 43 pour le donneur 4) pour la majorité des acides gras. Par la suite, une augmentation graduelle est observable jusqu'à la fin de l'étude. Les différences entre les courbes restent tout de même beaucoup plus importantes que celles du torse. Cela peut difficilement être expliqué par une raison claire, mais découle probablement des différents facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant le processus de décomposition d'un individu. Dans tous les cas, aucun signe d'hydrogénation des acides gras insaturés n'a été observé.

La différence entre les courbes obtenues à partir des échantillons provenant de la cuisse gauche des donneurs peut s'expliquer par une décomposition différente des corps (Figure 4.3). Comme pour l'échantillon du torse, la décomposition biochimique des triglycérides durant l'automne diffère grandement pour les deux donneurs tout comme les observations visuelles. En revanche, des similitudes sont observables entre les courbes pour la période d'échantillonnage ayant eu lieu au printemps 2021 par l'augmentation graduelle des concentrations. À ce moment, les deux donneurs présentaient une apparence similaire et les mêmes stades de décomposition (dessiccation et squelettique).

Enfin, les concentrations sont variables entre les donneurs pour les acides palmitique, oléique et linoléique. Le donneur 4 présente des valeurs plus élevées principalement à des valeurs de ADD plus élevées, soit vers la fin de l'étude. Le donneur 3, n'ayant pas atteint des valeurs de ADD aussi élevées, il est difficile de confirmer qu'il y ait bel et bien une différence majeure. Les courbes du donneur 3 ont une tendance à la hausse à la fin de l'étude. Les concentrations plus élevées du donneur 4 auraient donc pu être atteintes par le donneur 3. De plus, comme mentionnées précédemment, ces différences ne sont pas significatives

considérant qu'il s'agit de deux individus complètement différents. Enfin, les acides gras identifiés comme biomarqueurs potentiels lors de l'analyse des graphiques du torse (Figure 5.8) sont les mêmes pour la cuisse.

En somme, malgré une décomposition visuellement différente des donneurs 3 et 4 étudiés à l'automne 2020 et au printemps 2021, l'évolution de la dégradation des lipides présente des similitudes notables surtout suivant la période de dégel (après l'hiver).

5.3.7 Donneur 5

Les variations des concentrations des acides gras ont aussi été analysées pour le donneur 5, installé sur le site de REST[ES] au printemps 2021. La figure 5.10 présente les graphiques obtenus pour ce donneur.



Figure 5.10 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur toute l'étude pour le donneur 5.

Tout d'abord, pour les acides gras provenant des tissus mous du torse, une première augmentation des concentrations est observée entre 110 et 225 ADD (JE 7 et 13). Ces valeurs correspondent au moment où le corps était aux stades gonflé et actif. L'hydrolyse des triglycérides s'est donc produite aux stades attendus dans la littérature (Pfeiffer *et al.*, 1998). Par la suite, un premier sommet est atteint à 600 ADD (JE 35) pour la majorité des acides gras soit lorsque le corps entre tout juste au stade de dessiccation. Un second sommet est observable à 800 ADD (JE 50) pour tous les acides gras alors que le corps est complètement asséché. Il est difficile d'interpréter ce second maximum des concentrations vu la nature variable des échantillons traités. Cependant, il est tout de même possible d'observer une diminution des concentration suivant l'atteinte du premier sommet à 600 ADD (JE 35) pour les acides gras insaturés alors qu'une augmentation est plutôt rencontrée pour les acides gras saturés. En effet, le second sommet pour ces derniers présente une concentration maximale plus élevée que le premier particulièrement pour les acides palmitique et stéarique. L'inverse est observé pour les acides gras insaturés. Ceci pourrait être un indicateur de l'hydrogénation des acides gras insaturés.

En ce qui a trait aux acides gras de la cuisse, des variations de concentrations similaires sont observées. Une augmentation graduelle des concentrations se produit vers 200 ADD (JE 12) pour la majorité des acides gras. À ce moment, le corps présentait les caractéristiques des stades gonflé et actif. L'hydrolyse des triglycérides s'est donc produite à ce moment. Tout comme pour les acides gras du torse, un premier pic de concentrations est atteint vers 500 ADD (JE 29), puis un deuxième vers 1000 ADD (JE 56) pour les acides gras insaturés et vers 1700 ADD (JE 92) pour les acides gras saturés. Cette différence entre les valeurs de ADD pourrait être expliquée par le processus d'hydrogénation. En effet, l'atteinte d'un maximum de concentrations pour les acides gras insaturés suivi d'une importante diminution des concentrations est d'autant plus marquée pour les courbes des acides gras insaturés de la cuisse. Il en va de même pour les acides gras saturés où une nette augmentation des concentrations a été mesurée au moment où celles de leurs analogues insaturés diminuaient.

Dans l'ensemble, les courbes de chaque acide gras pour les deux régions anatomiques sont très similaires. Les mêmes variations sont observées à des moments semblables. Le processus d'hydrogénation des acides gras insaturés semble être plus marqué pour les échantillons provenant de la cuisse. Cependant, cela pourrait s'expliquer par la durée de la période d'échantillonnage plus longue pour la cuisse. Les augmentations de concentrations les plus importantes sont observées suivant la fin de la période d'échantillonnage du torse (après 1400 ADD; JE 78). Malgré cela, il est possible d'affirmer que les courbes

présentent plusieurs similarités entre les acides gras d'une même région anatomique et entre les mêmes acides gras pour les deux régions. De plus, les concentrations sont aussi comparables.

5.3.8 Donneur 6

Les échantillons du donneur 6, soit le dernier ayant été étudié dans le cadre de ce projet, ont aussi été analysés en laboratoire afin d'évaluer les variations de concentrations des acides gras cibles. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement à la figure 5.11.



Figure 5.11 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse (To) et de la cuisse (Cu) sur l'étude pour le donneur 6.

Tout d'abord, pour les acides gras contenus dans les tissus mous du torse, une nette augmentation des concentrations est observable à 230 ADD (JE 11) correspondant au début de l'hydrolyse des triglycérides. À ce moment, le corps se trouvait aux stades gonflé et actif. Le sommet de ce premier pic est rapidement atteint vers 290 ADD (JE 14), soit lors des mêmes stades de décomposition. Par la suite, les concentrations diminuent pour retrouver des valeurs similaires à celles de départ. Un plus petit sommet est présent à 600 ADD (JE 30) au moment où l'abdomen du donneur était au stade gonflé et en dessiccation. Un plateau de concentrations à des valeurs similaires à celles du départ est ensuite observé jusqu'à la fin de l'étude pour tous les acides gras. Il n'y a donc pas de signe d'hydrogénation des acides gras insaturés.

Dans l'ensemble, les courbes de tous les acides gras à l'exception de l'acide arachidique, présentent des variations de concentrations comparables avec la présence de deux pics de concentration au même moment. Il est à noter que l'acide arachidique fait exception à cela dû à la concentration nulle mesurée à 700 ADD (JE 35). Celle-ci pourrait être une valeur aberrante. Elle n'a cependant pas été exclue dû à la variabilité des échantillons étudiés qui peuvent être influencés par une multitude de facteurs non contrôlés.

Pour les échantillons provenant de la cuisse du donneur 6, les courbes présentent quelques similarités avec celles produites suivant l'analyse des échantillons du torse. Deux sommets de concentrations maximales sont atteints à des moments comparables pour la majorité des acides gras, soit un premier vers 200 ADD (JE 9) et un second à 600 ADD (JE 30). Les stades gonflé et actif étaient observés chez le donneur 6 pour le premier pic et les stades gonflé et de dessiccation pour le deuxième. Cependant, à l'inverse des courbes du torse, le second sommet présente des concentrations plus élevées que le premier pour l'ensemble des acides gras ainsi qu'une augmentation graduelle de celles-ci jusqu'à la fin de la période d'échantillonnage. Les valeurs finales sont les plus élevées à l'inverse des acides gras du torse où les valeurs finales sont presque aussi basses que les valeurs initiales. Aussi, le début de l'hydrolyse des triglycérides est plus rapide pour les échantillons provenant de la cuisse soit entre 70 et 160 ADD (JE 3 et 7). Cela correspond au début des stades gonflé et actif. Les valeurs maximales ont cependant été atteintes durant les stades de dessiccation et squelettique.

En observant ces graphiques, il semble que l'hydrolyse des triglycérides du torse se soit produite sur une très courte période et n'ait pas continué sur l'ensemble de l'étude comme observée pour ceux de la cuisse. Cette différence majeure est difficilement explicable. Les courbes présentent tout de même quelques similitudes, mais les concentrations observées sont très différentes. L'une des hypothèses pouvant être apportées est la décomposition particulière du donneur 6. En effet, ce donneur a présenté des signes de gonflement de l'abdomen pendant une très longue période alors que le reste du corps avait atteint le stade de dessiccation. Les jambes ont subi une décomposition plus « normale » avec l'observation des stades gonflé, actif et de dessiccation dans l'ordre présenté au tableau 2.1. Malgré des signes évidents de dégradation des tissus mous du torse du donneur 6 à un certain moment, celle-ci semble s'être arrêtée ou terminée très rapidement. Enfin, dans tous les cas, aucun signe d'hydrogénation des acides gras insaturés n'a été observé pour les deux régions anatomiques.

5.3.9 Comparaison des donneurs 5 et 6

Suivant l'analyse des échantillons des tissus mous collectés au printemps et à l'été 2021 sur les donneurs 5 et 6, les variations de concentrations des acides gras cibles pour ce projet ont été comparées. Les figures 5.12 et 5.13 présentent les courbes obtenues pour le torse et la cuisse respectivement.



Figure 5.12 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous du torse sur toute l'étude pour les donneurs 5 et 6 (printemps et été 2021).

En observant les courbes présentées à la figure 4.17, une similitude principale est rencontrée, soit la présence de deux pics d'augmentation des concentrations pour la majorité des acides gras. Cependant, les valeurs maximales de ceux-ci ne sont pas observées aux mêmes moments. Les sommets sont atteints beaucoup plus tôt pour le donneur 6 soit à 200 ADD (JE 9) et à 600 ADD (JE 30) comparativement à 600 ADD (JE 35) et 800 ADD (JE 50) pour le donneur 5. Cela concorde avec les observations visuelles des stades de décomposition. Le donneur 6 a atteint plus rapidement les stades gonflé et actif (120,6 ADD; JE 10 pour les deux stades) en comparaison au donneur 5 (173,5 ADD; JE 10 et 130,8 ADD; JE 8 respectivement). Les jours expérimentaux sont similaires pour les deux donneurs, mais les températures moyennes plus chaudes rencontrées pour le donneur 6 (Figure 4.1.e) ont probablement favorisé une hydrolyse plus rapide d'une quantité importante de triglycérides. Cependant, le début de l'hydrolyse semble s'être produit plus tôt pour le donneur 5. Une légère augmentation des concentrations est observable entre 110 et 225 ADD (JE 7 et 13), alors qu'une valeur de 230 ADD (JE 11) est plutôt rencontrée pour le donneur 6. La différence est cependant mineure et l'hydrolyse peut presque être considérée comme ayant eu lieu aux mêmes valeurs de ADD. L'augmentation des concentrations est beaucoup plus rapide dans le cas du dernier donneur expliquant l'atteinte d'un premier sommet avant le donneur 5.

Bien que ces deux donneurs présentent quelques similitudes, plusieurs différences importantes sont observées. Tout d'abord, les tendances des courbes entre les donneurs différents pour plusieurs acides gras. Pour le donneur 5, une augmentation graduelle des concentrations sur l'ensemble de l'étude est observable pour les acides gras saturés alors qu'une augmentation puis une diminution des concentrations après l'atteinte de concentrations maximales ont été mesurées pour les acides gras insaturés. Cette observation est d'ailleurs un indicateur de l'hydrogénation potentiel des acides gras insaturés. Pour le donneur 6, une augmentation rapide des concentrations suivie par l'atteinte rapide d'un maximum est d'abord observée. Par la suite, une diminution majeure des concentrations de tous les acides gras est rencontrée et un plateau est atteint pour le reste de l'étude. Il n'y a aucun signe d'hydrogénation des acides gras insaturés. Aussi, les concentrations de certains acides gras sont difficilement comparables par exemple pour les acides palmitique, stéarique et oléique. Les valeurs sont beaucoup plus faibles pour le donneur 5. Une fois de plus, cela pourrait être expliqué par une composition différente des acides gras majoritaires contenue dans les lipides des donneurs ou encore à des facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant le processus de décomposition. En somme, les courbes des acides gras du torse sont difficilement comparables entre les donneurs. D'un côté, la présence de deux pics d'augmentation des concentrations et le début de l'hydrolyse des triglycérides sont des points communs importants. En revanche, malgré des concentrations similaires pour certains acides gras, les variations de celles-ci diffèrent grandement rendant difficile la comparaison de ces courbes. De plus, l'absence d'indication d'hydrogénation des acides gras insaturés pour le donneur 6 est une différence notoire. La décomposition particulière de l'abdomen du donneur 6 pourrait expliquer ces différences.



Figure 5.13 Variation des concentrations moyennes des acides gras cibles provenant des tissus mous de la cuisse sur toute l'étude pour les donneurs 5 et 6 (printemps et été 2021).

Pour les acides gras contenus dans les tissus mous de la cuisse gauche des donneurs 5 et 6, les courbes sont plus similaires (Figure 5.13) que celles du torse. Tout d'abord, le début du processus d'hydrolyse des triglycérides se produit à des valeurs de ADD similaires soit vers 200 ADD (JE 12) pour le donneur 5 et entre 70 et 160 ADD (JE 3 et 7) pour le donneur 6. L'hydrolyse s'est donc produite un peu plus rapidement pour le dernier donneur qui a d'ailleurs présenté les premiers signes des stades gonflé et actif plus rapidement tels que mentionnés précédemment. Les observations visuelles s'accordent donc avec la dégradation des triglycérides des tissus mous des cuisses de ces donneurs.

Aussi, les mêmes tendances sont observées pour les variations de concentrations. Une augmentation graduelle des concentrations sur l'ensemble de la période d'étude est observable pour les acides gras saturés des deux donneurs. Pour les acides gras insaturés, une augmentation graduelle des concentrations jusqu'à l'atteinte d'un maximum à la fin de l'étude a été mesurée pour le donneur 6. Pour le donneur 5, la même tendance est rencontrée jusqu'à la fin de l'étude du donneur 6 (2030 ADD; JE 106) puis une diminution des concentrations potentiellement liée au phénomène d'hydrogénation des acides gras insaturés est observée. Cette différence entre les deux donneur 6. Les acides gras insaturés n'auraient possiblement pas été soumis au processus d'hydrogénation avant la fin de l'échantillonnage. En collectant des échantillons sur une plus longue période, cette réaction biochimique aurait peut-être pu être observée comme dans le cas du donneur 5. De plus, les concentrations sont similaires aux mêmes valeurs de ADD démontré par la quasi-superposition des courbes pour la majorité des acides gras.

Bref, les courbes des acides gras des donneurs 5 et 6 présentées à la figure 4.18 sont particulièrement similaires. Cela contraste grandement avec les courbes des acides gras du torse où beaucoup de différences ont été soulevées. Cela pourrait être expliqué par la décomposition différente de ces deux régions anatomiques. Les abdomens des donneurs ne se sont pas visuellement décomposés de la même manière. Pour le donneur 5, les stades de décomposition se sont enchaînés dans l'ordre présenté au tableau 2.1. L'abdomen s'est gonflé (173,5 ADD; JE 10), puis les tissus mous ont été consommés par les insectes et/ou liquéfiés durant le stade actif pour ensuite présenter une apparence « dégonflée » (Annexe G). La décomposition de l'abdomen du donneur 6 ne s'est pas produite de la même manière. L'abdomen a présenté des signes de gonflement sur une très longue période (121 à 843 ADD ; JE 5 à 43) perdurant après le stade actif (121 à 361 ADD ; JE 5 à 18). De plus, la décomposition active ne présentait pas autant d'activité entomologique que celle du donneur 5. À la fin de la période d'étude (2030 ADD; JE

106), le donneur 6 n'avait pas l'aspect « dégonflé » comme le donneur 5 (Annexes G et H) et donc la liquéfaction interne ne semblait pas terminée. Cela pourrait alors expliquer les différences observées. Les cuisses des deux donneurs ont plutôt présenté une décomposition similaire expliquant possiblement la ressemblance entre les courbes. À la fin de la période d'échantillonnage du donneur 6, la liquéfaction des tissus mous des cuisses ne semblait pas complète puisqu'elles étaient toujours d'apparence « gonflée » à l'inverse les cuisses du donneur 5 qui était totalement « dégonflées » (Annexe G). Cela pourrait alors expliquer la différence notée quant à l'hydrogénation des acides gras insaturés à des valeurs de ADD plus élevées. En somme, les observations visuelles effectuées pour ces deux donneurs semblent s'accorder aux observations chimiques réalisées.

Enfin, les donneurs 5 et 6 présentent aussi des acides gras pouvant être de bons biomarqueurs afin d'estimer l'IPM soit les acides palmitique, stéarique, palmitoléique, oléique et linoléique. De plus, tout comme les autres donneurs étudiés, l'acide arachidique semble aussi être utile pour marquer le début du processus d'hydrolyse des triglycérides.

5.3.10 Discussion

Suivant l'étude des variations de concentrations des acides gras dans le temps pour chaque donneur, certaines similarités ont été observées. La ressemblance majeure chez tous les donneurs, à l'exception du donneur 4, est le début de l'hydrolyse des triglycérides. Ce processus biologique a toujours lieu vers 200 ADD dans le cadre de cette étude. À la connaissance de l'auteur, aucune valeur en ADD n'a été rapportée dans la littérature quant au moment où ce phénomène se produit. En revanche, cette valeur correspond aux stades gonflé et actif tel qu'attendue (Pfeiffer *et al.*, 1998). Les acides myristoléique et arachidique pourraient d'ailleurs être de bons indicateurs de l'hydrolyse des triglycérides. En effet, des valeurs de 0 ppm sont mesurées lors du stade frais pour ensuite atteindre rapidement leur concentration maximale lors de l'hydrolyse des triglycérides. Il pourrait donc s'agir de bons indicateurs de cette prossible de déterminer le moment exact du début de l'hydrolyse des triglycérides. Celle-ci s'est produite entre le dernier échantillonnage à l'automne 2020 (278 ADD; JE 43) et le premier au printemps 2021 (731 ADD; JE 219). La barre des 200 ADD avait tout de même été atteinte à l'automne, mais aucun signe d'hydrolyse n'a été observé.

Ensuite, un second élément commun à tous les donneurs est l'atteinte d'un premier maximum de concentrations au début du stade de dessiccation (varie entre 300 et 600 ADD). L'hydrolyse des triglycérides débuterait donc lors des stades gonflé et actif et se poursuivrait durant le stade de dessiccation jusqu'à atteindre des valeurs de concentrations maximales. D'ailleurs, pour les donneurs 3, 4, 5 et 6, plusieurs sommets des concentrations ont été atteints durant la décomposition lors du stade de dessiccation. Les sommets atteints n'ont cependant pas des valeurs semblables entre les donneurs d'une même paire ni entre les paires de donneurs. Aucune corrélation claire ne peut donc être établie. Il n'est pas possible d'émettre d'hypothèse claire par rapport à ceux-ci. La variabilité de la décomposition d'un individu à un autre pourrait expliquer en partie les différences observées. Cela pourrait aussi expliquer l'allure générale variable des courbes de concentrations suivant l'atteinte d'un premier sommet de concentrations. En effet, suivant l'hydrolyse des triglycérides et l'atteinte d'un premier sommet de concentrations suivie d'une augmentation ou encore une diminution jusqu'à la fin de l'étude. Il n'est pas possible de déterminer une tendance (« pattern ») similaire à tous les donneurs. Seules les similarités interpaires mentionnées dans les sections précédentes (Section 4.2.3, 4.2.6 et 4.2.9) sont observables.

En revanche, une troisième similarité non négligeable concerne les concentrations mesurées pour chaque acide gras. Les intervalles de variation de concentrations sont très similaires pour tous les donneurs dans les deux régions anatomiques étudiées à l'exception du torse de donneur 6. Par exemple, l'acide myristoléique varie de 10 à 20 ppm sur l'ensemble de l'étude pour tous les donneurs. Les intervalles de variations sont un peu plus grands pour les acides palmitique, oléique, linoléique et stéarique qui sont ceux retrouvés en plus grande quantité dans les triglycérides. Il s'agit d'ailleurs de ceux ayant été identifiés comme biomarqueurs potentiels afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM) pour tous les donneurs en plus de l'acide palmitoléique. Il semble donc que malgré les attributs intrinsèques de chaque donneur, les concentrations attendues pour les acides gras cibles se retrouvent dans un même intervalle. Il s'agit d'un élément très important qui pourrait soutenir l'utilisation des acides gras à titre de biomarqueurs afin d'estimer l'IPM.

Enfin, un dernier élément commun à deux donneurs provenant de deux paires différentes est l'hydrogénation des acides gras insaturés pour les échantillons de la cuisse du donneur 1 ainsi que les échantillons provenant des deux régions anatomiques du donneur 5. Ce phénomène s'est produit au stade de dessiccation pour les deux donneurs, mais les valeurs de ADD ne sont pas semblables soit vers 620 ADD

pour le donneur 1 et 1000 ADD pour le donneur 5. Il n'est donc pas possible d'associer l'hydrogénation des acides gras insaturés à un moment précis de la décomposition excepté qu'elle a lieu au stade de dessiccation.

Les hypothèses et conclusions émises suivant l'analyse des graphiques de concentrations des acides gras dans le temps pourront être évaluées grâce à la chimiométrie dans la section suivante. De plus, il est à noter qu'un nombre plus élevé de donneurs devra être étudié durant chaque saison afin de mieux expliquer certaines des variations soulevées en plus de permettre la confirmation des conclusions rendues.

5.4 Graphiques d'interactions

Des graphiques d'interactions ont été réalisés pour chaque paire de donneurs (donneurs 1 et 2, donneurs 3 et 4, donneurs 5 et 6). Le principe est le même qu'à la section 5.1 soit l'évaluation d'effets d'interactions entre deux variables catégoriques et une variable continue. Cependant, il s'agit de comparer les régions anatomiques (torse et cuisse) des donneurs entre eux et non plus des côtés droit et gauche d'un même donneur. Cela a permis de mettre en lumière les similitudes et différences entre les régions anatomiques, mais aussi entre les donneurs d'une même saison pour les neuf acides gras étudiés.

5.4.1 Donneurs 1 et 2

Les graphiques d'interactions des acides gras analysés pour les donneurs 1 et 2, soit ceux étudiés à l'été 2020, sont présentés à la figure 5.14.



Figure 5.14 Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 1 et 2 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu).

Tout d'abord, ce type de graphique permet l'analyse des tendances pouvant être observées pour les deux régions anatomiques étudiées pour chaque donneur respectivement. Pour le donneur 1, il est possible d'affirmer que les concentrations moyennes des acides gras sont plus élevées pour les échantillons provenant de la cuisse plus particulièrement pour les acides palmitique, stéarique, palmitoléique et oléique en s'appuyant sur les graphiques de la figure 5.14. À l'inverse, dans le cas du donneur 2, les valeurs moyennes des concentrations sont plus élevées pour le torse pour les acides myristique, oléique et linoléique. Malgré ces quelques différences, il est possible d'affirmer qu'il ne semble pas y avoir de tendance majeure en fonction de la région anatomique étudiée. La distribution des acides gras serait donc relativement homogène dans le corps pour les deux donneurs, ce qui appuie les conclusions tirées à la section 5.1. C'est aussi ce qui avait été conclu auparavant par Makristathis *et al.*, (2002) et plus récemment par Ueland *et al.* (2021) lors de l'analyse de trois régions anatomiques différentes.

Des différences importantes sont cependant rencontrées entre les donneurs pour certains acides gras. Les acides palmitique et stéarique sont ceux où des dissimilitudes sont les plus marquées. La distance importante entre les lignes et donc entre les concentrations moyennes obtenues pour chaque région anatomique témoigne de cette différence. Le donneur 2 présente des concentrations plus élevées pour les deux régions anatomiques pour ces deux acides gras. Les acides palmitoléique, oléique et linoléique présentent aussi des différences par le croisé des lignes. Dans ce cas, il n'est pas possible d'affirmer qu'un donneur présente des concentrations en acide gras plus importantes que l'autre puisque les lignes se croisent. Pour les autres acides gras (p. ex. laurique, myrsitique, arachidique et myristoléique), la proximité voire la quasi-superposition des lignes dans certains cas, démontre la similarité des valeurs de concentrations obtenues. Ces résultats pourraient indiquer que les concentrations de ces derniers sont moins variables d'un individu à l'autre. Il pourrait alors s'agir de bons biomarqueurs pour estimer l'intervalle post mortem (IPM). Cependant, ces conclusions s'opposent aux résultats obtenus lors de l'analyse des graphiques de variations des concentrations dans le temps (Section 5.3). Cela pourrait être expliqué par la nature des graphiques d'interactions. En effet, ceux-ci ne permettent pas d'évaluer les variations de concentrations dans le temps qui sont primordiales afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM). Ces graphiques permettent seulement l'observation d'une moyenne des concentrations obtenues pour l'ensemble de la période étudiée. Des tests statistiques supplémentaires permettront donc de complémenter les résultats obtenus afin d'identifier les acides gras pouvant être de bons biomarqueurs de l'intervalle post mortem (IPM).

5.4.2 Donneurs 3 et 4

Pour les donneurs 3 et 4, étudiés à l'automne 2020 et au printemps 2021, les graphiques d'interactions résultant de leurs jeux de données respectifs sont présentés à la figure 5.15.



Figure 5.15 Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 3 et 4 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu).

En premier lieu, tous les acides gras du donneur 3 présentent des moyennes de concentrations similaires pour les deux régions anatomiques étudiées (torse et cuisse). Il en va de même pour le donneur 4 à l'exception de l'acide myristoléique. Dans ce cas, les concentrations pour la cuisse sont beaucoup plus élevées que celles du torse. Malgré cela, il semble une fois de plus que les acides gras soient uniformément distribués dans les lipides corporels d'un même individu.

Deuxièmement, bien que les moyennes entre les régions anatomiques pour un même donneur soient similaires, des différences importantes sont observées entre les deux donneurs pour certains acides gras. L'acide arachidique est celui présentant la différence la plus importante considérant qu'il n'y a même pas recouvrement des barres d'erreurs. Il en va de même pour l'acide laurique. Il s'agit d'ailleurs des deux acides gras présentant des concentrations plus élevées pour le donneur 3 pour les deux régions anatomiques. Celui-ci pourrait donc être différencié du donneur 4 par ces deux acides gras. Les acides myristique, stéarique et myristoléique présentent quant à eux de légères variations pour la cuisse alors que les acides palmitique et myristoléique en présentent pour le torse. Tous les autres acides gras sont similaires, soit les acides palmitoléique, oléique et linoléique. Ces derniers semblent être particulièrement similaires pour les deux donneurs. Il pourrait alors s'agir de bons biomarqueurs tels qu'observés dans les graphiques de variation de concentrations présentés à la section 5.3. Cependant, l'évolution des concentrations dans le temps n'est pas prise en considération une fois de plus.

5.4.3 Donneurs 5 et 6

Les graphiques d'interactions des deux derniers donneurs étudiés dans le cadre de cette étude, soit les donneurs 5 et 6 au printemps et à l'été 2021, sont présentés à la figure 5.16.



Figure 5.16 Graphiques d'interaction des acides gras des donneurs 5 et 6 des deux zones de prélèvement choisi soit le côté gauche du torse (To) et la cuisse gauche (Cu).

Tout d'abord, pour le donneur 5, les valeurs moyennes de concentrations observées pour le torse et la cuisse sont très similaires pour tous les acides gras témoignant de l'homogénéité de la répartition des acides gras dans les triglycérides des tissus mous pour ces deux régions anatomiques. Cette conclusion a été tirée pour chacun des donneurs étudiés jusqu'à présent. Le donneur 6 fait cependant exception à cette règle. Il est clair en observant les graphiques d'interactions de la figure 5.16 qu'il y a une différence majeure entre les deux régions anatomiques. Tous les acides gras présentent des concentrations moyennes beaucoup plus élevées pour la cuisse. C'est d'ailleurs ce qui avait été observé sur les graphiques de variation des concentrations à la section 5.3. Il est difficile d'expliquer cette différence de concentration. La décomposition plus lente de l'abdomen pourrait être à l'origine de cet écart (Section 4.2.6). En effet, il serait possible que le processus d'hydrolyse des triglycérides n'ait pas eu lieu ou faiblement comparativement aux jambes. Le stade gonflé a perduré sur une longue période pour ce donneur et la décomposition active n'a pas été aussi intense autant au niveau de l'activité entomologique que pour la liquéfaction des tissus mous. Il est donc possible que les tissus mous ne se soient pas dégradés au même rythme, entraînant donc cet écart.

Considérant les variations observées pour le donneur 6, il est clair que des différences importantes sont aussi présentes entre les deux donneurs. Il est tout de même possible d'observer certaines tendances telles que des concentrations moyennes similaires pour les acides myristique, palmitique, stéarique, myristoléique et palmitoléique pour les cuisses des donneurs. À l'inverse, les acides laurique et linoléique ont des concentrations moyennes similaires pour le torse de chacun des donneurs. Malgré cela, il s'avère difficile d'évaluer adéquatement les acides pouvant être de bons biomarqueurs afin d'estimer l'intervalle post mortem (IPM). L'absence de ligne parallèle et adjacente, voire superposée, indique qu'il y a une importante variabilité entre les acides gras des deux donneurs. Des analyses statistiques supplémentaires devront être réalisées afin d'évaluer le potentiel de chaque acide gras comme biomarqueurs potentiels pour estimer l'IPM.

5.5 Analyse en composantes principales (PCA)

Par la suite, une technique d'analyse dite non supervisée, l'analyse en composantes principales (PCA), a été appliquée aux jeux de données résultants de l'analyse des échantillons de tissus mous des six donneurs. Une PCA permet de réduire la dimensionnalité d'une matrice de données brutes par la projection de chacune d'elles sur des composantes principales tout en conservant un maximum de variance entre les échantillons (Varmuza et Filzmoser, 2016). Les données seront alors réexprimées sous

une autre forme et selon un nombre de dimensions différentes. Seules les composantes principales permettant d'exprimer un maximum de variance seront conservées afin de créer un graphique de distribution des données dans le nouvel espace cartésien appelé un « score plot » (Malik et Tuckfield, 2019; Varmuza et Filzmoser, 2016). Ainsi, la structure sous-jacente des données et de la manière dont différents attributs sont liés les uns aux autres (similarités et différences) (Malik et Tuckfield, 2019) ont pu être évaluées par la formation de groupes d'échantillons. Un autre type de graphique est aussi créé lors de l'analyse en composantes principales (PCA) soit le « loading plot ». Celui-ci permet de visualiser l'importance des variables étudiées pour chaque composante principale. En combinant ces deux représentations graphiques, il est possible d'observer le poids de certaines variables sur un groupe d'échantillon donné. Ce type de représentation est nommé « bi-plot » (Varmuza et Filzmoser, 2016).

Une fois de plus, les donneurs ont été séparés en fonction des saisons (donneurs 1 et 2, donneurs 3 et 4, donneurs 5 et 6) pour la comparaison des données recueilles. Pour chaque paire de donneurs, le « score plot » et le « bi-plot » ont été analysés. Le premier permet d'identifier les sous-groupes potentiels et d'observer s'il existe une séparation entre les donneurs. Le second permet d'identifier les acides gras exerçant une influence sur les composantes principales et donc sur la distribution des échantillons dans le plan cartésien. Une PCA de tous les donneurs est aussi présentée à la fin de cette section pour évaluer la présence de corrélation entre les acides gras et l'intervalle post mortem.

Afin de faciliter la description des figures présentées, les quatre sections délimitées par les axes des deux composantes principales choisis seront nommées tels les quadrants d'un plan cartésien, le premier quadrant étant celui en haut à droite. Les autres sont numérotés dans le sens antihoraire.

5.5.1 Donneur 1 et 2

Le « score plot » et le « bi-plot » des donneurs 1 et 2, soit ceux étudiés à l'été 2020, sont présentés aux figures 5.17 et 5.18 respectivement.


Figure 5.17 « Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse (To) et de la cuisse gauche (Cu) des donneurs 1 et 2 installés sur le site de REST[ES] à l'été 2020.

En observant le « score plot » présenté à la figure 5.17, le groupe rapproché d'échantillons situé à l'extrême gauche du quadrant trois se démarque du reste des échantillons du graphique qui sont beaucoup plus dispersés. Il s'agit des échantillons provenant des jours 0 à 10 (21 à 219 ADD) pour les deux donneurs à l'exception du D2 JE10-To. Durant cette période, le premier donneur est passé par le stade frais et le début des stades gonflé et actif. En observant les graphiques de concentrations des acides gras présentés à la section 5.3.1, l'hydrolyse des triglycérides du donneur 1 semble avoir débuté au JE 9 (203 ADD) pour la cuisse et au JE 14 (294 ADD) pour le torse. Cela peut aussi être observé sur la figure 5.17. Les échantillons du JE 14 (294 ADD) ne se retrouvent pas dans le groupe des premiers jours. Il est aussi intéressant de noter que l'échantillon D1 JE14-To est beaucoup plus près du groupe des premiers jours que l'échantillon D1 JE14-Cu. Cela concorde alors avec le début de l'hydrolyse des triglycérides plus rapide pour les échantillons provenant de la cuisse du donneur 1. Pour le donneur 2, les stades frais et gonflé ainsi que le début du stade actif ont été observés durant les jours 0 à 10 (21 à 219 ADD). Par la suite, tout comme le donneur 1, le début de l'hydrolyse des triglycérides au JE 9 (200 ADD) jusqu'à l'atteinte des concentrations maximales pour la majorité des acides gars au JE 16 (330 ADD), permet d'expliquer une fois de plus la distinction entre les premiers jours d'échantillonnage et le reste de l'étude. Il est donc possible de distinguer les tissus mous collectés durant le stade frais et le début des stades gonflé et actif du reste des échantillons, et ce pour les deux donneurs. De plus, aucune distinction ne peut être faite entre les donneurs, les régions anatomiques et les jours dans ce groupe. Ces échantillons peuvent donc être considérés comme indifférenciables.

Par la suite, pour les jours 11 à 70 (236 à 966 ADD), une séparation entre les donneurs est observable. Tout d'abord, pour le donneur 1, un groupe des jours 14 (excluant JE14-To) à 37 (294 à 624 ADD) se retrouve dans le quadrant quatre. Cet intervalle de temps correspond à la fin des stades gonflé et actif et au début des stades de dessiccation et squelettique. Les échantillons des derniers jours, soit des jours 42 à 70 (661 à 966 ADD) (excluant JE42-To) sont plutôt dispersés dans les quadrants deux et trois. Ils se situent donc entre les échantillons des premiers jours et ceux du milieu de l'étude. Une séparation similaire est observée pour les échantillons du donneur 2. Bien que moins marqués, les jours 28 à 70 (509 à 966 ADD) se situent entre les premiers jours d'échantillonnage et les échantillons collectés en milieu d'étude. Une diminution de la concentration des acides gras a d'ailleurs été remarquée durant ces périodes pour les deux donneurs dans les graphiques présentés à la section 5.3.3. Cela pourrait expliquer le positionnement des échantillons des derniers jours. De plus, cette distribution a aussi été observée dans une étude menée par Ueland *et al.* (2021). Il s'agirait de l'observation de la transition des acides gras insaturés vers leurs analogues saturés. L'analyse du « bi-plot » de cette PCA, présenté à la figure 5.18, a d'ailleurs permis de mieux comprendre la séparation des groupes et de supporter les résultats obtenus dans l'article précédemment mentionné. Enfin, l'analyse du « bi-plot » a aussi permis de mieux comprendre la séparation observée entre les donneurs pour les échantillons du milieu et de la fin de l'étude qui forme des groupes épars, mais distincts les uns des autres.



Figure 5.18 « Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 1 et 2 installés sur le site de REST[ES] à l'été 2020.

Tout d'abord, les deux acides gras ayant le plus d'influence sur la séparation des échantillons sont les acides palmitique (C16:0) et oléique (C18:1) autant pour la première que la deuxième composante principale. Les acides palmitoléique (C16:1), linoléique (C18:2) et stéarique (C18:0) exercent aussi une certaine influence sur la distribution des échantillons, mais de manière beaucoup moins importante. En effet, les variables se retrouvant à l'intersection des deux axes sont corrélées et donc moins importantes pour décrire et séparer les échantillons. Les cinq acides mentionnés correspondent d'ailleurs à ceux ayant été identifiés comme biomarqueurs potentiels pour l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) par l'analyse des graphiques à la section 5.3.3.

En ce qui a trait à la séparation des échantillons entre les premiers et les derniers jours d'échantillonnage pour les deux donneurs, la transition des premiers stades de décomposition vers les stades plus avancés est observable et influencée par les acides gras mentionnés précédemment. Tel qu'observé par Ueland et al. (2021), qui ont effectué une étude similaire à celle-ci, mais dans un environnement beaucoup plus chaud (Australie), les jours du milieu sont séparés des premiers jours d'échantillonnage par les acides palmitique, oléique et linoléique qui sont ceux retrouvés en quantité importante dans les tissus mous. L'hydrolyse des triglycérides menant à la libération des acides gras lors des stades gonflé et actif est donc clairement observée pour les deux donneurs dans cette PCA. Par la suite, la différenciation entre les jours du milieu et les derniers jours est caractérisée par le passage des acides gras insaturés vers les acides gras saturés. En effet, pour les deux donneurs, les derniers jours d'échantillonnage sont situés dans les quadrants un et deux. Les acides palmitique, stéarique et arachidique sont les principaux responsables de la séparation de ces échantillons. Cela représenterait donc le passage des donneurs à des stades de décomposition plus avancée. De plus, les jours du milieu sont ceux où les concentrations les plus élevées ont été observées (Section 5.3.3) expliquant qu'ils se retrouvent à l'opposé des premiers jours où les concentrations étaient très faibles. Les échantillons des derniers jours se situent quant à eux entre les deux puisque les concentrations sont en majorité plus faible que les jours du milieu, mais plus élevés que les premiers jours.

L'analyse des « loadings » permet aussi de comprendre la séparation observée entre les deux donneurs pour les échantillons collectés en milieu d'étude. Celle-ci est principalement due aux acides palmitique et oléique. En observant la position relative du groupe d'échantillons du donneur 1 dans le quadrant 4, la variable (« loading ») ayant le plus d'influence est l'acide oléique. À l'inverse, pour les échantillons du donneur 2, la majorité des échantillons se retrouve plus près de l'acide palmitique. Les concentrations observées pour ce donneur sont d'ailleurs plus importantes que celle du donneur 1 qui présente plutôt des concentrations plus élevées pour l'acide oléique. La composition des triglycérides contenue dans les tissus mous de ces donneurs entraîne possiblement cette différenciation entre les échantillons. Cependant, il ne semble pas y avoir de différence entre les régions anatomiques d'un même donneur tel qu'observé par l'analyse des graphiques d'interactions (Section 5.4).

En somme, suivant l'analyse des « score plot » et « bi-plot » résultant de la PCA réalisée à partir de la matrice de données des donneurs 1 et 2, plusieurs conclusions intéressantes ont pu être tirées. Tout d'abord, les premiers jours d'échantillonnages des deux donneurs sont indifférenciables et forme un groupe rapproché correspondant au stade frais et au début des stades gonflé et actif. Une séparation importante est par la suite observée lors de l'hydrolyse des triglycérides se produisant à la fin des stades gonflé et actif et au début du stade de dessiccation. Cette séparation est majoritairement due aux concentrations élevées en acides gras insaturés (oléique et linoléique) ainsi que l'acide palmitique. La transition des acides gras insaturés vers les acides gras saturés (stéarique et palmitique) est quant à elle indicatrice de l'avancement de la décomposition vers des stades plus avancés (dessiccation et squelettique). Les échantillons correspondants à ces stades se situent entre ceux des premiers jours et ceux du milieu de l'étude. Ces tendances sont observées, de manière générale peu importe la région anatomique étudiée (torse et cuisse) et entre les donneurs, et ce malgré des différences entre les acides gras dominants pour les deux donneurs (acide oléique pour le donneur 1 vs acide palmitique pour le donneur 2). Enfin, certains acides gras sont plus importants que d'autres pour la séparation des échantillons, soit les acides palmitique, palmitoléique, oléique, linoléique et stéarique. Il s'agit des mêmes que ceux identifiés lors de l'analyse des graphiques de concentration à la section 5.3.3. Cela soutient donc l'hypothèse selon laquelle il s'agirait de bons biomarqueurs pour l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM).

5.5.2 Donneurs 3 et 4

Le même exercice a été répété pour les échantillons des donneurs 3 et 4, soit ceux étudiés de l'automne 2020 au printemps 2021. Le « score plot » et le « bi-plot » obtenus sont présentés aux figures 5.19 et 5.20 respectivement.



Figure 5.19 « Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 3 et 4 installés sur le site de REST[ES] à l'automne 2020.

Tout d'abord, le « score plot » à la figure 5.19 présente un groupe d'échantillons rapprochés dans le quadrant deux. Celui-ci est constitué des premiers jours d'échantillonnage des deux donneurs.

Pour le donneur 3, les jours 0 à 7 (20 à 99 ADD) sont retrouvés dans ce groupe. Les jours 12 à 50 (152 à 367 ADD), correspondant aux autres échantillons collectés à l'automne 2020, forment un groupe épars dans les quadrants 3 et 4 à l'exception de JE50-To et JE32-Cu. Cette séparation avec les premiers jours d'échantillonnage concorde avec le début de l'hydrolyse des triglycérides ayant eu lieu lors des stades gonflé et actif au JE 5 (80 ADD) et JE 11 (138 ADD) respectivement. Cela correspond aussi à l'augmentation des concentrations en acide gras observé dans les graphiques présentés à la figure 5.6 débutant au jour 7 (100 ADD). Il est donc possible de différencier les échantillons de tissus mous ayant subi le processus d'hydrolyse des échantillons n'y ayant pas été soumis. Pour le reste des échantillons collectés à l'automne 2020 (JE 12 à JE 50; 152 à 367 ADD), le corps était aux stades gonflé et actif majoritairement et au début du stade de dessiccation pour la tête (JE 42; 317 ADD). Il est donc possible de distinguer les échantillons en fonction des stades de décomposition observés durant la période automnale. En ce qui a trait aux échantillons collectés au printemps 2021 (JE 226 à 282; 821 à 1820 ADD), ils forment un groupe adjacent à celui des jours 12 à 50 (152 à 367 ADD) dans le quatrième quadrant. Durant cette période, le corps présentait les stades de dessiccation et squelettique exclusivement. La distinction entre le groupe de l'automne et celui du printemps est mince. Certains échantillons se retrouvent même dans le « mauvais » groupe comme JE32-Cu qui est au centre du groupe d'échantillons collectés au printemps. Les concentrations en acide gras observées lors de l'analyse des tissus mous pourraient expliquer ce manque de distinction. En effet, toujours en observant les graphiques à la figure 5.6, les différences de concentrations entre les maximums atteints à l'automne 2020 et ceux atteints au printemps 2021 sont relativement faibles. Cela pourrait donc expliquer le manque de séparation claire entre les groupes. Il n'est donc pas possible de différencier adéquatement les échantillons de l'automne de ceux du printemps malgré l'observation de stades de décomposition différents. Seuls les échantillons collectés durant le stade frais peuvent être distingués adéquatement de tous les autres échantillons prélevés durant le reste de l'étude.

Pour le donneur 4, des observations différentes peuvent être faites à partir de la PCA présentée à la figure 5.19. Effectivement, une distinction claire est observable entre les échantillons collectés à l'automne 2020 et ceux du printemps 2021. Tous ceux prélevés durant l'automne (JE 0 à JE 50, 11 à 258 ADD) se retrouvent dans le quadrant deux, soit dans le même groupe rapproché que les premiers

jours du donneur 3. Tous les échantillons collectés au printemps 2021 (JE 219 à JE 324; 731 à 2741 ADD) sont quant à eux dispersés dans les quadrants 1 et 4 (à l'exception du JE219-Cu). Cette importante différence entre ces deux saisons peut être expliquée par les stades de décomposition observés durant ces périodes ainsi que les variations des concentrations en acides gras. La majorité du corps du donneur 4 est resté frais durant l'ensemble de l'étude réalisée à l'automne. Quelques régions présentaient des signes de dessiccation (visage, haut du thorax et jambes) sans que les stades gonflé et actif n'ai été observés. Suivant la fonte des neiges, le corps s'est retrouvé au stade de dessiccation dans son ensemble. Cette différence majeure pourrait donc être à l'origine de cette distinction importante. De plus, des conclusions similaires avaient été soulevées lors de l'analyse des graphiques de concentration présentée à la figure 5.7. Une augmentation notoire entre les concentrations des acides gras avant et après l'hiver est observable. L'hydrolyse des triglycérides se serait produite entre la dernière collecte d'échantillons à l'automne et la première ayant eu lieu au printemps. La libération des acides gras serait à l'origine de la séparation des échantillons observée pour cette PCA. Pour ce donneur, il est donc possible de différencier clairement les échantillons provenant de chacune des saisons. De plus, la distinction entre le stade frais et le stade de décomposition avancée de dessiccation est évidente due à l'hydrolyse des triglycérides. Les stades gonflé et squelettique n'ayant pas été observés pour ce donneur (Section 4.2.4), aucune conclusion ne peut être tirée pour ceux-ci. Pour le stade actif, aucune distinction n'a été observée pour les échantillons prélevés suivant la fin de ce stade (JE 253; 1312 ADD).

Une séparation est aussi observable entre les deux donneurs pour certains échantillons. Comme mentionné précédemment, les échantillons des premiers jours du donneur 3 et tous ceux collectés à l'automne 2020 pour le donneur 4 forment un groupe rapproché dans le quadrant 2. Ceux-ci peuvent donc être considérés comme indifférenciables. Durant ces périodes, les deux corps étaient au stade frais et le processus d'hydrolyse des triglycérides n'était pas commencé. Suivant cela, une distinction peut être faite entre les échantillons des deux donneurs. Ceux du donneur 3 sont principalement regroupés dans les quadrants 3 et 4, alors que ceux du donneur 4 se retrouvent plutôt dans les quadrants 1 et 4. Cette séparation entre les donneurs peut être expliquée par l'analyse des « loadings » du « bi-plot » présenté à la figure 5.20.



Figure 5.20 « Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 3 et 4 installés sur le site de REST[ES] à l'automne 2020.

La distribution des échantillons provenant des donneurs 3 et 4 est principalement influencée par les acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) pour la première composante principale. Les acides myristique (C14:0), palmitoléique (C16:1) et stéarique (C18:0) exercent aussi une influence sur cette composante, mais de manière beaucoup plus faible. La seconde composante principale est quant à elle influencée par les acides palmitique (C16:0) et linoléique (C18:2) ainsi que plus faiblement par l'acide palmitoléique (C16:1).

Pour le donneur 3, la séparation est majoritairement due aux acides gras ayant un impact sur la première composante principale puisque les échantillons sont dispersés en longueur plutôt qu'en hauteur. La séparation entre les échantillons des jours 0 à 7 (20 à 99 ADD) du reste des échantillons collectés est expliquée par la libération des acides gras lors du processus d'hydrolyse. Effectivement, vu l'abondance importante des acides palmitique, oléique et linoléique dans les triglycérides, l'augmentation de leur concentration indique le début du processus d'hydrolyse et par le fait même, une différence entre les stades de décomposition (frais vs gonflé et actif). En ce qui a trait aux échantillons collectés pour le reste de l'automne 2020 et ceux du printemps 2021, la mince distinction observée semble être influencée par les mêmes acides gras. En observant les graphiques de variations des concentrations à la figure 5.6, les acides palmitique, oléique et linoléique sont ceux présentant les concentrations les plus élevées en plus d'atteindre des maximums de concentrations durant la période printanière. Cela explique donc la proximité des échantillons prélevés durant cette saison aux « loadings » de ces acides gras comparativement à ceux de l'automne qui se retrouve un peu plus loin. Cette légère distinction ne peut cependant pas permettre une bonne différenciation des échantillons provenant de ces deux saisons puisqu'il n'y a pas de différence majeure entre les acides gras influençant la séparation.

Pour le donneur 4, une distinction claire entre les échantillons collectés à l'automne 2020 et ceux du printemps 2021 est observable. En observant le « bi-plot » à la figure 5.20, les échantillons semblent être séparés autant par les acides gras influençant la composante principale 1 (séparation en longueur) que par ceux ayant un impact sur la composante principale 2 (séparation en hauteur). Dans les deux cas, les acides palmitique, oléique et linoléique restent ceux ayant le plus d'influence. L'observation des « loadings » permet d'ailleurs de confirmer l'absence d'hydrolyse des triglycérides durant l'automne. Ce processus biochimique s'est donc produit entre l'automne et le début de la première collecte au printemps. Il serait donc possible de différencier un échantillon prélevé à l'automne d'un autre collecté au printemps à l'aide

de cette PCA. Ces observations concordent avec les stades de décomposition observés pour ce donneur soit majoritaire frais pour l'automne et en dessiccation complète au printemps.

Pour les deux donneurs, aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons prélevés en milieu d'étude (durant les stades gonflé, actif et au début du stade de dessiccation) et les derniers échantillons (lors des stades de dessiccation et squelettique). Aucune transition des acides gras insaturés vers leurs analogues saturés n'a donc été observée pour les stades de décomposition avancée malgré la durée de l'étude (282 jours; 1820 ADD pour le donneur 3 et 324 jours; 2741 ADD pour le donneur 4).

Enfin, la séparation entre les donneurs peut quant à elle être expliquée par deux acides gras principaux, soit l'acide palmitique et l'acide oléique. Les échantillons du donneur 4 présentent des concentrations plus élevées pour la majorité des acides gras, mais principalement pour ces deux derniers. De plus, le donneur 3 présente de faibles concentrations en acide palmitique expliquant le regroupement des échantillons dans les quadrants 3 et 4 soit plus près des « loadings » des acides oléique et linoléique et plus éloignés de l'acide palmitique. Une fois de plus, la différence dans l'abondance des acides gras dans les triglycérides des tissus mous permet d'observer une séparation entre deux donneurs. Cela pourrait d'ailleurs être expliqué par l'IMC de chaque donneur. En effet, le donneur 4 présentait des signes d'obésité (Tableau 2.2) pouvant être à l'origine des quantités plus importantes en acides gras saturés mesurés pour celui-ci.

En somme, suivant l'analyse des deux graphiques résultant de la PCA effectués à partir des jeux de données des donneurs 3 et 4, plusieurs conclusions peuvent être tirées. Tout d'abord, seuls les échantillons collectés durant le stade frais peuvent être différenciés des autres échantillons pour les deux donneurs. Cette distinction est due à l'hydrolyse des triglycérides des tissus mous se produisant lors des stades gonflé et actif. Pour les autres stades de décomposition, il n'est pas possible de différencier les échantillons. Il en va de même pour les régions anatomiques étudiées qui ne peuvent être différenciées. La transition des acides gras insaturés vers ceux saturés observés pour les donneurs 1 et 2 et par Ueland *et al.* (2021), n'a pas été observée dans ce cas ne permettant pas de voir l'évolution vers des stades plus avancés. Une séparation entre les donneurs est cependant présente pour les échantillons collectés suivant la fin du stade frais des donneurs (JE 0 à 7; 20 à 99 ADD pour donneur 3 et JE 0 à JE 50, 11 à 258 ADD pour donneur 4). Cette distinction entre ceux-ci est principalement influencée par les concentrations différentes des acides palmitique et oléique retrouvés dans leurs triglycérides. Ces deux acides gras font d'ailleurs partie de ceux ayant le plus d'influence sur la distribution des échantillons en plus des acides

linoléique et palmitoléique. Il s'agit une fois de plus des acides gras ayant été identifiés comme biomarqueurs potentiels pour l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM) lors de l'analyse des graphiques de variations des concentrations (Section 5.3.6). Enfin, l'une des particularités importantes du donneur 4 est la séparation des échantillons en fonction des saisons qui n'est pas observée pour le donneur 3. En effet, dû à la décomposition particulière du donneur 4 qui présentait une apparence générale fraîche pour tout l'automne 2020 et l'absence d'hydrolyse des triglycérides, une distinction claire est obversable entre les échantillons collectés à l'automne et ceux collectés au printemps 2021. Cela n'est cependant pas observé pour le donneur 3 où les stades gonflé et actif ont eu lieu durant l'automne entrainant l'hydrolyse des triglycérides.

5.5.3 Donneurs 5 et 6

Les jeux de données produits suivant l'analyse des échantillons de tissus mous des donneurs 5 et 6, soit ceux étudiés du printemps à l'été 2021, ont permis de réaliser une analyse en composantes principales (PCA). Le « score plot » et le « bi-plot » résultants sont présentés aux figures 5.21 et 5.22 respectivement.



Figure 5.21 « Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 5 et 6 installés sur le site de REST[ES] au printemps 2021.

Tout d'abord, pour le donneur 5, un groupe d'échantillons rapprochés est observable à gauche du quadrant 2 du « score plot » de la figure 5.21. Ceux-ci correspondent aux premiers échantillonnages réalisés soit des jours 0 à 7 (9 à 113 ADD). À ce moment, le corps était au stade frais. Une première séparation est observée avec les deux échantillons du jour 13 (226 ADD) qui sont séparés du groupe, mais se situe toujours dans le deuxième quadrant. C'est d'ailleurs entre ces jours expérimentaux qu'une importante augmentation des concentrations pour tous les acides gras a été observée sur les graphiques de la figure 5.10. Le début de l'hydrolyse des triglycérides serait donc responsable de la séparation de ces échantillons. Cette observation concorde aussi avec l'entrée du donneur 5 aux stades gonflé et actif durant cet intervalle de temps soit au JE 10 (174 ADD) et au JE 8 (131 ADD) respectivement. Le stade actif était à son maximum au jour 13 (226 ADD) pour l'ensemble du corps. Par la suite, un groupe plus épars est formé dans le quadrant un pour les jours 24 à 43 (384 à 743 ADD) (excluant JE43-To). Un premier sommet de concentrations des acides gras avait été atteint durant cette période soit au JE 35 (600 ADD) pour le torse et au JE 29 (500 ADD) pour la cuisse. C'est aussi à ce moment que le stade actif s'est terminé (JE 27; 457 ADD) pour entrer graduellement aux stades avancés de décomposition. Un quatrième groupe, composé des échantillons des jours 50 à 57 (895 ADD à 1019 ADD) à l'exception de JE57-To, se situe sous les échantillons précédents dans le quatrième quadrant. Durant cet intervalle de temps, un second sommet de concentrations pour les acides gras contenus dans les tissus mous du donneur 5 a été atteint, soit au JE 50 (800 ADD) pour le torse et au JE 56 (1000 ADD) pour la cuisse. Le corps était alors entièrement aux stades de dessiccation et squelettique. Enfin, les derniers jours d'échantillonnages (JE 78 à 106; 1428 à 2030 ADD) forme un cinquième groupe d'échantillons dans le quadrant 3. Ils se retrouvent donc entre les premiers jours d'échantillonnage et les jours du milieu tel qu'observé pour les donneurs 1 et 2. En somme, plusieurs sous-groupes ont été formés à partir de la matrice de données du donneur 5 correspondant à diverses observations réalisées à partir des graphiques de concentration ainsi qu'aux transitions vers différents stades de décomposition.

Pour le donneur 6, un groupe rapproché d'échantillons des premiers jours expérimentaux (JE 0 à 7; 15 à 167 ADD) excluant JE7-Cu, est retrouvé dans le second quadrant du graphique de la figure 5.21 avec les échantillons des premiers jours du donneur 5. Cet intervalle de temps correspond à l'entièreté du stade frais et au début des stades gonflé et actif (JE 5; 121 ADD pour les deux stades). L'échantillon JE11-To est aussi retrouvé dans ce groupe. Ces observations correspondent aux différences rapportées lors de l'analyse des graphiques de concentrations de ce donneur (Figure 5.11). Effectivement, l'augmentation des concentrations des acides gras, aussi représentative de l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les

tissus mous du donneur, c'est fait plus tardivement pour le torse (JE 11; 230 ADD) comparativement à la cuisse (JE 9; 200 ADD). Cette différence de séparation des échantillons peut donc s'expliquer par une dégradation différente des triglycérides pour les deux régions anatomiques analysées. Cette différence est par la suite observée pour le reste de l'étude. En effet, pour les jours 11 à 63 (234 à 1302 ADD) en excluant JE11-To, les échantillons provenant du torse forment un groupe adjacent à celui des premiers jours expérimentaux dans le deuxième quadrant. Seuls les échantillons JE14-To et JE30-To sont dissociés de ce groupe s'expliquant par l'atteinte de sommet de concentration à ces moments sur les graphiques de concentrations de la figure 5.11. Les échantillons de la cuisse (JE 7 à 63; 167 à 1302 ADD) sont plutôt distribués sur l'ensemble de la composante principale 1 du troisième quadrant. Les derniers jours d'échantillonnage se situent à l'extrême droite de ce quadrant alors que les jours du centre sont plus à gauche. Cela peut correspondre à l'augmentation graduelle de la majorité des acides gras observée sur les graphiques à la figure 5.11 lors des dernières journées d'échantillonnage. À ce moment, le corps était aux stades de dessiccation et squelettique.

Dans l'ensemble, il ne semble pas y avoir de distinction majeure entre les différents stades de décomposition du donneur 6, peu importe la région anatomique étudiée à l'exception du stade frais qui forme le groupe rapproché dans le second quadrant. L'hydrolyse des triglycérides se déroulant lors des stades gonflé et actif permet de distinguer le premier stade de décomposition des échantillons ayant été collectés lors des stades plus avancés. Ce donneur ne présente pas de distinction importante entre les derniers jours d'échantillonnage et ceux en milieu d'étude tel qu'observé pour le donneur 5. En revanche, une particularité dans la décomposition visuelle du donneur 6 pourrait expliquer la séparation entre les échantillons de chacune des régions anatomiques. Le gonflement prolongé de l'abdomen (JE 5 à JE 43; 121 à 843 ADD) et la décomposition active moins importante dans cette région pourraient expliquer cette distinction. La cuisse du donneur 6 semble s'être décomposée plus rapidement et avoir subi une hydrolyse des triglycérides plus importante que l'abdomen. C'est d'ailleurs ce qui avait été observé sur les graphiques de concentrations de la figure 5.11. Il s'agit du seul donneur étudié présentant une séparation entre les régions anatomiques. Cela avait d'ailleurs été noté à la section 5.4.3 lors de l'analyse des graphiques d'interactions.

Enfin, il n'y a pas de séparation importante entre les échantillons provenant des deux donneurs. Le donneur 5 présente plusieurs petits groupes séparés autant par la première que la seconde composante. Le donneur 6 est principalement distribué sur la première composante. Il y a donc un mélange des échantillons particulièrement pour les jours expérimentaux en milieu d'étude du donneur 5 et ceux provenant de la cuisse du donneur 6. Il y a cependant une différenciation pour les derniers jours du donneur 5 qui sont dans les quadrants 3 et 4 alors que tous les échantillons du donneur 6 sont dans les quadrants 1 et 2 à l'exception de JE14-To. Le « bi-plot » présenté à la figure 5.22 permet de mieux comprendre cette séparation et la distribution générale des échantillons en fonction des deux composantes principales.



Figure 5.22 « Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche des donneurs 5 et 6 installés sur le site de REST[ES] au printemps 2021.

Afin de mieux comprendre la distribution des échantillons, il faut analyser les « loadings » ayant le plus d'influence sur chacune des composantes principales dans le « bi-plot » de la figure 5.22. Pour la première composante principale, les acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) sont ceux ayant le plus grand impact suivi des acides palmitoléique (C16:1) et stéarique (C18:0). Les acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1) et stéarique (C18:1) et stéarique (C16:0), oléique (C18:1) et stéarique (C18:0) sont ceux ayant le plus d'influence sur la seconde composante principale. Les acides myristique (C14:0) et linoléique (C18:2) peuvent aussi être considérés comme exerçant une influence sur celle-ci, mais plus faiblement. Tous les autres acides gras se retrouvent à l'intersection des deux droites indiquant qu'ils sont corrélés entre eux et n'ont donc pas d'influence majeure sur la distribution des échantillons.

Pour le donneur 5, plusieurs distinctions entre les échantillons provenant de divers stades de décomposition sont observables par les nombreux sous-groupes formés. Il est d'ailleurs possible de mieux comprendre leur formation en analysant les « loadings ». Les premiers jours (JE 0 à 7; 9 à 113 ADD) sont regroupés et loin des « loadings » vu leurs faibles concentrations en acides gras. Cependant, lorsque la décomposition passe du stade frais aux stades gonflé et actif, une distribution graduelle des échantillons est observée sur l'ensemble de la composante principale 1 se rapprochant ainsi des « loadings » puisque les concentrations en acides gras augmentent dû à l'hydrolyse des triglycérides. Au milieu de l'étude, soit des jours 24 à 43 (384 à 743 ADD) (excluant JE43-To), la distribution des échantillons est principalement influencée par les acides oléique, linoléique et palmitique. Il est par la suite possible d'observer la transition graduelle des acides gras insaturés vers les acides gras saturés alors que la décomposition avance. En effet, le groupe des jours 50 à 57 (895 à 1019 ADD) (excepté de JE57-To) est séparé des jours précédents dus à l'influence plus importante des acides palmitique et stéarique et donc une diminution des acides gras insaturés. L'hydrogénation des insaturations des acides gras insaturés lors des stades de décomposition avancés est à l'origine de cette modification. Cette observation avait d'ailleurs été faite lors de l'analyse des graphiques de concentrations (Section 5.3.7). Cette transition est d'autant plus marquée pour les échantillons des derniers jours. Ceux-ci se retrouvent d'ailleurs entre les échantillons provenant des premiers jours et ceux collectés en milieu d'étude telle qu'observée pour les donneurs 1 et 2 ainsi que dans le cadre de l'étude de Ueland *et al.* (2021). Les acides gras permettent donc de suivre l'évolution de la décomposition de ce donneur en passant par l'observation du début de l'hydrolyse des triglycérides jusqu'à la transition des acides gras insaturés vers les acides gras saturés lors de l'atteinte de stades de décomposition plus avancés.

Pour le donneur 6, les conclusions pouvant être tirées du « bi-plot » présenté à la figure 5.22 sont assez différentes. Seul le début de l'hydrolyse des triglycérides peut être observé pour ce donneur par la séparation entre les échantillons des premiers jours et les autres échantillons plus près des « loadings » des acides gras. D'ailleurs, les acides gras ayant le plus d'influence sur la séparation de ces échantillons sont ceux ayant un impact sur la première composante principale, soit les acides oléique, linoléique et palmitique majoritairement. Les échantillons des derniers jours sont d'ailleurs fortement influencés par l'acide oléique alors que l'acide linoléique impact de manière plus importante les échantillons collectés en milieu d'étude. Aucune transition des acides gras insaturés vers leur analogue saturé n'a été observée. Les « loadings » permettent aussi de comprendre la séparation entre les échantillons provenant des deux régions anatomiques. Les échantillons du torse sont beaucoup plus éloignés des loadings indiquant la faible influence des acides gras comparativement aux échantillons provenant du torse sont très près du groupe des premiers jours indiquant leur faible concentration en acide gras. Cela est d'ailleurs clairement observé sur les graphiques de concentrations de la figure 5.11 et sur les graphiques d'interactions de la figure 5.16.

Enfin, en observant les acides gras ayant un impact sur la seconde composante principale, il est possible de mieux comprendre la séparation observée entre certains échantillons provenant des deux donneurs. Considérant que les échantillons des derniers jours expérimentaux du donneur 5 se retrouvent tous dans les quadrants 3 et 4, il est clair que leur distribution est largement influencée par les acides palmitique et stéarique. Le donneur 6 est plutôt influencé majoritairement par l'acide oléique. Cette différence pourrait découler d'une dissimilitude dans la composition des triglycérides des deux donneurs, mais elle pourrait aussi être expliquée par la décomposition différente de ceux-ci.

En somme, les échantillons collectés lors des premiers jours (JE 0 à 7, 9 à 151 ADD pour le donneur 5 et 15 à 167 ADD pour le donneur 6) pour les donneurs 5 et 6, alors qu'ils étaient au stade frais, se retrouvent dans un petit groupe rapproché. Il est donc impossible de les différencier. Une distinction avec les autres jours est ensuite observée dû à l'hydrolyse des triglycérides induisant l'augmentation des concentrations des acides gras libres. Pour le donneur 5, plusieurs sous-groupes sont formés en fonction des différents stades de décomposition observés. Il est d'ailleurs possible d'observer la transition des acides gras insaturés vers ceux saturés lors de l'atteinte de stades avancés. À l'inverse, il n'est pas possible de différencier les échantillons du donneur 6 en fonction des stades de décomposition à l'exception du stade

frais. De plus, ce donneur présente une séparation entre les deux régions anatomiques étudiées. Les triglycérides provenant des échantillons de tissus mous du torse semblent s'être moins dégradés que ceux de la cuisse. La décomposition particulière du donneur 6 pourrait être à l'origine des différences observées entre les régions anatomiques ainsi que de l'absence de sous-groupes selon les stades de décomposition. Malgré cela, les échantillons provenant des deux donneurs ne présentent pas une séparation claire. En effet, les échantillons collectés en milieu d'étude pour le donneur 5 sont indifférenciables des échantillons provenant de la cuisse du donneur 6. Seuls les échantillons des derniers jours du donneur 5 peuvent être différenciés des autres adéquatement. Finalement, les acides gras exerçant une influence sur la séparation des échantillons sont aussi ceux pouvant être de bons biomarqueurs potentiels pour l'estimation de l'IPM. Il s'agit des mêmes que ceux identifiés suivant l'analyse des PCA des autres donneurs ainsi que par l'observation des graphiques de la section 5.3.9 soit les acides palmitique, oléique, linoléique et stéarique.

5.5.4 Tous les donneurs (1 à 6)

La figure 5.23 présente le « score plot » résultant de la PCA des jeux de données de tous les donneurs étudiés (1 à 6).



Figure 5.23 « Score plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs (1 à 6) installés sur le site de REST[ES] d'août 2020 à août 2021.

Scores

L'élément le plus important du « score plot » présenté à la figure 5.23 est le groupe d'échantillons rapprochés dans le quadrant 2. Celui-ci est composé de tous les échantillons collectés lors du stade frais de chaque donneur. Par la suite, l'observation d'une séparation graduelle des échantillons dans le reste du plan cartésien est rencontrée suivant l'hydrolyse des triglycérides se produisant alors que les donneurs présentent les stades gonflé et actif. Cela se produit autour de 200 ADD pour tous les donneurs à l'exception du donneur 4. En ce qui a trait au reste de la PCA, aucun groupe d'échantillons particulier n'est observé. Il ne semble donc pas possible de faire une corrélation directe entre les stades de décomposition et les concentrations des acides gras à partir d'une PCA. Seul le passage du stade frais vers les stades gonflé et actif est adéquatement observable, bien que la séparation des groupes ne soit pas claire.

Cependant, malgré le manque de corrélation apparent pour les derniers stades de décomposition (dessiccation et squelettique), un autre point important à noter est l'absence de distinction majeure entre les donneurs. Lors des comparaisons entre les donneurs d'une même saison (Sections 5.5.1 à 5.5.3), quelques distinctions entre les donneurs étaient observées par la présence de sous-groupes. Dans la présente PCA (Figure 5.23), il n'est pas possible de différencier les échantillons provenant des différents donneurs à l'exception d'un petit groupe correspondant aux derniers jours d'échantillonnage du donneur 5 et l'échantillon D4 JE310-To. Cela permet donc d'appuyer les conclusions émises dans les sections précédentes concernant l'homogénéité de distribution des acides gras dans les tissus adipeux de différents individus. Le « bi-plot » présenté à la figure 5.24 permet d'ailleurs de valider cela ainsi que d'expliquer la distribution des échantillons dans le plan cartésien.



Figure 5.24 « Bi-plot » résultant de l'analyse en composantes principales (PCA) des échantillons provenant du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs (1 à 6) installés sur le site de REST[ES] d'août 2020 à août 2021.

Bi-plot

En observant les « loadings » du « bi-plot » de la figure 5.24, les acides gras ayant le plus d'influence sur les deux composantes principales retenues sont les acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2). Comme conclu dans les différentes sections précédentes (Sections 5.2 à 5.4), ces acides gras présentent un potentiel plus important à titre de biomarqueurs de l'IPM. Il s'agit d'ailleurs de ceux identifiés dans les différentes PCA présentées dans la présente section (Section 5.5).

En somme, malgré l'absence de corrélation claire entre les concentrations des acides gras et les stades de décomposition observés chez les donneurs sur certaines des PCA présentées, les acides gras présentent définitivement un potentiel pour l'estimation de l'IPM, plus particulièrement les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique. Ces résultats appuient d'ailleurs les conclusions émises par Ueland *et al.* (2021) dans leur étude sur la décomposition des lipides dans le climat australien. Aussi, l'observation de l'hydrolyse des triglycérides lors des stades gonflé et actif est un élément non négligeable qui pourrait éventuellement permettre de déterminer l'IPM pour les premiers stades de décomposition (frais, gonflé et actif).

5.6 Analyses de variance (ANOVA)

Enfin, des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs ont été réalisées. Celles-ci permettent d'observer les différences entre les six donneurs, les deux régions anatomiques étudiées et les interactions entre les donneurs et les régions. Tout d'abord, une ANOVA classique à deux facteurs avec une correction de type III a été réalisée. Ce type de correction doit être utilisé puisque les groupes du jeu de données n'étaient pas balancés (p. ex. les groupes n'ont pas le même nombre de données). La correction de type III permet d'ajuster les sommes des carrées afin d'estimer ce qu'ils seraient si le jeu de données était balancé (Hershberger, 2014). L'utilisation d'une ANOVA classique repose cependant sur l'hypothèse de normalité et d'homogénéité du groupe de données. De plus, une ANOVA classique est sensible aux données aberrantes. Des tests de normalité et d'homogénéité ont donc été effectués afin de vérifier si le jeu de données répondait aux hypothèses posées. Pour le test de normalité Shapiro-Wilk, les valeurs de p obtenues pour chaque acide gras étaient inférieures à 0,05 (Annexe K) indiquant une absence de normalité dans la distribution des données. Concernant le test d'homogénéité de variance de Levene, les valeurs de p obtenues étaient inférieures à 0,05 (Annexe K) pour deux acides gras saturés seulement indiquant l'homogénéité de la variance de la majorité des acides gras. En raison de la violation de l'un de ces tests, un autre type d'ANOVA doit être utilisé. Une ANOVA robuste à deux facteurs a donc été réalisée. Ce type d'analyse de variance résiste aux écarts par rapport aux hypothèses de l'ANOVA classique. Elle est aussi plus robuste aux valeurs aberrantes.

Le tableau 5.2 présente les résultats d'une ANOVA classique à deux facteurs avec correction de type III et ceux d'une ANOVA robuste à deux facteurs. Malgré la violation des hypothèses de normalité et d'homoscédacité, Mair et Wilcox (2020) suggèrent de comparer les résultats de la méthode robuste à celle de la méthode classique.

Tableau 5.2 Résultats de l'ANOVA classique à deux facteurs et de l'ANOVA robuste à deux facteurs. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0,05$)

	ANOVA classique à deux facteurs			ANOVA robuste à deux facteurs		
Analyte	Donneur	Région	Donneur: Région	Donneur	Région	Donneur: Région
Acide gras saturés						
Acide laurique	1,78 x 10 ⁻⁰⁷	0,3915	0,8942	0,001	0,251	0,056
Acide myristique	0,03478	0,29332	0,2808	0,077	0,194	0,063
Acide palmitique	0,1718	0,1246	0,3435	0,193	0,089	0,488
Acide stéarique	0,00533	0,32119	0,82692	0,083	0,316	0,378
Acide arachidique	0,1159	0,5248	0,7726	0,082	0,492	0,382
Acide gras insaturés						
Acide myristoléique	4,31 x 10 ⁻⁰⁵	0,07297	0,0659	0,002	0,00140	0,063
Acide palmitoléique	0,07332	0,01963	0,5312	0,008	0,031	0,128
Acide oléique	0,84673	0,14205	0,03962	0,228	0,138	0,005
Acide linoléique	0,2434	0,4323	0,3287	0,186	0,369	0,111

Tout d'abord, en comparant les résultats obtenus pour l'ANOVA classique à ceux de l'ANOVA robuste pour les acides gras insaturés, seul l'acide laurique présente une différence statistiquement significative entre les donneurs dans les deux cas. L'hypothèse nulle, selon laquelle les moyennes des concentrations de l'acide laurique sont égales entre les donneurs, est donc rejetée. Puisque le jeu de données comporte six donneurs, des tests post-hoc ont été réalisés pour l'ANOVA robuste (Annexe L) afin de déterminer quelles paires de donneurs présentent des différences statistiquement significatives entre leurs moyennes pour l'acide laurique. Ces tests ont permis d'identifier que cette différence provient majoritaire des donneurs 2 et 3 lorsqu'ils sont mis en paire avec les autres donneurs indépendamment de la région anatomique. Pour tous les autres acides gras insaturés, aucune différence significative n'est observée autant entre les donneurs, les régions anatomiques et entre les donneurs et les régions anatomiques combinées pour l'ANOVA robuste. Seuls les acides laurique, myristique et stéarique ont été identifiés comme présentant des différences significatives entre les moyennes de concentrations des donneurs avec l'ANOVA classique.

Ensuite, pour les acides gras saturés, les acides myristoléique et palmitoléique présentent des différences statistiquement significatives autant entre les donneurs qu'entre les régions anatomiques pour l'ANOVA robuste. Des tests post-hoc ont été réalisés pour les donneurs. Pour l'acide myristoléique, les différences sont principalement rencontrées pour les moyennes de concentration des donneurs 3 et 4 lorsqu'ils sont mis en paires avec les autres donneurs alors qu'il n'y a pas de tendance claire pour l'acide palmitoléique (Annexe L). En ce qui a trait aux régions anatomiques, aucun test n'est nécessaire puisque seules deux régions sont comparées. Une différence statistiquement significative est donc rencontrée pour ces deux acides entre le torse et la cuisse de chaque donneur.

Ces résultats permettent de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, en se basant sur les résultats obtenus à partir de l'ANOVA robuste, certains acides gras semblent être des biomarqueurs plus intéressants pour l'évaluation de l'intervalle post mortem (IPM). Il s'agit des acides myristique, palmitique, stéarique et arachidique pour des acides gras saturés et des acides linoléique et oléique pour les acides gras insaturés. L'absence de différence statistiquement significative entre les donneurs pour ces acides gras ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle selon laquelle les moyennes de concentrations sont égales entre les donneurs. Ces acides pourraient donc être de bons biomarqueurs potentiels pour estimer l'IPM puisqu'il n'y a pas de variations importantes entre les moyennes de concentrations entre différents individus étudiés à différents moments.

Deuxièmement, à la lumière des résultats de l'ANOVA classique et de l'ANOVA robuste, il est clair qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les concentrations en acides gras retrouvées dans les deux régions anatomiques étudiées (torse et cuisse) particulièrement pour les acides gras saturés où aucune différence n'a été observée. Pour les acides gras insaturés, seuls les acides myristoléique et palmitoléique conduisent au rejet de l'hypothèse nulle. Cette homogénéité apparente a d'ailleurs été observée dans plusieurs tests statiques effectués dans le cadre de cette étude en plus de supporter de précédentes études (Makristathis *et al.*, 2002; Ueland *et al.*, 2021).

5.7 Discussion générale

Suivant l'analyse des différents graphiques et des tests statistiques réalisés à partir de l'ensemble des données recueillies dans le cadre de cette étude sur la décomposition des corps dans le climat froid canadien, il est possible de tirer plusieurs conclusions et ainsi de répondre aux objectifs présentés à la section 1.8.

En premier lieu, l'homogénéité de la distribution des acides gras composant les triglycérides des deux régions anatomiques à l'étude (torse et cuisse) a largement été démontrée dans la majorité des analyses réalisées. Les graphiques d'interactions (Sections 5.1 et 5.4), les PCA (Section 5.5) et les différentes ANOVA (Sections 5.1 et 5.6) ont démontré l'absence de différence statistiquement significative tant entre les côtés (gauche et droite) qu'entre les régions anatomiques (torse et cuisse) étudiées pour un même individu. L'une des exceptions rencontrées est pour le donneur 6 où une différence importante entre les concentrations des acides gras du torse et de la cuisse a été observée dans les graphiques de concentrations (Figure 5.11), les graphiques d'interaction (Figure 5.16) et la PCA (Figure 5.21). Cette différence pourrait cependant être expliquée par la décomposition différente entre les deux régions étudiées (décomposition différentielle). Effectivement, comme mentionné à la section 4.2.6, l'abdomen du donneur 6 a présenté des caractéristiques du stade gonflé pendant une période relativement longue et un stade actif où l'activité entomologique était très faible et ne semblait pas présenter de signe de liquéfaction des tissus mous internes (pas d'apparence « dégonflé »). Les cuisses de ce donneur ont, quant à elles, présenté une activité entomologique plus importante et les tissus mous semblaient s'être liquéfiés en partie. Cela pourrait donc expliquer les faibles concentrations en acides gras observées pour le torse. Le processus d'hydrolyse des triglycérides, se produisant lors des stades gonflé et actif, ne semble pas s'être déroulé à un rythme similaire pour les deux régions anatomiques, voire s'être peu produit au niveau de l'abdomen conduisant à de faibles concentrations en acides gras libres. Cette différence de décomposition entre ces deux régions anatomiques n'a cependant pas pu être expliquée dans l'état des connaissances actuelles sur le sujet. Plusieurs facteurs extrinsèques et intrinsèques (p. ex. maladie, cause du décès) pourraient en être à l'origine.

Une seconde exception rencontrée lors des différents tests statistiques quant à l'homogénéité de la distribution des acides gras est la différence statistiquement significative résultant de l'ANOVA robuste (Tableau 5.2) pour les acides myristoléique et palmitoléique. Malgré cela, il est possible de conclure que, dans l'ensemble, les acides gras contenus dans les triglycérides et donc les lipides du torse et des cuisses

sont uniformément distribués. Cette observation supporte d'ailleurs les conclusions de Makristathis *et al.* (2002) et Ueland *et al.* (2021) qui ont respectivement travaillé sur le profil d'acides gras de momies humaines et les différences de décomposition des acides gras entre un corps frais et un corps congelé. L'homogénéité de distribution des acides gras est un élément important pour le travail de terrain puisqu'il peut s'avérer difficile de prélever des échantillons dans une même région anatomique sur différent cas selon l'état de préservation des corps. Certaines régions anatomiques peuvent s'être décomposées plus rapidement que d'autres. C'est d'ailleurs ce qui s'est produit pour le donneur 5 chez qui l'échantillonnage du torse s'est terminé beaucoup plus tôt que celui des cuisses (différence de 28 jours soit 602 ADD) vue la liquéfaction complète des tissus mous du torse. De plus, certaines régions anatomiques peuvent aussi avoir été entièrement consommées par des charognards ou encore seule une partie d'un corps peut être retrouvé. Cette homogénéité apparente des acides gras dans les tissus adipeux s'avère donc être un atout important pour envisager leur utilisation comme biomarqueurs pour l'estimation de l'intervalle post mortem (IPM).

En second lieu, certains acides gras étudiés présentent un potentiel plus grand à titre de biomarqueurs afin d'estimer l'IPM : les acides palmitique et stéarique (acides gras saturés) et les acides oléique et linoléique (acides gras insaturés). C'est d'ailleurs ceux retrouvés en plus grande quantité dans les triglycérides des tissus mous analysés. L'acide myristique semble aussi avoir un certain potentiel, mais les quatre acides gras précédemment mentionnés sont ceux identifiés dans toutes les analyses réalisées. Les résultats obtenus suivant les PCA (Figures 5.18, 5.20 et 5.22) démontrent clairement l'importance de ces acides gras. Pour tous les donneurs, il s'agit des acides gras permettant de séparer le plus adéquatement les échantillons en fonction des différents stades de décomposition observés. Ils sont particulièrement importants afin de distinguer le début de l'hydrolyse des triglycérides (passage du stade frais aux stades gonflé et actif) et dans la moitié des cas (donneurs 1, 2 et 5) le passage des donneurs à des stades de décomposition plus avancés (dessiccation et squelettisation). La pertinence des acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique en tant que biomarqueur a d'ailleurs été appuyée par les résultats des ANOVA classique et robuste (Tableau 5.2). Il s'agit d'acide gras ne présentant pas de différence statistiquement significative entre les six donneurs étudiés ni entre les différentes régions anatomiques. En revanche, ces acides gras n'ont pas été identifiés comme ceux ayant le plus grand potentiel pour estimer l'IPM d'après l'analyse des graphiques d'interactions (Section 5.4). Cela peut s'expliquer par les variations de concentrations plus importantes dans le temps qui ont conduit à des moyennes de concentrations plus variables que les acides avec de faibles variations comme les acides laurique, myristoléique et arachidique. C'est, entre autres, une raison supplémentaire qui en fait de ces acides gras de moins bons biomarqueurs potentiels. Cependant, comme mentionné dans la section 5.3, les acides myristoléique et arachidique pourraient être utiles afin d'évaluer le début de l'hydrolyse des triglycérides et donc le passage du stade frais au début des stades gonflé et actif.

Enfin, bien que les acides palmitique, oléique, linoléique et stéarique aient été identifiés comme de bons biomarqueurs potentiels pour estimer l'IPM, il n'a pas été possible d'établir de corrélation directe entre les concentrations obtenues et l'entièreté de l'IPM. En effet, bien que plusieurs échantillons provenant de certains donneurs aient été correctement séparés dans les PCA (Figures 5.18, 5.20 et 5.22) en fonction des différents stades de décomposition et/ou de l'IPM en général (début d'étude vs milieu vs fin), aucune valeur unique n'est attribuable à une valeur de ADD particulière. Ce phénomène avait d'ailleurs été observé à la section 5.3 lors de l'analyse des graphiques de variation des concentrations dans le temps. Seule l'hydrolyse des triglycérides semble se produire à une valeur relativement constante, soit à 200 ADD pour tous les donneurs à l'exception du donneur 4. Considérant tout cela, le potentiel des acides gras, plus particulièrement des acides palmitique, oléique, linoléique et stéarique, à titre de biomarqueurs de l'estimation de l'IPM est non négligeable. Des études complémentaires devront être menées afin d'augmenter le nombre de donneurs et permettre de mieux comprendre les variations observées.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

6.1 Objectifs et sommaires des résultats

La présente recherche s'inscrit dans une série d'études réalisées sur le site de Recherche en Sciences Thanatologiques [Expérimentales et Sociales] (REST[ES]), ouvert en août 2020, qui est le premier site de recherche sur la décomposition humaine au Canada. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer le potentiel des lipides en tant que biomarqueurs pour estimer l'intervalle post mortem (IPM) dans le climat continental froid et tempéré du sud du Québec (Dfb). Afin de répondre à cet objectif, quatre questions de recherches ont été soulevées.

La première consistait à comprendre l'influence du climat québécois sur la décomposition des tissus adipeux humains (p. ex. peau, muscles, gras). Pour ce faire, l'évolution de la décomposition de six donneurs installés à différentes saisons sur le site de REST[ES] a été suivie. Les comparaisons (en « accumulateddegree-days » (ADD)) des différents stades de décomposition observés chez les donneurs ont permis de conclure que les saisons semblent avoir une influence limitée sur le processus de décomposition à l'exception de l'hiver. En effet, mis à part le donneur 4, les stades de décomposition conçus pour les besoins de cette recherche (Tableau 2.1) débutent à des valeurs de ADD similaires et connaissent des durées comparables. Le donneur 4 est le seul à avoir présenté une trajectoire de décomposition qui se distingue de celle des autres. Plusieurs éléments pourraient être à l'origine de ces différences, notamment sa décomposition partielle dans l'eau durant deux semaines, son IMC élevé et les conditions climatiques dans lesquelles la décomposition a eu lieu (en hiver). Cependant, le donneur 3 qui a, lui aussi, été exposé aux mêmes conditions environnementales a connu une trajectoire de décomposition comparable à celle des autres donneurs étudiés dans le cadre de ce projet. En l'état des connaissances actuelles en thanatologie forensique, particulièrement en climat humide continental, il s'avère difficile de déterminer les causes exactes des différences observées entre le donneur 4 et les autres donneurs. L'hiver semble cependant exercer une certaine influence sur les stades de décomposition puisque le ou les stades observés à l'automne sont radicalement différents de celui ou ceux observés au printemps suivant. Dans le cas des donneurs 3 et 4, leur corps était en dessiccation complète suivant la fonte des neiges alors qu'ils ne présentaient peu, voire aucun signe de dessiccation avant les premières chutes de neige. En somme, malgré un nombre limité de donneurs disponible par saison, la décomposition semble évoluer de manière comparable durant le printemps, l'été et l'automne en se fondant sur l'apparition et la durée des stades de décomposition à l'aide des valeurs d'ADD.

La seconde question de recherche considérée dans ce mémoire visait à déterminer les concentrations des acides gras saturés et insaturés trouvés dans les tissus adipeux des donneurs durant les différents stades de décomposition. Pour ce faire, des méthodes d'extraction et d'analyse en GC-MS des échantillons de tissus mous collectés sur le site de REST[ES] ont d'abord été élaborées, optimisées et validées. Les concentrations de neuf acides gras saturés (acide laurique, myristique, palmitique, stéarique et arachidique) et insaturés (acide myristoléique, palmitoléique, oléique et linoléique) trouvés en quantités importantes dans les triglycérides des lipides ont été mesurées. Il a d'abord été démontré que les concentrations des acides gras étaient comparables pour les quatre zones anatomiques échantillonnées (côté droit et gauche du torse et les deux cuisses). En effet, grâce à des graphiques d'interactions, des PCA et des ANOVA, il a été possible de conclure que les acides gras semblaient uniformément répartis dans les triglycérides du corps humain. Ce résultat corrobore des études publiées dans la littérature (Makristathis et al., 2002; Ueland et al., 2021). Cette constatation a permis de réduire le nombre d'échantillons à analyser dans cette étude. Les concentrations observées entre les donneurs pour chaque acide gras étaient elles aussi du même ordre de grandeur, et ce malgré les variations dans le temps. Les concentrations minimales et maximales obtenues pour chaque acide gras sur l'ensemble des études sont comparables d'un donneur à l'autre. Seules les valeurs obtenues pour les échantillons provenant du torse du donneur 6 étaient différentes. Ce phénomène pourrait être expliqué par une décomposition particulière de l'abdomen de ce donneur. De plus, il a été identifié que les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique sont ceux présents en quantité la plus élevée dans les triglycérides chez tous les donneurs, corroborant ainsi les résultats disponibles dans la littérature scientifique (Forbes, 2008; Kingbury et al., 1960). Les variations de concentration de ces quatre acides gras sont aussi les plus importantes, ce qui présente un intérêt évident pour envisager leur utilisation comme biomarqueurs pour l'estimation de l'IPM. En résumé, les concentrations mesurées pour les différents acides gras sont similaires tant entre les différentes régions anatomiques chez un même individu (intraindividu) qu'entre différents individus de sexe, d'âge et de masse corporelle différents (interindividus).

La troisième question de recherche découle directement de la seconde et visait à déterminer s'il existe une corrélation entre les concentrations mesurées pour les acides gras et l'IPM. En comparant les variations de concentration dans le temps (en ADD) aux stades de décomposition observés chez les

donneurs, certaines corrélations ont été identifiées, principalement pour les premiers stades de décomposition (frais, gonflé et actif). Tout d'abord, une augmentation importante des concentrations de tous les acides gras étudiés est observable simultanément chez tous les donneurs (à l'exception du donneur 4) soit lors des stades gonflé et actif (à environ 200 ADD). Ce phénomène serait ainsi indicateur du début de l'hydrolyse des triglycérides qui se produit lors de ces stades de décomposition (Pfeiffer et al., 1998). Il serait alors possible d'identifier le passage du stade frais vers les stades gonflé et actif tels qu'observés lors de l'analyse des graphiques de variations des concentrations et des PCA. Par la suite, il a été observé qu'un maximum des concentrations pour tous les acides gras est atteint au début du stade de dessiccation (entre 300 et 600 ADD). Pour le reste du processus de décomposition, les corrélations observées entre les concentrations des acides gras et l'IPM ne permettent pas à ce stade une interprétation unique et évidente. L'analyse des graphiques de variations des concentrations et les PCA indiquent qu'il semble y avoir une transition des acides gras insaturés vers leurs analogues saturés chez certains donneurs (donneurs 1, 2 et 5), causée par l'hydrogénation des insaturations des acides gras insaturés. Les signes d'hydrogénation ont été observés durant le stade de dessiccation (entre 620 ADD et 1000 ADD). Cependant, il n'est pas possible en l'état des connaissances actuelles d'identifier une corrélation claire de cette transition. Enfin, malgré certaines différences observées dans l'évolution de la décomposition des donneurs, les observations visuelles semblent concorder avec les variations de concentrations des acides gras.

La quatrième et dernière question de recherche consistait à déterminer les acides gras pouvant potentiellement servir de biomarqueurs pour estimer l'IPM dans le cas où une corrélation aurait été démontrée. Malgré l'absence de corrélation claire pour les stades de dessiccation et squelettique, certains acides gras présentent un potentiel intéressant à explorer. Les acides palmitique et stéarique (saturés) et les acides oléique et linoléique (insaturés) présentent le plus grand potentiel parmi l'ensemble des analyses et tests statistiques réalisés dans cette étude. L'hydrolyse des triglycérides ainsi que l'hydrogénation des acides gras insaturés ont été observées majoritairement grâce à ces acides gras. L'acide arachidique pourrait, quant à lui, être un bon indicateur du début de l'hydrolyse des triglycérides et donc permettre l'identification du passage du stade frais vers les stades gonflé et actif. Des études ultérieures sur l'utilisation des acides gras.

6.2 Apports et applications de l'étude

Ce travail de recherche apporte une contribution significative à la thanatologie forensique, discipline en développement au Canada, en mettant à disposition de nouvelles connaissances primordiales sur le processus de décomposition dans un climat froid et tempéré. En outre, cette étude a mis en évidence le potentiel d'une nouvelle méthode d'estimation de l'IPM fondée sur la décomposition des lipides, peu utilisés à l'heure actuelle en pratique forensique. La littérature scientifique souligne d'ailleurs l'importance d'étudier la décomposition humaine dans différents environnements afin d'identifier leurs particularités et leur influence potentielle sur le processus de décomposition. Cependant, à ce jour, les climats froids et tempérés tel celui du sud du Québec souffraient d'un déficit d'études expérimentales. Cette recherche permet donc de combler une lacune importante dans l'état des connaissances actuelles sur le sujet. Cette étude servira de support initial pour les recherches subséquentes sur la décomposition humaine dans des climats comparables (p. ex. Canada, États-Unis, voire pays baltes en Europe). De plus, l'évaluation du potentiel des lipides à titre de biomarqueurs de l'IPM ouvre la voie au développement d'une nouvelle méthode d'estimation de l'IPM au Canada basée sur des données objectives (p. ex. utilisation des concentrations des acides gras en fonction des ADD) qui pourra venir compléter les approches de terrain utilisées en science forensigue. Enfin, les résultats et conclusions présentés dans le cadre de cette étude pourront, à terme, contribuer à l'identification de corps non identifiés, notamment en offrant un outil de tri au sein des dossiers de personnes disparues dont l'IPM n'est pas connu ou estimé et accélérer la résolution d'enquêtes et la poursuite de potentiels suspects afin de soutenir le système judiciaire.

En conclusion, ce mémoire apporte une contribution concrète à la création d'un premier état des connaissances sur l'évolution de la décomposition humaine au Canada et sur les apports potentiels des acides gras en tant que biomarqueurs de l'intervalle post mortem, élément clef dans les enquêtes impliquant des restes humains non identifiés.

6.3 Limitations de l'étude

Il importe toutefois de mentionner les limites de cette étude afin d'évaluer leur influence potentielle sur les résultats obtenus. La taille restreinte de la population étudiée pour chaque saison (n = 2) constitue la limite principale de cette étude. Dans le futur, il serait utile d'étudier la décomposition d'un nombre plus important d'individus afin de déterminer plus précisément les modalités d'évolution de la décomposition humaine dans le climat froid et tempéré du sud du Québec. Aussi, il conviendrait d'étudier un éventail plus large d'individus présentant des caractéristiques intrinsèques distinctes (sexe, âge, IMC, etc.). Dans le cadre de ce travail de recherche, seuls un donneur obèse, un jeune donneur et deux femmes ont été étudiés sur un total de six donneurs; il est donc difficile d'évaluer précisément l'impact des facteurs intrinsèques sur le processus de décomposition. Une autre limite à noter est l'inhibition de l'activité des charognards vertébrés pour les besoins de cette recherche. Or la littérature démontre l'influence importante des charognards sur la vitesse de décomposition, paramètre qui n'a pas pu être évalué dans cette étude pour des raisons éthiques. Une autre limite de cette étude est la reproductibilité de l'échantillonnage à l'aide de l'aiguille de biopsie. Puisque chaque individu présente, de manière inhérente, différentes épaisseurs de gras et de muscle, il n'a pas été possible d'échantillonner les tissus mous des donneurs à une profondeur constante pour l'ensemble de la population étudiée. De plus, pour un même donneur, l'épaisseur des différents tissus mous varie lors de la décomposition (liquéfaction des tissus mous) ne permettant pas un échantillonnage reproductible. Toutefois, l'homogénéité apparente de la distribution des acides gras dans les tissus mous réduit vraisemblablement l'influence de cette limite sur les résultats obtenus.

6.4 Perspectives de recherche

Afin de pallier les limites de cette étude, des recherches complémentaires devront être réalisées. Les conclusions de ce travail de recherche permettent d'ouvrir la voie à différentes études ultérieures. Tout d'abord, l'étude de la décomposition d'un plus grand nombre de sujets (n > 6) permettrait de mieux comprendre les particularités propres au climat du sud du Québec et plus particulièrement l'influence de la période hivernale. Une population plus large permettrait en outre de réduire l'impact de facteurs intrinsèques sur les données recueillies et/ou de mieux comprendre l'influence qu'exercent ces différents facteurs sur les trajectoires de décomposition. Par la suite, la corrélation entre l'hydrolyse des triglycérides et les premiers stades de décomposition (frais, gonflé et actif) et la transition des acides gras insaturés vers les acides gras saturés lors des stades de décomposition plus avancée (hydrogénation des acides gras insaturés) chez certains donneurs constituent des pistes de recherches intéressantes qui mériteront d'être approfondies dans le futur. Il serait particulièrement utile que ces recherches se concentrent sur les acides gras présentant le plus grand potentiel à titre de biomarqueurs pour estimer l'IPM qui ont été identifiés dans cette étude, soit les acides palmitique, stéarique, arachidique, oléique et linoléique.

ANNEXE A

CALCULS DES LIMITES DE DÉTECTION, DE QUANTIFICATION ET DU COEFFICIENT DE VARIATION

Exemple du calcul de la limite de détection (LD) à partir des données de l'acide myristoléique

Limite de détection (LD)= $\frac{(Conc. sol. standard) \times (3 \times \acute{E}cart-type)}{Moyenne}$

Limite de détection (LD) = $\frac{(2,5 \text{ ppm}) \text{ x} (3 \text{ x} 0,08 \text{ ppm})}{3,45 \text{ ppm}}$

Limite de détection LD = 0.2 ppm

Exemple du calcul de la limite de quantification (LQ) à partir des données de l'acide myristoléique

Limite de quantification (LQ) = $\frac{(Conc. sol. standard) \times (10 \times \acute{E}cart - type)}{Moyenne}$

Limite de quantification (LQ) = $\frac{(2,5 \text{ ppm}) \times (10 \times 0,08 \text{ ppm})}{3,45 \text{ ppm}}$

Limite de quantification (LQ) = 0.6 ppm

Exemple du calcul du coefficient de variation (CV) à partir des données de l'acide myristoléique

$$CV = \frac{\text{Écart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100 \%$$

$$CV = \frac{0.08 \text{ ppm}}{3.45 \text{ ppm}} \times 100 \% = 2.3 \%$$
ANNEXE B



COURBES D'ÉTALONNAGE

Figure B.2 Courbes d'étalonnage des neufs acides gras étudiés dans le cadre de ce projet réalisées à partir de solutions standards.

ANNEXE C

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 1

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@uqtr.ca

Figure C.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 1 installé sur le site de REST[ES] en août 2020; a) Frais (JE 0; 20,95 ADD) b) Gonflement de l'abdomen vu de côté (JE 6; 151,65 ADD) c) Gonflé et actif (JE 8; 188,02 ADD) d) Dessiccation (JE 18; 355,13 ADD) f) Dessiccation et squelettique (JE 70; 965,48 ADD; dernier jour d'échantillonnage).

ANNEXE D

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 2

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@uqtr.ca

Figure D.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 2 installé sur le site de REST[ES] en août 2020; a) Frais (JE 0; 20,95 ADD) b) Gonflé et actif (JE 7; 170,82 ADD) c) Gonflé et actif avec activité entomologique élevée (JE 8; 188,02 ADD) d) Dessiccation et squelettique (JE 15; 313,61 ADD) f) Dessiccation et squelettique (JE 70; 965,48 ADD; dernier jour d'échantillonnage).

ANNEXE E

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 3

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@ugtr.ca

Figure E.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 3 installé sur le site de REST[ES] en septembre 2020; a) Frais (JE 0; 19,54 ADD) b) Gonflé (JE 10; 130,28 ADD) c) Gonflé et actif (JE 24; 244,04 ADD) d) Gonflé, actif et début de dessiccation (JE 50; 366,65 ADD; dernier jour d'échantillonnage de l'automne 2020) f) Dessiccation (JE 226; 821,37 ADD; premier jour d'échantillonnage au printemps 2021).

ANNEXE F

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 4

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@uqtr.ca

Figure F.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 4 installé sur le site de REST[ES] en octobre 2020; a) Frais (JE 0; 10,47 ADD) b) Frais et dessiccation (JE 35; 228,04 ADD; dernier jour d'échantillonnage de l'automne 2020) c) Dessiccation (JE 219; 730,67 ADD; premier jour d'échantillonnage au printemps 2021) d) Actif et dessiccation/exemple de l'apparence « dégonflé » (JE 252; 578,48 ADD) f) Dessiccation (JE 324; 2740,81 ADD; dernier jour d'échantillonnage).

ANNEXE G

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 5

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@ugtr.ca

Figure G.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 5 installé sur le site de REST[ES] en mai 2021; a) Frais (JE 0; 9,04 ADD) b) Gonflé et actif (JE 10; 173,51 ADD) c) Gonflé, actif et dessiccation (JE11; 196,12 ADD) d) Dessiccation et squelettique/exemple de l'apparence « dégonflé » (JE 51; 913,38 ADD) f) Dessiccation et squelettique (JE 106; 2030,21 ADD; dernier jour d'échantillonnage).

ANNEXE H

DÉCOMPOSITION DU DONNEUR 6

Les photographies ont été retirées pour des raisons de confidentialité. Veuillez contacter l'auteur pour demander l'accès via l'adresse courriel suivante: gabrielle.harvey@ugtr.ca

Figure H.2 Évolution des stades de décomposition du donneur 6 installé sur le site de REST[ES] en juin 2021; a) Frais (JE 0; 14,65 ADD) b) Gonflé et actif (JE 6; 144,70 ADD) c) Gonflé et actif (JE 10; 216,95 ADD) d) Gonflé et actif (JE 11; 196,12 ADD) f) Dessiccation et Squelettique (JE 63; 1153,30 ADD; dernier jour d'échantillonnage).

ANNEXE I

TESTS DE SHAPIRO-WILK ET DE LEVENE (SECTION 5.1)

Tableau I.3 Résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk du jeu de données des échantillons du torse (droit et gauche) et de la cuisse (droite et gauche) du donneur 1. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0,05$)

Analyte	Valeur de p		
Acides gras saturés			
Acide laurique	0,420		
Acide myristique	0,1791		
Acide palmitique	0,1437		
Acide stéarique	0,124		
Acide arachidique	0,000830		
Acides gras insaturés			
Acide myristoléique	0,00186		
Acide palmitoléique	0,4196		
Acide linoléique	0,151		
Acide oléique	0,2068		

Tableau I.4 Résultats du test d'homogénéité de variance de Levene du jeu de données des échantillons du torse (droit et gauche) et de la cuisse (droite et gauche) du donneur 1. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0.05$)

Analyte	Valeur de p			
Acides gras saturés				
Acide laurique	0,9649			
Acide myristique	0,9826			
Acide palmitique	0,978			
Acide stéarique	0,923			
Acide arachidique	0,9996			
Acides gras insaturés				
Acide myristoléique	0,999			
Acide palmitoléique	0,9736			
Acide linoléique	0,960			
Acide oléique	0,997			

ANNEXE J

ÉCHANTILLONS ANALYSÉS EN GC-MS

Tableau J.2 Échantillons analysés en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) pour chaque donneur

Donneur	Jour expérimental et (valeur de ADD)	Jour expérimental et (valeur de ADD)			
1	0(21), 7(171), 14(294), 18(355), 42(661)	0 (21), 7(171), 10(219), 14(294), 30(539),			
	et 70(966)	32(561), 37(624), 39(641), 42(661) et			
		70(966)			
2	0(21), 7(171), 10(219), 14(294), 16(328),	0(21), 7(171), 11(236), 14(294), 23(428),			
	18(355), 23(428), 25(463), 28(509) et	32(561), 37(624), 39(641), 42(661) et			
	70(966)	70(966)			
3	0(20), 4(72), 7(99), 12(152), 14(162),	0(20), 7(99), 14(162), 25(254), 32(270),			
	25(254), 32(270), 38(282), 50(367),	38(282), 50(367), 226(821), 233(932),			
	226(821), 261(1417), 275(1696) et	261(1417), 275(1696) et 282(1820)			
	282(1820)				
4	0(11), 7(73), 14(136), 25(181), 31(193),	0(11), 4(49), 7(73), 14(136), 31(193),			
	43(278), 219(731), 268(1605), 296(2139),	43(278), 219(731), 275(1730), 296(2139),			
	310(2415) et 324(2741)	310(1215) et 324(2741)			
5	0(9), 3(46), 7(113), 13(226), 24(384),	0(9), 3(46), 7(113), 13(226), 24(384),			
	31(535), 36(616), 43(743), 50(895),	31(535), 43(743), 50(895), 57(1019),			
	57(1019) et 78(1428)	78(1428), 92(1704) et 106(2030)			
6	0(15), 3(73), 4(98), 7(167), 11(234),	0(15), 3(73), 7(166), 11(234), 14(291),			
	14(291), 21(423), 28(570), 30(695),	21(423), 28(570), 30(605), 35(700),			
	35(700), 49(976) et 63(1302)	49(976) et 63(1302)			

ANNEXE K

TESTS DE SHAPIRO-WILK ET DE LEVENE (SECTION 5.6)

Tableau K.3 Résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0,05$)

Analyte	Valeur de p			
Acides gras saturés				
Acide laurique	6,79 x 10 ⁻¹⁰			
Acide myristique	0,00024			
Acide palmitique	0,01435			
Acide stéarique	3,25 x 10⁻ ⁹			
Acide arachidique	2,64 x 10 ⁻¹⁰			
Acides gras insaturés				
Acide myristoléique	5,69 x 10 ⁻¹¹			
Acide palmitoléique	0,02255			
Acide linoléique	3,61 x 10⁻⁵			
Acide oléique	0,001822			

Tableau K.4 Résultats du test d'homogénéité de variance de Levene du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0,05$)

Analyte	Valeur de p			
Acides gras saturés				
Acide laurique	0,000524			
Acide myristique	0,06752			
Acide palmitique	0,09009			
Acide stéarique	0,0175			
Acide arachidique	0,660			
Acides gras insaturés				
Acide myristoléique	0,386			
Acide palmitoléique	0,09747			
Acide linoléique	0,177			
Acide oléique	0,201			

ANNEXE L

TESTS POST-HOC DE L'ANOVA ROBUSTE

Tableau L.1 Résultats des tests post-hoc du jeu de données des échantillons du torse et de la cuisse gauche de tous les donneurs. Les cellules en jaune indiquent la présence d'un résultat statistiquement significatif (valeur de $p \le 0,05$)

	Acides gras saturés				Acides gras insaturés				
	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide	Acide
	laurique	myristique	palmitique	stéarique	arachidique	myristoléique	palimoléique	linoléique	oléique
D1: D2	0,55961	0,22992	0,05156	0,02601	0,41734	0,86292	0,89115	0,27568	0,46609
D1: D3	0,00182	0,00777	0,97602	0,39318	0,50609	0,00288	0,96176	0,09452	0,9571
D1: D4	0,15274	0,23235	0,60627	0,90625	0,21681	0,01076	0,64148	0,38954	0,56509
D1: D5	0,08188	0,0324	0,11673	0,11252	0,88924	0,59511	0,2749	0,46962	0,6553
D1: D6	0,01029	0,11606	0,56969	0,68057	0,82451	0,15707	0,15701	0,44136	0,9962
D2: D3	0,00134	0,02752	0,02688	0,09069	0,7981	0,00055	0,71703	0,438	0,05653
D2: D4	0,09438	0,51218	0,43371	0,02492	0,01115	0,00678	0,37095	0,75692	0,09517
D2: D5	0,02087	0,10466	0,92019	0,60237	0,39606	0,61681	0,04049	0,05339	0,11611
D2: D6	0,00198	0,46114	0,10654	0,03151	0,07508	0,16291	0,00124	0,68015	0,16308
D3: D4	0,02235	0,48926	0,59618	0,35227	0,01968	0,85006	0,52655	0,92637	0,4399
D3: D5	0,00822	0,92665	0,08819	0,21967	0,52328	0,12553	0,08371	0,01413	0,54561
D3: D6	0,01514	0,13199	0,49635	0,60405	0,15836	0,02226	0,00482	0,2476	0,92699
D4: D5	0,69907	0,57446	0,51205	0,10373	0,11601	0,11501	0,42954	0,21342	0,86988
D4: D6	0,93775	0,77778	0,84164	0,60617	0,16761	0,02005	0,19833	0,61866	0,43484
D5: D6	0,44995	0,26053	0,21727	0,15	0,64538	0,50559	0,64066	0,10069	0,53436

RÉFÉRENCES

- Amendt, J. (2018). Forensic entomology. *Forensic Sciences Research*, 3(1), 1-1. https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1403081
- Amendt, J., Krettek, R., et Zehner, R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, *91*(2), 51-65. https://doi.org/10.1007/s00114-003-0493-5
- Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., et Hall, M. J. (2011). Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic science, medicine, and pathology*, 7(4), 379-392. <u>https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2</u>
- Anderson, G. S., et Cervenka, V. J.(2002). Insects associated with the body: their use and analyses. Dans Haglund, W., et Sorg, M. (dir.), Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives (p. 173-200). CRC Press.
- Arab, L. (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *The Journal of nutrition*, 133(3), 925S-932S. https://doi.org/10.1093/jn/133.3.925S
- Barton, P. S., Cunningham, S. A., Lindenmayer, D. B., et Manning, A. D. (2013). The role of carrion in maintaining biodiversity and ecological processes in terrestrial ecosystems. *Oecologia*, 171(4), 761-772. <u>https://doi.org/10.1007/s00442-012-2460-3</u>
- Baylin, A., Kabagambe, E. K., Siles, X., et Campos, H. (2002). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *The American journal of clinical nutrition*, *76*(4), 750-757. <u>https://doi.org/10.1093/ajcn/76.4.750</u>
- Berteaux, D. C., Nicolas; de Blois, Sylvie; Logan, Travis. (2014). Les climats du Québec. Dans Changements climatiques et biodiversité du Québec: vers un nouveau patrimoine naturel. PUQ.
- Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M. (2006). DNA and RNA structure. Dans Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M. (dir.), *Nucleic acids in chemistry and biology* (3^e ed, p. 13-76). Royal Society of Chemistry. <u>https://doi.org/10.1039/9781847555380</u>
- Bolton-Smith, C., Woodward, M., et Tavendale, R. (1997). Evidence for age-related differences in the fatty acid composition of human adipose tissue, independent of diet. *European journal of clinical nutrition*, 51(9), 619-624. <u>https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600455</u>
- Brais, C. J., Ibañez, J. O., Schwartz, A. J., et Ray, S. J. (2021). Recent advances in instrumental approches to time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 40(5). 647-669.
- Branden, C. I., et Tooze, J. (2012). The building blocks. Dans Branden, C. I., et Tooze, J. (dir.), *Introduction to protein structure* (2^e ed, p. 1-10). Garland Science.
- Calder, P., Harvey, D., Pond, C., et Newsholme, E. (1992). Site-specific differences in the fatty acid composition of human adipose tissue. *Lipids*, *27*(9), 716-720. https://doi.org/10.1007/BF02536031

- Campobasso, C. P., Di Vella, G., et Introna, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic science international*, *120*(1-2), 18-27. <u>https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00411-X</u>
- Carter, D. O., et Tibbett, M. (2008). Cadaver decomposition and soil: processes. Dans Carter, D. O., et Tibbett, M. (dir.), *Soil analysis in forensic taphonomy* (p. 29-51). CRC Press.
- Castellano, M. A., Villanueva, E. C., et Von Frenckel, R. (1984). Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of Forensic Science*, 29(2), 527-534. <u>https://doi.org/10.1520/jfs11700j</u>
- Catts, E. P., et Goff, M. L. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. *Annual review of Entomology*, *37*(1), 253-272. https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001345
- Christensen, A. M., Passalacqua, N. V., et Bartelink, E. J. (2019). Forensic taphonomy. Dans *Forensic anthropology: current methods and practice* (p. 145-181). Academic Press.
- Clark, M. A., Worrell, M. B., et Pless, J. E. (1997). Postmortem changes in soft tissues. Dans Sorg, M. H., et Haglund, W. D. (dir.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (p. 151-164). CRC Press.
- Cockle, D. L. (2013). Human decomposition and the factors that affect it: a retrospective study of death scenes in Canada [thèse de doctorat, Université Simon Fraser]. Summit. https://summit.sfu.ca/item/13876
- Cockle, D. L., et Bell, L. S. (2015). Human decomposition and the reliability of a 'Universal'model for post mortem interval estimations. *Forensic science international*, *253*, 136. e131-136. e139. http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.018
- Cockle, D. L., et Bell, L. S. (2017). The environmental variables that impact human decomposition in terrestrially exposed contexts within Canada. *Science & Justice*, *57*(2), 107-117. <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2016.11.001</u>
- Comstock, J. (2014). Elucidation of the lipid degradation process in soft tissue and fluid during decomposition, in the presence and absence of insects [thèse de doctorat, University of Ontario Institute of Technology]. Mirage. http://hdl.handle.net/10155/456
- Connor, M., Baigent, C., et Hansen, E. S. (2018). Testing the use of pigs as human proxies in decomposition studies. *Journal of forensic sciences*, *63*(5), 1350-1355. <u>http://dx.doi.org/10.1111/1556-4029.13727</u>
- Dent, B. B., Forbes, S. L., et Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental geology*, 45(4), 576-585. <u>https://doi.org/10.1007/s00254-003-0913-z</u>
- Développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques. (2015). *Sommaire normales mensuelles 30 ans (1981-2010).* Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. <u>https://menv.gouv.qc.ca/climat/donnees/sommaire.asp?cle=7011307&date_selection=2020-04-</u> <u>26</u>

DiMaio, D., et DiMaio, V. J. (2001). Time of death. Dans Forensic pathology (p. 21-42). CRC press.

- Dix, J., et Graham, M. (1999). Time of death (Postmortem interval) and decomposition. Dans Dix, J., et Graham, M. *Time of death, decomposition and identification: an atlas*. CRC press.
- Erzinçlioglu, Z. (2003). Forensic entomology. *Clinical medicine (London, England)*, *3*(1), 74-76. <u>http://dx.doi.org/10.7861/clinmedicine.3-1-74</u>
- Ferreira, M. T., et Cunha, E. (2013). Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic science international*, 226(1-3), 298. e291-298. e296. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.006
- Forbes, S. L. (2008). Decomposition chemistry in a burial environment. Dans Carter, D. O., et Tibbett, M. (dir.), *Soil analysis in forensic taphonomy* (p. 203-223). CRC Press.
- Forbes, S. L., Keegan, J., Stuart, B. H., et Dent, B. B. (2003). A gas chromatography-mass spectrometry method for the detection of adipocere in grave soils. *European journal of lipid science and technology*, 105(12), 761-768. <u>http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200300819</u>
- Forbes, S. L., Perrault, K. A., et Comstock, J. L. (2017). Microscopic Post-Mortem Changes: The Chemistry of Decomposition. Dans Schotsmans, E. M. J., Márquez-Grant, N., et Forbes, S. L. (dir.), *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment* (p. 26-38). John Wiley & Sons.
- Forbes, S. L., Stuart, B. H., Dadour, I. R., et Dent, B. B. (2004). A preliminary investigation of the stages of adipocere formation. *Journal of Forensic Science*, *49*(3), <u>http://dx.doi.org/10.1520/jfs2002230</u>
- Forbes, S. L., Stuart, B. H., et Dent, B. B. (2005). The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic science international*, 154(1), 24-34. <u>https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.107</u>
- Forbes, S., Stuart, B., et Dent, B. (2002). The identification of adipocere in grave soils. *Forensic science international*, 127(3), 225-230. <u>https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00127-5</u>
- Galloway, A., Birkby, W. H., Jones, A. M., Henry, T. E., et Parks, B. O. (1989). Decay rates of human remains in an arid environment. *Journal of Forensic Science*, 34(3), 607-616. http://dx.doi.org/10.1520/JFS12680J
- Gennard, D. (2012). Calculating the post mortem interval. Dans *Forensic entomology: an introduction* (p. 115-130). John Wiley & Sons.
- Gill-King, H. (1997). Chemical and ultrastructural aspects of decomposition Dans Sorg, M. H., et Haglund, W. D. (dir.), *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains* (p. 93-108). CRC Press.
- Goff, M. L. (2009). Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Experimental and applied acarology*, 49(1), 21-36. <u>http://dx.doi.org/10.1007/s10493-009-9284-9</u>

- Gotouda, H., Takatori, T., Terazawa, K., Nagao, M., et Tarao, H. (1988). The mechanism of experimental adipocere formation: hydration and dehydrogenation in microbial synthesis of hydroxy and oxo fatty acids. *Forensic science international*, *37*(4), 249-257. <u>https://doi.org/10.1016/0379-0738(88)90233-2</u>
- Haglund, W. D., et Sorg, M. H. (2002). Advancing forensic taphonomy: Purpose, theory, and process.
 Dans Haglund, W. D., et Sorg, M. H. (dir.), *Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives* (pp. 3-29). CRC Press.
- Haglund, W. D., et Sorg, M. H. (2002). Human remains in water environments. Dans Haglund, W. D., et Sorg, M. H. (dir.), *Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives* (p. 201-218). CRC Press.
- Hamilton, S. J., et Green, M. A. (2017). Gross Post-Mortem Changes in the Human Body. Dans Schotsmans,
 E. M. J., Márquez-Grant, N., et Forbes, S. L. (dir.), *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis* of the Dead and the Depositional (p. 9-25). John Wiley & Sons.
- Harvey, G., et Trudel, A. (2019). Évaluation de la taphonomie et thanatologie forensique dans un environnement froid et tempéré [document inédit]. Département de chimie, biochimie et physique, UQTR.
- Heffernan, A. G. (1964). Fatty acid composition of adipose tissue in normal and abnormal subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 15(1), 5-10. http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/15.1.5
- Hershberger, S. L. (2014). T ype I, T ype II and T ype III sums of squares. *Wiley StatsRef: Statistics Reference* Online. <u>https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat06355</u>
- Hirsch, J., Farquhar, J. W., Ahrens Jr, E., Peterson, M. L., et Stoffel, W. (1960). Studies of adipose tissue in man: a microtechnic for sampling and analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 8(4), 499-511. <u>https://doi.org/10.1093/ajcn/8.4.499</u>
- Hobischak, N., et Anderson, G. (1999). Freshwater-related death investigations in British Columbia in 1995–1996. A review of coroners cases. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 32(2-3), 97-106. https://doi.org/10.1080/00085030.1999.10757492
- Janaway, R. (1996). The decay of buried human remains and their associated materials. Dans *Studies in crime: an introduction to forensic archaeology* (p.58-85). Routledge
- Janaway, R. C., Percival, S. L., et Wilson, A. S. (2009). Decomposition of Human Remains. Dans Percival, S. L. (dir.), *Microbiology and Aging* (p. 313-334). Humana Press.
- Kingsbury, K., Paul, S., Crossley, A., et Morgan, D. (1961). The fatty acid composition of human depot fat. Biochemical Journal, 78(3), 541. <u>https://doi.org/10.1042/bj0780541</u>
- Liu, Z., et Phillips, J. B. (1991). Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of chromatographic science*, *29*(6), 227-231. https://doi.org/10.1093/chromsci/29.6.227

- Luong, S., Hayes, E., Flannery, E., Sutikna, T., Tocheri, M. W., Saptomo, E. W., et Roberts, R. G. (2017). Development and application of a comprehensive analytical workflow for the quantification of non-volatile low molecular weight lipids on archaeological stone tools. *Analytical Methods*, 9(30), 4349-4362. <u>https://doi.org/10.1039/C7AY01304C</u>
- Madea, B., et Henssge, C. (2015). General remarks on estimating the time since death. Dans Burkhard, M. (dir.), *Estimation of the time since death* (p. 1-6). CRC Press, Boca Raton.
- Mair, P., et Wilcox, R. (2020). Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behavior research methods*, 52(2), 464-488. <u>https://doi.org/10.3758/s13428-019-01246-w</u>
- Makristathis, A., Schwarzmeier, J., Mader, R. M., Varmuza, K., Simonitsch, I., Chavez, J. C., Platzer, W., Unterdorfer, H., Scheithauer, R., Derevianko, A., et Seidler, H. (2002). Fatty acid composition and preservation of the Tyrolean Iceman and other mummies. *J Lipid Res*, *43*(12), 2056-2061. <u>https://doi.org/10.1194/jlr.m100424-jlr200</u>
- Malcom, G. T., Bhattacharyya, A., Velez-Duran, M., Guzman, M., Oalmann, M., et Strong, J. (1989).
 Fatty acid composition of adipose tissue in humans: differences between subcutaneous sites. *The American journal of clinical nutrition*, 50(2), 288-291. <u>https://doi.org/10.1093/ajcn/50.2.288</u>
- Malik, A., et Tuckfield, B. (2019). Dimension reduction. Dans Applied Unsupervised Learning with *R*: Uncover hidden relationships and patterns with *k*-means clustering, hierarchical clustering, and *PCA* (p. 125-164). Packt Publishing Ltd.
- Mann, R. W., Bass, W. M., et Meadows, L. (1990). Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *Journal of Forensic Science*, 35(1), 103-111. <u>https://doi.org/10.1520/JFS12806J</u>
- Mant, A. K. (1987). Knowledge acquired from post-war exhumations. Dans Boddington, A., Garland, A. N., et Janaway, R. C. (dir.), *Death, decay and reconstruction: Approaches to archaeology and forensic science* (p. 65-78). Manchester University Press.
- Mant, A. K., et Furbank, R. (1957). Adipocere: a review. Journal of forensic medicine, 4, 18-35.
- Marhoff-Beard, S. J., Forbes, S. L., et Green, H. (2018). The validation of 'universal' PMI methods for the estimation of time since death in temperate Australian climates. *Forensic science international*, 291, 158-166. <u>https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.022</u>
- Matuszewski, S., Konwerski, S., Frątczak, K., et Szafałowicz, M. (2014). Effect of body mass and clothing on decomposition of pig carcasses. *International journal of legal medicine*, *128*(6), 1039-1048. <u>https://doi.org/10.1007/s00414-014-0965-5</u>
- McMurry, J., et Begley, T. P. (2006). *Chimie organique des processus biologiques* (traduit par G. L. A., Mislin). De Boeck.
- McNair, H. M., Miller, J. M., et Snow, N. H. (2019). Qualitative et quantitative analysis. Dans *Basic gas chromatography* (3^e ed, p. 139-155). John Wiley & Sons.

- Megyesi, M. S., Nawrocki, S. P., et Haskell, N. H. (2005). Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *Journal of Forensic Science*, *50*(3), 1-9. https://doi.org/10.1520/JFS2004017
- Mellen, P. F., Lowry, M. A., et Micozzi, M. S. (1993). Experimental observations on adipocere formation. *Journal of Forensic Science*, 38(1), 91-93. <u>https://doi.org/10.1520/JFS13379J</u>
- Michaud, J. P., et Moreau, G. (2011). A statistical approach based on accumulated degree-days to predict decomposition-related processes in forensic studies. *Journal of forensic sciences*, *56*(1), 229-232. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01559.x
- Michel, F. (2010). Derivatization of polar compounds for GC [presentation PowerPoint]. Sigma-Aldrich Co.
- Micozzi, M. S. (1991). Postmortem putrefaction and decay. Dans Iscan, M. Y. (dir.), *Postmortem change in human and animal remains-A systematic approach* (p. 9-13). Wayne State University Press
- Niessen, W. (2001). Principles and instrumentation of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Dans *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (p. 1-29). Marcel Dekker, Inc.
- Notter, S. J., Stuart, B. H., Rowe, R., et Langlois, N. (2009). The initial changes of fat deposits during the decomposition of human and pig remains. *Journal of forensic sciences*, *54*(1), 195-201. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00911.x
- O'Brien, R. C., Appleton, A. J., et Forbes, S. L. (2017). Comparison of taphonomic progression due to the necrophagic activity of geographically disparate scavenging guilds. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 50(1), 42-53. <u>https://doi.org/10.1080/00085030.2017.1260894</u>
- Patrushev, Y. (2015). Advantages of two-dimensional gas chromatography. *Kinetics and Catalysis, 56*(3), 386-393. <u>https://doi.org/10.1134/S0023158415030155</u>
- Payne, J. A. (1965). A summer carrion study of the baby pig Sus scrofa Linnaeus. *Ecology*, 46(5), 592-602. https://doi.org/10.2307/1934999
- Pecsi, E. L., Bronchti, G., Crispino, F., et Forbes, S. L. (2020). Perspectives on the establishment of a canadian human taphonomic facility: The experience of REST[ES]. *Forensic Science International: Synergy*, 2, 287-292. <u>https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2020.09.001</u>
- Petrik, M., Hobischak, N., et Anderson, G. (2004). Examination of factors surrounding human decomposition in freshwater: a review of body recoveries and coroner cases in British Columbia. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 37(1), 9-17. https://doi.org/10.1080/00085030.2004.10757565
- Pfeiffer, S., Milne, S., et Stevenson, R. (1998). The natural decomposition of adipocere. *Journal of Forensic Science*, 43(2), 368-370. <u>https://doi.org/10.1520/JFS16147J</u>
- Pinheiro, J. (2006). Decay process of a cadaver. Dans Schmitt, A., Cunha, E., et Pinheiro, J. (dir.), Forensic anthropology and medicine: complementary sciences from recovery to cause of death (p. 85-116). Humana Press

- Pocock, G., Richards, C. D., et Richards, D. A. (2013). The chemical constitution of the body. Dans *Human physiology* (p. 27-43). Oxford university press.
- Ribéreau-Gayon, A. (2019). The biological decomposition process of human corpses in marine environments and its potential to estimate the postmortem submersion interval [thèse de doctorat, University College London]. UCL. <u>https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10065647</u>
- Rodriguez, W. C., et Bass, W. M. (1985). Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *Journal of Forensic Science*, *30*(3), 836-852. <u>https://doi.org/10.1520/JFS11017J</u>
- Ruiz-Gutiérrez, V., Montero, E., et Villar, J. (1992). Determination of fatty acid and triacylglycerol composition of human adipose tissue. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *581*(2), 171-178. <u>https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80269-V</u>
- Saul, J. M., Saul, F. P., Haglund, W., et Sorg, M. (2002). Forensics, archaeology, and taphonomy: the symbiotic relationship. Dans Haglund, W., et Sorg, M. (dir.), *Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives* (p. 71-98). CRC Press.
- Schoenen, D., et Schoenen, H. (2013). Adipocere formation-the result of insufficient microbial degradation. *Forensic Science International*, 226(1-3), 301 e301-306. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.023
- Schotsmans, E. M., Márquez-Grant, N., et Forbes, S. L. (2017). Introduction. Dans Schotsmans, E. M. J., Márquez-Grant, N., et Forbes, S. L. (dir.), *Taphonomy of humain remains: forensic analysis of the dead and the depositional environement* (p. 1-8). John Wiley & Sons.
- Shoffner, A. V., et Brittingham, M. C. (2013). Freeze-drying to preserve birds for teaching collections. Northeastern Naturalist, 20(3), 441-450. <u>https://doi.org/10.1656/045.020.0309</u>
- Sigma-Aldrich Co. (1997). BSTFA + TMCS Product Specification. <u>https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/112</u> <u>/897/bstfa_tmcs.pdf</u>
- Simmons, T., Cross, P. A., Adlam, R. E., et Moffatt, C. (2010). The influence of insects on decomposition rate in buried and surface remains. *Journal of forensic sciences*, 55(4), 889-892. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01402.x
- Simmons, T., et Cross, P. (2012). Forensic Taphonomy. Dans Siegel, J. A., Saukko, P. J., et Houck, M. M. (dir.), *Encyclopedia of Forensic Sciences* (p. 12-17). Elsevier.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., et Crouch, S. R. (2013). Dans La chromatographie en phase gazeuse. Dans Chimie analytique (traduit par C. Buess-Herman, J. Dauchot et T. Doneux), (3^eed., p. 87-911). De.Boeck.
- Sledzik, P. S., et Micozzi, M. S. (1997). Autopsied, embalmed, and preserved human remains: distinguishing features in forensic and historic contexts. Dans Sorg, M. H., et Haglund, W. D. (dir.), Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains (p. 483-495). CRC Press.

- Spicka, A., Johnson, R., Bushing, J., Higley, L. G., et Carter, D. O. (2011). Carcass mass can influence rate of decomposition and release of ninhydrin-reactive nitrogen into gravesoil. *Forensic science international*, 209(1-3), 80-85. <u>https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.01.002</u>
- Stillwell, W. (2016a). Membrane lipids: Fatty acids. Dans An introduction to biological membranes: composition, structure and function (2^e ed, p. 49-62). Academic Press.
- Stillwell, W. (2016b). Membrane polar lipids. In *An introduction to biological membranes: composition, structure and function* (2^e ed, p. 63-87). Academic Press.
- Stuart, B. H., et Ueland, M. (2017). Decomposition in Aquatic Environments. Dans Schotsmans, E. M. J., Márquez-Grant, N., et Forbes, S. L. (dir.), *Taphonomy of humain remains: forensic analysis of the dead and the depositional environement* (p. 235-250). John Wiley & Sons.
- Takatori, T. (2001). The mechanism of human adipocere formation. *Legal Medicine*, *3*(4), 193-204. https://doi.org/10.1016/S1344-6223(01)00036-0
- Takatori, T., et Ishiguro, N. (1984). Optical rotation of 10-hydroxy fatty acids in human adipocere. Nihon hoigaku zasshi= The Japanese journal of legal medicine, 38(6), 785-786.
- Takatori, T., Gotouda, H., Terazawa, K., Mizukami, K., et Nagao, M. (1987). The mechanism of experimental adipocere formation: substrate specificity on microbial production of hydroxy and oxo fatty acids. *Forensic science international*, *35*(4), 277-281. <u>https://doi.org/10.1016/0379-0738(88)90233-2</u>
- Takatori, T., Ishiguro, N., Tarao, H., et Matsumiya, H. (1986). Microbial production of hydroxy and oxo fatty acids by several microoganisms as a model of adipocere formation. *Forensic science international*, *32*(1), 5-11. <u>https://doi.org/10.1016/0379-0738(86)90152-0</u>
- Ubelaker, D. H., et Zarenko, K. M. (2011). Adipocere: what is known after over two centuries of research. Forensic science international, 208(1-3), 167-172. <u>https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.11.024</u>
- Ueland, M., Collins, S., Maestrini, L., Forbes, S. L., et Luong, S. (2021). Fresh vs. frozen human decomposition–A preliminary investigation of lipid degradation products as biomarkers of postmortem interval. *Forensic Chemistry*, 24, 100335. <u>https://doi.org/10.1016/j.forc.2021.100335</u>
- Varmuza, K., et Filzmoser, P. (2016). Principal Component Analysis. Dans Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics (p. 44-90). CRC press.
- Vass, A. A. (2001). Beyond the grave-understanding human decomposition. *Microbiology today, 28*, 190-193.
- Vass, A. A. (2011). The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic science international*, 204(1-3), 34-40. <u>https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.04.052</u>
- Vass, A. A., Barshick, S.-A., Sega, G., Caton, J., Skeen, J. T., Love, J. C., et Synstelien, J. A. (2002). Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *Journal of Forensic Science*, 47(3), 542-553. https://doi.org/10.1520/JFS15294J

- Vass, A. A., Bass, W. M., Wolt, J. D., Foss, J. E., et Ammons, J. T. (1992). Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Science*, *37*(5), 1236-1253. https://doi.org/10.1520/JFS13311J
- Zhou, C., et Byard, R. W. (2011). Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers – An overview. *J Forensic Leg Med*, *18*(1), 6-9. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2010.10.003