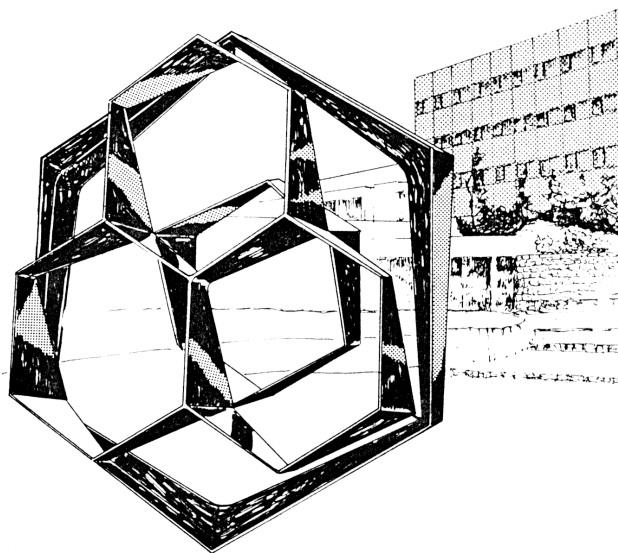


FACULTE DES SCIENCES
Département de Chimie

Chimie analytique organique et biologique - laboratoire de
spectrométrie de masse - Prof. J-F Focant

**Etude forensique des composés organiques
volatils émis par un cadavre de cochon en
décomposition**



Année académique 2010-2011

Dissertation présentée par
Pierre-Hugues Stefanuto
en vue de l'obtention du diplôme de
Master en Sciences Chimiques

REMERCIEMENTS :

La recherche scientifique est rarement le fait d'un seul homme...

A cet effet, je souhaiterais remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Le Professeur J-F. Focant, mon promoteur, pour ses remarques constructives et ses encouragements ;

Le Professeur E. Depauw, le Professeur E. Haubruge et le Professeur J-M. Dimandja pour avoir accepté de faire partie de mon jury ;

J. Decheirsschieter pour sa collaboration et pour m'avoir fourni les échantillons ;

L'ensemble du personnel du MSLab et du CART pour le bon accueil que j'ai reçu ;

Un grand merci à Catherine Brasseur pour son encadrement, ses conseils et son soutien ;

Merci à Benjamin, Michal et Romain pour la bonne ambiance dans le bureau ;

Merci à ma famille pour m'avoir soutenu durant ces cinq années d'étude.

Je souhaiterais également remercier l'Université de Liège ainsi que l'ensemble des Professeurs du département de chimie pour les connaissances acquises et la qualité de leurs enseignements.

Table des matières

I Introduction	1
Etat de la littérature	1
1 L'analyse des composés organiques volatils et l'olfaction	1
1.1 Le prélèvement et la détection des COVs.....	2
1.2 Physiologie de l'olfaction	7
2 La chimie forensique	9
3 L'étude du procédé de décomposition	12
II Structure et fonctionnement du GCxGC-ToFMS	22
1 Le GCxGC-ToFMS	23
2 Considérations théoriques	30
III Matériels et méthodes	32
1 Echantillonnage	32
1.1 Méthode.....	32
1.2 Biotope.....	33
2 Stockage et préparation des échantillons	34
2.1 Echantillons liquides	34
2.2 Echantillons de carcasse	35
3 Description du GCxGC-ToFMS	35
3.1 L'injecteur automatique	35
3.2 Le GCxGC-ToFMS	35
4 Acquisition et traitement des données	36
4.1 Méthode de <i>process</i>	36
4.2 Utilisation de <i>reference</i>	36
4.3 Méthode d'analyse statistique.....	37
4.4 Elaboration des fichiers de données.....	37
IV Résultats et Discussion	39
1.1 Etablissement des conditions d'analyse	39
1.1 Paramètres GCxGC	39
1.2 Paramètres ToFMS.....	40
1.3 Comparaison des différentes séquences	40
2 Choix du standard interne	43
3 Analyses des COVs en solution	44
3.1 Etude semi-quantitative	45
3.2 Etude statistique.....	49

3.3 Etude qualitative	50
3.4 Identification des voies de biosynthèse.....	51
4 Test des colonnes à phase liquide ionique	54
5 Analyse des COVs par DHS	59
V Conclusions et Perspectives	61
Bibliographie.....	v
Annexes.....	xii

Liste des abréviations

ACP Analyse par Composantes Principales
ADN Acide DésoxyriboNucléique
C-4 Explosif puissant de la famille des plastiques
CART *Centre for Analytical Research and Technology* (Centre pour la recherche et la technologie analytique)
CE-UV/vis *Capillary Electrophoresis Ultra-Violet/visible detector* (Electrophorèse capillaire à détection UV/visible)
COVs composés organiques volatils
DVB DiVinyle Benzène
e-nose *Electronic Nose* (Nez électronique)
ECD *Electron Capture Detector* (Détecteur par capture d'électron)
EVB EthylVinyle Benzène
FBI *Federal Bureau of Investigation* (Bureau fédérale d'investigation)
FID *Flame Ionisation Detector* (Détecteur à ionisation de flamme)
FTIR *Fourier Transform InfraRed spectroscopy* (Spectroscopie IR à transformée de Fourier)
GC *gas chromatography* (Chromatographie en phase gazeuse)
GCxGC méthode de chromatographie gazeuse bidimensionnelle compréhensive
GCxGC-ToFMS GCxGC couplée avec un ToFMS
GIS *Geographic Information System* (Système d'information géographique)
GPR *Ground-Penetrating Radar* (Radar géologique)
HBC HexaChloroBenzène
IMS *Ion Mobility Spectroscopy* (Spectroscopie à mobilité ionique)
LOD *Limit Of Detection* (Limite de détection)
MALDI *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation* (Désorption et ionisation laser assistées par matrice)
MCC *MultiCapillary Column* (Colonne mutlicapillaire)
MDGC *MultiDimensional Gas Chromatography* (Chromatographie gazeuse multidimensionnelle)
MS *Mass Spectrometry* (Spectrométrie de masse)
OHFA *Hydroxy-Faty Acid* (Hydroxyde d'acide gras)
OXOFA *Oxo-Faty Acid* (Oxyde d'acide gras)
PA *PolyAcrylate*
PCB PolyChloro Benzène
PDMS *PolyDiMethylSiloxane*
PFPD *Pulsed-Flame Photometric Detection* (Détecteur photométrique à flamme pulsée)
pH Potentiel d'hydrogène
PID *PhotoIonisation Detector* (Détecteur par photo-ionisation)
PMI *Post Mortem Interval* (Intervalle post-mortem)
POP Polluant Organique Persistent
qMS Spectrométrie de Masse à détection par Quadripôle
R&D Recherche et Développement
RI *Retention Index* (Index de rétention)
SBS *Sick Building Syndrome* (Syndrome des maladies de bâtiments)
SPME *Solid-Phase MicroExtraction* (Microextraction sur support solide)
TD *Thermal Desorption* (Désorption thermique)
TNT Tri-Nitro-Toluène
ToFMS *Time of Flight Mass Spectrometer* (Spectromètre de masse à temps de vol)
VFAs *Volatil Faty Acids* (Acide gras volatil)

Chapitre I : Introduction

Dans ce travail, les composés organiques volatils (COVs) émis par un cochon (*sus domesticus L.*) en décomposition ont été étudiés par chromatographie bidimensionnelle couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (GCxGC-ToFMS). Les échantillons ayant déjà été analysés par GC-MS, par le groupe du Prof. Eric Haubruge à Gembloux ABT [1], une comparaison des deux méthodes a été réalisée. Pour ce faire, il a fallu déterminer les conditions expérimentales optimales pour la GCxGC (type de colonne, programme de température...) et du spectromètre de masse (voltage du détecteur et de la source, gamme de masses étudiée...). Les résultats obtenus ont été traités par des outils statistiques pour essayer de sortir certaines tendances temporelles de l'émission de ces COVs. Les différentes voies de biosynthèse de certaines de ces molécules volatiles ont été mises en évidence. En complément de cette étude, différentes expériences ont été réalisées afin d'engager la suite de la recherche.

Etat de la littérature

L'analyse des composés organiques volatils est importante dans de nombreux domaines. Cette revue de la bibliographie s'organise en trois parties : une description générale de l'analyse des volatils et du processus d'olfaction ; un zoom sur la chimie forensique et pour terminer, un état de la recherche sur l'étude du procédé de décomposition.

1 L'analyse des composés organiques volatils et l'olfaction

Il semble logique de commencer cet exposé en définissant ce qu'est un composé organique volatil :

Un COV est une molécule contenant du carbone qui est gazeuse à température ambiante. Ces composés sont les constituants primaires des mixtures odorantes qui stimulent l'odorat chez les mammifères [2].

Des chercheurs qui ont du flair...

Les COVs forment une partie importante de la chimie actuelle. L'étude d'échantillons gazeux est un domaine à part entière de la chimie analytique. Ces recherches sont liées à un nombre important de secteurs allant de l'agro-alimentaire [3] aux diagnostics oncologiques [4] en passant par le contrôle de l'environnement [5]. En effet, certains COVs présents dans l'air peuvent avoir des effets néfastes sur notre santé. Certains volatils, auxquels nous sommes confrontés tous les jours, peuvent avoir de graves conséquences sur notre système respiratoire. En 1999, Jones rédigea un article sur le lien entre les composés volatils trouvés à l'intérieur des bâtiments et le développement de certaines maladies chez l'homme. Ce phénomène porte le nom de *Sick Building Syndrome* (syndrome des maladies de bâtiments) [5, 6]. De plus, le contrôle de l'émission de certains composés dans l'atmosphère est devenu important, suite à la pression écologique de la société actuelle [7]. Une liste des composés à risque a d'ailleurs été publiée dans la *World Health Organization Air Quality Guidelines* (Guide de qualité de l'air de l'organisation mondiale de la santé).

Aussi bien dans le secteur public que privé, le nombre d'unités de recherche sur les COVs ne cesse de croître. Les domaines forensiques [8, 9, 10, 11, 12], agronomiques [3, 13], environnementaux, industriels [14] (parfumerie, cosmétique, tabac, etc.) sont très intéressés par ces recherches. Notre université possède une plateforme d'olfactométrie au sein du campus d'Arlon Environnement de l'Université de Liège. Ce laboratoire est spécialisé dans l'analyse des nuisances olfactives. La complexité des mélanges et la difficulté liée à leur manipulation font de ce domaine un réel défi scientifique aussi bien au niveau de la partie échantillonnage que de l'analyse proprement dite.

1.1 Le prélèvement et la détection des COVs

L'analyse complète d'un échantillon de COVs fait intervenir plusieurs étapes critiques qui nécessitent une amélioration constante des techniques. Les points principaux sont le prélèvement, la séparation et la détection.

Le prélèvement

Tout commence par la prise d'échantillon. Il existe un grand nombre de techniques basées sur différents paramètres physico-chimiques, chacune possédant ses avantages et ses inconvénients. Il s'agit d'une étape cruciale dans le processus d'analyse (comme nous le verrons plus loin), il faut donc choisir la méthode la plus adéquate.

La première est une méthode où un échantillon complet d'air est prélevé. Elle consiste à remplir un sac spécial (Tedlar®, par exemple) avec le mélange gazeux à analyser et de le dégonfler dans l'appareil [12, 15]. Le grand désavantage de cette méthode est qu'elle nécessite une étape de pré-concentration. Les composés volatils doivent être focalisés à l'entrée du détecteur par un piège à froid ou sur un adsorbant. Cette technique engendre donc de nombreuses étapes de préparation, chacune d'entre elles pouvant conduire à des pertes. Elle n'est donc pas toujours recommandée pour l'analyse de COVs [15]. Par contre, elle est employée pour réaliser des dosages olfactométriques pour le contrôle des nuisances olfactives [6].

Une deuxième solution, sans doute la plus utilisée, consiste à piéger directement les composés volatils sur un matériau adsorbant et de le désorber dans l'injecteur. Cette méthode permet, en plus de l'échantillonnage, une pré-concentration des COVs souvent présents en faible quantité [16]. Il existe deux méthodes pour l'étape d'adsorption :

- la méthode dynamique : le piège adsorbant est monté sur une pompe qui contrôle le volume d'air échantillonné.
- la méthode passive : les COVs sont piégés par diffusion dans l'adsorbant et il n'y a pas de contrôle du volume passant sur le piège. Cette dernière technique est beaucoup plus longue mais plus facile à mettre en œuvre, car elle ne nécessite pas l'utilisation d'une pompe calibrée.

Une fois l'échantillon piégé, les composés sont désorbés thermiquement directement dans l'injecteur (TD). Cette méthode est intéressante car elle minimise les artefacts, les pertes et les contaminations et elle permet de diminuer la limite de détection (LOD). De plus, une automatisation complète simplifie son utilisation. Malheureusement, cette TD est coûteuse car elle nécessite le couplage d'un appareillage spécifique à l'injecteur [6].

Il est aussi possible de désorber par solvant et d'injecter la solution par la suite. Même si cette technique a l'avantage de ne pas utiliser tout l'échantillon lors de l'analyse, elle possède de lourds inconvénients. En effet, le signal du solvant est très intense et les manipulations de l'échantillon sont nombreuses. Ces dernières peuvent mener à des pertes, car il s'agit de composés volatils. De plus, la dilution due à l'extraction par solvant nécessite une plus grande concentration sur le piège que pour une TD. Ce qui entraîne une cadence d'échantillonnage plus lente.

La destruction de l'échantillon peut être limitée en TD. En effet, il existe de nouveau système permettant un recapture partielle des composés volatils sur un deuxième piège. *Markes International®* commercialise ce type d'appareil sous le nom d'*Unity 2 TDU*.

En conclusion, la TD permet une meilleure répétabilité et une meilleure LOD, car il n'y a pas de dilution. Tout est envoyé d'un coup dans la GC [16]. La voie thermique est donc, en général, favorisée.

Il existe une grande variété d'adsorbants disponibles dans le commerce permettant de réaliser l'analyse de COVs : Tenax®, Carbopack®... Ils diffèrent par leur composition chimique, leur structure poreuse et leur surface. Les échantillons d'air sont des mélanges très complexes, il est donc important de déterminer quel piège ou combinaison de pièges utiliser pour obtenir les meilleurs résultats dans l'application étudiée. Le choix de l'adsorbant doit être réalisé selon différents critères. Premièrement, un support capture plus facilement un type de composé qu'un autre, c'est pourquoi de plus en plus de pièges multi-adsorbants sont utilisés. Deuxièmement, les conditions d'échantillonnage tels que la température ou le taux d'humidité influencent l'efficacité du piège [6, 16, 17].

Une dernière technique d'échantillonnage pour les composés volatils est la micro extraction en phase solide (SPME). Il s'agit d'une seringue en acier inoxydable contenant une aiguille creuse à l'intérieur de laquelle se trouve une tige de silice fondue recouverte de l'adsorbant : PDMS, PA... Comme pour les autres méthodes, la phase polymère adsorbante et les conditions d'adsorption et désorption doivent être choisies en fonction de l'échantillon. La fibre peut soit être directement introduite dans l'échantillon, soit être exposée à l'espace de tête.

Espace de tête (*Headspace*) : *correspond à une technique d'analyse de molécules volatiles consistant à prélever les composés présents juste au dessus de la matrice étudiée*

Il ne s'agit pas d'une extraction totale, mais d'un équilibre qui se crée entre la matrice et le polymère, si les conditions sont maintenues constantes. Il est cependant possible de travailler hors équilibre [6]. La SPME est une méthode d'extraction sans solvant qui n'altère pas la structure de l'échantillon. Cette technique est avantageuse car elle ne nécessite pas d'appareillage spécifique comme des pompes calibrées et chaque fibre peut être employée une cinquantaine de fois [6, 18, 19].

La séparation et la détection

Une fois l'échantillonnage réalisé, plusieurs possibilités sont envisageables pour la détection. Cette partie était très ardue avant l'apparition des techniques de chromatographie gazeuse [20]. Depuis lors, de nouvelles méthodes ont vu le jour comme les nez électroniques [20] ou les techniques chromatographiques multidimensionnelles (MDGC, GCxGC).

La GC est sans conteste la reine de la discipline, impliquée dans un grand nombre de procédés d'analyse aussi bien en routine qu'en R&D. Il s'agit d'une méthode de séparation adaptable pouvant être couplée à différents détecteurs. Pour la GC, il existe une grande variété de phases stationnaires. En dehors des plus classiques en polysiloxane, des colonnes en PEG (dites Wax) ou en liquide ionique font leur apparition [21, 22]. Pour la technique de détection, le choix est tout aussi vaste PFPD (*Pulsed-Flame Photometric Detection*), FID (*Flame Ionisation Detector*), ECD (*Electron Capture Detector*), diverses méthodes MS... Même si la plupart des appareils utilisés sont fixes, il existe des GC portables avec des détecteurs PID (*PhotoIonisation Detector*), ECD ou FID permettant, par exemple, une analyse sur le terrain de tige SPME [6].

La GCxGC est la méthode au cœur de cette étude. Ses principes sont détaillés dans le second chapitre *structure et fonctionnement de l'appareil*. Cette technique émergente est de plus en plus étudiée et utilisée pour résoudre les problèmes liés à la complexité de certaines matrices. Elle commence à conquérir de plus en plus le secteur de l'analyse de composés volatils, autrefois occupé par la GC simple. Dans le secteur alimentaire, Ryan *et al.* ont étudié les composés présents dans l'espace de tête de différents types de grain de café [23]. Sanchez et son équipe l'ont utilisés à des fins médicales, pour étudier l'haleine humaine [24]. D'autres exemples de secteurs sont donnés dans le Tableau 1.

Tableau 1 Présentation des différents secteurs utilisant la GCxGC.

Secteur	Références
Alimentaire	13, 25, 26
Médical	24, 27
Parfumerie	14, 28
Pétrolier	29, 30
Métabolomique	31, 32
Analyse d'air	33, 34

Il existe encore d'autres méthodes pour l'analyse de composés volatils. Les procédés d'analyses de COVs utilisant la mobilité ionique (IMS) font leur apparition dans divers domaines ; comme par exemple, l'analyse d'haleine [35] ou d'urine [36] dans le secteur médical. Le fonctionnement de l'appareil est commun à toutes ces applications. Pour commencer, une pré-séparation est réalisée à l'aide de multiples colonnes capillaires (MCCs) de 50 à 300 mm de longueur et de 2 à 3 mm de diamètre extérieur. Ce dispositif permet une pré-séparation chromatographique avant l'analyse IMS proprement dite. Un atout important de l'utilisation d'un dispositif MCC est sans conteste la diminution de l'influence de l'humidité sur l'IMS [37]. Le mélange ayant subi la première séparation est alors ionisé à l'aide d'une source radioactive ^{63}Ni , compact et stable, permettant la réalisation d'appareil transportable. Les ions sont ensuite séparés dans le *drift tube* en fonction de leur masse, de leur charge et de leur forme. A la sortie du tube, les ions sont alors détectés [37]. Ces détecteurs portables peuvent s'avérer utiles pour la détection de résidus d'explosif ou de drogues lors d'opérations policières [38].

Il n'existe pas une seule méthode de choix pour l'analyse de COVs. Les techniques d'échantillonnages, de séparation et d'analyses doivent être définies en fonction de l'échantillon et de l'information que l'on désire obtenir.

Le nez électronique

Après avoir créé des instruments électroniques capables de voir ou d'entendre à notre place, les ingénieurs ont maintenant mis au point des appareils pouvant sentir. Les applications sont diverses, allant du contrôle qualité dans l'agro-alimentaire [39] au diagnostic médical, en passant par des orientations militaires avec la recherche d'explosif. La technologie des nez électroniques a réellement débuté en 1982 [40] avec la découverte de premiers détecteurs d'odeurs. Après cet événement, la recherche n'a pas cessé de se développer. Pour ce faire, les chercheurs ont dû identifier les étapes clés du fonctionnement de l'odorat ce qui ne fut pas simple [2] (voir *la physiologie de l'olfaction*).



Figure 1 e-nose.

L'*e-nose* est un appareillage qui répond à un profil de composés volatils sans donner de signal individuel pour chaque composé [20]. Il est donc moins efficace pour l'étude de mélange complexe mais il permet, contrairement aux autres méthodes, le monitoring en temps réel d'une odeur spécifique sur un site durant une longue période [2].

Un *e-nose* est constitué de trois parties : un collecteur d'échantillon, un

tableau de senseurs de gaz et un système de traitement du signal. La clé de l'appareil est bien entendu le tableau de détecteurs. Ces détecteurs sont installés en tableau pour pouvoir obtenir des patterns de reconnaissance ce qui permet d'augmenter la sélectivité. Il en existe de différents types : polymères conducteurs, oxydes métalliques semi-conducteurs, fluorescences optiques... Les détecteurs fonctionnent en liant les molécules à leurs surfaces par un ou plusieurs mécanismes (chimisorption, adsorption, absorption, chimie de coordination). Le mécanisme de liaison doit être choisi en lien avec l'application. Pour citer un exemple, la chimisorption permet une grande sélectivité mais une faible réversibilité [41].

Le détecteur parfait n'existe pas, tout est affaire de compromis, mais la recherche ne cesse de progresser comme le montre le nouvel appareil contenant trois tableaux conçu par Harun *et al.* [42].

1.2 la physiologie de l'olfaction

« *Le mécanisme de l'olfaction est un modèle de sophistication* » [43]

Le développement de l'olfaction chez les mammifères est un moment clé de l'évolution. En effet, elle ne permet pas uniquement de détecter de la nourriture mais aussi de percevoir des informations essentielles telles que l'identification d'un prédateur, la disponibilité sexuelle... [43]. Pourtant, le mécanisme physiologique de l'olfaction a longtemps été mystérieux et n'est pas encore totalement élucidé. Les avancées dans le domaine ont par ailleurs été récompensées par le prix Nobel de médecine et de physiologie décerné à Linda Buck et Richard Axel pour leur travail dans l'identification des gènes responsables de la formation des protéines réceptrices de l'épithélium nasal [44]. Ils ont découvert que les récepteurs olfactifs font partie de la superfamille des protéines G. Elles sont impliquées dans le contrôle du passage des ions au travers de la membrane cellulaire. Ce contrôle sur le potentiel de membrane permet la transmission du signal nerveux [44, 45].

Comment détectons-nous une odeur?

Odeur : *sensation générée lorsqu'une molécule odorante (gazeuse) interagit avec un récepteur sur un cil situé sur un neurone olfactif du nez humain* [2].

Les chercheurs ont d'abord pensé qu'il s'agissait d'un schéma clé-serrure où pour chaque odeur il existait une molécule (clé) et un récepteur (serrure) spécifique. La réalité est beaucoup plus complexe.

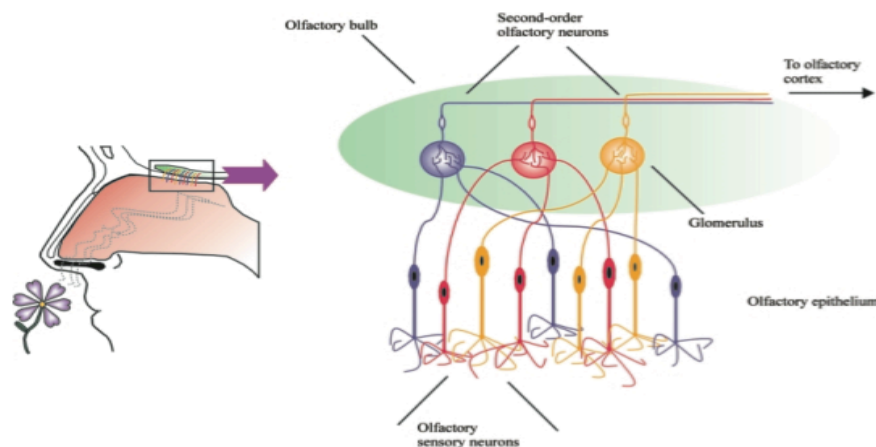


Figure 2 Schéma de fonctionnement de l'olfaction humaine du récepteur vers le cortex. Adapté de Menini *et al.* [45].

L'odeur d'une fleur contient un ensemble de composés volatils. La plupart de ces molécules vont pénétrer la cavité nasale avec l'air respiré. Une fois à l'intérieur, elles vont interagir avec les récepteurs des neurones sensoriels présents dans l'épithélium de notre nez. Ces derniers vont ensuite envoyer l'information sous forme d'un signal électrique à notre cerveau [45] (Figure 2). Buck et Axel ont découvert qu'il y avait des milliers de récepteurs dans la cavité nasale. Chacun peut fixer plusieurs types de molécules et chaque molécule peut se fixer à plusieurs types de récepteurs [44, 45]. L'odeur perçue est, en fait, le résultat d'une combinaison spécifique d'interactions des molécules émises par la fleur sur les récepteurs olfactifs [43].

Bien que l'odorat humain soit moins développé que celui d'autres mammifères comme le chien, il est capable d'identifier plus de 10000 odeurs [45]. Les récepteurs olfactifs sont extrêmement spécifiques : seul l'isomère R du limonène sent l'agrumes ou encore certains composés ont une odeur très différente en fonction de leurs concentrations. Ces quelques exemples illustrent la beauté de ce mécanisme (Figure 3).

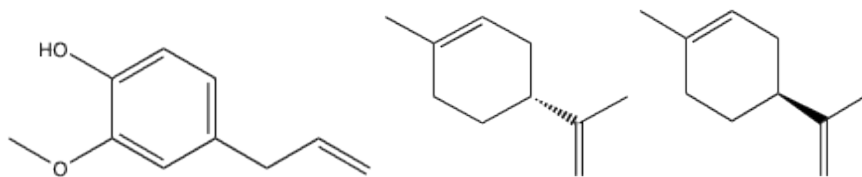


Figure 3 Voici trois molécules odorante : l'eugénol, le R-limonène et le S-limonène. La première sent la rose à faible concentration et le clou de girofle à concentration élevée. Pour le limonène, seul la forme R sent l'agrumes, le 2^{ème} sent l'huile de pin.

2 La chimie forensique

Des experts en haut de l'affiche

Le monde est fasciné par les Sciences Forensiques. Bien sur la télévision avec son flot de séries sur le sujet a contribué à cet intérêt grandissant, mais cette attraction pour les outils d'investigation scientifique remonte bien plus loin. En effet, de grands romanciers tels que Edgar Alan Poe, Charles Dickens et Sir Arthur Conan Doyle développaient déjà les bases de la police scientifique au milieu du 19^e siècle. Au travers de ses livres, Conan Doyle décrit les prémisses de l'investigation scientifique, par son enquêteur à l'esprit d'analyse sans faille, Sherlock Holmes. Il est, en effet, le premier enquêteur dont le raisonnement se base sur une interprétation scientifique des preuves [46].

« Élémentaire mon cher Watson »

Déjà à l'époque l'étude de COVs était à l'ordre du jour. Dans le roman « *une étude en rouge* », S. Holmes parvient à confondre le criminel grâce à l'identification de l'odeur du tabac d'un cigare particulier. Le professeur Holmes a d'ailleurs été le premier personnage de fiction à être récompensé par la Société Royale de Chimie londonienne [46].

A partir de la fin du 19^{ème} siècle, le domaine forensique n'a cessé d'évoluer. Cette période a notamment vu l'arrivée du premier test forensique, le test de Marsh, permettant la détection d'arsenic, le poison le plus employé au siècle dernier. Des belges ont aussi participé à ce processus. Jean Servais Stas, qui a notamment travaillé sur la détermination du poids des éléments, a étudié la détection de trace de poison végétal sur les corps par isolement des alcaloïdes stockés dans les organes, ce qui a permis d'élucider certains meurtres par empoisonnement [46, 47].

Le crime parfait n'existe pas

Ce vieil adage de série policière n'a jamais été aussi vrai. Au vu du grand nombre de techniques scientifiques à la disposition des brigades d'investigation, aucun criminel ne peut proclamer avoir effacé toutes ses traces sur le lieu du crime.

Qui permet à la police d'être toujours à la pointe de la technologie ?

Le domaine forensique est composé de techniques venant de toutes les branches des sciences mais la chimie est sans conteste une des parties participant le plus à son développement. Les méthodes chimiques d'analyse permettent l'étude de résidus de verres, de tirs, de drogues, de poisons, d'explosifs et de toutes sortes d'échantillons inconnus devant être identifiés. La chimie participe aussi à l'amélioration des techniques telles que l'analyse d'ADN et d'empreintes digitales [46, 47]. Par exemple, pour les empreintes digitales, tout le monde a dans l'esprit le technicien avec son pinceau et sa poudre mais cela va beaucoup plus loin. Les progrès de l'imagerie permettent dorénavant de reconstituer une empreinte par reconstruction spectrale de sa composition chimique. Bradshaw *et al.* ont montré récemment la possibilité de réaliser une image MALDI en se basant sur la composition des lubrifiants de préservatif, ce qui sera très utile dans le cadre d'enquêtes sur des agressions sexuelles [48].

La géoforensique

La géoforensique est un domaine d'investigation qui utilise des techniques développées pour les sciences géologiques (analyse chimique, botanique, géomorphologie, biologique et statistique) dans le cadre de procédures médico-légales. Ces techniques peuvent se diviser en deux sous-catégories : les méthodes macro- et microscopiques.

Les méthodes macroscopiques utilisent les appareils de recherche de corps comme les GPR (*Ground-Penetrating Radar*), les analyseurs tomographiques... mais englobent aussi les études géographiques du comportement des criminels par GIS (*Geographic Information System*).

Les méthodes microscopiques regroupent les analyses chimiques et biologiques de la composition des sols, des pollens et d'autres indices pouvant se trouver sous les ongles et dans le nez des victimes [49].

Une grande partie de l'étude de la décomposition implique des cadavres enterrés car c'est sans doute le moyen le plus utilisé pour faire disparaître un corps. Le travail des chercheurs dans ce

domaine est donc de développer des méthodes permettant de trouver les corps et de déterminer depuis combien de temps ils sont là. Pour le premier point, les chiens détecteurs de cadavres sont les plus efficaces. Mais pour le second plusieurs branches des sciences travaillent conjointement. Premièrement, la biologie permet une analyse entomologique et botanique des lieux. Ensuite, une analyse chimique du corps et du sol à proximité permet d'affiner les résultats [8, 12, 50, 51]. Le sol est un mélange complexe de minéraux, de composés organiques et d'un ensemble de macro- et micro-organismes [50]. La variabilité de sa composition d'un endroit à l'autre ne facilite pas la généralisation du phénomène.

Malgré toutes ces avancées prometteuses, il faut pourtant rester prudent et ne pas faire n'importe quoi au nom des sciences forensiques. Dans une lettre à l'éditeur du *Forensic Science International*, P.A. Bull, R.M. Morgan et J. Freudiger-Bonzon critiquent l'application non réfléchie de méthodes d'analyse géologique à des fins médico-légales [52]. Cette démarche pourrait concerner tout le domaine de la criminalistique. Il s'agit avant tout d'un travail scientifique et il doit être conduit dans cette optique.

Des indices qui jouent les filles de l'air

Dans le cadre de cette étude, c'est le point de vue forensique de l'analyse de COVs qui est investigué. Pour le moment, Il s'agit d'un domaine peu exploité mais en pleine progression. En effet, il trouve de nombreuses applications dans le cadre de : la lutte antidrogue, la détection d'explosif, la résolution de meurtre ou encore la lutte contre la contrebande d'ivoire. Le développement de techniques analytiques, aidant à la caractérisation d'échantillons gazeux complexes, est un atout indiscutable pour les enquêteurs.

Pour le moment, ce sont des chiens spécialement entraînés qui sont les outils principaux d'investigation [53, 54]. En 2003, Lorenzo a étudié l'empreinte olfactive de composés illicites reconnus par les chiens sniffeurs : la cocaïne et la méthamphétamine (ou « ecstasy ») pour les drogues, et le TNT et le C-4 pour les explosifs. Les principaux COVs identifiés ont permis de mieux interpréter leur détection et d'améliorer l'entraînement des chiens [54]. Une des raisons de l'attrait de ce secteur n'est pas sans rapport avec les tensions dans le monde. En effet, les normes de sécurité toujours plus strictes pour le transport aérien nécessitent des nouvelles méthodes de détection rapides et efficaces. Les COVs ont un rôle à jouer dans ce secteur, au travers du développement d'appareils portatifs et de la détermination de l'empreinte olfactive des composés à risque [38]. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses études sur le sujet soient soutenues financièrement par des organismes gouvernementaux tels que le bureau fédéral d'investigation, FBI [9, 10, 11, 12].

3 L'étude du procédé de décomposition

La décomposition des mammifères terrestres

Tout est poussière et redeviendra poussière...

L'étude de la décomposition des cadavres de mammifère est un domaine grandissant au sein du secteur forensique. Le procédé de dégradation d'un corps est complexe et méconnu [11, 55].

Il dépend d'un grand nombre de facteurs: conditions climatiques, environnement, données physiologiques... Le processus de décomposition est le même pour tous les corps. Il représente l'ensemble des réactions démarrant dans les quatre minutes après la mort et conduisant à la disparition totale des tissus. Ce mécanisme implique la dégradation des principaux constituants du corps: graisse, protéines et carbohydrates. Ces macromolécules sont divisées en composés plus petits que l'on peut retrouver dans les fluides de décomposition où dans les COVs (composés organiques volatils) émis par le cadavre. La compréhension du processus passe donc par l'étude de ses émissions [55, 56] Le processus de décomposition se divise en différentes étapes (Figure 4) : Frais (*Fresh*), décomposition active et gonflement (*Active and Bloated decay*), décomposition avancée (*Advanced decay*), restes secs et squelettisation (*Dry remains and Skeletonisation*) [10, 50, 56].

Le premier procédé est appelé autolyse ou *self-digestion*. Après la mort, les cellules ne sont plus approvisionnées en oxygène. Dès lors le taux de dioxyde de carbone dans le sang augmente, le pH sanguin diminue et les déchets s'accumulent dans les cytoplasmes cellulaires, occasionnant la mort des cellules. Simultanément à ce phénomène, les enzymes cellulaires commencent à lyser ces dernières de l'intérieur, causant leur rupture et l'écoulement des fluides. Au départ, l'autolyse se produit dans les cellules les plus actives, c'est à dire les plus productives d'ATP et les plus sensibles à l'anoxie (manque d'oxygène dans les cellules), comme les cellules cérébrales [10, 50, 55, 56].

Durant ce procédé le corps revient à température ambiante (*algor mortis*) ; la peau se déforme à cause de l'accumulation de fluides à l'intérieur du corps ; le sang cesse de circuler causant la lividité cadavérique (*livor mortis*) ; la solidification des cytoplasmes cellulaires, liée à l'augmentation d'acidité, cause la rigidité cadavérique (*rigor mortis*) [10, 50, 55, 56].

L'étape suivante est la putréfaction. Ce phénomène consiste en la destruction des tissus mous par l'action de micro-organismes (bactéries, champignons, protozoaires) conduisant à la formation de gaz et de liquides composés de petites molécules. Ces organismes proviennent du corps lui-même et de son environnement. Ils se divisent en deux catégories : aérobie et anaérobie. En fonction de l'environnement, une voie peut être plus favorisée que l'autre [50]. Le premier signe visible de la putréfaction est le verdissement de la peau. Ce changement de couleur est engendré par la dégradation du sang avec la formation de sulfhémoglobine. Cette dernière est formée par réaction de l'hémoglobine avec l'hydrogène sulfuré et les sulfamides [57]. Le second signe est le gonflement du cadavre résultant de la formation, par fermentation dans l'estomac de gaz et de fluides qui s'accumulent principalement dans l'intestin qui agit alors comme un ballon de baudruche. Les émissions responsables du gonflement sont normalement évacuées par le rectum mais en cas de surpression, le corps peut exploser entraînant de sérieux dommages sur l'état du cadavre [10, 50, 55, 56].

Les résidus de décomposition des tissus mous se composent de dérivés d'acides gras et d'acides carboxyliques (principalement butyrique et propanoïque) [10, 50, 55, 56].

Différents stades de décomposition



Frais (31/03/07)

- Commence directement après le décès
- Lividité et rigidité cadavérique
- Le corps équilibre sa température avec le milieu



Décomposition active (23/04/07)

- Noircissement de la peau
- La peau et les muscles se décomposent en petites molécules
- Possible formation d'adipocire
- Activité bactérienne maximale
- Activité importante d'insectes et de charognards



Gonflement (15/04/07)

- Destruction des tissus mous par les microorganismes
- Fermentation anaérobie dans le système digestif
- Production de fluide et de gaz, s'écoulant par les orifices
- Verdissement de la peau



Décomposition avancée (08/05/07)

- Les os sont exposés
- La chair a presque complètement disparue
- Fin des activités de la faune
- La peau sèche

Figure 4 Processus de décomposition pour un cochon en biotope forestier. Photos issues du mémoire de J. Dekeirsschieter [58].

A la suite des tissus mous, ce sont les muscles qui se dégradent. Ces tissus sont principalement composés de protéines, elles mêmes formées d'acides aminés. Leur décomposition va conduire à la production de nouveaux composés volatils sous l'action de la digestion bactérienne. La putrescine, la cadaverine, le skatole (3-methyl indole) et l'indole sont produits à cette étape et sont considérés comme spécifiques de la décomposition (Figure 5). Néanmoins, plusieurs études sur les COVs cadavériques soulignent leur absence. Ils sont pourtant utilisés dans l'entraînement de chiens chercheurs de cadavres [11, 54, 59]. A ce moment de la décomposition, les bactéries (aérobies et anaérobies), les insectes et les charognards contribuent fortement à la disparition du cadavre [10, 50, 56].

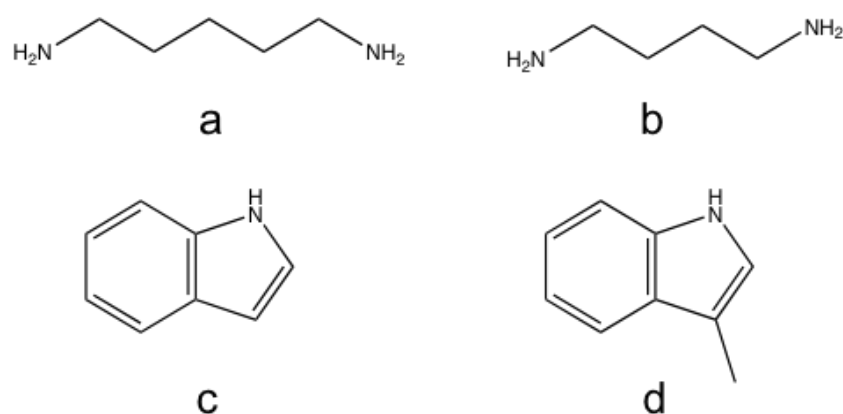


Figure 5 a. Cadaverine ; b. Putrescine ; c. Indole ; d. Skatole.

A la fin du processus de décomposition, seuls les dents et les os sont encore présents. Leur disparition peut prendre longtemps, en fonction de l'environnement. La durée de chaque étape du procédé change d'un cas à l'autre. Les facteurs les plus déterminants sont la température [58] et l'humidité. Les relevés météorologiques sont donc très importants lors d'études sur les cadavres [10, 11].

La décomposition est donc un phénomène compliqué résultant d'un grand nombre de sous-procédés enzymatiques, bactériens, physiologiques... Pourtant une bonne compréhension de ce phénomène est essentielle pour toutes les études dépendant de l'analyse d'échantillons prélevés post-mortem. Le premier pas dans la compréhension du processus de décomposition est la mise au point de méthodes permettant l'analyse d'échantillons complexes tels que les prélèvements de cadavres [56]. Divers travaux ont déjà été réalisés sur le sujet, impliquant différents mammifères allant du rat à l'humain en passant par le cochon [12, 58, 59, 60]. Le procédé de

décomposition s'étudie principalement sur base de trois matrices : l'adipocire [51, 61, 62, 63], les fluides de décomposition [8, 10, 60, 64] et les composés organiques volatils [12, 15, 11, 1, 65, 66].

L'étude de l'adipocire

Adipocire (ou gras du cadavre) : nom donné à la matière grasse du cadavre qui se transforme en substance savonneuse, grise, molle et grasse durant la décomposition. Elle résulte de la saponification des acides gras du corps [67].

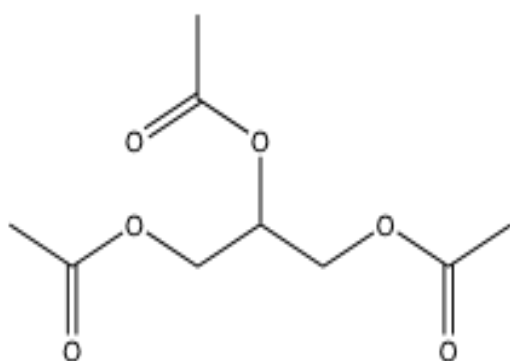


Figure 6 Exemple d'un triglycéride : ester de 3 acides gras et du glycérol.

Cette matrice a été principalement étudiée par T. Takatori et S. L. Forbes [51, 61, 67, 68]. Le premier s'est surtout intéressé au mécanisme de formation et de stabilisation de ce milieu. En effet, 60% des acides gras des tissus adipeux humains sont liquides à température ambiante. Néanmoins, l'adipocire forme sur les cadavres un résidu solide. Takatori a découvert que sa stabilisation était due à la présence d'hydroxy- et d'oxo- acides gras spécifiques (OHFA et OXOFA), en combinaison avec la réaction des carboxylates et des dications Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Ces derniers proviennent du « savon » de cadavre résultant de la saponification des triglycérides (Figure 6). Les acides gras principaux de ce mélange sont les myristiques, palmitiques et stéariques. D'autres composés sont aussi présents en quantité plus faible [51, 67, 68].

Les acides gras insaturés peuvent être hydratés et ensuite oxydés (sous forme d'aldéhydes ou de cétones) par les enzymes provenant de *Fravobacterium meningospeticum*. La formation de ces OHFA et OXOFA a donc été attribuée aux différents microorganismes présents dans l'adipocire [68]. Forbes a étudié l'aspect forensique de l'influence de l'environnement sur la formation et la composition de l'adipocire [51, 61]. Par exemple, ils ont analysés l'effet de la manière dont le corps est enterré (habillé de tissus différents, emballé dans du plastique...) sur la formation de l'adipocire [51]. Forbes a aussi réalisé une étude comparative par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) entre la formation de l'adipocire des cochons et des humains. Les deux espèces montrent une diminution de la bande d'absorption des triglycérides et une augmentation de celles des acides gras, au cours du temps [56, 61]. Pour obtenir des résultats plus poussés qu'en infrarouge, la GC-MS a aussi été utilisée. Cette technique permet

l'identification des molécules présentes dans la matrice et/ou la recherche de composés cibles. Néanmoins, la préparation des échantillons d'adipocire pour les études quantitatives n'est pas aisée [51]. Cette étape est longue et difficile, elle conduit souvent à la détérioration de l'échantillon par oxydation des chaînes insaturées des acides gras [68].

L'analyse de fluides et la détermination de l'intervalle post-mortem

Une partie des recherches forensiques sur la décomposition des corps ont pour objectif la détermination de l'intervalle post-mortem (PMI) [9, 10]. Ce dernier est une information essentielle lors d'enquête sur des morts suspectes. L'estimation de l'heure du décès permet aux enquêteurs d'écartier certains suspects ou de retracer les derniers déplacements de la victime [60]. Dans les premières heures de la mort, les médecins légistes peuvent, par expérience, donner une bonne estimation de l'heure du décès.

Au niveau des moyens plus scientifiques, l'entomologie est fortement utilisée [69], mais reste limitée dans certains cas de : décomposition très avancée, accès limité pour les insectes, présence de toxiques... elle n'est plus applicable [69]. Pour combler ce manque, l'utilisation des fluides de décomposition est étudiée. Le but de ces recherches est d'identifier des biomarqueurs dont l'émission par le cadavre est dépendante du temps, afin d'établir de nouvelles méthodes pour établir le PMI. Les fluides de décomposition d'un corps se mélangent souvent avec le sol sur lequel il repose. C'est pourquoi, ce domaine fait partie de la géoforensique [60].

Vass et son équipe ont réalisé une étude visant à déterminer la variation temporelle des biomarqueurs dans différents organes humains sur une période de quatre ans. Ils ont découvert que l'acide oxalique, l'acide glycolique (acide acétique hydroxylé), l'acide butyrique gamma aminé, la proline et la méthionine étaient des marqueurs importants relatifs à l'âge du cadavre. En plus du point de vue médico-légal, l'origine de certains de ces biomarqueurs a été étudiée. Par exemple, l'acide oxalique serait dérivé de l'acide oxaloacétique, acteur important du cycle de Krebs et l'acide glycolique serait dû à la réduction de l'acide oxalique [10]. Cette étude est un bel exemple de la concomitance de l'étude à but forensique et celle du procédé biologique. En 1992, Vass avait déjà identifié cinq acides gras volatils (VFAs): l'acide propanoïque, les acides butyrique et iso-butyrique, les acides valérique et iso-valérique. L'avantage de ces VFAs est leur persistance dans le temps, donnant la possibilité de déterminer les PMI avec une erreur de deux jours. Cette méthode fait d'ailleurs l'objet d'un brevet [8].

D'autres études sur cette matrice ont été menées par Swann (en collaboration avec Forbes) : une première utilisant la GC-MS [60] et la seconde utilisant l'électrophorèse capillaire [64]. L'analyse par spectrométrie de masse a servi à comparer la décomposition de diverses espèces de cochons, dans différents lieux géographiques, en contrôlant l'accès pour les insectes. Les résultats ont montré l'importance des conditions atmosphériques et de la colonisation des insectes sur l'émission de fluides. Il a été observé que la chaleur et l'accès autorisé aux insectes permettaient une dégradation plus rapide [60]. La deuxième étude utilisant une méthode d'analyse par électrophorèse capillaire à détection UV/visible (CE-UV/vis) a permis d'investiguer les composés aminés présents dans les fluides de décomposition [64]. Cette nouvelle méthode permet le travail avec une matrice complexe pour la recherche d'un type de molécules très important dans l'étude de la décomposition [8, 10, 64].

L'analyse de COVs lors de la décomposition

La recherche d'un corps abandonné demande beaucoup de temps. Durant la période de recherche, le cadavre subit différents changements physiques et chimiques qui vont compliquer le travail des enquêteurs. Dans ce domaine, les chiens spécialisés dans la découverte de victimes sont des outils inestimables [53]. Cependant, l'olfaction canine est un procédé encore méconnu, non caractérisé et non standardisé [11, 12]. De plus, les chiens sniffeurs sont sensibles et entraînés seulement sur certaines odeurs. Par exemple, dans le cadre de la lutte anti-drogue, un chien entraîné sur le cannabis ne détectera pas la cocaïne. Le même problème peut se poser dans la recherche de cadavre : un chien peut-il détecter un corps quelque soit la période depuis laquelle il est abandonné ?

Pour le moment, les maîtres chiens se fournissent en restes humains auprès des morgues, des médecins et d'autres maîtres chiens sans se soucier du type de tissu, de la quantité, de la température, de l'état de décomposition et des moisissures présentes. Cependant, Hoffman et son équipe ont montré en 2009 que l'on ne pouvait pas généraliser les COVs émis par un morceau de cadavre à ceux émis par un cadavre entier. Lors de cette recherche, ils se sont intéressés à la comparaison des COVs émis par différentes parties d'un corps humain en décomposition [59].

L'analyse de COVs dans le cas de sujets en décomposition a commencé en ayant pour objectif de pouvoir créer des détecteurs permettant de reproduire le travail des chiens. En effet, les forces policières n'ont pas toutes les moyens d'entraîner et de s'occuper d'une équipe canine.

Cependant, les moyens techniques actuels ne permettent pas d'égaliser la sensibilité des chiens. Par contre, l'étude des COVs permet de mieux comprendre la nature des composés que les chiens détectent. Ces informations sont également très utiles pour élaborer de nouvelles techniques d'entraînement et pour améliorer encore l'efficacité de ces chiens [11].

La création de mélanges standards simulant l'odeur de cadavre est très demandée, les restes humains n'étant pas toujours disponibles. Pour le moment, des mélanges de putrescine, cadaverine, indole et skatole déclenchent une réaction positive chez les chiens [54, 59], mais l'idéal serait un mélange plus complexe de concentrations bien déterminées pouvant simuler les odeurs liées à différentes conditions de décomposition. L'étude des composés volatils émis lors de la décomposition pourrait permettre de créer ce genre de mélange type. Cet outil permettrait aux maîtres chiens de tenir compte des facteurs environnementaux au cours du dressage [11, 59].

L'étude temporelle de l'émission de COVs par un corps pourrait aussi servir dans la détermination de l'intervalle post-mortem. De fait, les chiens possèdent un odorat si sensible que certains peuvent différencier un humain d'un autre mammifère, d'autres peuvent différencier les odeurs d'une personne vivante de celles d'un cadavre. Ils sont capables de retracer les différentes étapes de la décomposition. Cette dernière observation indique que l'odeur d'un cadavre est un mélange de composés volatils dont la composition varie dans le temps. De plus, des études ont montré que l'émission des COVs d'un cadavre variait différemment en fonction du composé étudié [66]. Il doit donc être possible d'utiliser ces variations à notre avantage [11, 56]. Dans ce but, Vass et son équipe ont commencé l'élaboration d'une base de données regroupant toutes les informations sur les COVs émis lors de la décomposition de cadavres humains. Cette liste, en perpétuelle évolution, contient principalement les données temporelles, qualitatives, quantitatives, météorologiques et expérimentales obtenues lors de différentes expériences. Elle est archivée au bureau FBI à Quantico et est donc malheureusement inaccessible au public [11, 12].

L'analyse de composés volatils issus de la décomposition peut se diviser en quatre étapes :

1. Identifier les COVs spécifiques de la décomposition
2. Quantifier ces derniers
3. Etablir une dépendance temporelle de l'émission des composés
4. Déterminer les COVs les plus pertinents et persistants

Les deux premiers points nécessitent l'élaboration de techniques optimales pour l'échantillonnage et l'analyse. Les deux suivants reposent sur des méthodes robustes de traitement des données.

De nombreuses applications sont aussi liées à l'étude des composés volatils de décomposition. Comme pour l'adipocire et les fluides, les COVs cadavériques sont employés pour mieux comprendre le procédé de décomposition par l'identification des voies biosynthétiques conduisant à la production de ces composés volatils [15, 66]. L'étude des composés volatils émis lors de la décomposition est aussi très utile dans le domaine de la santé publique. En effet, lors de catastrophes naturelles (tremblement de terre, tsunami...), des pics de pollution dans l'air, le sol et l'eau sont observés. L'étude des émissions des cadavres peut permettre de mieux appréhender ce genre de problèmes sanitaires [66, 70] et d'élaborer des méthodes de détection pour les troupes de recherche [65]. Ces COVs jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'efficacité du stockage alimentaire contre le pourrissement et la colonisation bactérienne. La caractérisation des composés impliqués dans la décomposition pourrait permettre de développer de nouvelles méthodes d'emballage améliorant les techniques de conservation [71].

Pour clôturer ce résumé bibliographique, un tableau regroupant les différents COVs détectés lors du processus de décomposition a été réalisé. Il est fourni en annexe A.

L'éthique et les difficultés de la recherche

A cause des problèmes éthiques liés à l'utilisation de corps humains pour l'étude de la décomposition, des cadavres de cochons, *sus domestica*, sont souvent employés [1, 51, 60, 64, 72]. Ils sont considérés comme de bons substituts vu leurs similarités avec l'homme d'un point de vue poids du torse, du rapport muscle/graisse, pilosité, biochimique et physiologique [50, 51].

De plus, le domaine commence seulement à s'étendre, ce qui explique qu'un grand nombre d'études sont réalisées en laboratoire [15, 59, 65]. Au vu de l'influence de l'environnement, des conditions d'humidité et de température [11, 12, 73] et des possibilités d'accès pour les insectes [10], il est nécessaire d'étudier la décomposition en condition réelle pour pouvoir obtenir des résultats en meilleure adéquation avec la réalité. Cependant, il n'est pas simple de mettre en place ce genre d'expérimentation [66]. Il faut des sites spécifiques protégés et surveillés, ce qui nécessite du personnel et des infrastructures pas toujours disponibles. Néanmoins, dans certains pays, des « fermes de cadavres » existent et sont entièrement dédiées aux études sur des restes humains [11, 12, 10].

Chapitre II : Structure et fonctionnement du GCxGC-ToFMS

Définitions utiles

Toutes nouvelles méthodes entraînent l'apparition de nouveaux termes dans le langage scientifique. Pour que tout le monde puisse se comprendre, l'établissement de définitions précises et communes est indispensable [74] :

Compréhensivité : cette définition est basée essentiellement sur les trois critères établis par Giddings [75] :

1. L'entièreté de l'échantillon est soumise aux deux dimensions de séparation
2. Un pourcentage égal (soit 100%, soit moins) de tous les composants de l'échantillon passe dans les deux colonnes et atteint finalement le détecteur
3. La séparation (résolution) obtenue en 1^{ère} dimension doit être maintenue lors du passage dans la seconde.

Le 3^e critère ne peut jamais être rencontré complètement, mais les scientifiques ont appris à vivre avec des distinctions arbitraires dans des contextes similaires. L'aspect le plus important de la préservation de la résolution, c'est le nombre de chromatogrammes de 2^{ème} dimension qui échantillonne le pic de 1^{ère} dimension. Il en faut 3 ou 4 au minimum [74].

NB : deux dimensions reliées de manière compréhensive sont jointes par un signe de multiplication x dans l'écriture abrégée.

Orthogonalité (en chimie analytique): de deux méthodes de séparation correspond à un système dont les temps d'élution dans chacune des dimensions peuvent être traités de manière indépendante. Les mécanismes de rétention dans chacune des dimensions sont donc complètement indépendants [74].

1 Le GCxGC-ToFMS

De nos jours, l'analyse de composés volatils ou semi-volatils se fait principalement par GC. Cette technique est aussi couramment employée pour l'étude de composés non-volatils en passant par une étape dérivatisation. Cette méthode possède de grande qualité d'un point de vue résolution, robustesse et justesse. Malheureusement, les progrès en matière de détection montrent que les matrices naturelles sont souvent plus complexes qu'imaginées. La volonté d'étudier ces mélanges nécessite donc le développement de nouvelles méthodes d'analyses repoussant les limites de la GC simple en augmentant : le nombre de critères de séparation, la résolution, la sensibilité... Il n'est donc pas surprenant de voir apparaître de plus en plus de techniques multidimensionnelles, pour surmonter ces difficultés [75, 76].

Depuis une vingtaine d'années, une grande amélioration a été apportée à la GC, par l'utilisation d'une deuxième dimension de séparation chromatographique. Cette nouvelle technique est appelée : chromatographie gazeuse bidimensionnelle. Cette dernière peut être séparée en deux grandes parties : la méthode *heart-cut* et la *compréhensive*. La première consiste à n'envoyer qu'une partie de l'éluât de première dimension dans la deuxième, elle n'est donc utilisable que pour la recherche de composés cibles [28, 77, 78]. Ce dernier point peut se démontrer par un simple exemple : pour réaliser une analyse exhaustive par *heart-cut* cela nécessiterait un nombre important d'analyses. Si le temps d'analyse pour chaque dimension est de 40 minutes et que l'on échantillonne par quatre secondes en deuxième dimension, il faudrait 600 analyses pour que chaque zone de l'éluât 1 passe dans la seconde colonne. Ce qui nous fait 24000 minutes auxquelles nous ajoutons les 24000 minutes d'analyse de deuxième dimension. Au final, l'analyse exhaustive par cette méthode aura nécessité 48000 minutes, c'est à dire 800 heures ou encore 33 jours de temps-machine. Ce qui est, bien entendu, inenvisageable en pratique.

La méthode *compréhensive*, quant à elle, consiste en un transfert exhaustif entre les deux dimensions durant toute l'analyse [28, 77, 78]. Pour ce système, le calcul du temps machine est simple. Ce dernier correspond au temps d'analyse d'une seule injection, c'est à dire 40 minutes. En effet, ici tout ce qui vient de la première dimension est injecté, à intervalle régulier fixé par un modulateur, dans la deuxième colonne. La longueur de celle-ci est réduite pour obtenir une GC rapide (quelques secondes). Au vu des considérations précédentes, c'est cette dernière méthode qui sera employée dans cette étude.

La chromatographie bidimensionnelle *compréhensive* est l'un des outils analytiques les plus performants pour l'analyse de composés volatils et semi-volatils [78]. Elle permet une

séparation orthogonale sur les deux colonnes conduisant à une amélioration des critères de séparation qui sont déterminants dans l'analyse d'échantillons complexes [28, 78]. De plus, la résolution, la sélectivité, la sensibilité, la capacité de pic sont meilleures qu'en GC classique sans pour autant nécessiter un temps d'analyse plus long [24, 28, 77, 78]. Pour ce faire, la GCxGC s'appuie sur les mêmes paramètres d'analyse que la simple GC : phase de colonne, programme de température, type de détecteur... en y ajoutant de nouvelles variables liées à la présence d'une seconde dimension: la modulation, le concept d'orthogonalité, l'utilisation de programmes de température séparés pour chaque dimension... [78].

La modulation

Le fait de moduler permet d'augmenter la sensibilité de manière importante. En effet, la modulation permet de réduire la largeur des pics inhérente au passage dans une longue colonne. Lors du procédé de modulation, les composés élués sont refocalisés et pulsés dans la 2^{ème} dimension travaillant en condition de GC rapide : petites dimensions, haute température... empêchant les pics de s'élargir de nouveau [28, 78]. Le modulateur est donc une partie clé de l'appareil [77, 79].

Modulateur : *Il s'agit de l'interface entre les deux colonnes dans un système de séparation à deux dimensions qui permet l'échantillonnage rapide de l'éluât de la première dimension, avant de le réinjecter dans la seconde [74].*

La qualité d'un modulateur se définit par sa capacité à effectuer des cycles ouvert/fermé avec une fréquence élevée et une grande reproductibilité [77, 80]. Le respect de ces critères permet d'être en accord avec la seconde règle de Giddings. En pratique, il existe deux groupes de modulateurs : à valves et thermiques [77, 79].

Les modulateurs à valves de manière générale sont moins efficaces mais moins coûteux que les modulateurs thermiques [77, 79]. Ils ne s'appliquent pas à ce travail et ne seront donc pas développés.

Il existe différentes méthodes de modulation thermique :

- La modulation par échauffement
- La modulation cryogénique

La modulation par échauffement n'est plus utilisée de nos jours, mais elle a été la première développée. Le système consistait à chauffer une partie de la colonne par le passage d'un courant électrique sur une peinture conductrice permettant un envoi pulsé dans la seconde colonne. L'absence d'une étape de focalisation est son principal désavantage [76, 77, 78].

A partir des enseignements de la première génération, la modulation cryogénique a fait son apparition pour devenir la méthode utilisée. Il existe différentes techniques : - les systèmes longitudinaux - les doubles étapes - les doubles étapes à quatre jets.

Ces systèmes reposent tous sur le même principe de base : l'éluât de première dimension est focalisé par un bref jet cryogénique et pulsé dans la deuxième dimension par l'augmentation de température. Les deux premiers types de modulateurs cryogéniques se sont succédés pour arriver au système à quatre jets qui est, pour le moment, le plus abouti [76, 77]. Dans le cadre de cette étude, c'est ce système qui a été employé.

La modulation double étapes à quatre jets

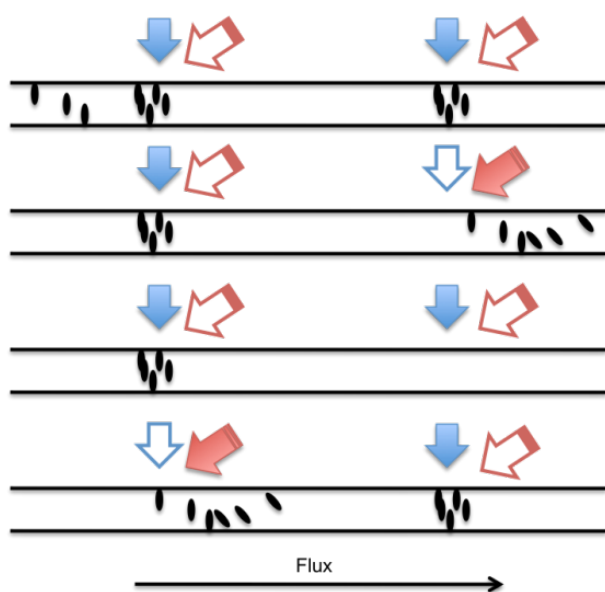


Figure 7 Séquence de fonctionnement du modulateur.

La Figure 7 représente le traitement des composés dans le modulateur. L'alternance de jets chauds (rouges) et froids (bleus) permet d'échantillonner l'éluât de première dimension en petite partie. Ces morceaux seront focalisés et injectés dans la seconde dimension. L'utilisation de cette séquence à double point de focalisation permet une bonne refocalisation.

Les pics co-éluants à la sortie de la première dimension sont modulés et envoyés simultanément dans la deuxième.

Cette deuxième dimension de phase

différente va permettre de les séparer. A la sortie, les pics de chacun des composés seront formés de très fins pics séparés d'une période de modulation [28].

Le liquide cryogénique, CO₂ ou N₂, doit être choisi en rapport avec la composition de l'échantillon à analyser. L'azote liquide étant le plus froid (-196°C vs -56°C), il permet de piéger plus efficacement les composés très volatils mais est plus difficile à manipuler. Au vu de la volatilité des composés étudiés ici, le système N₂ est indispensable [76].

Les colonnes

Elles sont à la base du processus de séparation chromatographique, le choix du bon type de colonne est déterminant pour l'analyse [77].

Pour satisfaire le principe d'orthogonalité deux colonnes de phases différentes doivent être reliées en série. Plus le système sera orthogonal, plus la séparation sera efficace. Généralement, la première colonne est apolaire, séparant les composés en fonction de leur température d'ébullition ; la seconde sépare en fonction de la polarité. Les molécules ne restent jamais plus que quelques secondes dans cette dimension, la séparation se fait en condition isotherme et se base sur la polarité uniquement. L'utilisation de cette configuration, dite normale, permet la transposition des méthodes développées en 1D aux méthodes 2D [77, 78, 79].

En général, en plus de la longueur, le diamètre de la seconde colonne est plus étroit que celui de la première. La pression du flux venant de la première colonne est donc augmentée dans la deuxième permettant un temps de rétention plus court dans cette dimension. Pour diminuer encore le temps de séjour des composés dans la seconde colonne, elle peut être placée dans un four différent et avoir son propre programme de température [76, 78].

Le choix des phases est crucial car il détermine l'orthogonalité de la méthode. Les plus courantes sont les phases en polysiloxane [77, 79]. Elles sont constituées d'une chaîne principale alternant Si et O, le silicium est porteur de chaînes latérales fixant la polarité (Figure 8a-b). Elles ont longtemps été l'unique choix disponible. De nos jours, de nouveaux matériaux sont employés pour atteindre des polarités plus élevées. L'augmentation de polarité permet de séparer plus efficacement des mélanges de composés polaires. Les colonnes en polyéthylène glycol, dites Wax, ont été les premières à permettre cette augmentation. Le désavantage majeur de ces phases est leur faible résistance thermique, conduisant à un saignement de colonne important [21, 22].

Récemment, des colonnes faites de liquides ioniques (LIs) sont apparues sur le marché. Elles permettent d'obtenir des polarités encore jamais atteintes [21]. De plus, elles permettent de palier aux défauts des colonnes Wax. Elles font preuve d'une grande stabilité, d'un faible saignement de colonne et d'une grande versatilité au niveau du design de la sélectivité. Point de vue GCxGC, leurs polarités

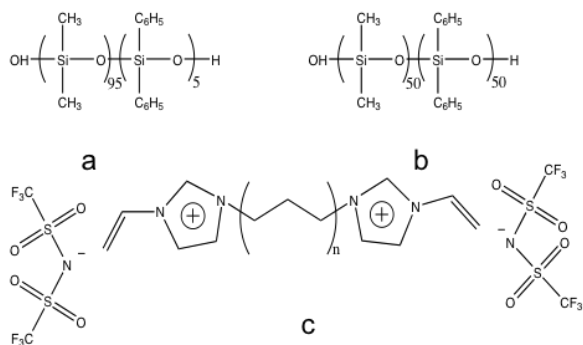


Figure 8 a. Colonne RTX-5 ; b. Colonne RXi-17 ; c. SLB-LI111.

extrêmes permettent d'améliorer les conditions d'orthogonalité [21, 22]. Même si les colonnes LIs sont peu utilisées pour le moment, leur développement est prometteur.

Pour cette étude, une configuration normale a été utilisée pour l'analyse principale. Néanmoins, les possibles améliorations liées à l'utilisation des colonnes LIs ont aussi été investiguées.

La détection

Le détecteur est lui aussi une partie clé de l'appareil GCxGC. En effet, les pics sortant de la seconde colonne sont extrêmement étroits ($\approx 0,06s$). Le détecteur doit donc avoir une grande vitesse d'acquisition et un faible volume interne pour assurer une reconstruction correcte du chromatogramme, c'est à dire avoir au minimum 6 à 10 points par pic [81, 82]. Les appareils correspondant à ces caractéristiques sont répartis en deux classes [78, 79] :

- les détecteurs à ionisation de flamme (FID), à capture d'électron (μ ECD) et autres détecteurs élémentaires
- les spectromètres de masse à temps de vol (ToFMS) et quadripôle (qMS)

Pour des études visant à l'indentification de COVs, la détection par spectrométrie de masse est indispensable. Elle permet d'obtenir une dimension supplémentaire d'analyse en fournissant les spectres caractéristiques des différents composés [28, 78, 79]. Mais quel spectromètre est le mieux adapté ?

En GC, les détecteurs quadripôles, secteurs et *ion traps* sont très populaires. Les secteurs permettent notamment d'obtenir une haute résolution en masse, mais leurs faibles vitesses d'acquisition limitent leur utilisation en 2D. Par contre, le ToFMS possède toutes les qualités d'un bon détecteur GCxGC. Avec une vitesse d'acquisition de 500 spectres par seconde, il peut parfaitement reconstruire les pics avec une excellente résolution. De plus, les détecteurs ToF

collectent l'entièreté du spectre à chaque acquisition, permettant d'obtenir le maximum d'informations nécessaires à la déconvolution et à l'identification [28, 78, 79].

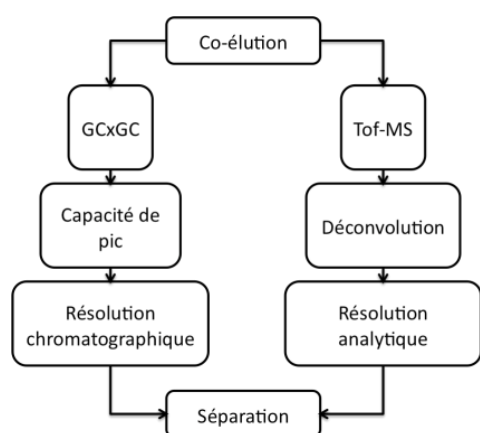


Figure 9 Processus complémentaires pour la séparation de pics co-éluant. Figure traduite de *Comprehensive Analytical Chemistry* [76].

Malgré sa faible vitesse d'acquisition le rendant non efficace en GCxGC, le détecteur qMS peut quand même être utilisé dans certaines applications. En effet, quand une masse cible ou de petits intervalles sont étudiés, les nouveaux qMS peuvent atteindre des vitesses d'acquisition acceptables. Le quadripôle apporte ainsi ses qualités en terme de sensibilité [23, 78, 79].

Au point de vue technique d'ionisation, les ToFMS sont principalement couplées à une source d'ionisation par impact électronique (IE). Cette méthode, très répandue, permet une fragmentation reproductible. Les spectres obtenus forment l'empreinte digitale de la molécule. L'IE est donc largement utilisé pour l'élaboration de librairie de spectres [76].

Dans le cadre de ce travail, une vaste zone de masse est scannée durant l'analyse. L'utilisation d'un détecteur ToFMS est donc la plus appropriée. De plus, comme l'identification des différents COVs est voulue, l'IE permettra d'utiliser les librairies de recherche pour l'attribution des spectres.

Le traitement des données

Le volume de données à traiter en GCxGC est très important [78]. Par exemple, au cours d'une analyse de 30 minutes (c.à.d. 1800 secondes) avec une vitesse d'acquisition de 100 spectres/sec, il y a eu 180 000 spectres de masse collectés.

Par conséquent, un des défis majeurs de la GCxGC est le traitement du signal nécessaire pour pouvoir obtenir un chromatogramme utilisable [79].

La transformation du signal brut en données analysables se déroule en quatre étapes [77, 78] :

1. Acquisition du signal brut
2. Segmentation en fonction du temps de modulation
3. Liaison entre les deux temps de rétention de chacune des dimensions
4. Visualisation des résultats

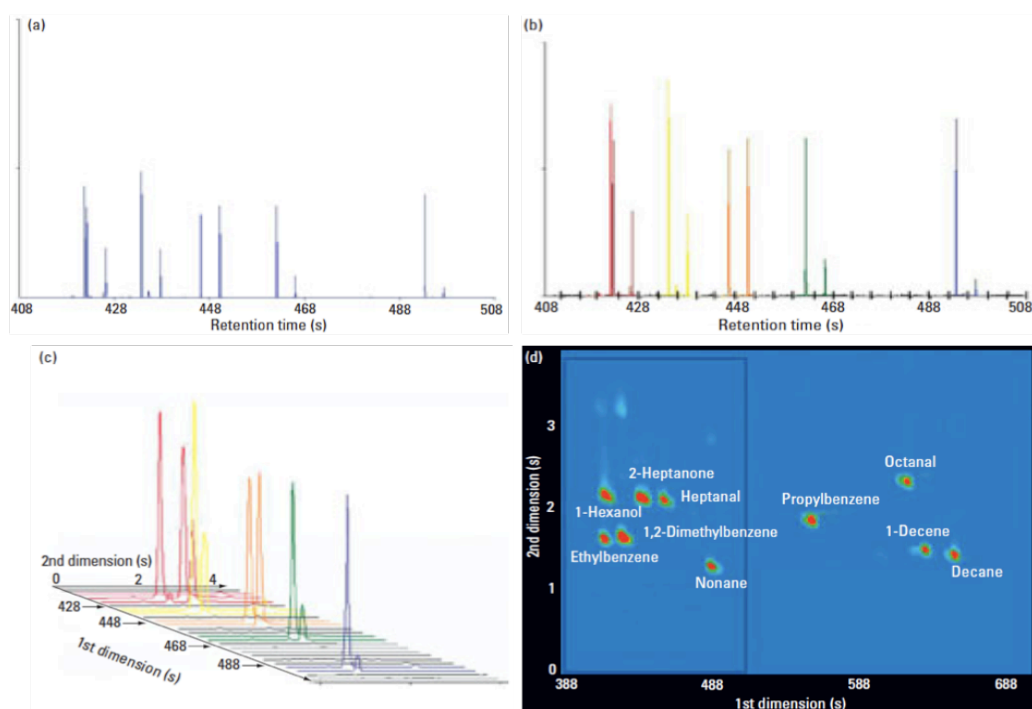


Figure 10 Illustration du procédé en 4 étapes pour le traitement du signal. Adapté de l'article de J-M D. Dimandja [77].

Il s'agit, sans aucun doute, de la partie la plus longue de l'analyse [76]. La GC bidimensionnelle étant une méthode récente, il a fallu attendre le développement de logiciels commerciaux permettant de gérer le volume de données issues de l'analyse [76, 77, 78, 79].

De nos jours, des logiciels comme *ChromaToF*® (utilisé dans ce travail) permettent un traitement facilité des données. Ce type de programme nécessite néanmoins de puissants ordinateurs.

2 Considérations théoriques

Les trois caractéristiques principales définissant un pic en GC sont : le temps de rétention, la largeur et l'intensité. Dans le cas d'une méthode bidimensionnelle, le temps de rétention et la largeur sont dédoublés en fonction de chaque dimension. Ces caractéristiques supplémentaires fournissent plus d'informations mais les données deviennent complexes à analyser et à théoriser [76].

En GCxGC, le temps de rétention est caractérisé par une valeur pour chaque dimension 1t_R et 2t_R . 1t_R est défini comme le temps de parcours entre l'injecteur et le modulateur et 2t_R comme le temps de parcours entre le modulateur et le détecteur. Ces différentes durées sont définies par les interactions entre les composés et les phases des colonnes traversées. D'autres paramètres sont aussi déterminants : le flux, les dimensions, le programme de températures... Deux composés identiques injectés sur le même set de colonne, dans les mêmes conditions, auront le même temps de rétention. Ce dernier est donc un critère d'identification. Cependant, au vu du nombre de variables, il est difficile d'obtenir des temps de rétention reproductibles entre deux appareils différents. Néanmoins, pour obtenir des résultats comparables, il est possible de définir un temps de rétention relatif par rapport à une référence. Ce raisonnement se base sur le fait que lors de la variation d'un ou plusieurs paramètres, tous les composés sont influencés de la même façon. La position relative doit donc rester constante, elle est appelée index de rétention. En GC, la détermination de ces RI est possible grâce à l'interpolation logarithmique de Kovats. Malheureusement, le nombre important de variables en GCxGC empêche, pour le moment, l'élaboration d'une telle loi. Cette information serait pourtant fort utile pour réaliser des comparaisons de données entre différents laboratoires possédant des appareils différents [76, 77].

Une autre donnée importante est le paramètre de rétention. Il s'agit de déterminer le temps de rétention d'un composé avant son analyse en se basant soit sur sa structure soit sur les données chromatographiques obtenues dans d'autres conditions. L'idéal serait de pouvoir déterminer les temps de rétentions 2D à partir des données obtenues en 1D , ce qui faciliterait la transposition entre les deux techniques et permettrait une optimisation plus facile des méthodes GCxGC [76].

D'autres valeurs paramétriques sont aussi importantes lors de l'utilisation de méthodes basées sur la GCxGC : la résolution, la capacité de pic, l'orthogonalité... Tous ces concepts sont pour le

moment étudiés afin de leur assigner une valeur chiffrée permettant de les utiliser dans l'optimisation des techniques bidimensionnelles [76].

Pour conclure, la modélisation du phénomène de rétention en GCxGC est encore en développement. Certaines pistes comme l'utilisation des courbes d'isovolatilité semblent être prometteuses mais les difficultés sont multiples. En effet, la détermination des paramètres de rétention et des RI nécessite la connaissance du flux, de la température et du temps mort de l'appareil. Ces paramètres varient continuellement avec le programme de température et la modulation, rendant le travail difficile [76, 77].

Chapitre III : Matériels et méthodes

Ce chapitre concentre les informations relatives aux conditions d'échantillonnage ; aux conditions de stockage et à la préparation des échantillons ; aux paramètres de l'appareil GCxGC et aux programmes informatiques utilisés pour le traitement des données.

1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé par J. Dekeirsschieter lors de son mémoire réalisé au sein du groupe du professeur Haubruge à GxABT en 2007 et intitulé « étude des odeurs émises par des carcasses de porcs (*Sus domesticus* L.) en décomposition et suivi de la colonisation post-mortem par les nécrophages ». Il s'agit d'un ensemble de treize paires échantillon-témoin prélevées entre le 30/03/07 et le 11/05/07 (Tableau 2).

1.1 Méthode

L'échantillonnage a été réalisé par adsorption sur un support *superQ*® (polymère de DVB et EVB) et désorption par solvant avec du diéthyle éther. Les échantillons ont été prélevés par une méthode dynamique : les cartouches d'adsorbant ont été reliées à une pompe calibrée à $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 11) pendant une heure pour chaque prélèvement. Les prélèvements témoins ont été réalisés de la même façon, à une distance de 25m par rapport au cadavre.

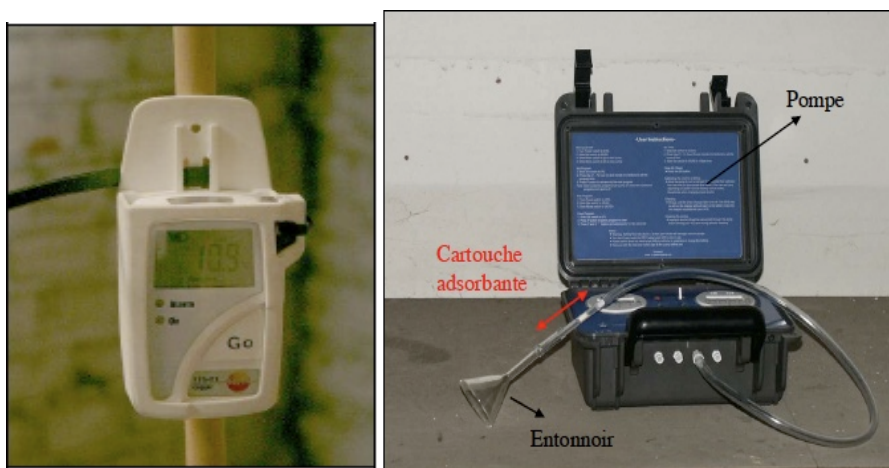


Figure 11 A gauche, l'enregistreur de température, situé à 70cm du sol. A droite, le dispositif constitué : d'une pompe, d'un tuyau de téflon, d'une cartouche de 40mg d'adsorbant et d'un entonnoir *pirex*®.

Pour tenir compte des facteurs environnementaux, des relevés météorologiques et un suivi des températures ont été réalisés. Les mesures de température ont été faites à l'aide d'un enregistreur de type *Testo 175T1*, mesurant la température toutes les heures (Figure 11).

La mesure des températures a permis de calculer le facteur *Accumulation Degrees Days* (Tableau 2). Cette donnée permet d'estimer l'état de décomposition en fonction de la température du milieu [11, 12]. L'ADDs pour x jours est calculé à l'aide de la formule ci-dessous.

$$ADD_{s_x} = \sum_{i=1}^x \overline{T}_i$$

Tableau 2 Tableau indicatif des volumes des échantillons. Pour chaque jour, l'ADDs a été calculé.

	Témoin	Cochon	ADDs		Volume
30/03/07			16,2		
3/04/07			59,6		
6/04/07			82,2		
10/04/07			120,1		
13/04/07			156,5		
17/04/07			227,8		
20/04/07			261,0		
24/04/07			309,4		
27/04/07			363,9		vide
1/05/07			433,8		<3µl
4/05/07			477,8		3-10µl
8/05/07			531,8		10-50µl
11/05/07			570,2		>50µl

1.2 Biotope

Le cochon analysé s'est décomposé dans un biotope forestier.



Figure 12 Forêt de Braine le château, altitude 80m. Photo issue du mémoire de J. Dekeirsschieter [58].

Le site est inclus dans le Domaine privé de Braine-le-Château. Au niveau de la flore, il s'agit d'une parcelle de feuillus contenant des chênes pédonculés (*Quercus robur* L.), des hêtres (*Fagus sylvatica* L.) et des érables sycomores (*Acer pseudoplatanus* L.). Le site possède une strate herbacée peu développée. Elle contient des ronces des bois (*Rubus fruticosus*) et des jonquilles (*Nacissus pseudo-narcissus* L.) [58]. Pour éviter les attaques de gros charognard, le cochon était disposé dans une cage métallique [58].

2 Stockage et préparation des échantillons

2.1 Echantillons liquides

Les échantillons récoltés en 2007 ont été conservés à -80°C. Suite à cette longue période de stockage, des variations dans les volumes d'échantillons (Tableau 2) ont été observées malgré un stockage groupé (différents problèmes techniques). Les analyses ont été réalisées en gardant à l'esprit que tout résultat devait reposer sur certaines hypothèses. Par soucis de clarté, ces dernières seront énoncées clairement à chaque étape.

Pour cette étude, les échantillons ont aussi été conservés à -80°C durant leur non utilisation et à -20°C lors de leur utilisation pour analyse. Chaque prélèvement a toujours été déplacé avec son témoin.

Pour les analyses réalisées dans le cadre de ce mémoire les échantillons n'ont subi qu'un minimum de transformations, chaque manipulation conduisant à un risque d'altération supplémentaire. Les solutions, initialement conservées dans des vials à visser, ont toutes été transposées dans des vials à certis afin de limiter les pertes et les contaminations plus efficacement, lors des différentes manipulations. Il s'agit de vials *Fisherbrand*® 1,5ml, auxquels un insert *VWR™ micro-insert* 0,1ml a été ajouté. Aucun standard interne n'avait été ajouté lors de la première étude. Nous avons donc introduit de l'hexachlorobenzène (HBC). Lors de la transposition, 5µl d'une solution 10ng.µl⁻¹ d'HBC dans le cyclohexane ont été ajoutés dans chaque vial.

Durant toutes les manipulations, les échantillons ont été maintenus sur glace. Cependant, l'évaporation de certaines solutions n'a pu être totalement évitée. Elle était facilement détectable par l'odeur spécifique du diéthyle éther et l'odeur forte de certains résidus de

décomposition. Ceci s'explique par la volatilité des COVs étudiés et la très faible tension de vapeur du solvant ($T_{\text{ébullition}} = -29,8^{\circ}\text{C}$).

2.2 Echantillons de carcasse

Lors de l'échantillonnage, des morceaux de carcasse ont été prélevés après six semaines de décomposition et congelés à -80°C . Pour réaliser des tests par *Dynamic HeadSpace* (DHS), ils ont été transférés dans des vials de 20ml *Gerstel*® et conservés à -80°C . L'impact de la congélation sur les tissus pour les études sur la décomposition a été évalué par Strokes *et al.* [83]. Elle a montré qu'aucune différence n'apparaissait après la congélation des échantillons.

3 Description de l'appareil

3.1 L'injecteur automatique

Il s'agit d'un *Gerstel*® *MultiPurpose System XL2*, conçu principalement pour l'analyse thermique. Il est composé d'un *Dynamic HeadSpace*, d'un *Thermal Desorption Unit* et d'un *Cryogenic Injector System*. Ce système permet aussi de réaliser des injections liquides.

Le système d'analyse thermique a été utilisé pour les tests DHS sur les morceaux de carcasse. Pour ce faire, les composés volatils ont été piégés sur un adsorbant de type *Tenax*® *TA* fournis par *Gerstel*®. Les paramètres d'analyse sont fournis en Annexe C.

Pour les analyses des COVs, 1 μl de solution a été injecté manuellement. A l'aide d'une seringue *Hamilton*® *7015N* 10 μl . L'injecteur automatique ne permettant pas le prélèvement dans les vials contenant un volume inférieur à 70 μl , l'injection manuelle a été utilisée pour tous les échantillons.

3.2 Le GCxGC-ToFMS

L'instrument utilisé est un *LECO Pegasus*® *4D* (LECO Corp., St Joseph, MI, USA). Il s'agit d'un système GCxGC couplé à un spectromètre de masse à temps de vol. La partie chromatographique, *Agilent*®*7890A*, est munie d'un four secondaire et d'un modulateur double étapes à quatre jets *LECO*®, fonctionnant à l'azote liquide.

Lors de cette étude deux sets de colonnes ont été testés. Il s'agit pour le premier d'une RTX-5 (30m x 0,18mm x 0,2µm) en 1^{ère} dimension et d'une RXi-17 (1m x 0,1mm x 0,1µm) en 2^{ème} dimension. Le second set était constitué de la même première dimension et d'une colonne en liquide ionique SLB-LI-111 (1,5m x 0,1mm x 0,08µm) en deuxième dimension.

Les paramètres d'analyse de la GCxGC et du ToFMS sont fournis dans l'Annexe E.

4 Acquisition et traitement des données

L'acquisition des données fournies par le spectromètre a été réalisée par le programme *LECO ChromaTOF® 4.33*. Ce programme permet de contrôler les paramètres de la GCxGC et du spectromètre de masse.

4.1 Méthode de *Process*¹

Le *process* a été réalisé à l'aide du programme *LECO ChromaTOF® 4.33*. Cette étape consiste à identifier et à déconvoluer les pics au dessus d'un rapport signal sur bruit seuil. Pour l'identification des pics, les bibliothèques *Wiley* (2008) et *NIST* (2008) ont été utilisées.

Les données obtenues ont été *processées* avec un signal sur bruit seuil de 50 pour l'identification et la déconvolution. Les différentes « tranches » de pics obtenues par la modulation (voir chapitre précédent) ont été reconstituées avec un *match* de 600. L'aire des pics a été calculée en se basant sur l'*appexing mass*. Cette dernière consiste à mesurer l'aire sur base d'un ensemble de masse.

A la fin du *process*, les « tranches » de pic n'ont rassemblées ont été additionnées manuellement. La totalité des paramètres est fournie en Annexe D.

4.2 Utilisation de *reference*

La comparaison entre les échantillons de cochon et les témoins a été faite à l'aide du programme *LECO ChromaTOF® 4.33*. Une table de référence a été réalisée sur base des échantillons de cochons.

¹ Le logiciel *LECO ChromaTOF® 4.33* utilise la langue anglaise. Le nom des différentes options est laissé dans la langue d'origine.

Le programme *reference* est basé sur une méthode algorithmique de comparaison de données. Ce logiciel compare les chromatogrammes de deux échantillons sur base des temps de rétention, des aires et des spectres de masses relatifs à chaque pic. Une fois la comparaison terminée, les pics sont classés selon les catégories *match*, *not found*, *out of area tolerance* et *unkown*.

Les échantillons ont été comparés sur base des paramètres suivant : une tolérance sur l'aire des pics de 50%, un *shift* selon 1t_R valant 8 secs (deux périodes de modulation) et 0,2 sec selon 2t_R . Le standard interne, HBC, a permis d'aligner les chromatogrammes avant l'analyse.

Les composés classés comme *not found* et *out of area tolerance* (avec une concentration inférieure à 10%) ont été considérés comme spécifiques à l'échantillon cochon.

4.3 Méthode d'analyse statistique

Les analyses statistiques multivariées ont été réalisées à l'aide du programme *The Unscrambler X*®.

4.4 Elaboration des fichiers de données

Pour réaliser les différentes analyses semi-quantitatives et statistiques, une préparation des données était nécessaire. Cette partie décrit les différentes étapes de ce traitement :

Premièrement, pour chaque jour, les composés spécifiques identifiés dans *reference* ont été copiés dans un classeur Excel. Les aires de ces composés ont été entrées manuellement car elles n'étaient pas disponibles dans le fichier *LECO*® final.

Deuxièmement, les résidus de colonnes, la ligne de bruit et les composés contaminants identifiés dans le blanc ont été supprimés de ces tableaux. Dans chaque fichier, les composés ont été renommés manuellement avec le même système de nomenclature. Ceux possédant le même nom mais un temps de rétention différent ont été numérotés par ordre de temps de rétention croissant.

Troisièmement, pour chaque date d'échantillonnage, un nouveau fichier a été créé. Ces fichiers contiennent les COVs triés par famille chimique : alcanes, alcènes, aromatiques, acides carboxyliques, esters, éthers, composés soufrés, composés azotés, aldéhydes, cétones, composés halogénés et autres.

Quatrièmement, l'aire relative de chaque composé a été calculée à l'aide de la formule ci-dessous. Pour un composé x dans un mélange de y molécules :

$$Ax_{relative} = \frac{Ax_{composé}}{\sum_{i=1}^y Ai_{composé}}$$

Pour terminer, tous les composés ont été regroupés dans un fichier global comprenant leurs jours d'émission et leurs aires relatives. Ces dernières ont été utilisées pour les analyses semi-quantitatives (voir chapitre suivant). Pour utiliser le programme *The Unscrambler X*®, les données devaient être classées sous forme d'une matrice. Pour ce faire, les COVs ont servi de lignes et les jours d'échantillonnage de colonnes. Les aires relatives ont été utilisées pour compléter les cases. Les cases vides ont été définies par une aire nulle.

Chapitre IV Résultats et Discussion

1 Etablissement des conditions d'analyses

La première étape de ce travail a été l'établissement des paramètres d'analyse du spectromètre. Pour ce faire, il a fallu étudier l'influence des différents facteurs et comparer différentes séquences.

1.1 Paramètres GCxGC

Au niveau de la GCxGC, l'optimisation des conditions s'est faite sur les paramètres les plus importants :

- *Température de l'injecteur* : Cette température doit être assez élevée pour permettre l'évaporation de tous les composés, mais elle ne doit pas être excessive au risque de détériorer l'échantillon.
- *Température initiale et rampe du four 1* : Sans conteste un des paramètres les plus importants. C'est principalement par le choix de ces valeurs que l'efficacité de la méthode sera déterminée.
- *Température initiale et rampe du four 2* : Pour cette étude, il a été décidé d'utiliser la même rampe dans les deux fours, mais d'augmenter de 5°C les températures initiale et finale du four 2.
- *Période de modulation et durée des différents jets* : L'importance de ce paramètre a été détaillée dans le chapitre II. La période de modulation a été choisie pour obtenir l'échantillonnage maximum des pics de premières dimensions tout en évitant les phénomènes de *wrap-around*.

Pour la durée des jets, c'est le jet chaud qui fixe la valeur pour le jet froid par la formule :

$$J_{froid} = \frac{P_{mod}}{2} - J_{chaud}$$

En augmentant la durée du jet chaud, la séparation des pics augmente. Mais si cette valeur est trop grande, la focalisation des pics est diminuée et leur largeur augmente.

Wrap-around : Ce phénomène apparaît lorsqu'un composé est trop fortement retenu dans la seconde colonne. Il ne s'élué plus dans des conditions de GC rapide et la période de modulation devient donc inférieure à son temps de rétention. Cet effet est facilement identifiable par la présence de pics sous la ligne de bruit [74].

1.2 Paramètres ToFMS

Au niveau du spectromètre de masse, les paramètres importants sont :

- *Ventilation du solvant* : il s'agit des premières minutes de l'analyse, durant lesquelles l'injecteur est ventilé pour éliminer une partie du solvant.
- *La gamme de masse* : c'est l'intervalle de masse détecté par le ToF.
- *La vitesse d'acquisition* : elle correspond au nombre de spectres pris par seconde. En GCxGC une grande vitesse d'acquisition est souhaitée (voir chapitre II). Mais l'intensité est inversement proportionnelle à cette valeur. Un compromis est donc nécessaire.
- *Le voltage du détecteur* : ce paramètre fixe la sensibilité du détecteur. Augmenter le voltage du détecteur permet, généralement, de contre balancer la perte d'intensité liée à la vitesse d'acquisition.
- *Energie des électrons* : ce facteur influence la fragmentation des composés. Il est fixé à -70 Volts pour correspondre aux conditions d'établissement des bibliothèques de spectres.
- *La température de la source* : elle fixe la quantité d'électrons émis.

1.3 Comparaisons de différentes séquences

Au cours de cette étude, différentes séquences ont été testées. Les paramètres des différentes séquences sont fournis en Annexe E.

Pour commencer, les méthodes GC utilisées par J. Dekeirsschieter ont été testées. Elles correspondent aux *runs* 04-05_3 et 04-05_4. Ensuite, une méthode établie avec LECO®, 04-05_5, a été employée. Sur bases des observations, trois séquences « maisons » ont été établies : 04-05_6, 04-05_7 et 04-05_final.

Les séquences testées ont été évaluées sur base des critères suivants :

- *La dispersion des pics dans l'espace à deux dimensions* : la 2^{ème} dimension nous offre une plus grande capacité de pics. Le *run* doit donc être optimisé pour utiliser cet espace au maximum.
- *Le temps de run* : ce n'est pas une limite proprement dite, mais un temps de *run* long induit un fichier plus lourd et un temps de *process* plus long.
- *Le nombre de composés pics détectés* : indicateur de la sensibilité de la méthode.
- *Le pourcentage d'inconnus lors de la recherche librairie* : ce pourcentage correspond au nombre de pics non identifiés durant l'identification librairie.

L'observation de la Figure 13 nous montre la dispersion des pics sur les différents *runs* testés. Nous remarquons que les séquences 04-05_3 et 04-05_4 utilisent mal l'espace disponible dans la deuxième dimension. Dans 04-05_5, l'utilisation d'une rampe de températures plus lente permet une meilleure dispersion des pics. Cependant, les pics s'alignent sous la forme de courbe d'isovolatilité (en rouge sur la figure), nuisant à la séparation. Pour supprimer cet effet indésirable, la rampe de températures a été augmentée donnant le chromatogramme 04-05_6. Les courbes d'isovolatilité sont diminuées mais encore présentes. Une nouvelle augmentation de la rampe est donc appliquée conduisant à 04-05_7. Ce dernier montre une bonne dispersion des points.

Le temps de modulation de 6 secs a été raccourci entre 04-05_5 et 04-05_6. En effet, aucun pic étant situé au delà de 4 secs de modulation, la période pouvait être raccourcie permettant un meilleur échantillonnage des pics issus de la première dimension.

En parallèle à l'analyse de la dispersion, les trois critères : temps de *run*, nombre de pics et pourcentage d'inconnus ont été étudiés. Ils sont repris dans le Tableau 3. L'analyse de ce dernier montre clairement que le meilleur compromis se situe dans le *run* 04-05_7. Néanmoins, le pourcentage d'inconnus restait élevé. Nous avons donc décidé de diminuer le voltage du détecteur pour réduire légèrement la sensibilité et préserver le spectromètre de masse. Ce dernier réglage correspond à la séquence 04-05_final.

Tableau 3 Comparaison des différents *runs* testés, en fonction des critères établis.

	04-05_3	04-05_4	04-05_5	04-05_6	04-05_7	04-05_final
Temps de <i>run</i>	2310s	2140s	7600s	4200s	2760s	2760s
Nombre de pics	2597	4011	7112	3984	7796	664
% inconnus	79%	86%	95%	91%	76%	10%

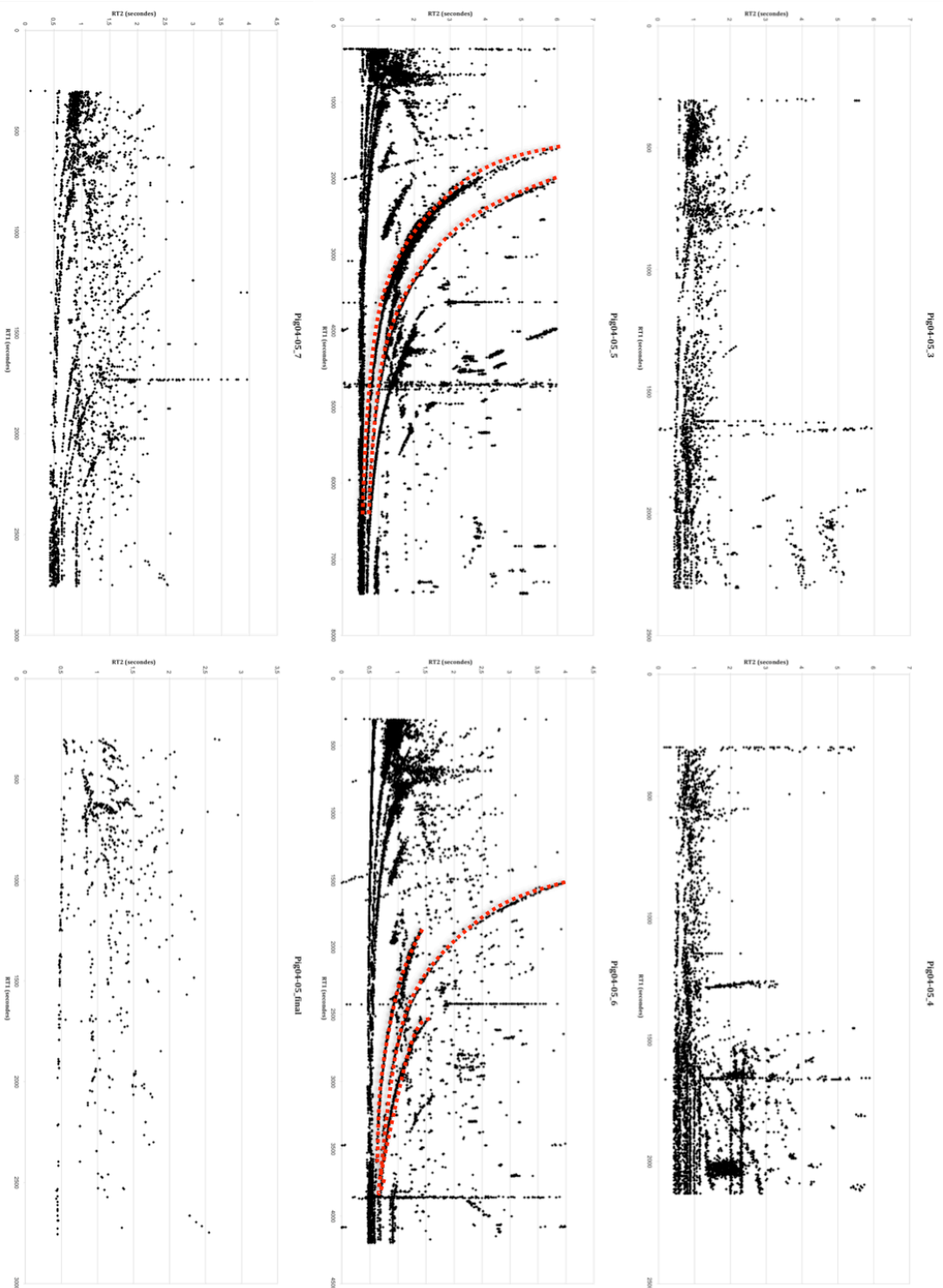


Figure 13 Chromatogramme des différents runs testés. Les lignes rouges retracent les courbes d'isovolatilité.

2 Choix du standard interne

Malgré le fait qu'une quantification soit impossible, un standard interne a été ajouté dans les échantillons pour pouvoir aligner les spectres. En effet, le temps de rétention est un des critères lors de la comparaison entre un échantillon et son témoin (voir chapitre III).

Pour commencer, une revue de la littérature a été réalisée pour identifier les standards utilisés habituellement pour les COVs cadavériques. Elle a montré que : Vass utilise du bromobenzène [11, 12] et Satheropoulos du chlorobenzène deutéré [15, 65, 66]. Le premier n'a pas été retenu car ce composé pourrait se retrouver dans les échantillons étudiés. Le deuxième est déjà plus intéressant, mais n'était pas disponible au laboratoire.

Divers standards internes présents au CART (*Centre for Analytical Research and Technology*) ont donc été testés. Au départ, le choix s'est porté sur des PolyChloro Benzène (PCBs), car ces polluants de la famille des Poluants Organiques Persistants (POPs) ne sont pas retrouvés dans les COVs étudiés. Le PCB 153 a été testé mais sa trop faible volatilité ne permettait pas de l'éluer dans les conditions utilisées. Ensuite, le PCB 37 a lui aussi été testé car, ne possédant que trois atomes de chlore sa tension de vapeur est plus faible. Malheureusement lui non plus ne s'élue pas hors de la colonne. Dès lors, notre choix s'est posé sur l'hexachlorobenzène. Il s'agit d'un standard couramment utilisé en GC et qui ne se trouve pas naturellement dans l'air. Ce composé s'est avéré idéal avec un t_R situé au milieu de l'analyse.

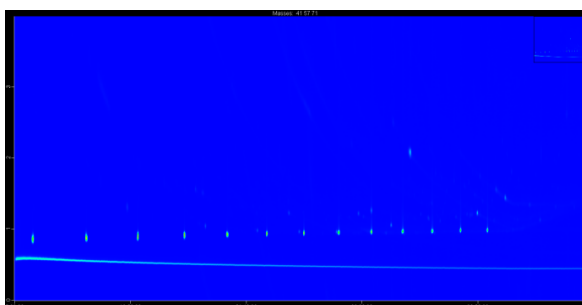


Figure 14 Chromatogramme : mélange de n-alcane (C₈-C₂₀).

En parallèle, des essais ont été menés sur des mélanges d'alcane à chaîne linéaire. Une solution contenant tous les n-alcane de C₈ à C₂₀ a été injectée dans les mêmes conditions que les échantillons. Le chromatogramme obtenu montre que les alcane sortent à intervalles réguliers durant l'analyse (Figure 14). Un tel mélange pourrait donc s'avérer utile

pour quadriller l'espace 2D dans le but de calculer les index de rétention (voir chapitre II) des différents composés. En fonctionnalisant les chaînes d'alcane par des fonctions aromatiques, halogénées, etc. nous pourrions quadriller la seconde dimension également. En effet, ces groupements permettraient d'augmenter les t_R et d'occuper tout l'espace 2D. De tels mélanges

ont déjà été investigués dans la littérature. Le « Phillips Mix » est un mélange de composés provenant de différentes familles chimiques. Il permet un quadrillage de l'espace 2D. Ce mélange pourrait aider à une normalisation des paramètres d'analyses lors de l'élaboration et de la comparaison de séquences [84]. Cependant, il faudrait se procurer les standards marqués en ^{13}C car de nombreux composés différents ont été retrouvés dans les échantillons étudiés.

3 Analyse des COVs en solution

Ce point représente le cœur de ce mémoire. Pour déterminer l'évolution temporelle des COVs émis par un cadavre de cochon, douze paires échantillons-témoins ont été injectées. Ces échantillons ont été prélevés sur un intervalle de six semaines. Cette partie rassemble les résultats obtenus après le traitement des données (voir chapitre III).

Comme expliqué au chapitre précédent, les échantillons analysés dans ce travail ont subis des problèmes de conservation empêchant tout dosages quantitatifs. Une approche semi-quantitative a donc été envisagée. Cette analyse repose sur le calcul des aires relatives (voir chapitre III). Les aires relatives de chaque composé ont été utilisées comme valeur d'intensité dans les différentes interprétations de résultats.

Hypothèse pour la tenue d'une analyse semi-quantitative :

1. Tous les composés présents dans les échantillons ont été altérés de la même façon. C'est à dire que les rapports de concentration sont inchangés.
2. Les altérations ont été identiques pour les échantillons et leurs témoins. Ceci permettant une comparaison au niveau des aires dans le programme *reference*.
3. Les aires relatives permettent de tenir compte principalement des variations intra-échantillons. En effet, pour le côté inter-échantillon, l'aire totale pour chaque jour étant différente, le poids des aires relatives ne peut pas être comparé. En effet, si un composé est présent respectivement à 4% et 5% sur deux jours, cela ne veut pas dire qu'il est plus présent le 2^{ème} jour de façon absolue mais que son importance par rapport aux autres composés du 2^{ème} jour est plus grande.

3.1 Etude semi-quantitative

L'analyse a commencé par une approche générale des données obtenues. Elle consiste à l'évaluation du nombre de composés émis au cours du temps (Figure 15).

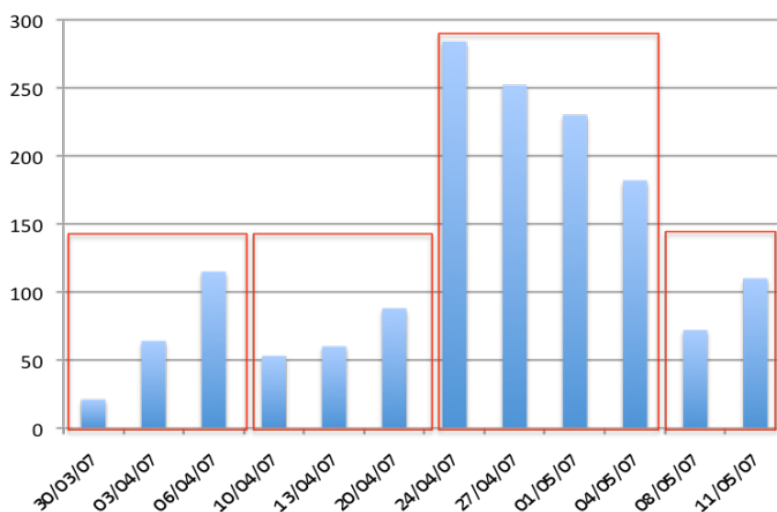


Figure 15 Histogramme du nombre de COVs émis chaque jour.

L'histogramme obtenu peut être divisé en quatre zones de croissance ou décroissance (en rouge sur le graphique). Chacune correspond à une étape dans le processus de décomposition. La démarche peut paraître simpliste, le nombre de composés n'étant pas vraiment une valeur de quantification. Elle donne toute fois des résultats intéressants. En effet, il s'agit d'un premier argument montrant les possibilités d'utilisation des COVs pour étudier le phénomène de décomposition.

Au vu de ce dernier point, une deuxième approche a été testée. Elle est basée sur la somme des aires de pic pour chaque jour. Les aires formant des indicateurs quantitatifs plus fiables. Malheureusement, aucune évolution temporelle n'a pu être déterminée sur base de ce nouvel histogramme (Annexe F).

Après cette étude générale, une approche intra-jour a été utilisée. Elle consiste à comparer l'importance de chaque famille chimique à l'intérieur d'une journée à l'aide des aires relatives. Les résultats obtenus peuvent ensuite être comparés de manière inter-jour, en gardant à l'esprit l'hypothèse 3. L'utilisation des familles chimiques peut sembler simpliste, mais elle a déjà été employée [11, 59].

La Figure 16 montre que pour la plupart des jours, une ou deux familles occupent plus de 60% de l'aire totale. De plus, ce schéma semble montrer que certaines familles subissent un pic d'abondance au cours du temps.

Pour mieux se rendre compte de cette tendance, un histogramme comparant ces proportions de manière inter-jour a été tracé (Figure 17). Ce schéma montre bien les pics d'abondance de certains composés aux différents jours de la décomposition. La détermination d l'intervalle post-mortem (PMI) par l'identification et la quantification de biomarqueurs volatils est donc bien envisageable.

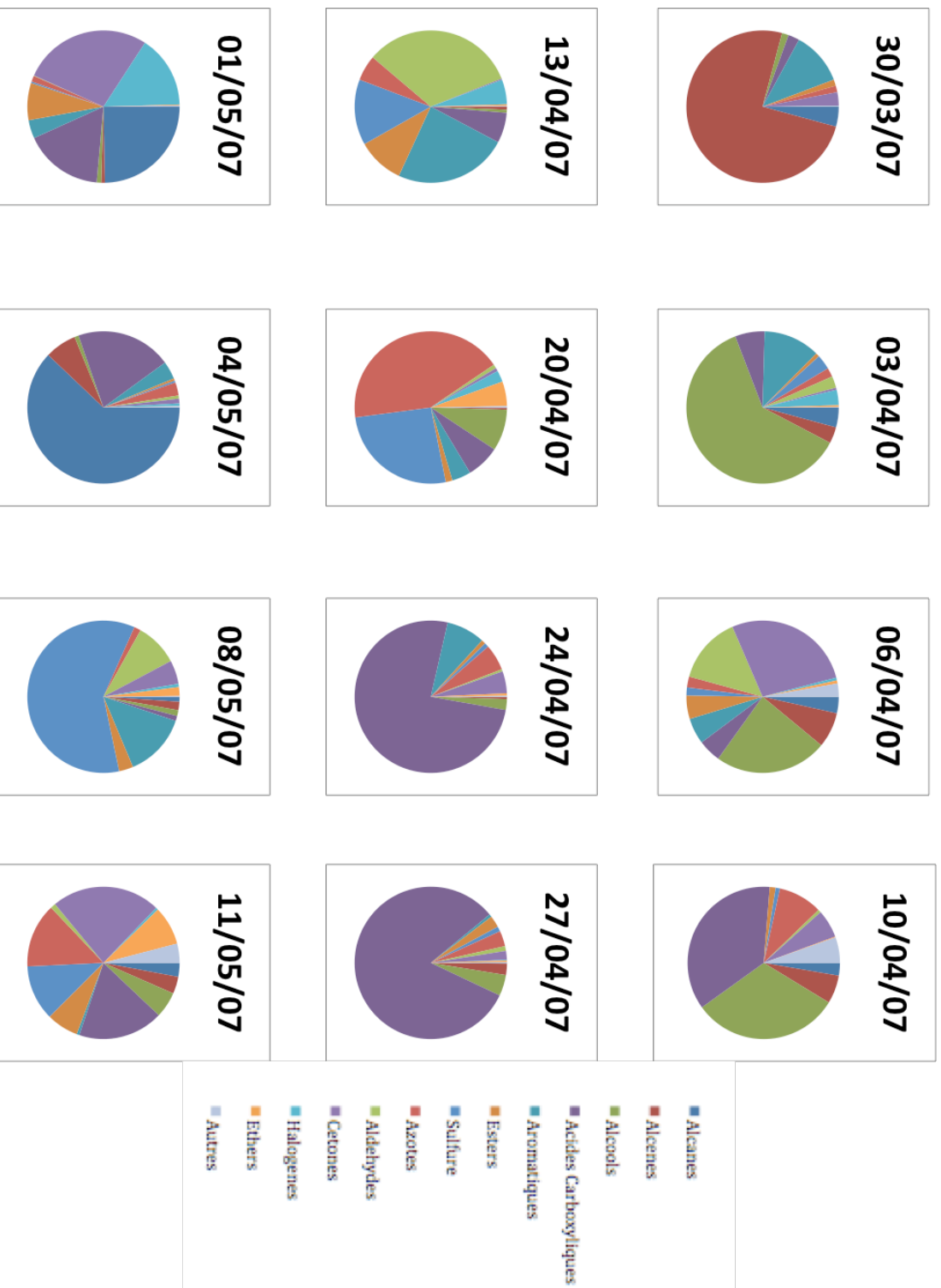


Figure 16 Importance relative des différentes familles chimiques basée sur les autres relatives.

L'analyse de ce graphique a permis de retrouver une nouvelle fois, les différentes étapes de décomposition. Mais cette fois-ci, il est possible d'identifier les familles de composés responsables de cette séparation.

Pour la séparation entre le 1^{er} et le 2^{ème} stade de décomposition, elle se situe une nouvelle fois entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour. Les aldéhydes, les cétones, les esters, les acides carboxyliques, les azotés et les aromatiques présentent un changement d'intensité qui serait lié au passage entre les deux stades. Cependant les alcanes, les alcènes et les alcools placeraient cette transition entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour.

La transition entre le 2^{ème} et le 3^{ème} stade, les acides carboxyliques, les éthers, les aromatiques et les cétones la placent entre le jour 6 et le jour 7. Les autres familles ne suivent pas cette tendance. Cependant, elles ne montrent pas de variation permettant de situer la transition à une autre date.

Pour les deux derniers stades, la séparation est bien marquée entre les jours 10 et 11. Les alcanes, alcènes, acides carboxyliques, les aromatiques, les sulfures, les aldéhydes et les halogènes sont les indicateurs de cette transition.

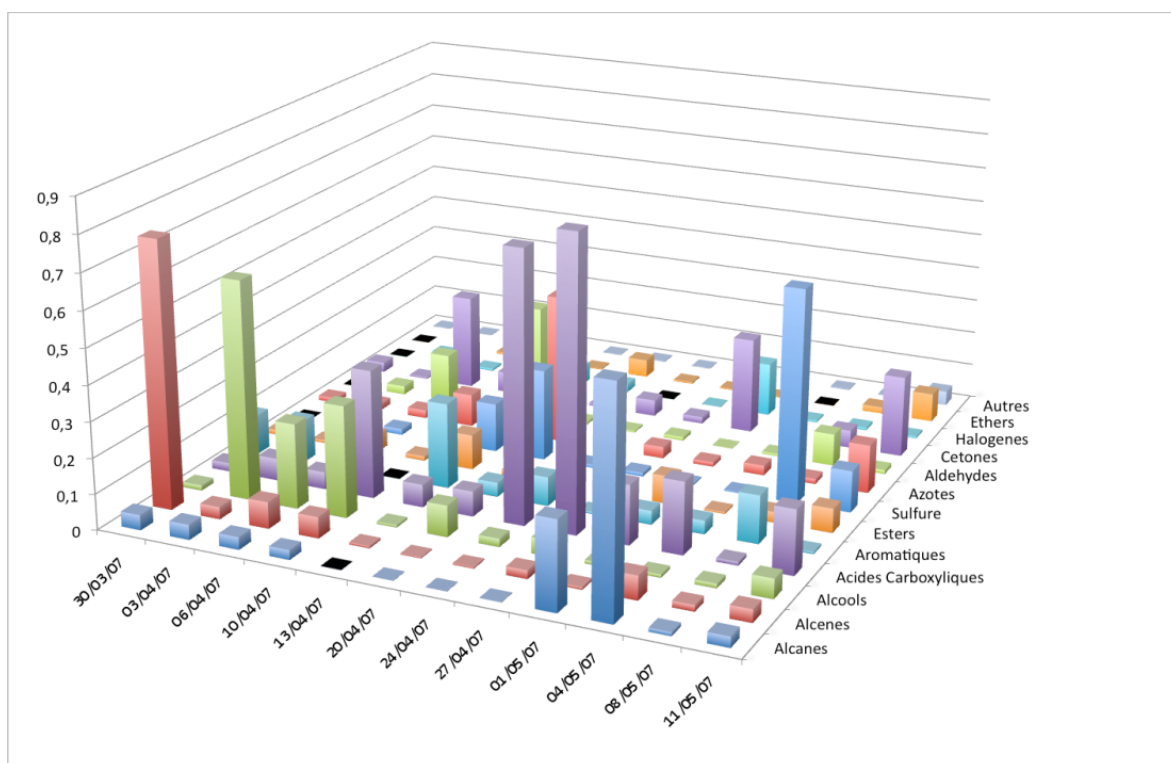


Figure 17 Histogramme inter-jour de l'importance relative de chaque famille chimique.

Il est évident que l'échelle de temps définie par la localisation des stades de décomposition est liée à une appréciation subjective. Cependant la cohérence entre l'analyse par nombres de composés et par aires relatives n'en reste pas moins marquante. De plus des échelles subjectives sont employées pour évaluer des phénomènes dans divers domaines. Par exemple, l'échelle de Mercali détermine la magnitude d'un tremblement de terre en fonction des dégâts que celui-ci a causés. L'utilisation des stades de décomposition n'est pas très différente, mais il est tout de même indispensable de déterminer une échelle objective plus robuste. Une solution pourrait venir de l'analyse statistique des résultats.

3.2 Etude statistique

Les méthodes de statistique multivariées sont des outils importants de la chimie analytique. Pourtant, elles restent très peu employées dans les études de COVs cadavériques [1, 65]. Dans le but de démontrer leur utilité, une analyse par composantes principales (ACP) a été testée. L'objectif premier de ce test était de séparer les différentes dates pour observer une évolution temporelle dans l'émission des COVs. Pour réaliser ces analyses, une matrice a été créée. Sa création est détaillée au chapitre III. L'ACP n'a pas permis de retrouver une évolution croissante selon les différents jours (Annexe F). Par contre, l'observation des composés classés *outliers* a montré des résultats prometteurs. Les *outliers* sont définis comme étant les composés ayant une grande influence sur la dispersion des points. Ce sont donc les composés les plus éloignés de l'origine du repère de l'ACP.

L'ACP a permis d'identifier les composés ayant la plus forte influence sur l'évolution temporelle de l'émission des COVs. Cette influence se base sur un compromis entre l'intensité et la distribution temporelle. Pour déterminer ces critères, il a fallu étudier les matrices avant et après suppression des *outliers*. Cette comparaison a montré que tous les composés, dont l'aire relative était supérieure à 5%, étaient supprimés. De plus la majorité des composés compris en 1 et 5% étaient eux aussi éliminés. Néanmoins, l'aire n'est pas l'unique facteur. En effet, 50% des composés présents sur plus d'une date ont été eux aussi supprimés. Ce point démontre l'importance de la dispersion temporelle. Cependant, certains composés présents sur cinq jours n'étaient pas supprimés alors que d'autres présents sur trois jours l'étaient. Après investigation, les composés en très faible quantité présents sur plusieurs jours n'étaient pas supprimés.

L'influence sur l'évolution temporelle de l'émission des COVs résulte donc d'un compromis entre l'intensité et la distribution temporelle.

Cette découverte montre le potentiel de l'ACP pour l'étude de COVs. En effet, les composés intenses ou ceux fortement dispersés peuvent être identifiés dans un simple fichier Excel. Mais le poids du compromis ne peut être évalué de manière objective que par une méthode statistique telle que l'ACP. De plus, cette méthode permet d'analyser facilement de grands volumes de données. Pour cette analyse, la matrice étudiée est formée par 12 colonnes (jours) et 1198 lignes (composés). Ce qui fait 14376 valeurs à traiter.

Une autre méthode multivariée a été utilisée, l'arborescence. Elle a cependant été rapidement abandonnée au vu de la plus longue durée d'analyse et de la complexité de la figure obtenue (Annexe F). Chaque séparation correspond à l'élimination des composés *outliers*. Un grand nombre d'analyses successives est nécessaire pour obtenir les mêmes résultats que ceux obtenus par l'ACP.

3.3 Etude qualitative

Au cours de cette étude, 5608 pics ont été détectés sur les douze jours d'échantillonnage. Après la comparaison avec les témoins, ce nombre a été ramené à 2164. Une étude manuelle de cette liste a permis d'identifier les pics non spécifiques restants tels que les résidus de colonne, les polluants du laboratoire et les solvants.

- Résidus de colonne : composés siloxanes, éthane-1,1-oxybis identifiés par l'analyse des blancs réalisés avant chaque injection.
- Polluants du laboratoire : le linalool, les oxydes de linalool, le nonane sont présents dans les solvants utilisés.
- Solvants : hexane (nettoyage de la seringue), cyclohexane (solvant de HBC), diéthyl éther (solvant des COVs), hydroperoxyde diéthyléther (provenant de la dégradation de l'éther correspondant).

Après la suppression de ces derniers, il restait 1198 composés identifiés comme spécifiques au cadavre étudié. Cette liste a servi de base à la création de la matrice utilisée pour le traitement semi-quantitatif et l'étude statistique (voir chapitre III). Elle n'est pas fournie au vu de sa taille trop importante.

Les composés spécifiques identifiés ci-dessus ont été comparés à la base de données (Annexe A). Il en ressort que $\pm 21\%$ des composés avaient été identifiés par le passé. Lors de l'analyse par GC simple, 34 composés avaient été identifiés dans le biotope forestier (en gris dans le tableau). Vingt six d'entre eux ont été retrouvés au cours de l'analyse par GCxGC. Cependant, l'étude GC a été menée sur deux cadavres, les COVs non retrouvés proviennent peut-être du deuxième cochon. L'analyse par GCxGC a permis de retrouver des biomarqueurs retrouvés uniquement dans les fluides : le skatole, le 4-ethyl-phénol. Cette observation indique que la GC bidimensionnelle permettrait de retrouver tous les biomarqueurs recherchés sans passer par une longue étape de préparation d'échantillon.

Lors de l'ACP, 138 composés *outliers* ont été identifiés. Ils sont joints dans l'Annexe B. Ils ont été ensuite comparés à la base de données bibliographiques (Annexe A). Il s'avère que $\pm 40\%$ des *outliers* avaient déjà été identifiés. Ils sont indiqués en vert dans le tableau. Parmi ces composés, nous avons retrouvé certains biomarqueurs de décomposition déjà identifiés : les acides butyrique et iso-butyrique, les acides valérique et iso-valérique, l'indole, le trisulfure de diméthyle, le benzaldéhyde...

3.4 Identification des voies de biosynthèse

Une fois les composés spécifiques identifiés, notre attention s'est portée vers leurs origines. Les COVs de décomposition sont issus de la dégradation des macromolécules du corps : les protéines, les graisses et les carbohydrates. La dégradation de ces composés est le fait de micro-organismes (voir chapitre I).

La biosynthèse des résidus de décomposition est un secteur encore peu exploré. Quelques articles font pourtant référence à des voies possibles de dégradation [50, 60]. Parmi les *outliers* identifiés lors de l'ACP, nous avons identifié certains composés non répertoriés dans la littérature (en bleu dans le tableau). Comme expliqué précédemment, ces *outliers* sont les principaux responsables de l'évolution temporelle de l'émission de COVs. Nous avons donc recherché l'origine biologique de certains de ces composés spécifiques.

Pour ce faire, il a fallu comparer les molécules identifiées avec les composants des principales macromolécules de notre corps : les acides aminés, les triglycérides et les sucres. Après ce premier tri, des recherches dans la littérature ont été menées pour voir si ces voies de

dégradations avaient déjà été identifiées. Cette méthode a permis d'identifier l'origine de certains composés mais surtout d'établir la démarche à adopter dans ce but.

Lors de la revue bibliographique, nous avons remarqué que certains COVs cadavériques avaient déjà été détectés dans des études différentes. Phung D. Le et R. I. Mackie se sont intéressés à l'activité des micro-organismes impliqués dans la digestion des cochons et dans la décomposition de leur lisier. Dans ce but, ils ont étudié les émissions de composés volatils provenant des fermes d'élevage [85, 86]. Nous avons remarqué un grand nombre de similitudes entre les COVs de ces études et ceux détectés sur les cadavres. Ceci confirme que ce sont les micro-organismes du système digestif qui sont les principaux acteurs de la décomposition.

Pour illustrer notre démarche voici quelques exemples d'identification de voies de biosynthèse. A ce stade de l'étude, il s'agit encore d'hypothèses. Une étude biochimique serait nécessaire pour confirmer ces postulats.

Les triglycérides

Les tissus adipeux sont formés principalement de triglycérides qui s'hydrolysent en glycérol et en acides gras (voir chapitre I).

Dans la famille des alcools, nous avons identifié le 1,2,3-propanetriol (glycérol), pièce centrale des tryglycérides. Les acides gras à chaînes longues sont à l'origine de nombreux composés volatils. Les prédominants sont les acides myristique (C₁₄), palmitique (C₁₆) et stéarique (C₁₈). Ces acides ont été retrouvés dans les 1198 composés spécifiques mais pas dans les *outliers*. Les acides gras naturels possèdent un nombre de carbones pair. Les résidus de décarboxylation, alcanes ou alcènes, doivent contenir un nombre impair de carbones. Parmi les *outliers*, l'heptadécane (C₁₇) et l'heneicosane (C₂₁) ont été détectés. Il pourrait s'agir des résidus de la décarboxylation de l'acide stéarique et de l'acide behénique. Des micro-organismes conduisant à la décarboxylation d'acide gras à chaînes longues sont pour le moment étudiés dans le domaine des biocarburants. Ces mêmes organismes pourraient être responsable de la même réaction sur les corps [87].

Les acides aminés

Un grand nombre de composés identifiés proviennent de la dégradation des acides aminés. Les dérivés azotés, soufrés, aromatiques et les acides carboxyliques à chaînes courtes peuvent être reliés à un acide aminé. Les bactéries utilisent la décomposition des peptides pour produire leur énergie. La dégradation des acides aminés est un processus enzymatique. Ce dernier implique des réactions d'oxydoréduction [88]. Les résidus d'acides aminés sont souvent le résultat d'une déamination ou d'une décarboxylation du composé primaire [86]. Ces réactions sont le fait de bactéries :

- pour la déamination : *Bacteroides*, *Prevotella*, *Selenomonas*, etc. qui travaillent en milieu neutre (pH de 6 à 7) [86]
- pour la décarboxylation : *Bifidobacterium*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, etc. qui travaillent en milieu légèrement acide (pH de 5 à 6) [86].

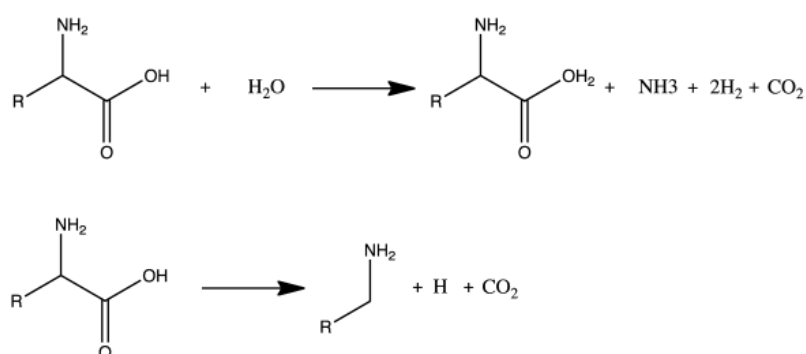


Figure 18 Réaction de déamination et de décarboxylation des acides aminés.

Parmi les *outliers*, le 4-amino-1-butanol, à-amino- γ -butyrolactone et le 5-isopropyl-3(2H)-dihydrofuranone ont retenu notre attention. Ils pourraient tous trois provenir de l'homoserine (iso-thréonine). Aucune référence sur la dégradation de cet acide aminé n'a été trouvée. Cette hypothèse ouvre la voie sur la prise en compte des acides aminés n'étant pas codés par l'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'acide 5-oxopentanoïque pourrait venir de la désamination de la lysine, suivie d'une oxydation de l'amine terminale. Il pourrait s'agir d'un oxyde d'acide gras (OXOFA) mentionner par Takatori [67, 68].

Les voies biosynthétiques de composés non repris dans les *outliers* ou déjà présents dans la littérature ont aussi été investiguées. Par exemple, dans la famille des composés aromatiques, le skatole et l'indole ont été détectés. Ils sont sans doute issus de la dégradation du tryptophane. Le phénol et ses dérivés pourraient provenir de la dégradation de la tyrosine.

Les sucres

La dégradation des sucres est plus souvent l'œuvre de champignons. Ce processus entraîne la formation d'acide gras volatiles (VFAs) linéaires tels que les acides acétique, propionique et butyrique. Les formes iso de ces acides sont dues à la dégradation d'acides aminés [85]. Ces composés ont été identifiés parmi les *outliers*. Cependant ils ont déjà été décrits dans la littérature, leur biosynthèse n'est donc pas détaillée.

Dans nos composés étudiés, certains proviendraient du cycle de dégradation des sucres. L'oxalate de diéthyle et l'acide oxo-acétique seraient originaires de l'acide oxaloacétique présent dans le cycle de Krebs. L'acide 2,4-dihydroxysuccinique pourrait être le résultat d'une double hydroxylation de l'acide fumarique intervenant, lui aussi, dans le cycle de Krebs.

4 Test des colonnes à phase liquide ionique

Au cours de nos analyses, nous avons investigué l'impact de la phase stationnaire de la seconde dimension. L'utilisation de colonnes plus polaires avait déjà été testée par Swann en 2010. Elle avait analysé les fluides de décomposition sur une colonne de type WAX [60]. Pour ces tests, la colonne à phase liquide ionique la plus polaire du marché a été utilisée. Les avantages et la structure des colonnes à phase liquide ionique ont été développés dans le chapitre II.

Pour réaliser ces essais, une paire d'échantillons a été réinjectée dans ces nouvelles conditions. L'échantillon 04-05 a été utilisé car il avait déjà été employé lors de l'établissement des conditions de séparation. Les mêmes conditions d'analyse et de GC ont été utilisées. Néanmoins, le temps de modulation de 4 secondes ne suffit plus. En effet, certains composés sont trop retenus en deuxième dimension et des *wrap-arounds* apparaissent. La période a été augmentée à 6 secondes. Si nous appliquons les mêmes critères d'évaluation qu'au point 1.1., nous remarquons que les résultats obtenus sont très intéressants. Point de vue dispersion, une étude du chromatogramme 2D montre la bonne occupation de l'espace (Figure 19).

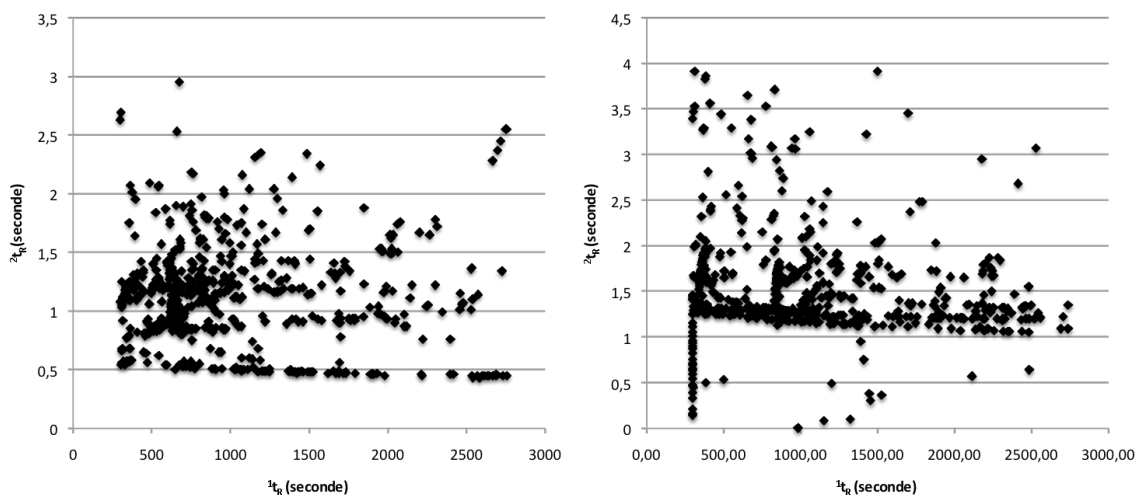


Figure 19 Chromatogramme de l'échantillon du 04/05/07. A gauche, sur le set polysiloxane, à droite sur le set LI.

La dispersion des points pour le set LI pourrait être encore améliorée. En effet, des *wraps* sont présents sous la ligne de bruit. De plus, les pics possédant un $2t_r$ compris entre 1 et 1,5 seconde ne sont pas très bien séparés. Les conditions d'analyses pour ce set de colonne doivent encore être optimisées.

Pour le nombre de composés et le pourcentage d'inconnus, les résultats sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 Comparaison des critères d'évaluation des paramètres de séparation.

	04-05_final	04-05 (LI)
% inconnus	10%	6,6%
Nombre de composés	664	648
Nombre de spécifiques	182	248
% de spécifiques	27%	38%

Nous pouvons comparer ces résultats avec ceux obtenus lors de l'établissement des conditions de séparation. Le tableau ci-dessus montre les très bons résultats obtenus avec la colonne liquide ionique. Pour un nombre de pics similaires, le nombre de composés spécifiques est plus important. L'utilisation de ces nouvelles colonnes permet d'augmenter l'efficacité de la séparation et la détection des COVs.

Le pourcentage de composés spécifiques est plus important pour le set liquide ionique. Ceci s'explique en partie par le faible saignement de ces nouvelles colonnes. Un grand nombre de

résidus détectés provenaient de la première dimension en polysiloxane. Dans une approche semi-quantitative, l'importance de chaque famille chimique a été comparée (Figure 20).

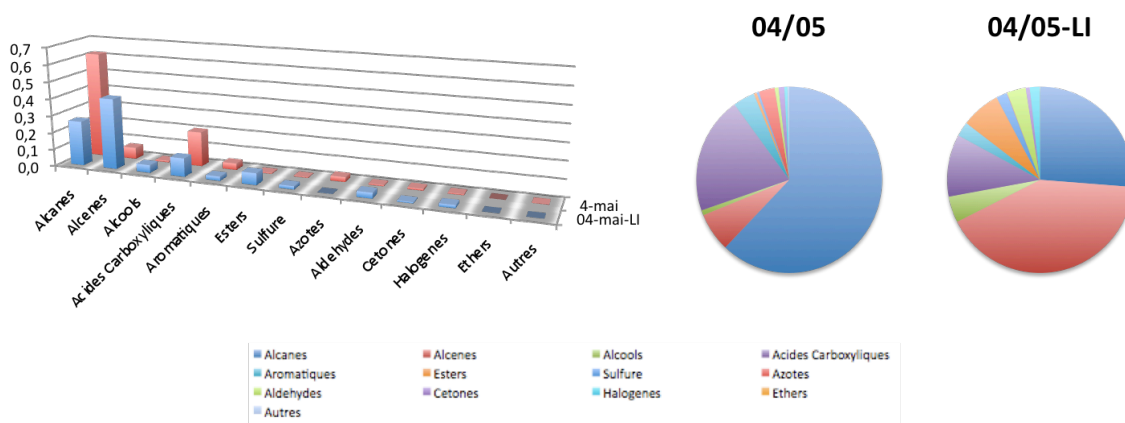


Figure 20 Comparaison des aires relatives entre une analyse sur un set en polysiloxane et un set liquide ionique.

La Figure 20 nous montre que, malgré les différences soulignées précédemment, il existe certaines corrélations entre les deux sets de colonnes. Elle montre que les mêmes familles chimiques (alcanes, alcènes et acides carboxyliques) sont majoritaires, mais avec un rapport de force différent. Les esters et les alcools montrent une plus grande variabilité entre les deux analyses. Ces observations semblent indiquer une différence de sensibilité entre les deux sets en fonction des composés étudiés.

Pour comprendre ce phénomène, nous avons étudié la dispersion dans l'espace à deux dimensions pour ces familles au comportement particulier (Figure 21). Une efficacité de séparation différente expliquerait le phénomène observé. En effet, les pics bien séparés sont plus facilement quantifiables. L'aire du pic dépend donc de l'efficacité de la séparation.

Pour les acides carboxyliques, l'intensité plus faible en LI s'explique par le nombre de composés différent. En effet, seulement quatre pics d'acides carboxyliques sont détectés sur les colonnes LI ce qui conduit à une perte d'intensité totale pour cette famille.

Le cas des alcènes pose plus de difficultés. En effet, cette famille est plus présente dans le set LI. Cependant, le nombre et la dispersion des pics sont semblables dans les deux analyses. Une évaluation chiffrée de la dispersion permettrait peut-être d'expliquer le phénomène observé.

Pour la famille des alcanes, nous observons une mauvaise dispersion des pics sur le set LI. Ce phénomène peut s'expliquer par l'extrême polarité de la seconde dimension. Les alcanes étant des composés apolaires, leur séparation n'est pas efficace sur ce set.

Les alcools et les esters sont plus présents lors de l'analyse sur LI. Parallèlement, ils sont plus dispersés sur le set LI. Ce dernier point peut s'expliquer par la différence de polarité entre les phases étudiées. La colonne en liquide ionique est beaucoup plus polaire que la phase en polysiloxane. La séparation des composés polaires est donc plus efficace avec cette phase.

En conclusion, l'augmentation de la polarité en seconde dimension permet d'influencer la séparation des pics. Les composés polaires sont mieux séparés et donc mieux détectés, tandis que les composés apolaires subissent l'effet inverse. Une compréhension complète du phénomène permettrait de faciliter le choix du type de colonne lors de l'élaboration des conditions d'analyse. En fonction de la polarité des composés recherchés, le choix du set de colonne est déterminant pour leur détection et leur quantification.

Dans le futur, une étude approfondie de cette configuration de colonne permettrait sans doute de mieux comprendre les raisons de ce comportement. De plus, la possibilité d'utiliser ces colonnes en configuration inverse (1D : polaire x 2D : apolaire) doit être envisagée. L'utilisation de ces sets de colonnes a déjà montré des résultats intéressants : augmentation de la résolution et meilleure occupation de l'espace à deux dimensions [89]. Ces recherches pourraient ouvrir la voie à cette nouvelle technologie.

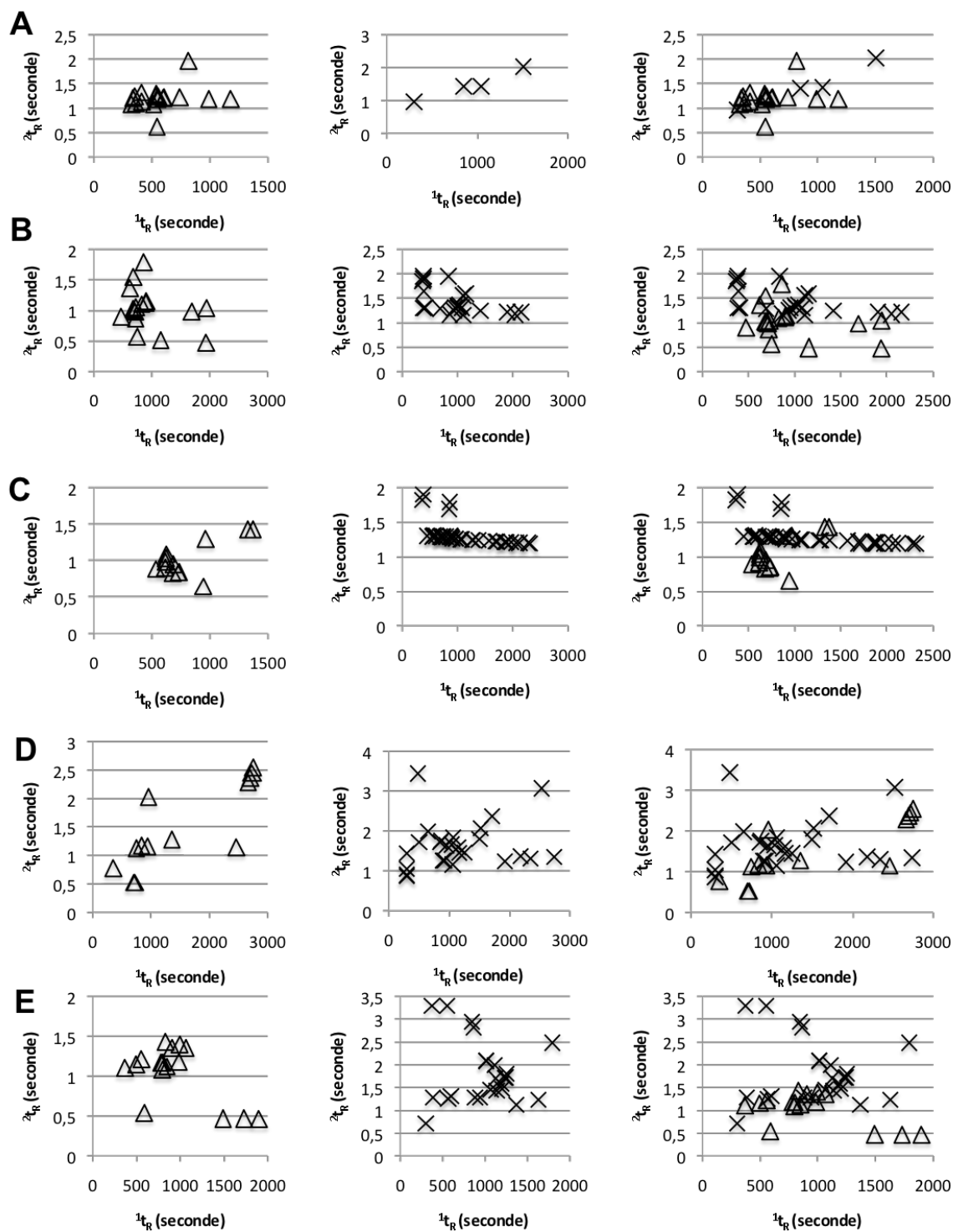


Figure 21 Comparaison de la dispersion des pics entre les différents sets de colonne : A pour le set polysiloxane et X pour le set ionique. A acides carboxyliques, B alcènes, C alcanes, D Alcools ; E Esters.

5 Analyse des COVs par DHS

En 2009, J. Dekeirsschieter a aussi prélevé des échantillons de carcasse après six semaines de décomposition. Des analyses DHS ont donc été réalisées pour évaluer les possibilités d'utilisation de l'échantillonnage dynamique dans le domaine des COVs cadavériques.



Figure 22 Echantillons de peau utilisés pour l'analyse DHS.

Une revue de la bibliographie a été réalisée pour établir les meilleures conditions d'incubation et de désorption. Au point de vue incubation, aucune référence à de la DHS sur des échantillons de cadavre n'a été trouvée. Les conditions ont donc été choisies en fonction de tests déjà réalisés sur des fleurs et des cigarettes au sein du laboratoire. Pour la désorption thermique, la bibliographie montre des conditions fortement différentes d'un auteur à l'autre [1, 11, 65]. Ces variations sont certainement liées aux différents adsorbants utilisés. Néanmoins, ces articles ont permis de déterminer la zone de températures habituellement utilisée de 200°C [65] à 350°C [1, 11]. Dans cet intervalle, les composés ne subissent pas de dommages. Pour terminer, les conditions du CIS ont été choisies en lien avec les conditions déjà utilisées par J. Dekeirsschieter [1]. Les conditions d'analyses sont données dans l'Annexe C.

Pour les paramètres de l'appareil, les conditions et le set de colonnes pour phase liquide ionique ont été utilisés. La seule modification est l'utilisation d'un temps de modulation de six secondes pour éviter les *wrap-arounds* observés durant les tests préliminaires.

Au cours de cette analyse, 828 composés ont été détectés. Ce nombre a été ramené à 660 après suppression des résidus de colonnes et d'adsorbant identifiés dans le blanc de l'adsorbant. Ces résultats sont vraiment impressionnants sachant que pour six semaines de décomposition, l'analyse liquide n'a identifié que 111 composés spécifiques. Cela signifie qu'une seule analyse DHS fournit presque six fois plus de composés que l'échantillonnage avec extraction dans le solvant. De plus, sur l'ensemble des douze échantillons liquides, 1198 composés ont été trouvés. Si nous résonnons en nombre, plus de 50% des composés sont retrouvés dans une seule analyse DHS. Ceci nous laisse imaginer le nombre de COVs que nous pourrions identifier en utilisant la désorption thermique et la GCxGC-ToFMS pour une nouvelle étude temporelle de décomposition.

Pour l'aspect qualitatif, les biomarqueurs importants, préalablement identifiés, sont retrouvés. Ils sont donnés dans le Tableau 5. En plus du nombre, la DHS permet de retrouver les composés spécifiques recherchés.

Tableau 5 Liste non-exhaustive des composés d'intérêts détectés en DHS.

Composés détectés en DHS			
1-Butanol, 2-methyl	2-Propanone	Disulfide, dimethyl	Palmitic acid, isopropyl ester
1-Hexadecanol	2-Propenal	Ethanol	Octadecanoic acid, methyl ester
1-octadecanol	1-Butanol, 4-amino	Heptadecane	Palmitic acid, vinyl ester
1,2,3-Propanetriol, triacetate	Benzaldehyde	Hexadecanal, 2-methyl	Pentanamide
1,4-Butanediamine	Benzothiazole	Hexadecanoamide	Piperidine
2-Butanol	Butanal, 3-methyl	Hexadecanoic acid	Tetradecane
2-Butanone	Butanedioic acid	Myristic acid, isopropyl ester	Trisulfide, dimethyl

Nous pouvons remarquer que le Tableau 5 est constitué de composés spécifiques ou de leurs dérivés. Des composés comme le 1,4-butanediamine, appelé putrescine, sont très intéressants car ils ne sont pas souvent détectés dans les mélanges de COVs cadavériques [1, 11].

Tableau 6 Composés « exotiques » détecté lors de l'analyse DHS.

Composés	Origines
Benzedrex	Stimulant
Chloroquine	Antipaludique
Citral	Citronnelle
DI-phenylephrine	Décongestionnant
Farnesol	Muguet
Globulol	Expectorant
Lignocaine	Anesthésique
Nerolidol	Composant huiles essentiels
p-mentha-1,5-dien-8-ol	Volatils plantes
Zizanyl acetate	Odeur de graminée

Lors de l'analyse DHS, des composés « exotiques » ont été détectés (Tableau 6). Il s'agit de molécules provenant principalement du domaine pharmaceutique ou de la botanique. Nous ne pouvons déterminer si ces composés sont liés au traitement du cochon, à la décomposition, à l'environnement ou à une quelconque contamination. Néanmoins, ils ouvrent la voie à de nouvelles investigations. Pouvons-nous détecter sur un corps des traces volatiles de médicaments ? Des indices provenant du lieu du crime ? Dans le secteur de l'agroalimentaire, pourrions-nous détecter les traces de traitements médicamenteux sur les animaux ? Et bien d'autres encore...

Chapitre V : Conclusions et Perspectives

L'objectif de ce travail était l'analyse de composés organiques volatils (COVs) émis par un cadavre de cochon en décomposition. L'étude a été menée en différentes étapes. Pour commencer, il a fallu établir les conditions d'analyse pour l'instrument. Ensuite, nous avons réalisé l'étude proprement dite des douze paires échantillon-témoin. Pour terminer, nous avons mené quelques expériences traçant les lignes directrices pour la suite de la recherche.

L'établissement des conditions d'analyse passait par une compréhension de l'influence de chaque paramètre sur l'analyse. Une fois cette étape réalisée, différents tests de *runs* ont permis de définir les conditions d'analyse optimales. Cette étude a notamment permis l'établissement de critères d'évaluation permettant de comparer différentes séquences d'analyse.

L'analyse des échantillons de COVs cadavériques s'est orientée vers différentes voies : semi-quantitative, statistique et qualitative. Elle a conduit à des résultats intéressants malgré l'impossibilité de réaliser une quantification complète.

Premièrement, l'analyse semi-quantitative basée sur le nombre de composés a permis de retrouver les différents stades de la décomposition. Cette observation est de bon augure pour la compréhension du phénomène de décomposition par l'étude de l'émission de COVs. L'analyse des aires relatives des composés montre que, pour chaque jour, une ou deux familles chimiques représentent plus de 60% de la totalité des COVs émis. Sur base de cette observation, nous avons identifié des pics d'émission parmi les familles de COVs durant la décomposition. Ces pics d'émission nous ont permis de distinguer, une nouvelle fois, les différents stades de la décomposition. En fonction du stade de dégradation, les composés majoritaires sont différents. La quantification des COVs pourrait donc repousser les limites de la détermination de l'intervalle post-mortem. Pour vérifier ce postulat, une étude basée sur une quantification totale doit être réalisée. L'évolution de l'émission de chaque composé doit être étudiée, en plus d'une généralisation par famille chimique.

Deuxièmement, l'analyse par composantes principales (ACP) a permis l'identification des composés ayant la plus grande influence sur l'évolution temporelle de l'émission des COVs. De plus, elle a permis d'établir que cette influence résultait d'un compromis entre l'intensité et la dispersion temporelle. Ce facteur ne peut être évalué que par une méthode statistique robuste.

L'ACP s'est révélée très efficace pour retrouver ces composés d'influence parmi de grandes matrices de données.

Troisièmement, une étude qualitative des composés spécifiques identifiés avant et après l'ACP a été menée. Elle a montré que la GCxGC-ToFMS permettait d'identifier beaucoup plus de composés que les méthodes précédemment employées. En effet, seulement 21% des composés de cette étude étaient déjà référencés dans la littérature. De plus, cette étude a révélé que la GCxGC-ToFMS permettait de détecter des biomarqueurs importants qui n'étaient identifiés que dans les fluides de décomposition. L'étude des composés *outliers* identifiés en ACP a montré que 40% étaient déjà repris dans la littérature. L'ACP permet donc de retrouver les composés importants dans des matrices complexes.

Pour finir, les voies de biosynthèse des nouveaux COVs détectés ont été investiguées. Certaines pistes probables de dégradation des macromolécules ont été présentées. La validation des hypothèses formulées nécessite une étude biochimique du métabolisme des micro-organismes impliqués dans la décomposition.

Parallèlement à cette étude, l'impact de la phase stationnaire a été évalué par le test de la colonne de type liquide ionique la plus polaire du marché. Nous avons mis en évidence les variations de séparation des composés en fonction de la polarité de la seconde dimension et l'impact de ce phénomène sur la détection. De plus, il a été établi que certains biomarqueurs de la décomposition permettraient d'améliorer la détermination de l'intervalle post-mortem (PMI). L'élaboration de sets de colonnes optimisés pour ces composés est une des étapes clés de l'établissement de méthodes d'analyse. Elle permettra sans doute une meilleure séparation et de meilleures limites de détection.

L'analyse DHS des échantillons de carcasses s'est révélée très intéressante. Elle a permis d'identifier un grand nombre de composés en une seule analyse. En plus de cet aspect quantitatif, des biomarqueurs d'intérêt ont été détectés. Par exemple la cadavérine, composé important mais généralement non détecté dans les analyses classiques de COVs cadavériques.

Les observations réalisées au cours de ce mémoire présagent de belles perspectives pour la suite de la recherche. Toutefois, la prochaine étape nécessite le passage à un niveau supérieur. En effet, les études de COVs menées jusqu'à maintenant ont été conduites à l'échelle d'un laboratoire. La suite de cette recherche serait la réalisation d'une étude de plus grande ampleur. Cette étude permettrait l'évaluation de l'impact de différents facteurs sur l'émission de COVs de

décomposition. L'influence de facteurs comme l'environnement et le climat ont déjà été relevés, mais leur impact réel n'est pas totalement élucidé. Une étude de décomposition à grande échelle basée sur des répliquas, des prélèvements sur une longue période et un grand nombre de variables environnementales constituerait une avancée majeure dans ce domaine.

Pour ce faire, l'utilisation de la TD-GCxGC-ToFMS pour étudier l'évolution temporelle de COVs cadavériques permettrait une analyse qualitative et quantitative encore jamais réalisée. Elle permettrait, peut-être, l'élaboration de méthodes de détermination du PMI applicables pour les services de polices scientifiques.

Pour réaliser une telle étude, certains paramètres doivent encore être optimisés. La partie échantillonnage doit être revue pour pouvoir utiliser la TD. Ensuite, l'étude du comportement des composés sur des sets en liquide ionique doit être approfondie. Pour terminer, l'analyse et le traitement des résultats doivent passer par des méthodes statistiques multivariées.

D'un point de vue plus fondamental, l'ajout de standards d'alcane linéaires et d'alcane fonctionnalisés permettrait l'élaboration d'index de rétention pour les COVs étudiés. Dans l'optique d'une étude comparative inter-laboratoire, les informations contenues dans les temps de rétention relatifs seraient précieuses.

Bibliographie

1. Dekeirsschietter, J. *et al.*, Cadaveric volatil organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic science international* **189** (1-3), 46-53 (2009).
2. Nagle, H. T., Gutierrez-Osuna, R. & Schiffman, S. S., The how and why of electronic noses. *Spectrum, IEEE* **35** (9), 22-31 (1998).
3. Polásková, P., Herszage, J. & Ebeler, S. E., Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews* **37** (11), 2478-89 (2008).
4. Buszewski, B., Kęsy, M., Ligor, T. & Amann, A., Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomedical Chromatography* **21** (6), 553-566 (2007).
5. Jones, A., Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment* **33** (28), 4535-4564 (1999).
6. Barro, R., Regueiro, J., Llompart, M. & Garcia-Jares, C., Analysis of industrial contaminants in indoor air: part 1. Volatil organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Journal of chromatography A* **1216** (3), 540-66 (2009).
7. Atkinson, R., Atmospheric chemistry of VOCs and NO_x. *Atmospheric Environment* **34**, 2063-2101 (2000).
8. Vass, A. A. *et al.*, Odor analysis of decomposing buried human remains. *Journal of forensic sciences* **53** (2), 384-91 (2008).
9. Vass, A. A. *et al.*, Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *Journal of forensic sciences* **47** (3), 542-53 (2002).
10. Vass, A. A., Bass, W. M., Wolt, J. D., Foss, J. E. & Ammons, J. T., Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of forensic sciences* **37** (5), 1236-53 (1992).
11. Vass, A. A., The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic science international* **204** (1-3), 34-40 (2011).
12. Vass, A. A. *et al.*, Decompositional odor analysis database. *Journal of forensic sciences* **49** (4), 760-9 (2004).
13. Cajka, T., Hajslova, J., Pudil, F. & Riddellova, K., Traceability of honey origin based on volatils pattern processing by artificial neural networks. *Journal of chromatography A* **1216** (9), 1458-62 (2009).
14. Morrison, P. D., Marriott, P. J., Poynter, S. D. H. & Shellie, R. A., Selection of Columns for GCXGC Analysis of Essential Oils. *LC GC Europe* **23** (2), 76-80 (2010).
15. Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C. & Agapiou, A., A study of volatil organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic science international* **153** (2-3), 147-55 (2005).
16. Ramírez, N., Cuadras, A., Rovira, E., Borrull, F. & Marcé, R. M., Comparative study of solvent

extraction and thermal desorption methods for determining a wide range of volatile organic compounds in ambient air. *Talanta* **82** (2), 719-727 (2010).

17. Gallego, E., Roca, F. J., Perales, J. F. & Guardino, X., Comparative study of the adsorption performance of a multi-sorbent bed (Carbotrap, Carbopack X, Carboxen 569) and a Tenax TA adsorbent tube for the analysis of volatile organic compounds (VOCs). *Talanta* **81** (3), 916-24 (2010).
18. Burgot, G. & Pellerin, F., Microextraction en phase solide (SPME). *Traité de l'ingénieur* **430**, 1-20 (2003).
19. Gottzein, A. K., Musshoff, F. & Madea, B., Qualitative screening for volatile organic compounds in human blood using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* **45** (4), 391-7 (2010).
20. Zhang, Z. & Li, G., A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchemical Journal* **95** (2), 127-139 (2010).
21. Armstrong, D. W., Payagala, T. & Sidisky, L. M., The Advent and Potential Impact of Ionic Liquid Stationary Phases in GC and GCxGC. *LC GC North America* **27** (8), 459-467 (2009).
22. Siegler, W. C., Crank, J. A., Armstrong, D. W. & Synovec, R. E., Increasing selectivity in comprehensive three-dimensional gas chromatography via an ionic liquid stationary phase column in one dimension. *Journal of chromatography A* **1217** (18), 3144-9 (2010).
23. Ryan, D. *et al.*, Analysis of roasted coffee bean volatils by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **1054** (1-2), 57-65 (2004).
24. Sanchez, J. M. & Sacks, R. D., Development of a multibed sorption trap, comprehensive two-dimensional gas chromatography, and time-of-flight mass spectrometry system for the analysis of volatile organic compounds in human breath. *Analytical chemistry* **78** (9), 3046-54 (2006).
25. Cordero, C. *et al.*, Profiling food volatils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry: advanced fingerprinting approaches for comparative analysis of the volatile fraction of roasted hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from different origins. *Journal of chromatography A* **1217** (37), 5848-58 (2010).
26. Welke, J. E. & Zini, C. A., Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Analysis of Volatile Compounds in Foods and Beverages. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* **22** (4), 609-622 (2011).
27. Libardoni, M., Stevens, P. T., Waite, J. H. & Sacks, R., Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **842** (1), 13-21 (2006).
28. Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P. & Dugo, G., Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of chromatography A* **970** (1-2), 225-34 (2002).

29. von Muhlen, C., Zini, C., Caramao, E. & Marriott, P., Applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography to the characterization of petrochemical and related samples. *Journal of chromatography A* **1105** (1-2), 39-50 (2006).
30. Vendevre, C., Ruiz-Guerrero, R., Bertocini, F., Duval, L. & Thiebaut, D., Comprehensive two-dimensional gas chromatography for detailed characterisation of petroleum products. *Oil & Gas Science And Technology-Revue De L Institut Francais Du Petrole* **62** (1), 43-55 (2007).
31. Pasikanti, K. K. *et al.*, Metabolic footprinting of tumorigenic and nontumorigenic uroepithelial cells using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **398** (3), 1285-1293 (2010).
32. Ralston-Hooper, K. *et al.*, Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates. *Aquatic Toxicology* **88** (1), 48-52 (2008).
33. Xu, X., *et al.*, Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC× GC) measurements of volatil organic compounds in the atmosphere. *Atmospheric chemisty and physic discussions* (2003).
34. Lewis, A. *et al.*, A larger pool of ozone-forming carbon compounds in urban atmospheres. *Nature* **405** (6788), 778-781 (2000).
35. Westhoff, M. *et al.*, Ion mobility spectrometry for the detection of volatil organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer: results of a pilot study. *Thorax* **64** (9), 744-8 (2009).
36. Rudnicka, J. *et al.*, Application of ion mobility spectrometry for the detection of human urine. *Analytical and bioanalytical chemistry* **398** (5), 2031-8 (2010).
37. Aguilera-Herrador, E., Cárdenas, S., Ruzsanyi, V., Sielemann, S. & Valcárcel, M., Evaluation of a new miniaturized ion mobility spectrometer and its coupling to fast gas chromatography multicapillary columns. *Journal of chromatography A* **1214** (1-2), 143-50 (2008).
38. Mäkinen, M. A., Anttalainen, O. A. & Sillanpää, M. E. T., Ion mobility spectrometry and its applications in detection of chemical warfare agents. *Analytical chemistry* **82** (23), 9594-600 (2010).
39. Di Natale, C. *et al.*, An electronic nose for food analysis. *Sensors And Actuators B-Chemical* **44** (1-3), 521-526 (1997).
40. Persaud, K., Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *nature* (1982).
41. James, D., Scott, S., Ali, Z. & O'Hare, W., Chemical sensors for electronic nose systems. *Microchimica Acta* **149** (1-2), 1-17 (2005).
42. Harun, F. K. C., Taylor, J. E., Covington, J. A. & Gardner, J. W., An electronic nose employing dual-channel odour separation columns with large chemosensor arrays for advanced odour discrimination. *Sensors And Actuators B-Chemical* **141** (1), 134-140 (2009).
43. Firestein, S., How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413** (6852), 211-218 (2001).

44. Buck, L. & Axel, R., A novel multigene family may encode odorant receptors – a molecular-basis for odor recognition. *Cell* **65** (1), 175-187 (1991).
45. Menini, A., Lagostena, L. & Boccaccio, A., Olfaction: From odorant molecules to the olfactory cortex. *News in Physiological Sciences* **19**, 101-104 (2004).
46. Newton, D. E., *Forensic chemistry*, Checkmark Books ed. (New York, 2008).
47. Cathy Cobb, M. L. F. J. G. G. ., *Crime Scene Chemistry For The Armchair Sleuth*, Prometheus Books ed. (New York, 2007).
48. Bradshaw, R. *et al.*, A novel matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging based methodology for the identification of sexual assault suspects. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **25** (3), 415-22 (2011).
49. Morgan, R. & Bull, P., Forensic geoscience and crime detection. *Bull and Morgan*, 20 (2006).
50. Dent, B., Forbes, S. & Stuart, B., Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology* **45** (4), 576-585 (2004).
51. Forbes, S. L., Stuart, B. H. & Dent, B. B., The effect of the method of burial on adipocere formation. *Forensic science international* **154** (1), 44-52 (2005).
52. Bull, P. A., Morgan, R. M. & Freudiger-Bonzon, J., A critique of the present use of some geochemical techniques in geoforensic analysis. *Forensic science international* **178** (2-3), 35-40 (2008).
53. Oesterhelweg, L. *et al.*, Cadaver dogs--a study on detection of contaminated carpet squares. *Forensic science international* **174** (1), 35-9 (2008).
54. Lorenzo, N. *et al.*, Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and bioanalytical chemistry* **376** (8), 1212-24 (2003).
55. H., G.-K., *Forensic Taphonomy: the postmortem fate of human remains*, CRC Press ed. (1996).
56. Swann, L. M., Forbes, S. L. & Lewis, S. W., Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: a review. *Analytica Chimica Acta* **682** (1-2), 9-22 (2010).
57. Katikou, P., Georgantelis, D., Paleologos, E. K., Ambrosiadis, I. & Kontominas, M. G., Relation of biogenic amines' formation with microbiological and sensory attributes in *Lactobacillus*-inoculated vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (12), 4277-83 (2006).
58. Dekeirsschieter, J., *Etude des odeurs émises par des carcasses de porc (Sus domesticus L.) en décomposition et suivi de la colonisation postmortem par les insectes nécrophages* (Gembloux, 2007).
59. Hoffman, E. M., Curran, A. M., Dulgerian, N., Stockham, R. A. & Eckenrode, B. A., Characterization of the volatil organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. *Forensic science international* **186** (1-3), 6-13 (2009).
60. Swann, L. M., Forbes, S. L. & Lewis, S. W., A capillary electrophoresis method for the

determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. *Talanta* **81** (4-5), 1697-702 (2010).

61. Forbes, S., Keegan, J., Stuart, H. B. & Dent B. B., A gas chromatography-mass spectrometry method for the detection of adipocere in grave soils. *European journal of lipid science* **105**, 761-768(2003).
62. Forbes, S. L., Stuart, B. H., Dadour, I. R. & Dent, B. B., A preliminary investigation of the stages of adipocere formation. *Journal of forensic sciences* **49** (3), 566-74 (2004).
63. Forbes, S. L., Stuart, B. H. & Dent, B. B., The identification of adipocere in grave soils. *Forensic science international* **127** (3), 225-230 (2002).
64. Swann, L., Chidlow, G. E., Forbes, S. & Lewis, S. W., Preliminary studies into the characterization of chemical markers of decomposition for geoforensics. *Journal of forensic sciences* **55** (2), 308-14 (2010).
65. Statheropoulos, M., Agapiou, A., Spiliopoulou, C., Pallis, G. C. & Sianos, E., Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. *The Science of the total environment* **385** (1-3), 221-7 (2007).
66. Statheropoulos, M., Mikedi, K., Agapiou, A., Georgiadou, A. & Karma, S., Discriminant Analysis of Volatil Organic Compounds data related to a new location method of entrapped people in collapsed buildings of an earthquake. *Analytica Chimica Acta* **566** (2), 207-216 (2006).
67. Takatori, T., Investigations on the mechanism of adipocere formation and its relation to other biochemical reactions. *Forensic science international* **80** (1-2), 49-61 (1996).
68. Takatori, T., The mechanism of human adipocere formation. *Legal medicine (Tokyo, Japan)* **3** (4), 193-204 (2001).
69. Arnaldos, M. I., García, M. D., Romera, E., Presa, J. J. & Luna, A., Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic science international* **149** (1), 57-65 (2005).
70. Presley, S. M. *et al.*, Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. *Environmental science & technology* **40** (2), 468-74 (2006).
71. Katsumata, Y., Sato, K. & Yada, S., Green pigments in epidermal blisters of decomposed cadavers. *Forensic science international* **28** (3-4), 167-74 (1985).
72. Van Belle, L. E., Carter, D. O. & Forbes, S. L., Measurement of ninhydrin reactive nitrogen influx into gravesoil during aboveground and belowground carcass (*Sus domesticus*) decomposition. *Forensic science international* **193** (1-3), 37-41 (2009).
73. Megyesi, M., Nawrocki, S. & Haskell, N., Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. *Journal of forensic sciences* **50** (3), 618-626 (2005).
74. Peter, S., Marriott, P. J. & Beens, J., Nomenclature and Conventions in Comprehensive Mutlidimensional Chromatography. *LC-GC europe*, 1-4 (2003).
75. Giddings, J., Concepts and comparisons in multidimensional separation. *Journal of High*

Resolution Chromatography (1987).

76. Comprehensive Analytical Chemistry, *Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography*, Elsevier ed. (Barcelona, 2009).
77. Dimandja, J.-M. D., Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. *Analytical chemistry*, 167-171 (2004).
78. Mondello, L., Tranchida, P. Q., Dugo, P. & Dugo, G., Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review. *Mass Spectrometry Reviews* **27** (2), 101-24 (2008).
79. Ryan, D., Morrison, P. & Marriott, P., Orthogonality considerations in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of chromatography A* **1071** (1-2), 47-53 (2005).
80. Adahchour, M., Beens, J. & Brinkman, U., Single-jet, single-stage cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). *Analyst* **128** (3), 213-216 (2003).
81. Adahchour, M. *et al.*, Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer: principles and applications. *Journal of chromatography A* **1067** (1-2), 245-254 (2005).
82. Mastovska, K., Hajslova, J. & Lehotay, S., Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops. *Journal of chromatography A* **1054** (1-2), 335-349 (2004).
83. Stokes, K. L., Forbes, S. L. & Tibbett, M., Freezing skeletal muscle tissue does not affect its decomposition in soil: evidence from temporal changes in tissue mass, microbial activity and soil chemistry based on excised samples. *Forensic science international* **183** (1-3), 6-13 (2009).
84. Dimandja, J.-M. D. *et al.*, Standardized test mixture for the characterisation of comprehensive two-dimensional gas chromatography columns: the Phillips mix. *Journal of Chromatography A* **1019** (1-2), 261-272 (2003).
85. Le, P. D., Aarnink, A. J. A., Ogink, N. W. M., Becker, P. M. & Verstegen, M. W. A., Odour from animal production facilities: its relationship to diet. *Nutrition Research Reviews* **18** (1), 3-30 (2005).
86. Mackie, R. I., Stroot, P. G. & Varel, V. H., Biochemical identification and biological origin of key odor components in livestock waste. *Journal of animal science* **76** (5), 1331-42 (1998).
87. Rude, M. A. *et al.*, Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel p450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* species. *Applied and environmental microbiology* **77** (5), 1718-27 (2011).
88. Barker, H. A., Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual review of biochemistry* **50**, 23-40 (1981).
89. Tran, T. C. *et al.*, Comparison of column phase configurations for comprehensive two dimensional gas chromatographic analysis of crude oil and bitumen. *Organic Geochemistry* **37** (9), 1190-1194 (2006).

Annexes

Annexe A : Tableau des COVs issus de la bibliographie	xii
Annexe B : Tableau des COVs <i>outliers</i>	xvi
Annexe C : Paramètres analyse DHS	xviii
Annexe D : Paramètres de <i>Process</i>	xviii
Annexe E : Paramètres GCxGC-ToFMS	xix
Annexe F : Figures	xxii

Annexe A : Tableau des COVs issus de la bibliographie.

Aldehydes	References		
2-Butenal	5	Tyrosine	8,12
2-Heptenal	6	γ -amino butyric acid	8
2-Hexenal	6	Tryptophane	12
2-Nonenal	6	Octadecanoic acid (stearic)	11
2-Octenal	6	Butadecanoic acid (myristic)	11
2-Propenal	5	9-Hexadecenoic	11
2,4-Heptadienal	6	Alcools	References
2,4-Nonadienal	6	1-Butanol	1,5
Acetaldehyde	1,3,14	1-Butanol, 3-mehtyl	5
Benzaldehyde	4,6,3,13,14	1-Hexanol	1,6
Butanal	5	1-Hexanol, 2-ethyl	3,4,5,6,13
Butanal, 2-methyl	5	1-Octanol	6,13,14
Butanal, 3-methyl	4,14	1-Octen-3-ol	6,13,14
Decanal	2,3,13	1-pentanol	1,5,6,9
Heptanal	5,6,9	1-pentanol, 2-methyl	1
Hexanal	1,3,6,9,14	1-Propanol, 2-mehtyl	1,5
Nonanal	2,3,6,13,14	1,3-Propanediol	14
Octanal	6,14	2-Butanol	5
Pentanal	1,5	2-Butanol, 2-methyl	14
Propanal, 2-methyl	5	2-Butanol, 3-methyl	5
Acides carboxyliques	References	2-Octen-1-ol	14
Octadecanoic acid, 10-hydroxy	10	2-propanol	4
Acetic acid	14	Ethanol	1,3,4,5
Acetic acid, phenyl	7	Ethanol, 2-phenyl	5
Benzoic acid	14	Esters	References
Benzoylformic acid	5	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	2
Butanoic acid (butyric)	5,6,8,9,15	Acetic acid, butyl ester	14
Butanoic acid, 2-methyl	5,8,15	Acetic acid, ethyl ester	1,3
Butanoic acid, 3-methyl (iso-valeric)	5	Acetic acid, methyl ester	3
Decanoic acid	14	Acetic acid, propyl ester	1,3
Formic acid	5	Butyl 2-methylbutanoate	5
Heptanoic acid	9,14	Butyl 2-methylpropanoate	5
Hexadecanoic acid (palmitic)	9, 10	Butyl 3-methylbutanoate	5
Hexadecanoic acid, 10-hydroxy	10, 11	Butyl acetate	5
Hexanoic acid	5,6,9	Butyl butanoate	5
Histidine	8	Butyl formate	5
Isoleucine	8	Butyl pentanoate	5
Linoleic acid	11	Carbonic acid, dimethyl ester	3
Methionine	8	Hexadecanoic acid, methyl ester	2,13
Nonanoic acid	5,9	Hexanoic acid, ethyl ester	6
Octadecanoic acid, 10-Hydroxy	10	Hexanoic acid, hexyl ester	6
Octanoic acid	5,9	Hexanoic acid, pentyl ester	6
Oleic acid	9, 10,14	n-Octyl acetate	3
Oxalic acid	8	Propanoic acid, 2-methyl ester	5
Palmitoleic acid	11	Propanoic acid, 2-methyl, ethyl ester	1
Pentanoic acid	5,6,8,9,15	Phenyl butanoate	14
Pentanoic acid, 4-methyl (Iso-caproic)	5,8,15	Butyl isobutanoate	14
Phenylalanine	8,12		
Proline	8		
Propanoic acid	5,6,8,9,15		
Propanoic acid, 2-methyl (iso-butyric)	5		
Propanoic acid, phenyl	7		

Cetones	References	Tetrachloroethene	2,13
2-Butanone	1,3,4,5	Tetrachloroethylene	6
2-Butanone, 1-methyl	14	Tetrachloromethane	1,3,7,13
2-Decanone	14	Trichloroethane	13
2-Heptanone	1,5,6	Trichloroethene	2,13
2-Hexanone	1,3	Trichloromonofluoromethane	2,13
2-Nonanone	4,5	Alcenes	References
2-pentanone	1,3,5	1-Butene	5
2-propanone	3,1,13	1-Heptene	1,3,5
2,3-Butanedione	5	1-Heptene, 5-methyl	3
3-Octanone	14	1-Hexene	1,3
3-pentanone	1,3	1-Pentene	1,5
3-Penten-2-one	5	1-Pentene, 2-methyl	3
Acetone	3,5	1-Pentene, 3-ethyl	3
Acetophenone	14	1-Propene	1,3
Cyclohexanone	1,3,6	1-Propene, 2-methyl	1,5
Ethanone, 1-phenyl	3,4,5	1-Undecene	4
Pentadecanone	14	1,3-Pentadiene	1
Sulfures	References	2-Butene	5
Benzothiazole	7,13	2-Hexene	5
Butane, 1-methylsulfonyloxy	5	2-octene	1,3
Butyl methansulfonate	14	2-Pentene, 4-methyl	1,3
Carbon disulfide	1,2,3,13,14	3-Carene	14
Carbon oxide sulfide	1,3	3-Octene	1
Dimethyl, disulfide	3,4,6,9,13,14	à-pinene	1,3
Dimethyl, sulfide	1,2,4	c-terpinene	3
Dimethyl, tetrasulfide	14	DI-limonene	1,3,4
Dimethyl, trisulfide	1,2,3,4,7,13,14	Isoprene	3
Disulfide, methyl ethyl	1,3,4	Alcenes	References
Disulfide, methyl propyl	1	Butane, 2,2-dimethyl	1
Ethanone, 1-methylsulfanyl	5	Butane, 2,2,3-trimethyl	1,3
Methadithione	5	Butane, 2,3-dimethyl	1,3
Methanethiol	5	Cyclohexane	1
Methyl Thioacetate	14	Cyclohexane, 1,3-dimethyl	3
Methyldisulfanylmethane	5	Cyclohexane, 1,4-dimethyl	3
Methylsulfanyldisulfanylmethane	5	Cyclohexane, methyl	3
Sulfur dioxide	2,5,13	Cyclopentane, methyl	1
Thiophene, 3-methyl	5	Cyclohexane, 1-ethyl-4-methyl	3
Thiophene, phenyl	14	Cyclohexane, 1,1,2,3-tetramethyl	1
Autres	References	Cyclohexane, 1,2,4-trimethyl(1-alpha)	1,3
Thiocyanomethane	14	Cyclohexane, 1,3,5-trimethyl	1
Halogenes	References	Cyclohexane, 1,4-dimethyl	1
Butane, 1-chloro	5,7	Cyclohexylcyclohexane	5
Chloroform	2,13	Decane	3,4
Dichlorodifluoroethane	13	Decane, 2-methyl	5
Dichlorodifluoromethane	2,13	Decane, trimethyl	4
Dichloromethane	3	Eicosane	5
Ethane, 1,1-dichloro, 1-fluoro	2	Heptane	1,3,4,7,13
Ethane, 1,1,2-trichloro, 1,2,2-trifluoro	2	Heptane 2-mehtyl	1,3
Ethane, terachloro	4	Heptane 3-methyl	1,3
Palmic acid, 9-chloro, 10-methoxy	10	Heptane, 2,4-dimethyl	1,3
Propane, 1-chloro, 2-methyl	14	Heptane, 4-methyl	3,5
Stearic acid, 9-chloro, 10-methoxy	10	Hexane	1,3,4

		Aromatiques	References
Hexane, 2-methyl	1,3		
Hexane, 2,3-dimethyl	1,3	1-H-Indene, 2,3-dihydro	1,3
Hexane, 3-methyl	1,3	1-H-Indene, 2,3-dihydro-2-methyl	3
Hexane, tetramethyl	4	1-H-Pyrrole	5
Nonane	3	2-Butylfuran	1
Octane	1,3,4	Aniline	12
Octane, 2-methyl	1	Benzene	1,2,3
Octane, 3-methyl	3	Benzene, 2-methyl, 1-propenyl	3
Octane, 3,6-dimethyl	1	Benzene, 1-ethenyl, 4-ethyl	3
Pentadecane, 3-hexyl	5	Benzene, 1-ethyl, 2-methyl	1,2,3,7
Pentane, 2-methyl	1,3,7,13	Benzene, 1-ethyl, 3-methyl	1,3
Pentane, 2,3-dimethyl	1	Benzene, 1-ethyl, 4-methyl	1,3
Pentane, 2,3,3-trimethyl	1,3	Benzene, 1-methoxypropyl	2,13
Pentane, 2,3,4-trimethyl	1,3	Benzene, 1-methyl, 2-ethyl	13
Pentane, 2,4-dimethyl	1,3	Benzene, 1-methyl, 4-(1-methylethyl)	5
Pentane, 3-methyl	1,3	Benzene, 1,2-diethyl	1
Propane, 2-ethoxy-2-methyl	3	Benzene, 1,2-dimethyl	2,13
Undecane	2,3,13	Benzene, 1,2,3-trimethyl	1,3,4
Undecane, 2,6-dimethyl	5	Benzene, 1,2,4-trimethyl	1,3
Pentadecane	14	Benzene, 1,3-diethenyl	3
Heptadecane	14	Benzene, 1,3,5-trimethyl	1
Amines/Amides	References		
2-Anthracenamine	9	Benzene, 1,4-dimethyl	2,13
2-Piperidinone	5	Benzene, 1,4-diol	5
Acetamide	5	Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl	4
Acetonitrile	5	Benzene, ethyl	1,2,3,13
Acetonitrile, 2-phenyl	5	Benzene, ethylmethyl	3,4,14
Acetonitrile, 2,2-dimethylamino	5	Benzene, methyl	4
Butanamide	5	Benzene, propyl	1,3
Butanamide, 3-methyl	5	Benzenemethanol, alpha, alpha, dimethyl	2
Cadaverine	12	Benzonitrile	5,7,13
Isonitrile, methyl	14	Benzoxazole	5
Isopropyl nitrate	14	Benzylamine	12
Methenamine	2,13	Biphenyl	14
N-Methylacetamide	5	Cumene	14
N-Methylbenzamide	5	Furan, 2-ethyl	1
N-Methylpropanamide	5	Furan, 2-pentyl	6
N-Methylpropylformamide	14	Furan, 2-pentyl	9
N-Nitrosodimethylamine	14	Histamine	12
N,N-Dimethylacetamide	5	Hydroquinone	14
N,N-Dimethylbenzamide	5	Indole	6,12,14
N,N-Dimethylformamide	5	Indole, à-methyl	14
N,N-Dimethylnitrous amide	5	m-Xylene	1,3,4
N,N-Dimethylpropanamide	5	Naphtalene	2,3,4,13
Nonanenitrile	5	Naphtalene, 1-methyl	13,14
Octanenitrile	14	Naphtalene, 2,6-diisopropyl	14
Propan-2-yl-nitrate	5	o-Xylene	3,4
Propanamide	5	p-Cresol	9
Propanamide, 2-methyl	14	p-Cymene	14
Putrescine	12	p-Xylene	1,3,4,6,7
Trimethylamine	5,9	Phenol	3,4,5
		Phenol, 2-Nitro	5
		Phenol, 4-methyl	4,5
		Phenyl Butanoate	5

Annexe B : Tableau des COVs outliers.

Alcanes	Butanoic acid 6
1,3-Diethylcyclopentane	Butanoic acid 7
1,3-Diethylcyclopentane	Butanoic acid 8
Cyclohexane, 1-ethyl-2-methyl-	Butanoic acid, 2-methyl 3
Cyclohexane, 1-ethyl-4-methyl-	Butanoic acid, 2-methyl 5
Cyclohexane, 1-ethyl-4-methyl- 2	Butanoic acid, 3-methyl-
Cyclopentane, 1-hexyl-3-methyl-	Butanoic acid, 3-methyl- 2
Cyclopentane, 1-methyl-2-propyl-	Butanoic acid, 3-methyl- 3
Cyclopentane, 1-methyl-3-(2-methylpropyl)-	Butanoic acid, 3-methyl- 4
Cyclopentane, butyl-	Heptanoic acid 2
Heneicosane	Pentanoic acid
Heptadecane 2	Pentanoic acid 4
Hexane, 2,4,4-trimethyl-	Pentanoic acid 5
Methylenecyclooctane	Pentanoic acid, 4-methyl-
Nonane	Pentanoic acid, 4-methyl- 4
Octane, 2,5,6-trimethyl-	Propanoic acid, 2-methyl-
Pentane, 2,2,4-trimethyl-	Propanoic acid, 2-methyl- 2
Tetradecane	Propanoic acid, 2-methyl- 3
Alcenes	Propanoic acid, 2-methyl- 9
1-Docosene	Aromatiques
1-Pentene, 2-methyl-	1H-Indole
1-Pentene, 2-methyl- 2	2-tert-Butyl-4-(2,4,4-trimethylpent-2-yl)phenol
1-Pentene, 2-methyl- 4	Benzene, methyl- 2
1-Pentene, 2-methyl- 6	Benzenemethanol, à-methyl-
Ç-Terpinene 2	Isoquinoline
o-Xylene	Phenol, 4-methyl-
Alcools	Pyrazine, trimethyl-
1-Butanol 5	tri-t-butyl-phenol
1-Hepten-4-ol	Esters
1,2,3-Propanetriol	Allyl tert-Butyl carbonate
1,2,3-Propanetriol 2	Ethyl Acetate
1,2,3-Propanetriol 7	Formic acid, ethenyl ester 2
1,3-Propanediol	Formic acid, octyl ester
2-Hexanol	Oxalic acid, allyl ethyl ester
3-Hexene-2,5-diol	Oxalic acid, diethyl ester
3,4-Hexanediol, 2,5-dimethyl-	Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methylbutyl ester
6,6-Dimethylheptane-1,5-diol	Propanoic acid, 2-propenyl ester
7-Octen-4-ol	Tiglate, 3-hexenyl-
Cyclohexanol	Sulfure
Ethanol 5	Dicyclohexyldisulphide
Pentalene, octahydro-2-methyl-	Disulfide, dimethyl
Acides Carboxyliques	Sulfone, butyl isopropyl 2
2,3-Dihydroxysuccinic acid	Sulfurous acid, dicyclohexyl ester 2
2,3-Dihydroxysuccinic acid 2	Trisulfide, dimethyl
2,3-Dihydroxysuccinic acid 3	Azotes
5-Oxopentanoic acid	1-Butanol, 4-Amino-
Acetic acid, oxo-	1-Butanol, 4-Amino- 2
Butanoic acid	3-tetrahydrofuran-2'-ylpropanenitrile
Butanoic acid 13	5,5-Dimethylimidazolidin-2,4-diimine
Butanoic acid 2	Acetamide 2
Butanoic acid 3	Diazene, 2-butoxy-1-(1-methylethyl)-, 1-oxide
Butanoic acid 4	Ethane, diazo-
Butanoic acid 5	Formamide, N-butyl-

Formamide, N-butyl- 2
Formamide, N-phenyl- 2
Formamide, N,N-dimethyl-
Isopropylamine, N-3-Bromo-2-butylidene
Nitroacetamide 2
Pentanamide, 4-methyl-
Trimethylamine 4
Aldehydes
2-Butenal, 3-methyl- 4
Benzaldehyde
Nonanal
Propanal, 2,2-dimethyl-
Propanal, 2,2-dimethyl- 3
Propanal, 2,2-dimethyl- 4
Cetones
2-Azetidinone, 3,3-dimethyl-
2-Heptanone
2-Hexanone
2-Nonanone
2-Octanone 2
3-Hexanone
3-Octanone
3-Penten-2-one, 4-methyl-
3(2H)-Furanone, dihydro-5-isopropyl-
4-acetoxy-3-nonanone
à-Amino-ç-butyrolactone
Cyclohexanone
Cyclohexanone 4
Cyclohexanone 5
Halogenes
2-But-2'-enylpiperidine Hydrochloride
2-Propanone, 1-bromo-
5-azidoctane, 4-bromo-
Acetamidine, hydrochloride- 2
Ethers
1,3-Dioxolane, 2-methoxy-
3-Methyl-oxiran-2-yl-methanol
Ether, 3-butenyl pentyl
Furan, 2,3-dihydro-2,5-dimethyl- 2
Hexane, 1-methoxy-
Autres
Borinic acid, diethyl-
Cyanic acid, propyl ester
Hydroperoxide, 1-methylpentyl
Hydroperoxide, 1-methylpentyl 2

Annexe C : Paramètres analyse DHS.

DHS			
Incubation	30°C	10 min	
Trapping	25°C	200ml	20 ml/min
Drying	25°C	25 ml	10 ml/min
Transfert	110°C		
TDU			
Ramp	50°-250°C	100°C/min	
Hold Time	5 min		
Transfert	250°C		
CIS			
Ramp	-30°-250°C		
Hold Time	1 min		

Annexe D : Paramètres de *Process*.

Pic finding	
Baseline offset	0,8
Smoothing	auto
1st peak width	12 sec
2nd match required to combine	600
allowed 2D RT shift to combine	0,1
2D peak width	0,06 sec
Maximum peak	10 ⁵
S/N	50
Librairie	
Search mode	normal/ Forward
Zone de mass	0-1000
Mass threshold	50
Match	50
Librairie	NIST/willey
Mass use for area calculation	appexing mass

Annexe E : Paramètres GCxGC-ToFMS.

04-05.3		
MS		
Solvent vent	300 sec	
Serinusas	20µm	
Enhanas	60µm	
Acquisition rate	100 spectra/sec	
Detector voltage	180V	
Detector bias	-70V	
Ion source	230°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Evolution mode	splitless	
Flow	1ml/min	
Evolutionary flow	3ml/min	
Evolutionary pressure	30 sec	
GC2S sublet type flow	10 ml/min	
GC2S sublet val flow	11 ml/min	
Evolutionary pressure	230°C	
Overall equilibration time	1min	
Transfer line T°	230°C	
Oven 1		
Target temp °C		Duration
Initial	35	5
	50	0
	110	0
	285	5
Oven 2		
Target temp °C		Duration
Initial	40	5
	55	0
	115	0
	280	5
Modulation		
Modulation T sec	0.6	Cool time between stages
		24

04-05.4		
MS		
Solvent vent	300 sec	
GC1 Tress	35µm	
GC2 Tress	600µm	
Acquisition rate	100 spectra/sec	
Detector voltage	1800V	
Detector Bias	-70V	
Ion source	250°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Evolution mode	splitless	
Flow	1 ml/min	
GC1 inlet purge flow	3 ml/min	
GC2 inlet purge flow	30 sec	
GC2 Back inlet purge flow	10 ml/min	
GC2 Back inlet total flow	11 ml/min	
Back inlet temperature	200°C	
Oven Equilibration Time	1 min	
Transfer line T°	225°C	
Oven 1		
Target temp °C		Duration
Initial	40	5
	10	0
	30	10
Oven 2		
Target temp °C		Duration
Initial	45	5
	10	0
	30	10
Modulation		
Modulation T sec	0.6	Cool time between stages
		24

04_05_5		
MS		
Shut off vent	300 sec	
Start mass	20 uma	
End mass	600 uma	
Acquisition rate	100 spectra/sec	
Detector voltage	1800 V	
Bedron Energy	-70 V	
In source	250°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Bak inlet mode	Splines	
Flow	1 ml/min	
Bak inlet purge flow	3 ml/min	
Bak inlet purge time	30 sec	
Col2 Bak inlet purge flow	10 ml/min	
Col2 Bak inlet total flow	11 ml/min	
Bak inlet temperature	250°C	
Oven Equilibration Time	1 min	
Transfer time T°	250°C	
Oven1		
Rate °C/min	Target temp °C	Duration min
initial	40	0.3
1.5	220	4
Oven2		
Rate °C/min	Target temp °C	Duration min
initial	46	1
1.5	220	4
Modulation		
Modulation T sec	Hot pulse duration sec	Cooltime between stages
6	0.6	2.4

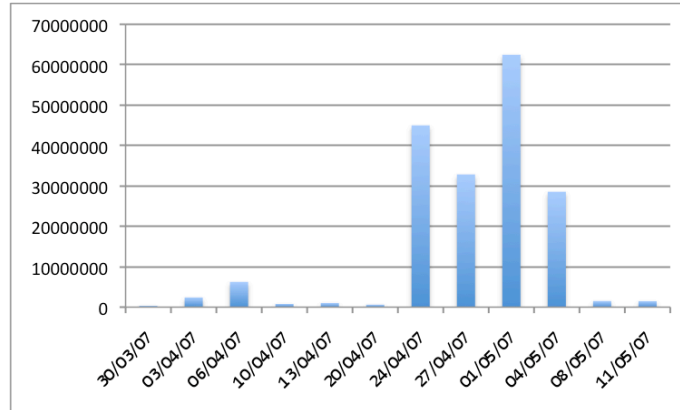
04_05_6		
MS		
Shut off vent	300 sec	
Start mass	35 uma	
End mass	600 uma	
Acquisition rate	100 spectra/sec	
Detector voltage	1800 V	
Bedron Energy	-70 V	
In source	250°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Bak inlet mode	Splines	
Flow	1 ml/min	
Bak inlet purge flow	3 ml/min	
Bak inlet purge time	30 sec	
Col2 Bak inlet purge flow	10 ml/min	
Col2 Bak inlet total flow	11 ml/min	
Bak inlet temperature	200°C	
Oven Equilibration Time	1 min	
Transfer time T°	225°C	
Oven1		
Rate °C/min	Target temp °C	Duration min
initial	40	5
3	220	5
Oven2		
Rate °C/min	Target temp °C	Duration min
initial	45	5
3	225	5
Modulation		
Modulation T sec	Hot pulse duration sec	Cooltime between stages
4	0.6	1.4

04-05-7		
MS		
Shut off vent	300 sec	
Start mass	35.7ma	
End mass	600.uma	
Acquisition rate	100 gpe/tes/sec	
Detector voltage	1800 V	
Detector Energy	-70V	
In source	250°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Bak inlet mode	Splitless	
Flow	1 ml/min	
Bak inlet purge flow	3 ml/min	
Bak inlet purge time	30 sec	
Col2 Bak inlet purge flow	10 ml/min	
Col2 Bak inlet total flow	11 ml/min	
Bak inlet temperature	200°C	
Oven Equilibration Time	1min	
Transfer line T°	225°C	
Oven1		
Rate °C/min	Target temp °C	Durationmin
initial	40	5
5	220	5
Oven2		
Rate °C/min	Target temp °C	Durationmin
initial	45	5
5	225	5
Modulation		
Modulation T sec	Hot pulse duration sec	Cooltime between stages
4	0.6	1.4

04-05 final		
MS		
Shut off vent	300 sec	
Start mass	35.7ma	
End mass	600.uma	
Acquisition rate	100 gpe/tes/sec	
Detector voltage	1500 V	
Detector Energy	-70V	
In source	250°C	
GCxGC		
Gas	Helium	
Bak inlet mode	Splitless	
Flow	1 ml/min	
Bak inlet purge flow	3 ml/min	
Bak inlet purge time	30 sec	
Col2 Bak inlet purge flow	10 ml/min	
Col2 Bak inlet total flow	11 ml/min	
Bak inlet temperature	200°C	
Oven Equilibration Time	1min	
Transfer line T°	225°C	
Oven1		
Rate °C/min	Target temp °C	Durationmin
initial	40	5
5	220	5
Oven2		
Rate °C/min	Target temp °C	Durationmin
initial	45	5
5	225	5
Modulation		
Modulation T sec	Hot pulse duration sec	Cooltime between stages
4	0.6	1.4

Annexe F : Figures.

1 Histogramme représentant l'aire totale pour chaque jour d'échantillonnage



2 ACP et analyse par arborescence

