

Thanatochimie : Caractérisation de l'odeur de décomposition d'un cadavre et réponse olfactive des Coléoptères nécrophages

Auteur : Minchilli, Damien

Promoteur(s) : Verheggen, François

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : gestion des forêts et des espaces naturels, à finalité spécialisée

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/10296>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

THANATOCHIMIE : CARACTÉRISATION DE L'ODEUR DE DÉCOMPOSITION D'UN CADAVRE ET RÉPONSE OLFACTIVE DES COLÉOPTÈRES NÉCROPHAGES

MINCHILLI DAMIEN

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN GESTION DES FORÊTS ET DES ESPACES NATURELS**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020

PROMOTEUR: PR. FRANÇOIS VERHEGGEN

©Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

THANATOCHIMIE : CARACTÉRISATION DE L'ODEUR DE DÉCOMPOSITION D'UN CADAVRE ET RÉPONSE OLFACTIVE DES COLÉOPTÈRES NÉCROPHAGES

MINCHILLI DAMIEN

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN GESTION DES FORÊTS ET DES ESPACES NATURELS**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020

PROMOTEUR: PR. FRANÇOIS VERHEGGEN

Remerciements

Ce travail de fin d'étude marque la fin d'un chapitre de ma vie, sept années d'études riches en émotions en tous genres. À ce titre, je tiens à remercier l'ensemble des personnes ayant été présentes pendant mon parcours académique mais également celles présentes tout au long de ce périple qu'est le mémoire de fin d'études.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon promoteur, Pr. François Verheggen ainsi qu'au Doctorant Clément Martin pour leur encadrement, leur suivi, leur patience, leur confiance et leurs précieux conseils qui m'ont aidé à rester motivé. Merci de m'avoir permis d'enrichir cette dernière année, période relativement particulière pour moi, en m'offrant l'opportunité de rédiger et de publier un article. Ce fût une belle découverte !

J'aimerais également remercier les professeurs Yves Brostaux pour l'aide apportée pour les analyses statistiques et Georgia Purcaro pour ses conseils concernant les prélèvements d'odeur.

Ensuite, j'aimerais remercier l'ensemble des doctorants et TFistes de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive ainsi que l'ensemble des personnes travaillant au TERRA pour leur accueil, leur aide et leur bonne humeur ainsi que toutes les autres personnes rencontrées lors de ce mémoire.

Merci à tous mes amis avec qui j'ai passé de beaux moments tout au long de mes études. Mention spéciale pour Marion, Sandrine et Dylan, mes cokotteurs d'amour qui m'ont toujours soutenu et supporté. Sans vous, ma vie gembloutoise n'aurait jamais été pareille.

Merci à Alexia, mon amie de longue date. Bien qu'on ait chacun vécu l'expérience de l'autre à distance, ta présence et tes encouragements et nos longues heures de discussions m'ont été d'une grande nécessité.

Enfin, je remercie énormément ma famille et mes parents d'avoir toujours cru en moi. Merci Maman d'avoir toujours été à mes côtés, dans les bons comme les mauvais moments que j'ai passé, d'avoir supporté toutes mes sautes d'humeur mais surtout merci de m'avoir toujours poussé à persévérer et ne pas baisser les bras.

Résumé

Le présent mémoire est constitué de deux parties. La première avait pour objectif de déterminer l'attraction d'une espèce de Coléoptères nécrophages couramment retrouvée sur des corps en décomposition : *Dermestes frischii* Kugelann (1792) (Coléoptères : Dermestidae) envers différents stades de décomposition cadavérique. Afin de répondre à cette problématique, des compresses stériles ont été placées dans l'espace de tête de cuves hermétiques où ont été disposés des rats en décomposition pour collecter les composés organiques volatiles (COVs) cadavériques émis par les différents stades de décomposition (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé). Une fois imprégnées des COVs, ces compresses ont permis d'étudier la réponse antennaire et comportementale de *D. frischii* avant d'être analysées en chromatographie en phase gazeuse. Les essais électrophysiologiques ont déterminé que le stade de décomposition avancé induisait une réponse antennaire plus forte que les stades de décomposition précédents. Les essais comportementaux ont mis en évidence une attraction des mâles par les odeurs associées aux stades actifs et avancés, tandis que les femelles n'ont montré aucune réponse quel que soit le stade. La chromatographie en phase gazeuse a permis de caractériser le profil odorant des différents stades de décomposition mais les composés responsables de l'attraction n'ont pas pu être identifiés. L'ensemble des essais a donc confirmé que *D. frischii* perçoit et est attiré par les COVs émis en fin de décomposition. La seconde partie avait pour but l'étude du profil odorant de sols de tombe. Le profil odorant des sols a été caractérisé à plusieurs profondeurs afin d'observer la diffusion des COVs le long de la colonne de sol. Ces changements longitudinaux ont été étudiés pour deux textures de sol différentes (*i.e.* limoneux et sablo-limoneux). Pour chaque texture, trois rats ont été enterrés et exhumés après deux mois de décomposition. Lors de l'exhumation, trois couches de sol au-dessus des rats et une en-dessous ont été échantillonnées. Les analyses chromatographiques en phase gazeuse réalisées pour les différentes couches de sol ont mis en évidence l'influence de la présence d'un rat en décomposition sur le profil odorant du sol, quelle que soit la texture. Cependant, selon la texture de sol, les différentes couches situées à des profondeurs différentes ne semblent pas être impactées de la même manière. En effet, dans un sol limoneux, les COVs émis sont répartis le long de la colonne de sol alors que dans un sol sablo-limoneux, ce sont les couches les plus proches du cadavre qui sont les plus impactées. Le diméthyldisulfure (DMDS) et le 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol ont été révélés comme composés indicateurs de sols de tombe. D'autres textures de sol devraient être investiguées afin de confirmer l'identification des composés indicateurs et donc d'améliorer la localisation de tombes clandestines via des analyses chimiques ou via l'utilisation de chiens de détection de restes humains.

Mots clés : Dermestidae, Coléoptères nécrophages, composés organiques volatils, électrophysiologie, olfactométrie, sol de tombe, 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol, DMDS, sciences judiciaires.

Abstract

This master thesis consists of two parts. The first part aimed to determine the attraction of a necrophagous Coleopteran species commonly found on cadavers: *Dermestes frischii* Kugelann (1792) (Coleoptera: Dermestidae) towards different decomposition stages. Sterile gauzes were suspended in the headspace of sealed tanks where decaying rats were placed in order to collect cadaveric volatile organic compounds (VOCs) released by different decomposition stages (*i.e.* fresh, bloated, active and advanced decay). Once impregnated with the VOCs, the gauzes were used to study the behavioral and the electrophysiological responses before being analyzed using gas chromatography. Electrophysiological tests revealed that the advanced stage of decomposition elicited a stronger antennal response than the previous stages of decomposition. Behavioral bioassays showed that males were attracted to the smells associated with the active and advanced stages while females do not respond at any stage. Gas chromatography allowed characterizing the volatilome of the different stages of decomposition but the compounds responsible for the attraction could not be identified. All the tests confirmed that *D. frischii* perceives and is attracted by the VOCs released at the end of the decomposition. The purpose of the second part was to study the volatilome of gravesoils. The volatilome of these soils was characterized at several depths in order to observe the diffusion of VOCs along the soil column. These longitudinal changes were studied for two different soil textures (*i.e.* loamy and sandy loam soils). Three rats were buried and exhumed after two months of decomposition for both textures. During exhumation, three soil layers above the rats and one below were sampled. Gas chromatography analyses of the different soil layers revealed the influence of the presence of a decaying rat on the volatilome of the soil, regardless of the texture. The different layers located at different depths do not seem to be impacted similarly depending on the soil texture. Indeed, VOCs emitted are distributed along the soil column in loamy soil whereas the layers closest to the corpse are the most impacted in sandy loam soil. Two indicator compounds have been revealed dimethyldisulfide (DMDS) and 2-isopropyl-5-methyl-heptan-1-ol. Other soil textures should be investigated in order to confirm the identification of indicator compounds and to improve the location of gravesites through chemical analysis or the use of human remains detection dogs.

Keywords : Dermestidae, necrophagous coleopteran, volatile organic compounds, electrophysiology, olfactometry, gravesoil, 2-isopropyl-5-methyl-heptan-1-ol, DMDS, forensic science.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	iii
Table des figures	vii
Table des tableaux	viii
Introduction	1
Taphonomie	1
Thanatomorphose	1
Thanatochimie : L'odeur cadavérique	4
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	8
Les insectes nécrophages	8
<i>Les Diptères nécrophages</i>	8
<i>Les Coléoptères nécrophages</i>	9
L'olfaction chez les insectes nécrophages	12
<i>Olfaction des Diptères nécrophages</i>	13
<i>Olfaction des Coléoptères nécrophages</i>	14
<i>Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	16
Les sols de tombes	16
Objectifs	18
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	18
<i>Partie 2: Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	18
Matériels et méthodes.....	19
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	19
Élevage	19
<i>Rattus norvegicus</i> Berkenhout (1769).....	19
<i>Lucilia sericata</i> Meigen (1826).....	19
<i>Dermestes frischii</i> Kugelann (1792)	19
Collectes des composés cadavériques volatils pour les essais comportementaux et électrophysiologiques	20

<i>Pré-test</i>	20
<i>Décomposition des rats</i>	20
<i>Collecte des composés organiques volatils (COVs) émis lors des quatre premiers stades de décomposition.</i>	20
Tests électrophysiologiques.....	21
Tests comportementaux	22
<i>Dispositif expérimental</i>	22
Prélèvements d'odeurs.....	23
<i>Mise au point du dispositif</i>	23
<i>Analyses chromatographiques en phase gazeuse (GC)</i>	24
Analyses statistiques.....	24
<i>Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	25
Description du site	25
Analyse physique des sols	26
Prélèvements d'odeurs.....	26
<i>Dispositif expérimental</i>	26
Analyses en chromatographie en phase gazeuse (GC)	27
Analyses statistiques.....	28
Résultats	29
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	29
Description du processus de décomposition.....	29
Tests électrophysiologiques.....	30
Tests comportementaux	31
Analyses des COVs cadavériques émis par les différents stades de décomposition.....	32
<i>Partie 2 : Etude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	34
Caractérisation du profil odorant de tombe composée de sol limoneux.....	35
Caractérisation du profil odorant de tombe composée de sol sablo-limoneux.....	39
Discussion	42
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	42
<i>Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	46

Conclusion.....	48
<i>Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.</i>	48
<i>Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.</i>	48
Références bibliographiques	49
Annexes	61
Annexe 1: Dimorphisme sexuel chez <i>Lucilia sericata</i> (à gauche la femelle avec les yeux écartés et à droite le mâle avec les yeux rapprochés)	61
Annexe 2: Dimorphisme sexuel chez <i>Dermestes frischii</i> (à gauche le mâle disposant de poils jaunes dans un cercle au niveau du quatrième sternite abdominale ; à droite la femelle sans aucun cercle).....	62
Annexe 3: Tableau des COVs émis par les sols contrôles et par les différentes couches de sols limoneux et sablo-limoneux en présence d'un rat en décomposition (ng de COV/g de sol). (L = sol limoneux, S = sol sablo-limoneux, 1,2,3,4 = numéro des couches). Adapté de (Martin <i>et al.</i> , 2020).....	63
Annexe 4: Article publié: “Behavioral and Electrophysiological Responses of the Fringed Larder Beetle <i>Dermestes frischii</i> to the Smell of a Cadaver at Different Decomposition Stages”	67
Annexe 5: Article en cours de révision: “Forensic taphonomy: characterization of the gravesoil chemistry through a multivariate approach combining mineral and volatile analyses”	77

Table des figures

Figure 1. Nombre de composés organiques volatils émis en fonction du stade de décomposition (<i>i.e.</i> frais, gonflé, actif et avancé) et de l'intervalle <i>post-mortem</i> (Verheggen <i>et al.</i> , 2017).	7
Figure 2. Succession des familles d'insectes nécrophages observés sur un corps en fonction de son stade de décomposition (<i>i.e.</i> frais, gonflé, avancé, sec) (Rodriguez, 1982; Byrd & Castner, 2001).	8
Figure 3. Schéma d'une sensille d'une antenne (Pask & Ray, 2016).	13
Figure 4. Dispositif expérimental utilisé pour collecter les COVs cadavériques émis par les rats lors de leurs différents stades de décomposition.	21
Figure 5. Branchement d'une antenne aux électrodes (SYNTECH, 2004).	22
Figure 6. Dispositif utilisé lors des tests comportementaux (Martin <i>et al.</i> , 2020).	23
Figure 7. Disposition des différentes tombes dans la serre. Un rat a été placé dans chacune d'elle à l'exception des tombes témoins (=Control). (Layer = Couche ; Loam soil = Sol limoneux ; Sandy loam soil = Sol sablo-limoneux). Figure tirée de (Martin <i>et al.</i> , 2020)	26
Figure 8. Dispositif de prélèvement d'odeur utilisé lors du prélèvement de composés organiques volatils émis par du substrat de sol issus de tombe.	27
Figure 9. Réponse électrophysiologique moyenne des antennes mâles (M) et femelles (F) à l'odeur émise par les différents stades de décomposition ($\mu V \pm ES$). *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : Non Significatif. Figure adaptée de (Martin <i>et al.</i> , 2020).	31
Figure 10. Illustration de l'attractivité des différents stades de décomposition (frais, gonflé, actif, avancé) pour les Coléoptères nécrophages <i>D. frischii</i> selon que l'individu soit de sexe mâle ou femelle. De gauche à droite, les diagrammes circulaires indiquent les proportions d'individus répondants ; les réponses comportementales des mâles et des femelles aux COVs associés à chaque stade de décomposition sont représentées à l'aide des diagrammes en bâtonnet. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : non significatif. Figure adaptée de (Martin <i>et al.</i> , 2020).	32
Figure 11. Analyse en composantes principales illustrant la différence de composition en COVs cadavériques adsorbés sur les compresses lors de chaque stade de la décomposition. Figure adaptée de (Martin <i>et al.</i> , 2020)	34
Figure 12. Analyse en composantes principales du sol limoneux en présence d'un rat d'une part (sol de tombe), en l'absence de ce dernier (sol contrôle) d'autre part.	36
Figure 13. Analyse en composantes principales pour le sol limoneux différenciant le profil odorant de chaque couche de sol limoneux (C = couche ; RL = présence d'un rat dans un sol limoneux).	36
Figure 14. Analyse en composantes principales le sol sablo-limoneux en présence d'un rat (sol de tombe) d'une part, en l'absence de ce dernier (sol contrôle) d'autre part.	40
Figure 15. Analyse en composantes principales différenciant le profil odorant de chaque couche de sol pour le sol sablo-limoneux (C = couche, R = présence d'un rat, S = sol sablo-limoneux).	41

Table des tableaux

Tableau 1. Illustration des différents stades de décompositions par lesquels sont passés les rats.	30
Tableau 2. Ensemble des COVs détectés pour chacun des différents stades de décomposition étudiés.....	33
Tableau 3. Liste des COVs détectés dans les différentes couches de sol limoneux (L) et sablo-limoneux (S).....	37

Introduction

Taphonomie

La taphonomie est la discipline qui étudie l'ensemble des processus qui mènent à la formation d'un fossile depuis la mort de l'organisme jusqu'à la fossilisation si elle a lieu. Cette science peut être appliquée au domaine judiciaire. Elle étudie les processus qui s'opèrent lors de la décomposition d'un corps ainsi que l'impact de la décomposition sur le milieu environnant et inversement (Denys, 2002; Donovan, 2002; Verheggen *et al.*, 2017; Rattenbury, 2018; Sincerbox & DiGangi, 2017).

Deux types de mort peuvent être identifiés : la mort somatique, aussi appelée mort cérébrale, et la mort cellulaire (Saukko & Knight, 2013). Lors de la mort somatique, une perte irréversible de personnalité est observée. Cependant, les fonctions vitales telles que la circulation sanguine et la respiration sont préservées. Quant à la mort cellulaire, elle se traduit par l'arrêt des fonctions cellulaires vitales. Les activités cellulaires et tissulaires sont alors arrêtées (Saukko & Knight, 2013). Lorsque la mort sera mentionnée dans ce document, il s'agira toujours de la mort cellulaire.

Thanatomorphose

La décomposition d'un corps est un phénomène complexe affecté par un ensemble de facteurs internes et externes (Dent *et al.*, 2004; Statheropoulos *et al.*, 2007). La décomposition est issue de l'interaction de deux processus complexes : l'autolyse et la putréfaction. L'autolyse correspond à une dégradation enzymatique des cellules, indépendante de toute action bactérienne (Statheropoulos *et al.*, 2007; Janaway *et al.*, 2009; Adams, 2017). De ce fait, les tissus riches en enzymes digestives, comme le foie, sont digérés plus rapidement (Amendt *et al.*, 2010; Leblanc & Logan, 2010). La putréfaction, quant à elle, est définie comme la destruction des tissus mous du corps par l'action de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons et les protozoaires. Elle est caractérisée par l'altération des constituants protéiques, glucidiques et lipidiques (Dent *et al.*, 2004). Plusieurs produits sont issus de cette dégradation tels que des gaz (*e.g.* hydrogène, dioxyde de carbone) ou des liquides. Le premier signe visible de putréfaction est une coloration verdâtre de la peau suivie d'une accumulation de gaz provoquant un gonflement du corps (Vass, 2001; Rosier *et al.*, 2014). La putréfaction peut donc être définie de manière simplifiée comme une fermentation anaérobie (Vass, 2001). Pour résumer, l'autolyse va donc initier la décomposition du corps. S'ajoute et s'en suit alors, plus ou moins rapidement, la putréfaction qui accélère de manière exponentielle la décomposition notamment dû à l'arrivée massive d'insectes sur le corps attirés par les émanations de gaz et odeurs. Les insectes jouent donc également un rôle prédominant dans la décomposition (Gaudry *et al.*, 2007)

Lors de ce processus de décomposition, plusieurs changements physiques peuvent être observés et sont couramment résumés en trois étapes :

- *Algor mortis*: Immédiatement après la mort, le corps se refroidit et se met à l'équilibre avec la température environnante (Janaway *et al.*, 2009; Levy *et al.*, 2010; Saukko & Knight, 2013).
- *Rigor mortis* : La rigidité cadavérique est causée par la dégradation de l'ATP. Le blocage des filaments d'actines et de myosines induisent une contraction des muscles entraînant la rigidification du corps. En climat tempéré, ce phénomène, non permanent, débute dans les deux à quatre heures après la mort. L'intensité des rigidités est à son maximum après douze heures. Puis, l'intensité commence à décroître après vingt-quatre heures. Le relâchement des muscles est dû aux liquides alcalins libérés pendant la putréfaction (Janaway *et al.*, 2009; Levy *et al.*, 2010; Saukko & Knight, 2013).
- *Livor mortis*: Les lividités sont la conséquence de l'arrêt de la circulation du sang. Sous l'effet de la gravité, le sang est drainé vers les parties les plus basses du corps. La teinte violette spécifique de ces lividités résulte du manque d'oxygène. Elles apparaissent une à deux heures après la mort et sont fixées après douze heures (Janaway *et al.*, 2009; Levy *et al.*, 2010; Saukko & Knight, 2013).

Ces changements morphologiques du corps ont tous une importance dans le cadre judiciaire notamment lors du calcul de l'intervalle *post-mortem* ou lors de la détermination d'un déplacement *post-mortem* du corps (Amendt *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009; Rivers & Dahlem, 2014).

Outre ces modifications précoces suivant la mort, le corps subit d'autres changements physiques et chimiques ayant tous pour conséquence la dégradation de la matière organique. La décomposition débute dans les premières minutes qui suivent la mort (Vass, 2001; Dent *et al.*, 2004). Bien qu'aucune décomposition ne soit la même dû au nombre important de facteurs l'affectant, le processus présente de nombreuses similarités (Vass, 2001; Rivers & Dahlem, 2014). Dès lors, différents stades de décomposition ont été déterminés : le stade frais, le stade de gonflement, les stades de décomposition active et avancée, et le stade restes secs (Payne, 1965; Vass, 2001; Amendt *et al.*, 2004; Grassberger & Frank, 2004; Verheggen *et al.*, 2017). A chaque stade de décomposition correspond une entomofaune caractéristique (Gaudry *et al.*, 2007; Charabidze, 2008; Charabidze, 2013; Dekeirsschieter, 2013) :

- Le stade frais apparait immédiatement après la mort. Peu de changements physiques sont observés sur le corps. Néanmoins, l'autolyse s'opère déjà. Rapidement, des Diptères Calliphoridae (*e.g. Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830, *Lucilia spp.*) et Muscidae (*e.g. Musca domestica* Linnaeus, 1758) arrivent sur le corps. Ils constituent la première vague d'insectes nécrophages colonisant le corps (Payne, 1965).
- Le stade de gonflement débute dès les premiers signes de gonflement du corps suite à l'accumulation des gaz de putréfaction produits par les bactéries se développant en anaérobiose depuis le début du processus de décomposition (Payne, 1965; Kocárek, 2003; Sharanowski *et al.*, 2008). Lors de ce stade, en plus des familles de Diptères précédemment citées, des Sarcophagidae sont fréquemment observés ainsi que des Coléoptères Silphidae (*e.g. Thanatophilus sinuatus*) et Histeridae (Kelly *et al.*, 2008).

- Lors de la nécrose des tissus, le corps se trouve en stade de décomposition active. Ce stade est caractérisé par un dégonflement du corps. Le dégonflement est expliqué par la dégradation des tissus externes (*e.g.* la peau) sous l'action de l'assèchement et de l'activité des insectes. Un écoulement des fluides internes est souvent observé (Kelly *et al.*, 2008; Sharanowski *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2012). Lors de ce stade, les charognards arrivent et l'abondance de l'entomofaune augmente (Payne, 1965). Ceci s'explique par les nombreuses molécules odorantes libérées lors du dégonflement du corps (Dekeirsschieter, *et al.*, 2012). On retrouve beaucoup de familles de Diptères (*e.g.* Piophilidae, Phoridae,...) et de Coléoptères (*e.g.* Staphylinidae, Dermestidae,...). Il s'agit du stade de décomposition le plus riche en biodiversité (Payne, 1965)
- Le stade suivant est le stade de décomposition avancée qui est marqué par l'apparition des os. Une fermentation butyrique induisant la dégradation des graisses est aussi observée. À ce moment, le nombre de Coléoptères présents sur le corps augmente au détriment des Diptères, précédemment majoritaires sur le corps (Payne, 1965; Tantawi *et al.*, 1996; Grassberger & Frank, 2004; Charabidze, 2008)
- Enfin, au stade restes secs, lorsqu'il ne reste que les os, les cartilages et de la peau séchée, les Coléoptères sont majoritairement présents (*e.g.* Cleridae, Dermestidae, Scarabaeidae,...) (Payne, 1965; Kocárek, 2003; Grassberger & Frank, 2004; Charabidze, 2008; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Amendt *et al.*, 2010; Rivers & Dahlem, 2014).

Il est important de souligner que les différentes espèces citées ci-dessus ne représentent ni une liste exhaustive de l'ensemble des Hexapodes pouvant être retrouvés sur un cadavre, ni une règle absolue de succession. D'ailleurs, la notion de « vague » d'insectes nécrophages est de moins en moins utilisée étant donné que ces vagues finissent par se mélanger plutôt que de se succéder dans un ordre précis (Charabidze, 2013).

Le processus de décomposition peut être influencé par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Rodriguez, 1982; Mann *et al.*, 1990; Tantawi *et al.*, 1996; Saukko & Knight, 2013; Rivers & Dahlem, 2014; Verheggen *et al.*, 2017). Les facteurs abiotiques influençant la décomposition d'un corps sont principalement le climat et/ou l'environnement (Rodriguez, 1982; Kumara *et al.*, 2009; Dupont *et al.*, 2012). La température est le facteur qui influence le plus le processus de décomposition. En effet, elle influence non seulement les processus internes mais aussi externes auxquels est soumis le cadavre (*e.g.* dégradation enzymatique, activité bactérienne...). Elle joue également un rôle important sur l'activité et le cycle de vie des insectes nécrophages (Payne, 1965; Mann *et al.*, 1990; Rivers & Dahlem, 2014; Martin *et al.*, 2019). Dès lors, la période de l'année pendant laquelle s'opère la décomposition est un facteur d'influence importante puisqu'elle est directement liée à la température. Par exemple, en hiver, les températures étant plus basses, la décomposition est ralentie suite à une activité de l'entomofaune beaucoup moins importante et à une diminution des dégradations bactériennes et enzymatiques (Campobasso *et al.*, 2001; Kocárek, 2003; Prado e Castro *et al.*, 2013). Outre la température, l'humidité du milieu de décomposition est un autre facteur abiotique qui va également influencer la décomposition d'un corps de manière non négligeable. En effet, l'humidité est importante pour le développement et l'activité microbienne. (Carter *et al.*, 2010; Rivers & Dahlem, 2014). L'importance de ces deux facteurs

dans le processus de décomposition détermine le type de décomposition que le corps va subir : la décomposition classique, la momification ou la saponification. En conditions climatiques chaudes et humides et en conditions anaérobies, on observe le phénomène de saponification *i.e.* l'hydrolyse des graisses corporelles (Goff, 2009). Les tissus jaunissent et prennent une allure grasse et cireuse sous l'action du *Clostridium perfringens* en présence de sels de sodium ou de potassium (Vass, 2001; Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009; Dubois *et al.*, 2018; Zurgani, 2018). En milieu sec (*e.g.* les déserts ou les régions arctiques), un autre phénomène se produit : la momification. Elle est le résultat final de la déshydratation des tissus (Mann *et al.*, 1990; Vass, 2001; Janaway *et al.*, 2009). Ces deux processus mènent à une conservation beaucoup plus longue du corps (Janaway *et al.*, 2009).

Les facteurs biotiques sont représentés par l'ensemble des organismes vivants (*e.g.* microorganismes, insectes nécrophages, charognards...) participant à la dégradation et au recyclage de la matière organique. Ces derniers jouent un rôle clé dans le processus de décomposition. Leur présence influence la vitesse de la décomposition. Par exemple, lorsque les insectes ne peuvent pas accéder aux corps, la décomposition est beaucoup plus lente (Payne, 1965; Mann *et al.*, 1990; Campobasso *et al.*, 2001; Charabidze, 2008; Dupont *et al.*, 2012). En effet, les insectes nécrophages ainsi que les charognards de par leur activité participent à la macro-décomposition (*i.e.* l'ablation des tissus facilitant la dégradation du cadavre) faisant de ces organismes des acteurs clé dirigeant la vitesse de décomposition. Il en est de même des microorganismes lors du processus de putréfaction (Payne, 1965; Campobasso *et al.*, 2001; Charabidze, 2008; Rivers & Dahlem, 2014).

Thanatochimie : L'odeur cadavérique

La thanatochimie a pour but de comprendre les mécanismes chimiques qui s'opèrent lors de la décomposition d'un corps. Elle vise également à caractériser la dégradation des constituants du corps et à identifier les composés résultant de cette dégradation (Dekeirsschieter *et al.*, 2010; Stefanuto *et al.*, 2014).

Un corps humain est composé d'environ 64% d'eau. Cette eau a une importance majeure dans le processus de décomposition car elle est indispensable à la plupart des organismes intervenant dans le processus de décomposition tels que les bactéries, les champignons et les insectes. En effet, elle est le milieu dans lequel se réalisent les réactions enzymatiques. Outre l'eau, trois groupes majeurs de macromolécules constituant la masse corporelle peuvent être identifiés : les protéines, les graisses et les hydrates de carbone. Chacune de ces familles de constituants atteignent une proportion moyenne de respectivement 20%, 10% et 1%. L'autolyse et la putréfaction, expliquées précédemment, sont les processus responsables de leur dégradation. Quant aux minéraux, ils représentent en moyenne 5% de la masse totale du corps (Janaway *et al.*, 2009). La dégradation de ces composants majoritaires du corps mène à la formation de plusieurs sous-produits tels que les composés organiques volatils (COVs) (Janaway *et al.*, 2009; Martin & Verheggen, 2018).

En 1965, Payne avait déjà suggéré la réalisation de recherches plus spécifiques sur la caractérisation des odeurs de décomposition (Payne, 1965). En effet, durant la décomposition

d'un cadavre, de nombreux composés organiques volatiles sont émis (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Leblanc and Logan, 2010). Depuis, quelques études ont été menées à ce sujet et ont permis l'identification de plusieurs centaines de molécules chimiques appartenant à presque toutes les familles chimiques : alcools, alcanes, acides carboxyliques, esters, cétones, aldéhydes, hydrocarbures cycliques, composés aromatiques et composés soufrés et azotés (Statheropoulos *et al.*, 2007; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Rosier *et al.*, 2014).

Les protéines sont présentes dans tous les tissus du corps et sont les composants majeurs des muscles (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009; Martin & Verheggen, 2018). La décomposition des protéines s'opère via le mécanisme de protéolyse qui est un processus principalement enzymatique (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009). La vitesse à laquelle se réalise la protéolyse n'est pas homogène sur l'ensemble du corps, elle est dépendante de la température, de l'humidité et de l'action bactérienne (*e.g.* *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Micrococcus* ont une activité protéolytique importante) et, en particulier, de l'accessibilité des tissus par les bactéries (Janaway *et al.*, 2009; Martin & Verheggen, 2018). Les protéines sont dégradées en peptones, polypeptides puis en acides aminés (Paczkowski & Schütz, 2011). Les produits de la protéolyse sont ensuite dégradés par le mécanisme d'Ehrlich et par une fermentation réalisée par des microorganismes en condition d'aérobiose ou d'anaérobiose (*e.g.* levures et bactéries) (Martin & Verheggen, 2018). Plusieurs microorganismes interviennent dans ces mécanismes de dégradation (*e.g.* *Moraxella phenylpyruvica*, les *Staphylococcus xylosus* ou *S. starnosus*) (Boumba *et al.*, 2008; Paczkowski & Schütz, 2011; Martin & Verheggen, 2018). Les COVs émis suite à ces réactions en cascade sont majoritairement des substances phénoliques (*e.g.* indole et scatole), des gaz (*e.g.* méthane, dioxyde de carbone, sulfure d'hydrogène et ammoniac) et des composés organiques soufrés (*e.g.* diméthyldisulfure) (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Janaway *et al.*, 2009; Paczkowski & Schütz, 2011).

Les lipides présents dans le corps humains sont constitués d'environ 90 à 99% de triglycérides (Janaway *et al.*, 2009; Martin & Verheggen, 2018). La dégradation des lipides se réalise dans la plupart des cas en anaérobiose. Les graisses vont donc être hydrolysées par des lipases (Janaway *et al.*, 2009). Cette hydrolyse enzymatique génère du glycérol et des acides gras libres majoritairement insaturés (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009; Paczkowski & Schütz, 2011). Le glycérol est ensuite dégradé en pyruvate, ATP et NADH qui seront les substrats d'autres réactions de dégradation menant à la formation de COVs cadavériques volatils (Paczkowski & Schütz, 2011). L'hydrolyse n'est néanmoins pas le seul mécanisme de dégradation des graisses. Lorsque les conditions sont favorables, une oxydation des graisses peut être observée. Cette réaction s'opère en aérobiose et est catalysée par l'action de la lumière. La décomposition de ces acides gras varie en fonction de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Dent *et al.*, 2004; Martin, 2017). Peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur la dégradation des lipides engendrant la formation de COVs. Néanmoins, des alcools, acides carboxyliques, aldéhydes et cétones sont suspectés d'être issus de la dégradation des graisses (Boumba *et al.*, 2008; Paczkowski & Schütz, 2011).

Les hydrates de carbone peuvent être décomposés via différents mécanismes. Lors de la décomposition, certains sucres sont complètement oxydés en dioxyde de carbone et en eau.

Sous l'action de bactéries comme *Clostridium spp.*, les sucres sont transformés en alcools et acides organiques. De plus, par fermentation bactérienne, des gaz comme le méthane, l'hydrogène et le sulfure d'hydrogène sont produits (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009). En effet, les hydrates de carbone font partie des principales sources nutritives utiles à la croissance des microorganismes. Cela explique la diversité de mécanismes de dégradation que les hydrates de carbone peuvent suivre lors de la décomposition d'un corps. De manière générale, les microorganismes dégradent le glucose en pyruvate selon la voie métabolique d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou la voie d'Entner-Doudoroff (Boumba *et al.*, 2008; Paczkowski & Schütz, 2011). Le pyruvate est ensuite dégradé par des bactéries ou des levures en éthanol et en acide acétique. En fonction des bactéries présentes lors de cette dernière dégradation, d'autres co-produits peuvent être émis tels que certains acides carboxyliques (*e.g.* acide pyruvique, lactique, butanoïque et propanoïque), alcools (*e.g.* 1-propanol, 2-propanol, 2-butanol et 1,3-butanediol), cétones (*e.g.* acétone) et aldéhydes (*e.g.* acétaldéhyde). Certains champignons jouent aussi un rôle dans la dégradation des sucres en produisant des acides organiques tels que les acides glucuronique, citrique et oxalique (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009; Paczkowski & Schütz, 2011).

Une fois les tissus mous entièrement décomposés, il ne reste plus que les os, les cheveux et cartilage. Ces tissus plus résistants sont, eux aussi, décomposés mais beaucoup plus lentement. Le tissu osseux est probablement le tissu dont la décomposition est la plus lente. Il est constitué de trois parties : une partie protéique principalement composée de collagène, une partie minérale composée d'apatite biologique et une partie composée de molécules organiques tels que les mucopolysaccharides et les glycoprotéines (Janaway *et al.*, 2009; Cablk *et al.*, 2012). Le collagène crée des liaisons avec la partie minérale (*i.e.* hydroxyapatite). Ces fortes liaisons moléculaires sont difficiles à dégrader et donc augmentent la résistance du tissu osseux au processus de décomposition. Une fois la liaison protéique minérale rompue, l'os est plus vulnérable à l'altération (Dent *et al.*, 2004; Paczkowski & Schütz, 2011). Les os étant riches en ions calcium, les conditions de pH du milieu vont fortement affecter la décomposition de ce tissu. En effet, en milieu acide (*i.e.* pH faible), les ions de calcium présents dans l'apatite sont remplacés par des protons. De ce fait, plus le pH du milieu est faible et plus la dégradation du tissu osseux est importante (Janaway *et al.*, 2009). Dès lors, une perte d'hydroxyapatite est constatée. Le collagène est, quant à lui, dégradé soit sous l'action des collagénases bactériennes, soit par des bactéries « gaz-gangrène » ayant un pH neutre. Des acides aminés sont alors libérés lors de cette dégradation. Ces derniers suivent les mêmes mécanismes de décomposition que ceux issus de la dégradation des protéines (Dent *et al.*, 2004; Janaway *et al.*, 2009). Les COVs émis lors de la décomposition de ce tissu appartiennent à plusieurs familles de molécules chimiques. On retrouve des cétones, aldéhydes et alcools (*e.g.* 2-nonanol, nonanal, hexanal, 1-hexanol, nonan-2-one) (Paczowski & Schütz, 2011).

Comme susmentionné, la dégradation des macromolécules sont à l'origine des COVs émis lors de la décomposition d'un corps. Cependant, toutes les macromolécules ne se dégradent pas en même temps, ni même à la même vitesse (*e.g.* tissus osseux *versus* muscles). Dès lors, le profil odorant évolue et change tout au long de la décomposition et ce, dès les premières

minutes après la mort et jusqu'à la disparition complète du corps, lorsqu'elle est atteinte (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Janaway *et al.*, 2009; Statheropoulos *et al.*, 2011; von Hoermann *et al.*, 2011; Rosier *et al.*, 2016; Verheggen *et al.*, 2017; Martin & Verheggen, 2018). Bien que l'ensemble des COVs émanant d'un corps en décomposition n'a pas encore été clairement détaillé et compris, certaines évolutions du profil odorant au cours de la décomposition ont pu être identifiées (Figure 1) (von Hoermann *et al.*, 2011; Verheggen *et al.*, 2017).

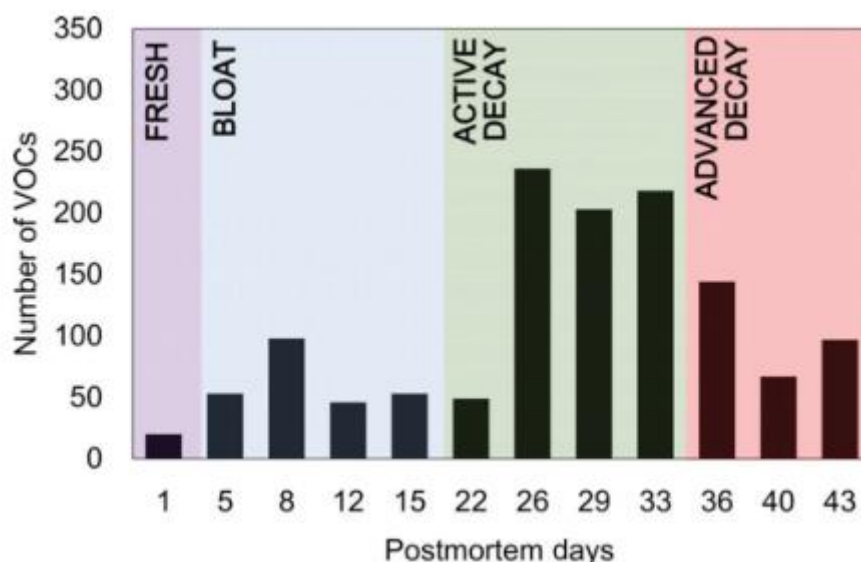


Figure 1. Nombre de composés organiques volatils émis en fonction du stade de décomposition (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé) et de l'intervalle *post-mortem* (Verheggen *et al.*, 2017).

Lors du stade frais, peu de COVs sont émis. À ce moment, il est difficile de clairement distinguer les composés issus de la décomposition des composés propres à la personne, déjà présents avant la mort. Lors du stade de gonflement, qui dure en moyenne 3 à 5 jours, en fonction de la saison, la quantité et la diversité des COVs cadavériques émis augmentent. La présence d'alcools, de cétones, d'amines et d'acides carboxyliques est alors observée (Dekeirsschieter *et al.*, 2009). Lors du stade de décomposition active (*i.e.* durant environ une dizaine de jours), des composés aromatiques tels que l'indole sont identifiés. De plus, une plus grande quantité d'acides organiques est émise. Il s'agit du stade de décomposition le plus odorant (Dekeirsschieter *et al.*, 2009). Une fois le stade de décomposition avancée atteint, la quantité de COVs émis diminue. Néanmoins, la proportion d'aldéhydes augmente lors de ce stade qui s'étend sur environ un mois. Enfin, Les hydrocarbures sont principalement observés dans les derniers stades. Malgré ces changements du profil odorant observés tout au long de la décomposition, certains composés volatils vont être émis de manière continue lors de la décomposition. Il s'agit principalement de composés soufrés tels que le diméthylsulfure (DMS), diméthyldisulfure (DMDS) ou encore diméthyltrisulfure (DMTS) (Statheropoulos *et al.*, 2007; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; Kasper, 2013; Rosier *et al.*, 2014; Verheggen *et al.*, 2017; Martin & Verheggen, 2018).

La suite de cette introduction est scindée en deux parties correspondant aux deux études menées lors de ce mémoire. La première partie concerne l'attractivité des stades de décomposition envers les Coléoptères nécrophages et la seconde partie concerne la

caractérisation du profil odorant de sols de différentes textures lorsqu'un mammifère en décomposition y est présent.

Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

Les insectes nécrophages

Les insectes nécrophages sont des organismes ayant un impact majeur sur la décomposition de tissus organiques (Gaudry *et al.*, 2007) et interviennent directement après la mort. Ils sont majoritairement représentés par l'ordre des Diptères et des Coléoptères (Payne, 1965; Rodriguez, 1982; Tantawi *et al.*, 1996; Campobasso *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2001; Kocárek, 2003; Charabidze, 2013; Zurgani, 2018). Ces insectes sont attirés par les odeurs qui sont émises lors de la décomposition du corps. La majorité des insectes nécrophages se servent du corps comme lieux de reproduction, comme source de nourriture ou encore comme habitat. En effet, les larves des espèces nécrophages se nourrissent du corps et réalisent leur cycle de développement entièrement ou en partie sur le cadavre (Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Rivers & Dahlem, 2014). La figure 2 montre que tous les ordres d'insectes ne sont pas observés au même moment sur un corps en décomposition et illustre parfaitement le fait que le concept de vagues successives d'insectes nécrophages n'est pas totalement correcte (Charabidze, 2013).

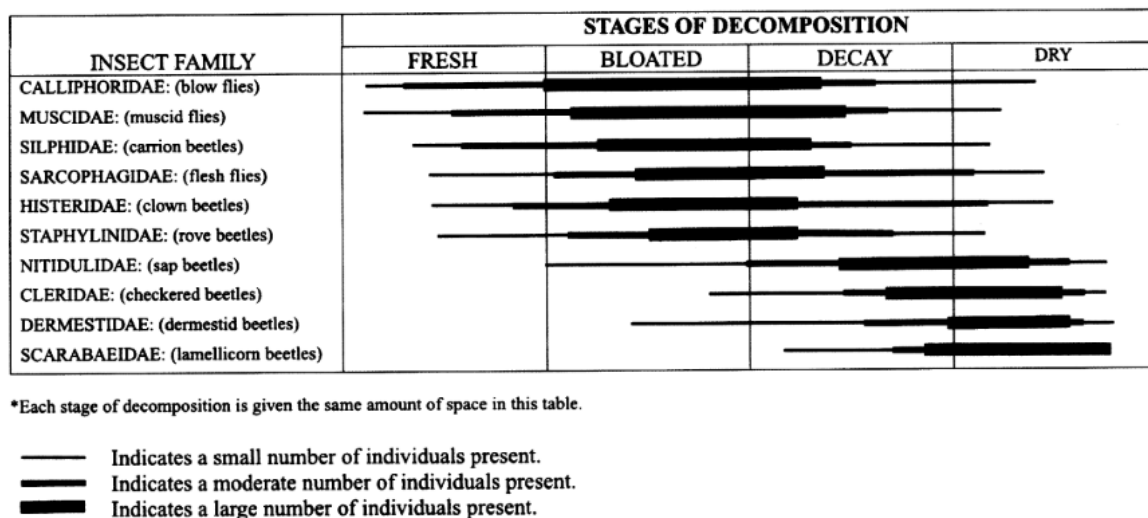


Figure 2. Succession des familles d'insectes nécrophages observés sur un corps en fonction de son stade de décomposition (i.e. frais, gonflé, avancé, sec) (Rodriguez, 1982; Byrd & Castner, 2001).

Les Diptères nécrophages

Les Diptères sont ubiquistes, on les retrouve presque partout dans le monde et dans tous types de milieux. Ils sont holométaboles : les asticots se transforment en nymphes (appelée pupes), desquelles émergent les adultes (ou imago). La larve passe par plusieurs stades larvaires, généralement trois (Charabidze, 2008). La durée du cycle de développement des Diptères dépend non seulement des conditions environnementales (e.g. la température) mais aussi de la source et de la disponibilité en nourriture (Charabidze, 2008). Le facteur affectant le plus la croissance des larves est la température. En effet, plus la température est élevée, plus le

développement est rapide (Campobasso *et al.*, 2001). La température est d'ailleurs un facteur important à prendre en compte lorsque l'on estime l'intervalle *post-mortem* sur base de prélèvements entomologiques (Archer & Elgar, 2003b; Charabidze, 2008).

Généralement, les Diptères nécrophages pondent directement sur le corps en décomposition (Tomberlin *et al.*, 2017) à l'exception de certains Sarcophagidae ovovivipares qui déposent leurs larves et non leurs œufs sur le cadavre (Ren *et al.*, 2018). L'oviposition est souvent observée au niveau des orifices naturels ou dans des plaies. Cependant, cette oviposition préférentielle n'est pas bien expliquée même si certaines hypothèses sont émises. Parmi ces hypothèses, certains chercheurs pensent que le choix des orifices et des plaies est dû au fait que ces endroits sont plus humides et donc plus favorables au développement des larves (Amendt *et al.*, 2004; Leblanc & Logan, 2010). Un comportement grégaire est observé chez les larves de Diptères ce qui engendre la formation de masses larvaires sur le cadavre. Ces masses sont soit homogènes (*i.e.* composées d'une seule espèce), soit hétérogènes (*i.e.* composées de plusieurs espèces) (Rivers & Dahlem, 2014). Plusieurs raisons expliquent ce comportement grégaire. Dans un premier temps, l'activité des larves permet une augmentation locale de la température favorisant la croissance des larves (Charabidze *et al.*, 2011). De plus, cela permet une digestion coopérative de la matière organique. En effet, les larves de Diptères sécrètent des enzymes digestives sur le corps. Au plus il y a de larves, au plus la quantité d'enzymes sécrétées est importante et donc, au plus la digestion est efficace (Dos Reis *et al.*, 1999; Charabidze, 2013). Une fois matures et en phase de pré-pupaison, les larves arrêtent de se nourrir et s'éloignent du cadavre pour débiter leur pupaison (Charabidze, 2008; Sharanowski *et al.*, 2008).

La littérature suppose que les Diptères sont les premiers colonisateurs des corps en décomposition et les premiers en terme d'abondance (Payne, 1965; Archer & Elgar, 2003a; Rivers & Dahlem, 2014). En effet, dans leur étude, Segura *et al.* (2009) ont recensé 89,9% de Diptères lors du stade frais, principalement des Calliphoridae. De plus, la structure de leur appareil buccal ne leur permet que de se nourrir de tissus mous (Schroeder *et al.*, 2002). Une des raisons pour laquelle les Diptères colonisent et pondent sur un corps en début de décomposition pourrait être qu'ils préfèrent éviter que leurs larves soient en compétition avec de nombreux autres organismes ou éviter de subir de la prédation (Huntington, 2008; Brodie *et al.*, 2016).

Les Calliphoridae et les Sarcophagidae sont les familles de Diptères nécrophages les plus fréquemment rencontrées sur un corps en décomposition. On retrouve également les Muscidae, les Piophilidae, les Phoridae et les Anthomyiidae (Payne, 1965; Grassberger & Frank, 2004; Charabidze, 2008).

Les Coléoptères nécrophages

L'ordre des Coléoptères est le second ordre le plus important en termes d'abondance lors de la colonisation d'un corps. Les individus adultes et les larves se nourrissent du cadavre (Schroeder *et al.*, 2002). Contrairement aux Diptères qui ont un cycle de développement qui ne dure que quelques jours et qui dépend des conditions environnementales, les Coléoptères ont un cycle de développement plus long se comptant en semaines. Leur cycle de vie consiste

en un stade œuf, plusieurs stades larvaires selon les espèces et une pupaison avant d'atteindre le stade adulte (Gennard, 2007; Kumara *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs vont influencer la durée du cycle de développement. Tout comme les Diptères, on observe que la température et l'humidité sont des facteurs déterminants qui peuvent accélérer ou ralentir la durée du cycle (Campobasso *et al.*, 2001; Rosenbaum *et al.*, 2016). La densité de larves présentes sur le corps va également influencer le cycle de développement. En effet, au plus la densité est élevée, au moins le cycle sera long. Du cannibalisme peut cependant être observé si la densité larvaire est trop importante (Richardson & Goff, 2001). De plus, en présence de forte compétition ou lorsque leur nourriture se raréfie, les Coléoptères peuvent être prédateurs des larves de Diptères nécrophages (Rosenbaum *et al.*, 2016). La présence et le comportement des Coléoptères sont également influencés par les saisons. Les températures hivernales réduisent l'activité des insectes et donc, leur présence. Cependant, les Nitidulidae, bien que minoritaires le reste de l'année, sont fortement présents en hiver (14%). Au printemps, la diversité en terme d'espèces est la plus élevée mais c'est en automne que les Coléoptères sont les plus abondants (Prado e Castro *et al.*, 2013). Dans leur étude, Prado e Castro *et al.* (2013) ont observé que les Staphylinidae sont les Coléoptères nécrophages les plus présents tout au long de l'année. La localisation géographique est aussi un facteur influençant la colonisation par cet ordre (Kulshrestha & Satpathy, 2001; Kumara *et al.*, 2009). En général, peu d'espèces sont présentes conjointement sur un même corps en décomposition. Plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet notamment celle d'un phénomène de compétition ou de répulsion (Rosenbaum *et al.*, 2016).

Les Coléoptères adultes ne séjournent pas sur le cadavre. Souvent, ils restent aux alentours et n'y reviennent que pour manger, se reproduire ou pondre. Contrairement aux Diptères, les femelles ne pondent pas dans les orifices ou dans les plaies mais directement sous la peau, préférentiellement au niveau des muscles du corps, améliorant ainsi la survie des larves. Bien qu'il arrive parfois que l'oviposition se fasse dans les graisses ou dans la moelle osseuse. L'hypothèse explicative de ce phénomène est la réduction de la compétition des larves (Archer & Elgar, 1998; Woodcock *et al.*, 2013). Pour pondre, elles insèrent leur ovipositeur sous la surface de la peau. Généralement, les premières éclosions se déroulent dans les jours suivant l'oviposition (Woodcock *et al.*, 2013; Gunn, 2018). Selon Lutz *et al.* (2018), Lorsque l'accès au corps est restreint par des limites physiques (poubelles, valises, conteneurs), les Coléoptères adoptent un comportement différent. En effet, leur arrivée sur le corps ainsi que la durée pendant laquelle ils y restent, leurs relations interspécifiques, leurs stratégies reproductives et leurs regroupements sont modifiés en fonction du type de barrière physique. Dès lors, lorsque les fluides provenant du cadavre sont plus aisément accessibles (*e.g.* s'écoulent d'une valise), les Coléoptères, notamment *Necrodes surinamensis* Fabricius, 1775, sont retrouvés en plus grand nombre. De plus, le succès reproducteur peut être également influencé par la présence de pathogènes et de prédateurs sur le corps. Aussi, les individus adultes de certaines espèces restent près de leurs progénitures jusqu'à leur pupaison, pour assurer une meilleure survie des larves (Wilson & Fudge, 1984)

Les Coléoptères sont surtout observés sur les corps en fin de décomposition (Rosenbaum *et al.*, 2015). Cependant, en Afrique du Sud, certains Silphidae comme *Thanatophilus micans*

Fabricius, 1794 ont été observés dans un intervalle de temps court après la mort d'un organisme (Midgley & Villet, 2009). L'étude de Gunn (2018) souligne le fait de ne retrouver des Coléoptères nécrophages qu'en fin de décomposition serait plutôt le résultat d'une compétition interspécifique qu'une préférence alimentaire. En effet, lors de ses tests expérimentaux sur un rat et une souris en décomposition, il a été prouvé que *Dermestes maculatus* De Geer, 1774 peut pondre sur un corps fraîchement mort et que ses larves y survivent (Gunn, 2018).

Les Dermestidae, les Silphidae, les Staphylinidae, les Histeridae, les Nitidulidae et les Cleridae sont les familles de Coléoptères nécrophages les plus communes (Grassberger & Frank, 2004; Segura *et al.*, 2009; Rivers & Dahlem, 2014).

Les Silphidae sont soit nécrophages, soit prédateurs d'œufs ou larves de mouches (*i.e.* nécrophiles). Certaines espèces sont observables au printemps alors que d'autres le sont en été. Cependant, peu le sont en automne. En dehors des cadavres, ils se trouvent soit dans les forêts, soit dans les espaces ouverts. Les Silphidae sont principalement des insectes nocturnes mais certaines espèces sont diurnes ou crépusculaires. Deux sous-familles distinctes existent au sein des Silphidae : les *Silphinae* et les *Nicrophorinae*. La première a une préférence pour les grandes carcasses en décomposition alors que la seconde préfère les petites (Dekeirsschieter *et al.*, 2011). Enfin, certains Silphidae peuvent repérer un cadavre à des kilomètres grâce à leurs chémorécepteurs très sensibles (Kalinová *et al.*, 2009).

Les Dermestidae sont abondants au printemps et en été et se nourrissent directement sur les cadavres en décomposition (Schroeder *et al.*, 2002; Kocárek, 2003). Ils arrivent normalement durant les derniers stades de décomposition lorsque la dégradation des graisses dégage des acides gras volatils (Wolff *et al.*, 2001; Kocárek, 2003; Yones *et al.*, 2010; Charabidze, 2013; Prado e Castro *et al.*, 2013). Cependant, certaines études soulignent qu'ils peuvent être présents à tout moment lors de la décomposition mais ont une préférence et sont plus nombreux lors du stade « restes secs » (Arnaldos *et al.*, 2005; Özdemir & Sert, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; Magni *et al.*, 2015). Selon Arnaldos *et al.* (2005) et Zhantiev (2009), ils ont une préférence pour les matières organiques sèches et riches en protéines (*e.g.* la peau et les tissus) et beaucoup d'espèces s'en nourrissent à tous stades de développement (Kulshrestha & Satpathy, 2001; Martin-Vega *et al.*, 2017). Certaines espèces se retrouvent même dans les momies (Huchet, 2014) et d'autres sont utilisées pour nettoyer les restes de tissus présents sur certains ossements notamment dans un contexte muséal (Hall & Russel, 1933; Hefti *et al.*, 1980). Dès lors, ils s'avèrent être des indicateurs utiles et efficaces en entomologie forensique dans les cas où le corps n'est plus que squelette ou est momifié (Martin-Vega *et al.*, 2017). Sous conditions environnementales chaudes et sèches, ils se reproduisent rapidement et peuvent être très nombreux et, de ce fait, accélèrent la squelettisation (Schroeder *et al.*, 2002; Yones *et al.*, 2010; Charabidze *et al.*, 2014). Au sein de toutes les espèces de Dermestidae connues, seulement une dizaine sont communément retrouvées sur les cadavres (Zhantiev, 2009; Matuszewski & Szafałowicz, 2013; Charabidze *et al.*, 2014). Parmi les plus fréquentes, on retrouve les *Dermestes maculatus*, *Dermestes frischii* et *Dermestes undulatus* (Kulshrestha & Satpathy, 2001; Yones *et al.*, 2014; Magni *et al.*, 2015; Pasquerault *et al.*, 2016; Martin-Vega *et al.*, 2017).

Il est supposé que ce sont les mâles qui sont attirés par les odeurs cadavériques. Ils libèreraient ensuite des phéromones pour signaler aux femelles un site approprié de ponte ou de reproduction pour certaines espèces (Schroeder *et al.*, 2002; Kalinová *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; Gunn, 2018). Cependant, les autres mâles réagissent également aux phéromones émises par les mâles arrivés en premier sur le corps. Dès lors, de nombreux individus sont rapidement attirés sur le corps (Schroeder *et al.*, 2002). Néanmoins, dans leur étude, l'équipe Kalinová *et al.*, (2009) ont testé la réponse des mâles et des femelles face aux COVs cadavériques. Lors de ces tests comportementaux, à la fois les mâles et les femelles étaient attirés par les COVs issus de la décomposition d'un corps. Il se pourrait donc que, pour l'espèce testée (*i.e.* *Nicrophorus vespillo* et *Nicrophorus vespilloides*), les femelles aient également la capacité de détecter les composés cadavériques et d'être attirées (Kalinová *et al.*, 2009). La notion d'attraction des Coléoptères nécrophages par les COVs cadavériques est donc encore peu connue à l'heure actuelle.

L'olfaction chez les insectes nécrophages

Le monde est perçu différemment par les insectes que par les humains. Leur écologie repose sur des signaux chimiques, appelés sémiouchimiques, qu'ils captent et qui leur servent de repères. Ils utilisent ces composés pour localiser une source nutritive, un partenaire sexuel, un site de ponte ou pour détecter un danger. Dès lors, ces composés chimiques jouent un rôle essentiel dans le comportement et la survie de l'insecte. (Gaudry *et al.*, 2007; Leblanc & Logan, 2010; Dekeirsschieter *et al.*, 2013; Johansen *et al.*, 2014; Gadenne *et al.*, 2016).

Le système olfactif est principalement situé dans les antennes qui sont le support des organes sensoriels (*i.e.* sensilles olfactives) des insectes permettant de capter des molécules odorantes. Parfois, les palpes maxillaires peuvent également faire partie du système. Chaque hémisphère cérébral dispose d'un lobe antennaire constitué de glomérules qui ont pour rôle de relayer l'information captée par les sensilles sur les antennes vers les lobes. (Picimbon, 2002; Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Pask & Ray, 2016).

La perception olfactive chez les insectes suit trois étapes : la réception, la transduction et l'intégration du message olfactif (Picimbon, 2002; Dekeirsschieter *et al.*, 2012). À chaque famille de molécules chimiques correspondent des sensilles spécifiques. De nombreuses sensilles sont présentes sur chaque antenne. Trois types principaux de sensilles se retrouvent sur les antennes : les trichodéiques, les basiconiques et les placodéiques. Malgré leurs différentes formes, il semblerait que les sensilles jouent toutes le même rôle de protection des dendrites des neurones sensoriels (Hansson & Stensmyr, 2011). Elles sont composées de neurones sensoriels ou chémorécepteurs (*i.e.* neurones récepteurs olfactifs, ORNs) qui détectent les substances chimiques volatiles généralement hydrophobes (Hansson & Stensmyr, 2011; Dekeirsschieter *et al.*, 2012).. Les COVs s'introduisent à l'intérieur du système par des pores cuticulaires. Une fois la molécule détectée, le récepteur peut soit être activé, soit la molécule odorante est éliminée par une estérase sensillaire afin de pouvoir capter de nouvelles molécules (Picimbon, 2002). Au lieu d'être éliminée, la molécule odorante peut aussi être dirigée vers un autre récepteur. Dans le cas où le récepteur est activé,

la molécule odorante est fixée sur la partie extracellulaire du récepteur dendritique, c'est la réception (Picimbon, 2002; Hansson & Stensmyr, 2011; Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Pask & Ray, 2016).

Suite à cette fixation, un ensemble d'interactions moléculaires se déroulent dans le milieu intracellulaire, encourageant l'ouverture de canaux ioniques (Meillour, 2002). Les ORNs réalisent la transduction du signal en transformant les signaux chimiques en signaux électriques. Ce signal est alors transmis aux lobes antennaires via les glomérules. Le système nerveux central traite ensuite l'information afin d'induire une réponse comportementale adéquate tels que la fuite face à l'odeur d'un prédateur (Meillour, 2002; Dekeirsschieter *et al.*, 2012).

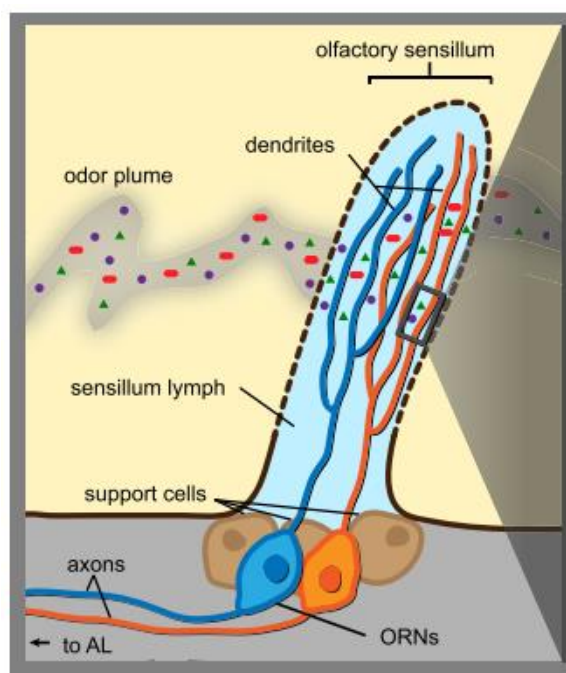


Figure 3. Schéma d'une sensille d'une antenne (Pask & Ray, 2016)

Généralement, les insectes répondent non seulement à des composés uniques mais aussi à des combinaisons de composés pouvant parfois agir en synergie. Ils ont également la faculté de détecter les gradients chimiques leur donnant des informations sur la position de la source d'odeur (Leblanc & Logan, 2010; Dekeirsschieter *et al.*, 2012). Cependant, les composés qui attirent les différentes espèces nécrophages restent peu connus aujourd'hui. Afin d'approfondir les connaissances actuelles sur l'attraction des insectes nécrophages par les COVs cadavériques, l'électroantennographie ainsi que les tests comportementaux seront les deux approches utilisées au cœur de la présente étude (Kalinová *et al.*, 2009; Podskalská *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; Dekeirsschieter, *et al.*, 2012).

Olfaction des Diptères nécrophages

La majorité des études réalisées sur l'olfaction des Diptères nécrophages a été menée sur des espèces de Calliphoridae. De manière générale, ils sont les premiers à rejoindre un corps en décomposition car leur système olfactif est très sensible. En effet, ils peuvent repérer des cadavres à longue distance (Charabidze, 2013). La réponse antennaire des individus dépend

de la concentrations des COVs émis (Frederickx *et al.*, 2012) mais est aussi différente en fonction du stade de décomposition, du sexe et de l'état physiologique des femelles. En effet, les femelles gravides (*e.g. Lucilia caesar*) sont activement à la recherche de carcasses pour pondre (Kasper, 2013).

Les composés soufrés, seuls (*e.g.* le diméthylsulfure, DMDS et le diméthyltrisulfure, DMTS) ou en mélange, sont connus pour fortement attirer les espèces de Diptères Calliphoridae (*e.g. Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar*) mais aussi les Muscidae (*e.g. Musca domestica*) (Ashworth & Wall, 1994; Nilssen *et al.*, 1996; Zito *et al.*, 2014). Ils associent les COVs soufrés à un signal d'abondance de chair sur le cadavre (Johansen *et al.*, 2014). D'ailleurs, de manière générale, l'abondance de Diptères Calliphoridae, tend à diminuer lors des derniers stades de décomposition (*i.e.* moins de chair disponible), car les composés soufrés se raréfient et laissent place à de nombreux composés cycliques et acides gras (Kasper, 2013; Johansen *et al.*, 2014).

Grâce à des tests électrophysiologiques, d'autres composés ont également été identifiés comme attractants pour les Diptères tels que le phénol, le butan-1-ol (Frederickx *et al.*, 2012) ou encore l'hydroxytoluène butylé, le 3-hydroxy-2-butanone et le nonanal, notamment pour *Calliphora vicina* (Johansen *et al.*, 2014). Plus particulièrement, *M. domestica* est attirée par un mélange d'acide 3-méthylbutanoïque, d'indole et de DMTS (Cossé & Baker, 1996).

Enfin, certains COVs sont également considérés comme stimulants pour l'oviposition. Les composés identifiés en tant que tels sont l'indole, le DMTS, certains mélanges d'isovaléraldéhydes ; le 4-méthylpentan-2-one; le 3-méthylbutanol; le 2-phényléthanol et le p-crésol (Cragg & Ramage, 1945; Cragg & Thurston, 1950; Frederickx *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013; Brodie *et al.*, 2014, 2016; Verheggen *et al.*, 2017).

Olfaction des Coléoptères nécrophages

Beaucoup d'interrogations demeurent encore aujourd'hui sur l'attrait des Coléoptères nécrophages pour les COVs émis par les corps en décomposition. En effet, peu d'études ont identifié quels étaient les composés attirant ces insectes et quels facteurs pourraient affecter cette attraction (von Hoermann *et al.*, 2011).

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de différents composés soufrés tels que le diméthylsulfure, diméthylsulfure et le diméthyltrisulfure sur différentes espèces de *Silphidae* suggérant qu'ils agissaient comme attractants (Kalinová *et al.*, 2009; Podskalská *et al.*, 2009; Dekeirsschietter *et al.*, 2013; von Hoermann *et al.*, 2016). De plus, la volatilité de ces composés soufrés influence l'attraction des Coléoptères. En effet, il semblerait que au plus le composé est volatil, au moins il attire l'insecte. Dès lors, le diméthyltrisulfure attire donc mieux les *Silphidae*. Cependant, l'attractivité de ces composés augmente lorsqu'ils sont combinés (Podskalská *et al.*, 2009).

von Hoermann *et al.* (2011) ont étudié quels COVs émis lors de la décomposition provoquaient une réponse comportementale chez *Dermestes maculatus* et ont conclu que seuls les jeunes mâles sont attirés par le butyrate de benzyle émis lors du stade de post-gonflement mais soupçonnent que ce composé ne soit pas le seul qui les attire. Une fois sur place, les

mâles émettent des phéromones mais il n'a pas encore été prouvé qu'ils étaient à l'origine de l'attraction des femelles sur le cadavre (Kalinová *et al.*, 2009; Kasper, 2013). En 2012, von Hoermann *et al.* ont découvert que les jeunes femelles venant d'émerger montrent une attraction pour le cadavre en fin de décomposition seulement si les COVs émis par ce dernier sont combinées avec des phéromones libérées par les mâles (von Hoermann *et al.*, 2012)

Étant donné que le profil odorant d'un corps en décomposition évolue au cours du temps, il peut être aisément supposé que les organismes vivants se nourrissant du cadavre (*e.g.* les insectes nécrophages) et ceux qui sont attirés par le cadavre via les odeurs émises, ne seront pas tous attirés au même moment de la décomposition (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Verheggen *et al.*, 2017). La littérature suppose et admet, qu'en milieu naturel, les Coléoptères arrivent plus tard dans la décomposition, lorsqu'un grand nombre de composés tels que des acides gras volatils sont relâchés. Cependant, cela ne signifie pas qu'ils n'éprouvent aucun intérêt pour les stades de décomposition plus précoces. Il est donc intéressant d'approfondir les connaissances actuelles sur le sujet.

Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

Les sols de tombes

Les sols de tombe sont les sols associés à la décomposition d'un corps, quelle que soit l'espèce et peu importe si le corps se trouve à la surface du sol ou enterré (Carter *et al.*, 2007). Lorsqu'il s'agit de tombes, plusieurs caractéristiques d'un sol peuvent affecter la décomposition (Tumer *et al.*, 2013; P. Stefanuto & Focant, 2016; Fancher *et al.*, 2017).

La texture du sol joue a un impact sur la décomposition d'organismes dans le sol (Tumer *et al.*, 2013). En effet, la porosité et la perméabilité du sol régulent les mouvements d'eau et de gaz à travers la colonne de sol (Santarsiero *et al.*, 2000; Fiedler & Graw, 2003; Vass *et al.*, 2004). Dès lors, les sols à éléments plus grossiers favorisent la diffusion des gaz au sein de la matrice de sol (Carter *et al.*, 2007). De fait, la disponibilité en oxygène au sein de la tombe dépend également notamment de la texture. L'oxygène permet la croissance de certains microorganismes participant à la décomposition (*e.g.* champignons) (Dent *et al.*, 2004). La température et l'humidité du sol impactent également la décomposition. Ces facteurs influencent les microorganismes (an)aérobiques du sol (*e.g.* *Clostridium perfringens* Veillon & Zuber, 1898) qui participent également activement à la décomposition (Santarsiero *et al.*, 2000; Fiedler & Graw, 2003; Dent *et al.*, 2004) mais également les activités microbienne et enzymatique du sol (Wilson *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2008; Tumer *et al.*, 2013). D'ailleurs, la décomposition de corps dans le sol est principalement menée par activité microbienne (Carter *et al.*, 2007). Les sols argileux étant des sols à texture fine, l'eau y est retenue et donc le processus de décomposition est entravé et parfois, seuls les processus anaérobiques ont donc lieu (Carter *et al.*, 2007). Quant au pH du sol, il impacte également la décomposition. Cependant, certaines études ont observé une augmentation de pH et d'autres une diminution lorsqu'un corps se décompose sous la surface du sol (Haslam & Tibbett, 2009; Tumer *et al.*, 2013; Fancher *et al.*, 2017).

À l'inverse, peu d'études se sont intéressées à l'impact de la décomposition d'un corps sur les caractéristiques du sol environnant. La majorité de ces études se sont intéressées à l'impact d'un cadavre sur la chimie minérale des sols de tombe (Stokes *et al.*, 2009; Tibbett & Carter, 2009; Spicka *et al.*, 2011; Aitkenhead-Peterson *et al.*, 2012; Macdonald *et al.*, 2014; Stefanuto *et al.*, 2015; Fancher *et al.*, 2017; Szelecz *et al.*, 2018). Dès lors, il a déjà été prouvé que la décomposition d'un corps influence la structure chimique et biologique du sol (*e.g.* modification de la concentration en nutriments, modification de l'humidité, etc.) (Benninger *et al.*, 2008; Stokes *et al.*, 2009). En effet, la présence d'un cadavre sur le sol augmente la biomasse et l'activité microbiennes de celui-ci ainsi que la concentration en nutriments tels que l'ammonium et le soufre (Hopkins *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2007). Un corps en décomposition dans un sol est donc souvent synonyme d'un enrichissement en nutriments (Stokes *et al.*, 2009). De plus, l'observation des modifications continues de la chimie minérale du sol est une des méthodes permettant la détermination de l'intervalle *post-mortem* ainsi que la localisation de tombes (Fancher *et al.*, 2017; Szelecz *et al.*, 2018).

Toutefois, peu d'études se sont focalisées sur le profil odorant de ces sols (Vass *et al.*, 2004; Vass *et al.*, 2008; Brasseur *et al.*, 2012; Forbes & Perrault, 2014). Il est difficile de détecter et d'identifier des composés propres à la décomposition étant donné que de nombreux constituants du sol émettent des COVs (Vass *et al.*, 2008). Certains COVs ne sont retrouvés qu'en début de décomposition (*e.g.* hexane, dioxyde de soufre) alors que d'autres sont détectés tout au long du processus (*e.g.* nonanal) et d'autres encore persistent même une fois que les restes sont secs (*e.g.* DMDS, DMTS) (Vass *et al.*, 2008).

L'intérêt d'étudier le profil odorant des sols de tombe réside dans l'amélioration de la détermination de l'intervalle post-mortem mais également dans l'amélioration de la localisation par les chiens pisteurs, sachant que leur capacité de détection est notamment influencée par la texture du sol (Vass *et al.*, 2008; Larson *et al.*, 2011; Spicka *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2013; Alexander *et al.*, 2016; Dubois *et al.*, 2018).

Objectifs

Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

L'objectif principal de cette partie est la **détermination de l'attractivité des différents stades de décomposition envers un Coléoptère nécrophage (i.e. *Dermestes frischii*)**. Pour ce faire quatre tâches ont été réalisées :

- (i) Collectes des composés organiques volatils émis par des rats lors des quatre premiers stades de décomposition (i.e. frais, gonflé, actif, avancé).
- (ii) Mise en place de tests comportementaux afin d'identifier les stades de décomposition attirant *D. frischii*.
- (iii) Evaluation de la réponse électrophysiologique de *D. frischii* aux différents stades de décomposition.
- (iv) Caractérisation du profil odorant de chaque stade de décomposition en GC-ms.

Partie 2: Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

L'objectif de cette partie est de déterminer **l'influence de la décomposition d'un mammifère sur le profil odorant du sol**. Pour ce faire, plusieurs tâches ont été réalisées :

- (i) Inhumation de rats dans deux sols de textures différentes (i.e. limoneux et sablo-limoneux).
- (ii) Prélèvements de plusieurs couches de sols au-dessus et sous les rats (après exhumation de ceux-ci) afin de tenir compte des changements de profils odorant s'opérant dans le sol du cadavre à la surface.
- (iii) Caractérisation du profil odorant des différents sols en GC-ms.
- (iv) Détermination des composés spécifiques aux sols de tombe.

Matériels et méthodes

Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

Élevage

***Rattus norvegicus* Berkenhout (1769)**

Tous les rats de laboratoire (*R. norvegicus*), utilisés lors des expériences, proviennent de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Uliège). Les rats ont été élevés et euthanasiés par asphyxie au CO₂, puis congelés (numéro de dossier éthique : 18-2021). Avant expérimentation, ils ont été décongelés dans un bain d'eau chaude à $\pm 40^{\circ}\text{C}$.

***Lucilia sericata* Meigen (1826)**

Des larves de *L. sericata* (Diptères : *Calliphoridae*) achetées dans une pêcherie (Lacroix Pêche, Perwez, Belgique) ont été placées dans une boîte de Pétri (d=20 cm). Cette boîte a ensuite été placée dans un bac en plastique (30x20x10 cm) à $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Les larves ont été nourries avec du foie de porc placé quotidiennement dans la boîte de Pétri jusqu'à l'observation des premières pupes. Puis, les pupes ont été récoltées et placées dans une cage de vol en nylon (30x30x30 cm). Dès émergence des adultes, les mouches ont été sexées (Annexe 1) et séparées dans deux cages de vol.

***Dermestes frischii* Kugelann (1792)**

Les *D. frischii* (Coléoptères : *Dermestidae*) ont été élevés dans une boîte en plastique hermétique (50x30x40 cm) contenant des copeaux de bois et du polystyrène. Le polystyrène offre un lieu idéal pour la pupaison des larves. La boîte est placée de manière permanente à l'obscurité dans une étuve à $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ et à une humidité de $40 \pm 1\%$ (Gennard, 2007; Magni *et al.*, 2015; Martin-Vega *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2019). Toute les deux semaines, un rat mort est placé dans la boîte d'élevage afin d'assurer la nutrition des larves et des adultes. Ces rats servent également de lieu de ponte pour les femelles.

Les *Dermestes* utilisés pour les tests comportementaux et électrophysiologiques ont été sexés (Annexe 2) et séparés selon leur sexe dans des boîtes en plastique aérées (20x20x10 cm) contenant de la nourriture (*i.e.* des morceaux de foie de porc). De précédentes études sur les Coléoptères nécrophages ont démontré des différences de réponses en fonction du sexe (Kalinová *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; von Hoermann *et al.*, 2012). Dès lors, il a été supposé que les individus mâles et femelles *D. frischii* pourraient réagir différemment et les tests ont été réalisés séparément pour chaque sexe.

Collectes des composés cadavériques volatils pour les essais comportementaux et électrophysiologiques

Pré-test

Dans un premier temps, des composés identifiés dans la littérature comme étant issus de la décomposition d'un corps ont été sélectionnés sur base de leur famille chimique et de leur durée d'émission lors de la décomposition : nonanal (p=95%, d=0,827, Sigma Aldrich[®]), diméthylsulfure (DMDS ; p=99%, d=1,046, Sigma Aldrich[®]) et indole (p≥99%, MM = 117,15g/mol, Sigma Aldrich[®]). Un mélange équimolaire (1 mol/L) de ces composés (*i.e.* nonanal; DMDS; indole) a ensuite été constitué. Afin de vérifier le choix du dispositif expérimental, 200 µl du mélange ont été placés dans des diffuseurs. Ces derniers ont ensuite été disposés dans deux cuves hermétiques à raison de quatre par cuve. Des compresses de gaze stériles (Stella[®] 1/3, 5x5 cm) ont été suspendues à l'aide d'un fil de pêche dans ces cuves durant 24 heures pour imprégner l'odeur émise par les diffuseurs. Les compresses ont été stockées dans une chambre froide à – 20°C. Ces pré-tests en laboratoire ont permis de confirmer l'imprégnation de COVs cadavériques sur les compresses.

Décomposition des rats

Afin de collecter les odeurs émises lors des différents stades de décomposition, quatre rats de laboratoire mâles (408,05 ± 30,15 g), obtenus comme expliqué précédemment, ont été mis individuellement à décomposer dans des cuves hermétiques en verre de 30 litres (Figure 4). Afin de mimer au mieux une décomposition naturelle, cinq couples de Diptères nécrophages (*i.e.* *L. sericata*) ont été insérés dans les cuves contenant les rats. Pour assurer la survie de ces mouches adultes, de l'eau et du sucre ont également été placés dans chacune des cuves. Du tulle a été ajouté au niveau de l'ouverture des cuves afin d'éviter la fuite des mouches. Une cinquième cuve témoin servant de contrôle a également été installée dans les mêmes conditions que les quatre autres à l'exception du rat, absent dans cette dernière. La température et l'humidité relative ont été relevées toutes les 30 minutes à l'aide d'un Data logger[®].

Collecte des composés organiques volatils (COVs) émis lors des quatre premiers stades de décomposition.

Deux heures avant de placer les compresses, les cuves de prélèvement ont été refermées afin d'enrichir l'espace de tête en composés cadavériques. Ensuite, les compresses de gaze stériles (n=90) (Stella[®] 1/3, 5x5 cm) ont été suspendues à l'aide d'un fil de pêche dans l'espace de tête de chacune des cuves (Figure 4). Pour chaque stade de décomposition ciblé (*i.e.* frais, gonflé, décomposition active, décomposition avancée), les compresses ont été placées pendant 24 heures à 10 cm du rat dans les cuves maintenues fermées. À la fin de l'imprégnation, les compresses ont été placées dans des boîtes de Pétri en verre (d=20 cm) scellées à l'aide de parafilm[®]. Les boîtes ont ensuite été stockées dans une chambre froide à – 20°C jusqu'à leur utilisation pour les essais comportementaux et électrophysiologiques. La même méthodologie a été appliquée pour chacun des stades de décomposition. Les compresses ont été disposées dans les cuves dès observation du début de chaque stade. Les différents stades ont été distingués à l'aide de caractéristiques physiques décrites dans la littérature (Payne, 1965; Dekeirsschieter *et al.*, 2009). En dehors des périodes de prélèvement les cuves étaient

maintenues ouvertes afin d'éviter une décomposition anaérobique et de respecter au mieux les conditions de décomposition en milieu naturel. Cette méthode a déjà été utilisée lors d'autres expériences (Degreeff & Furton, 2011; DeGreeff *et al.*, 2012)



Figure 4. Dispositif expérimental utilisé pour collecter les COVs cadavériques émis par les rats lors de leurs différents stades de décomposition.

Tests électrophysiologiques

Afin d'évaluer la perception des différents stades de décomposition par *D. frischii*, des pré-tests ont été effectués à l'aide d'une solution témoin de DMDS (1,09 mol/L) dans de l'huile de paraffine ($d=0,86$; VWR®). Ces pré-tests ont été réalisés sur des antennes seules détachées de l'insecte et sur des têtes entières coupées. Cependant, les réponses antennaires obtenues avec les antennes seules n'étaient pas suffisamment intenses et présentaient beaucoup d'interférence. Il a donc été décidé de couper la tête entière de l'insecte afin de la brancher aux électrodes car un meilleur signal était enregistré. Chaque tête a été déposée côté coupé sur une électrode de référence (*i.e.* reliée à la terre) et une des deux antennes était mise en contact avec l'électrode de travail, *i.e.* une électrode reliée à un amplificateur 100X (IDAC-4; Syntech), lui-même relié à un ordinateur (Figure 6). Ces électrodes ont été fabriquées à l'aide de capillaires (Harvard Apparatus, Holliston, MA; 1.5 mm o.d. 9 1.17 mm i.d.) en verre et ont été « taillées » de la manière la plus adéquate à la forme de l'antenne. Les capillaires étaient remplis d'une solution saline (NaCl 7,5 g/L; CaCl₂ 0,21 g/L; KCl 0,35 g/L; NaHCO₃ 0,2 g/L). Chaque électrode était en contact avec un filament d'argent (Dekeirsschieter *et al.*, 2013). Une fois branchée, l'antenne était constamment soumise à un flux d'air humidifié et filtré grâce à un filtre de charbon actif (débit de 200 mL/min) et la diffusion de l'odeur à tester était

actionnée à l'aide d'une pédale (Dekeirsschieter *et al.*, 2013). Dix antennes différentes ont été testées par sexe et par stade.

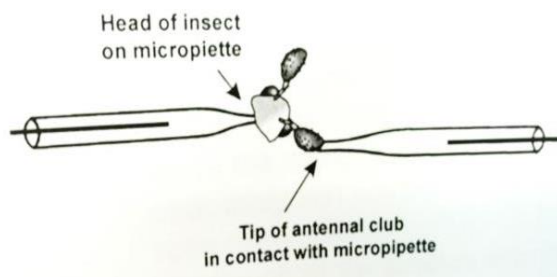


Figure 5. Branchement d'une antenne aux électrodes (SYNTECH, 2004).

Pour diffuser l'odeur sur l'antenne, des pipettes pasteur en verre ont été utilisées. Dans chaque pipette, pour chaque stade, quatre morceaux de compresse (0,25x0,5 cm) correspondant aux quatre rats ont été introduits. Un témoin ainsi qu'un blanc ont également été testés. Le témoin était une dose de 10 μ L de la solution utilisée lors des pré-tests sur un morceau de compresse vierge et le blanc était un morceau de compresse vierge seul. Chaque antenne testée a été soumise à six stimulations, *i.e.* au blanc, au témoin puis, aux quatre différents stades testés dans un ordre aléatoire. Chaque flux odorant produit par l'actionnement de la pédale durait cinq secondes (débit constant de 1,5L/min) et tous les « puffs » étaient séparés d'environ 30 secondes pour permettre la repolarisation de l'antenne. Les réponses antennaires à ces stimulations ont été enregistrées sur un ordinateur grâce au logiciel Autospike[®] (Autospike v.3.2; Syntech, Hilversum, Netherlands).

Tests comportementaux

Dispositif expérimental

La réponse comportementale des individus mâles et femelles *D. frischii* pour différents stades de décomposition (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé) a été déterminée à l'aide de tests comportementaux. Ces tests ont été réalisés à l'aide d'un tube en verre (32 cm de long ; 3,6 cm de diamètre interne) comportant trois entrées (Figure 5), appelé olfactomètre. Les deux ouvertures latérales étaient fermées à l'aide de capuchon GL45 (Barsics *et al.*, 2012; Gfeller *et al.*, 2013). L'ouverture centrale de l'olfactomètre permettait l'insertion de l'insecte dans le dispositif. À la sortie des deux autres ouvertures (GL14), opposées à l'ouverture centrale, se trouvaient deux pots en verre dans lesquels un morceau de compresse ($\sim 0,25$ cm²) a été placé (blanc vs stade, *i.e.* source cadavérique). Pour éviter tout contact entre l'insecte et la compresse, du tulle a été utilisé pour réceptionner l'insecte ayant fait son choix. De cette manière, chaque morceau de gaze a pu être utilisé pour deux tests, seul le tulle du pot dans lequel l'insecte est tombé lors de l'essai était remplacé. Les pots en verre étaient recouverts de parafilm afin de concentrer les odeurs dans le dispositif expérimental. Avant de lancer l'expérimentation, des pré-tests permettant la validation du dispositif ont été réalisés à l'aide de compresses imprégnées. Ces compresses ont été recueillies lors des pré-tests de la collecte de COVs. L'ensemble des tests ont été réalisés dans un laboratoire à température de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

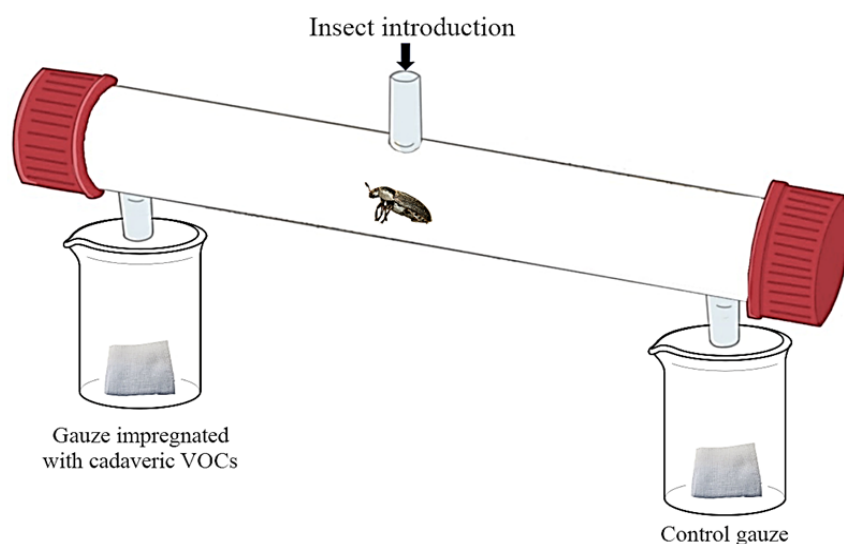


Figure 6. Dispositif utilisé lors des tests comportementaux (Martin *et al.*, 2020).

Les tests comportementaux ont été réalisés pour les quatre stades de décomposition susmentionnés. Les insectes, placés individuellement dans chaque dispositif, avaient le choix entre deux sources d'odeurs *i.e.* un morceau de compresse provenant du blanc et un provenant d'un des stades de décomposition. Pour assurer la fiabilité des résultats, les tests ont été répétés jusqu'à obtenir 90 individus femelles et 90 mâles répondants pour chaque stade. La durée du test étant de 30 minutes, tout individu n'ayant pas fait de choix au bout de 30 minutes était enregistré comme non répondant. Le pourcentage d'insectes non répondants a également été calculé. Les insectes étaient placés individuellement dans chaque olfactomètre afin d'éviter un phénomène de trace. Pour éviter le phénomène de fuite, les insectes étaient endormis dans de la glace avant d'être placés dans l'olfactomètre. La position des compresses dans les olfactomètres et l'orientation des olfactomètres lors de l'expérience étaient choisies aléatoirement afin d'éviter tout biais issus de l'environnement (*e.g.* gradient de température). Entre chaque essai, les olfactomètres et les bouchons ont été nettoyés au pentane ($p = 99,8\%$; $d = 0,626 \text{ kg/L}$, VWR®). À la fin de chaque journée de tests, l'ensemble du matériel utilisé était déposé dans un bain d'EXTRAN MA3 pendant une nuit puis rincé et la verrerie était séchée dans une étuve (modèle KBW-240, Binder®) à 60°C .

Prélèvements d'odeurs

Mise au point du dispositif

Afin d'identifier les COVs imprégnés sur les compresses (*i.e.* frais, gonflé, actif, avancé), différentes méthodes de prélèvement ont été testées. Cependant, une seule a été retenue.

Pour chaque stade de décomposition, les COVs émis ont été collectés à l'aide d'une cartouche de thermodésorption (Markes international®, UK ; longueur 8,9 cm ; diamètre extérieur 0,64 cm). Quatre répliques (correspondant aux quatre rats) ont été réalisés par stade ($n_{\text{stades}}=4$). De plus, des compresses non utilisées ont servi de contrôle pour chacun des stades de décomposition ($n=4/\text{stade}$). Un total de 32 cartouches a donc été utilisé. Les cartouches ont été vidées de leur phase et une demi-compresse (Stella® 1/3, 5x5 cm) (*cf.* section Collecte des COVs) a été directement insérée dans chacune d'elles. Afin de quantifier les composés

identifiés en chromatographie, 42,5 ng de butylbenzène ($p > 99\%$, Sigma Aldrich®) en solution dans de l'hexane a été utilisé comme standard interne, et injecté dans chaque cartouche avant leur injection.

Analyses chromatographiques en phase gazeuse (GC)

Les cartouches ont été analysées par un chromatographe à phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/ms) (modèle QP2020 NX, Shimadzu®, Japon). Les analyses chromatographiques ont permis d'identifier les composés retenus dans les compresses de gaze qui ont été suspendues au-dessus des rats pour chaque stade de décomposition. Les COVs ont été thermodésorbés à 80°C pendant 8 minutes avant d'être cryoconcentrés à -20°C par effet Peltier. La désorption du cool trap a été réalisée à 280°C afin d'injecter l'ensemble des composés en tête de colonne (5% diphényle; 30 m × 0,25 mm I.D.; épaisseur 0.25 µmm) (DB5-ms, Filter service®; Eupen; Belgium). Les composés ont ensuite été séparés à l'aide du programme de température suivant : 40°C pendant 2 minutes, 5°C/min jusqu'à 300°C maintenu pendant 5 minutes. A l'injection un split ratio de 3 a été appliqué afin d'éviter la saturation de certains composés à la masse.

Analyses statistiques

L'ensemble des résultats obtenus ont été encodés dans des feuilles de calcul du logiciel Microsoft® Office Excel et ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel RStudio®. Pour simplifier l'encodage, le traitement et l'analyse des données, les rats ont été numérotés de 1 à 4 et la cuve témoin a été appelée « blanc ».

Les résultats recueillis lors des tests électrophysiologiques ont été traités séparément pour chaque sexe. L'existence ou non d'effets apportés par l'antenne testée ainsi que par le stade de décomposition sur les réponses électrophysiologiques enregistrées a été vérifiée à l'aide à l'aide d'un modèle linéaire à effet mixte (fonction « lmer », package R « lmerTest »). Grâce à ce test, les stades induisant une réponse antennaire chez les individus *D. frischii* ont pu être déterminés. L'ensemble des analyses ont été réalisées sur les données brutes, *i.e.* en intégrant la réponse des insectes au morceau de compresse vierge (également appelé blanc) dans les tests comme une modalité en soi.

Pour les données issues des tests comportementaux, un modèle linéaire généralisé à effets mixtes (GLMM, generalized linear mixed model) (fonction « glmer », package R « lmerTest ») a d'abord été testé pour vérifier l'existence ou non d'un effet apporté par les facteurs aléatoires (*i.e.* les facteurs « bloc » et « rat »). Lorsque ces effets n'étaient pas significatifs, un modèle linéaire généralisé simple (GLM) a alors été employé (fonction « glmer », package R « lme4 »). Ces tests ont permis d'identifier les stades les plus attractifs pour *D. frischii*. L'effet du sexe a également été testé de manière à voir s'il y avait une différence de comportement entre les individus mâles et femelles. Avant de réaliser les analyses statistiques, l'ensemble des conditions d'applications de ces tests ont été vérifiées (homoscédasticité et normalité).

Plusieurs manipulations ont dû être exécutées avant l'analyse statistique des COVs associés à chaque stade de décomposition. Après intégration manuelle des différents chromatogrammes, obtenus grâce à la chromatographie à phase gazeuse, à l'aide du logiciel GCMSsolution

(Shimadzu®, Japon) et retrait des COVs identifiés dans les blancs, les différents profils odorants ont été alignés sur base des temps de rétention à l'aide du logiciel GCAligner 1.0 (Dellicour & Lecocq, 2013). Avant de procéder aux analyses statistiques, les molécules apparaissant dans moins de deux répliques ont été retirées, pour chaque stade.

Afin de mettre en évidence des différences entre les profils odorants des différents stades de décomposition, une analyse en composantes principales (ACP) (commande « Fviz_pca_ind », packages R: ggplot2, Factoextra (ver. 1.0.3)) a été réalisée. Un diagramme de corrélation (commande « corrplot », package R : corrplot) a permis d'identifier quels COVs contribuaient le plus aux différentes dimensions de l'ACP. Une analyse multivariée par test de permutation a été effectuée en utilisant une matrice de distance euclidienne et 999 permutations (perMANOVA ; commande « adonis », package R : vegan, (Oksanen et al. 2017)). La normalité et l'homoscédasticité ont été vérifiées grâce à la fonction « betadisper ».

Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

Description du site

L'expérience a été réalisée dans une serre (5m x 3m) de la faculté de Gembloux Agro-Bio Tech (ULiège, Belgique). Après avoir quadrillé la serre en 15 carrés (1x1m), huit tombes ont été creusées (40x20x30 cm) à raison d'un carré sur deux pour éviter toute contamination. Le substrat de sol recueilli a été réparti dans deux containers. Dans un des containers du sable (0,7 mm) a été ajouté au substrat prélevé de manière à avoir un ratio 60/40 v/v (sol naturel/sable). Le substrat du second container est resté inchangé. Après homogénéisation de chaque container, la moitié des tombes a été recouverte de dix centimètres de sol naturel (*i.e.* sol limoneux) et l'autre partie de dix centimètres de sol modifié (*i.e.* sol sablo-limoneux). Six rats ($208,9 \pm 16,4$ g), obtenus dans les mêmes conditions que décrites précédemment, ont été déposés dans chacune des tombes. Trois d'entre eux ont été disposés dans le sol limoneux et les trois autres dans le sol sablo-limoneux. Ensuite, les tombes limoneuses et sablo-limoneuses ont respectivement été remplies de 20 cm de sol limoneux et sablo-limoneux. Pour chaque texture de sol, une tombe supplémentaire dépourvue de rat a servi de contrôle (Figure 7).

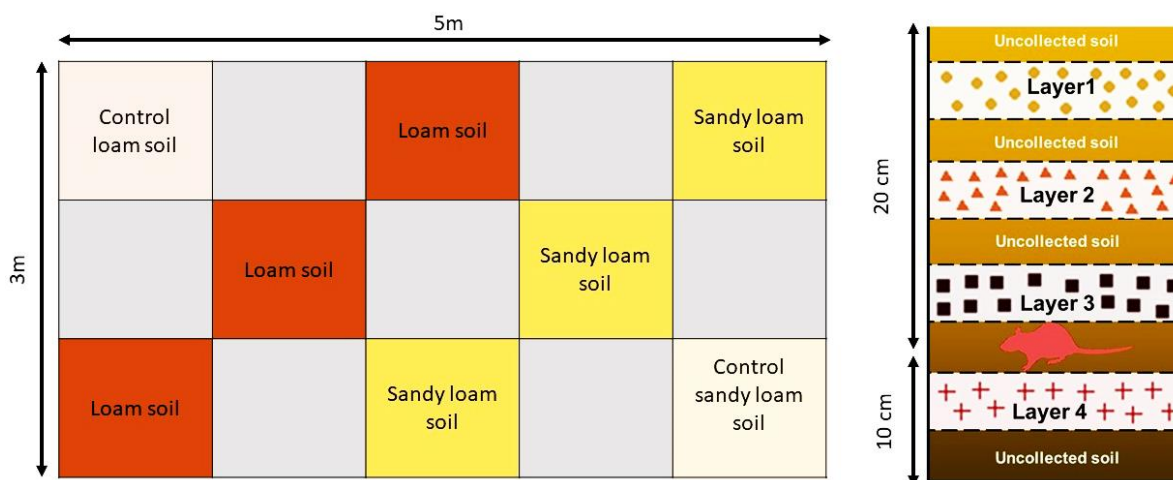


Figure 7. Disposition des différentes tombes dans la serre. Un rat a été placé dans chacune d'elle à l'exception des tombes témoins (=Control). (Layer = Couche ; Loam soil = Sol limoneux ; Sandy loam soil = Sol sablo-limoneux). Figure tirée de (Martin *et al.*, 2020)

Deux mois plus tard, les rats ont été exhumés et du substrat de chaque sol a été prélevé. D'abord, les quatre premiers centimètres ont été retirés. Puis, un kilogramme de substrat a été collecté sur une couche de trois centimètres. Les trois centimètres suivant ont été retirés avant de prélever à nouveau un kilogramme de substrat sur une deuxième couche de trois centimètres. La même manipulation a été réalisée pour une troisième couche. Une fois les rats exhumés, un nouveau prélèvement d'un kilogramme a été échantillonné dans une quatrième couche de trois centimètres située sous les restes (Figure 7). L'ensemble des échantillons ont finalement été stockés dans des récipients hermétiques à -80°C.

Analyse physique des sols

La proportion d'argile (0-2 μm), de limon grossier (2-20 μm), limon fin (20-50 μm) et de sable (>50 μm) a été déterminée pour chaque texture de sol. Un échantillon de chaque sol a été prélevé après homogénéisation et la taille des particules a été déterminée à l'aide de la méthode de la pipette (Ranst *et al.*, 1999). Un réplica était suffisant pour être représentatif car chaque sol a été homogénéisé avant remplissage des tombes.

Prélèvements d'odeurs

Afin de déterminer si la présence d'un rat en décomposition impacte le profil odorant de sols de deux textures différentes, des prélèvements d'odeur ont été effectués.

Dispositif expérimental

Pour chaque échantillon prélevé, $20 \pm 0,5$ g de sol ont été disposés dans des cuves hermétiques en verre de 400 mL ($d=10\text{cm}$; $h=5\text{cm}$) connectées à des pompes de prélèvement (GilAir® plus) permettant l'aspiration de l'air situé dans la cuve à un débit de 200 mL/min. Un filtre de charbon actif a été placé à une autre extrémité de la cuve afin de filtrer l'air entrant dans la cuve suite à l'aspiration de la pompe (Figure 8). Les prélèvements ont été effectués à température ambiante ($23 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Les COVs émis par les différents substrats ont été adsorbés sur des cartouches hydrophobes Tenax/Carbograph (Markes International®),

Llantrisant, UK) (Perrault *et al.*, 2014). La durée du prélèvement a été fixée à deux heures après avoir mis au point la méthode. Cette période permettait la détection de COVs cadavériques sans observer de percée. En effet, lors de la mise au point de la méthode, deux cartouches ont été disposées en série et aucun COV n'a été détecté dans la 2^e cartouche. Avant chaque prélèvement, 20 minutes de mise à l'équilibre ont été réalisées au sein des cuves fermées. Après les prélèvements, les cartouches ont été scellées et stockées dans un réfrigérateur à 4°C.

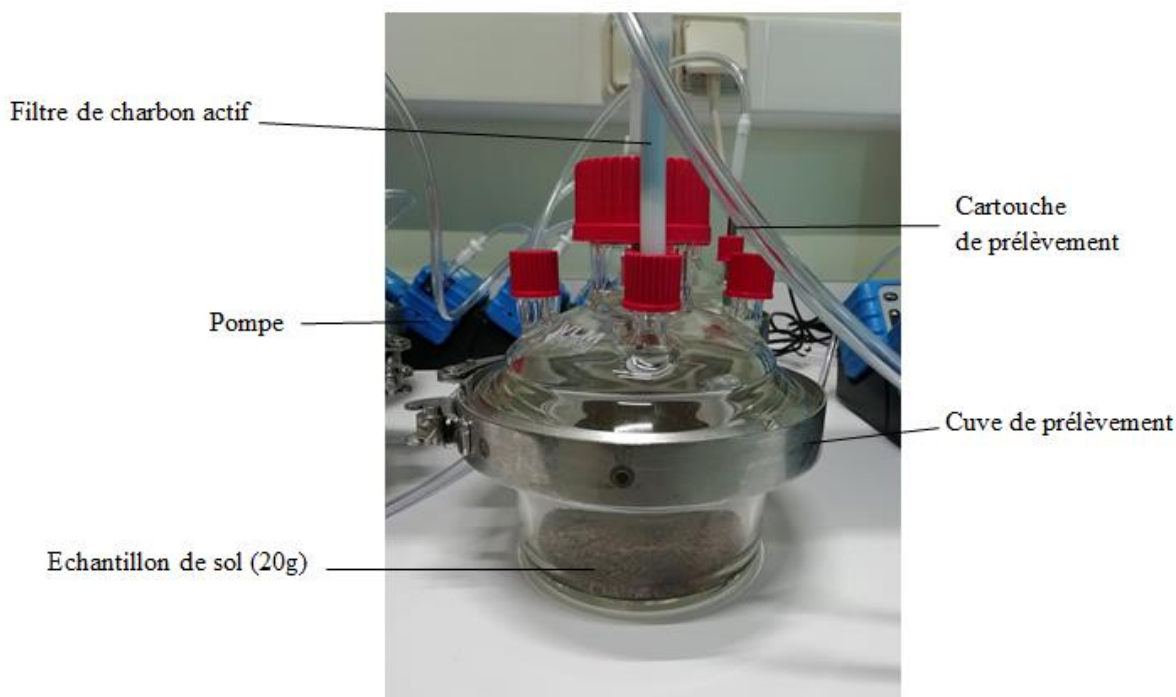


Figure 8. Dispositif de prélèvement d'odeur utilisé lors du prélèvement de composés organiques volatils émis par du substrat de sol issus de tombe.

Analyses en chromatographie en phase gazeuse (GC)

La séparation des composés adsorbés sur les cartouches s'est réalisée en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) (modèle QP2020 NX, Shimadzu®, Japon). Les cartouches ont d'abord été chauffées à 280°C pendant huit minutes permettant la thermodésorption des COVs adsorbés lors du prélèvement. Un split ratio a été appliqué lors de la thermodésorption (split ratio = 5) afin d'éviter une saturation de la détection au spectromètre de masse. Ces composés ont ensuite été cryoconcentrés à -30°C par effet Peltier. Une seconde période de chauffe (280°C) a permis l'injection des composés en tête de colonne (5% diphényle; 30 m × 0,25 mm I.D.; épaisseur 0.25 µmm) (Filter service®; Eupen; Belgium). La séparation des composés a été effectuée via le programme de température suivant: 40°C pendant 3 minutes, 4°C/min jusqu'à 220°C, 10°C/min jusqu'à 300°C maintenue pendant 2 minutes.

Analyses statistiques

L'ensemble des résultats obtenus ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel RStudio®.

Avant analyses statistiques des données obtenues, une intégration manuelle des différents chromatogrammes ainsi qu'un alignement (logiciel GCAligner 1.0) des profils odorants des différents sols ont dû être effectués, selon le même schéma que celui décrit dans la première partie de ce mémoire.

Afin de mettre en évidence l'impact de la présence d'un rat en décomposition sur le profil odorant du sol, mais aussi le rôle de la texture du sol dans la diffusion des COVs au sein du sol, plusieurs analyses en composantes principales (ACP) (commande "Fviz_pca_ind", packages R: ggplot2, Factoextra (ver. 1.0.3)) ont été réalisées. Ces analyses ont été suivies d'analyse multivariées par test de permutation en utilisant une matrice de distance euclidienne et 999 permutations (perMANOVA ; commande « adonis », package R vegan, (Oksanen *et al.*, 2017)). La normalité et l'homoscédasticité ont été vérifiées grâce à la fonction «betadisper».

Les composés indicateurs de la présence d'un cadavre dans le sol ont été identifiés par l'application d'un algorithme random forest (commande "randomForest", package R randomForest). Cet algorithme a permis de déterminer les distances entre les points de données en générant 500 arbres avec 10 variables explicatives par branche. Grâce à cet algorithme, le coefficient de Gini de chaque COV a également pu être calculé. Au plus ce coefficient est proche de 1, au plus le COV permet de distinguer le sol d'un autre.

Résultats

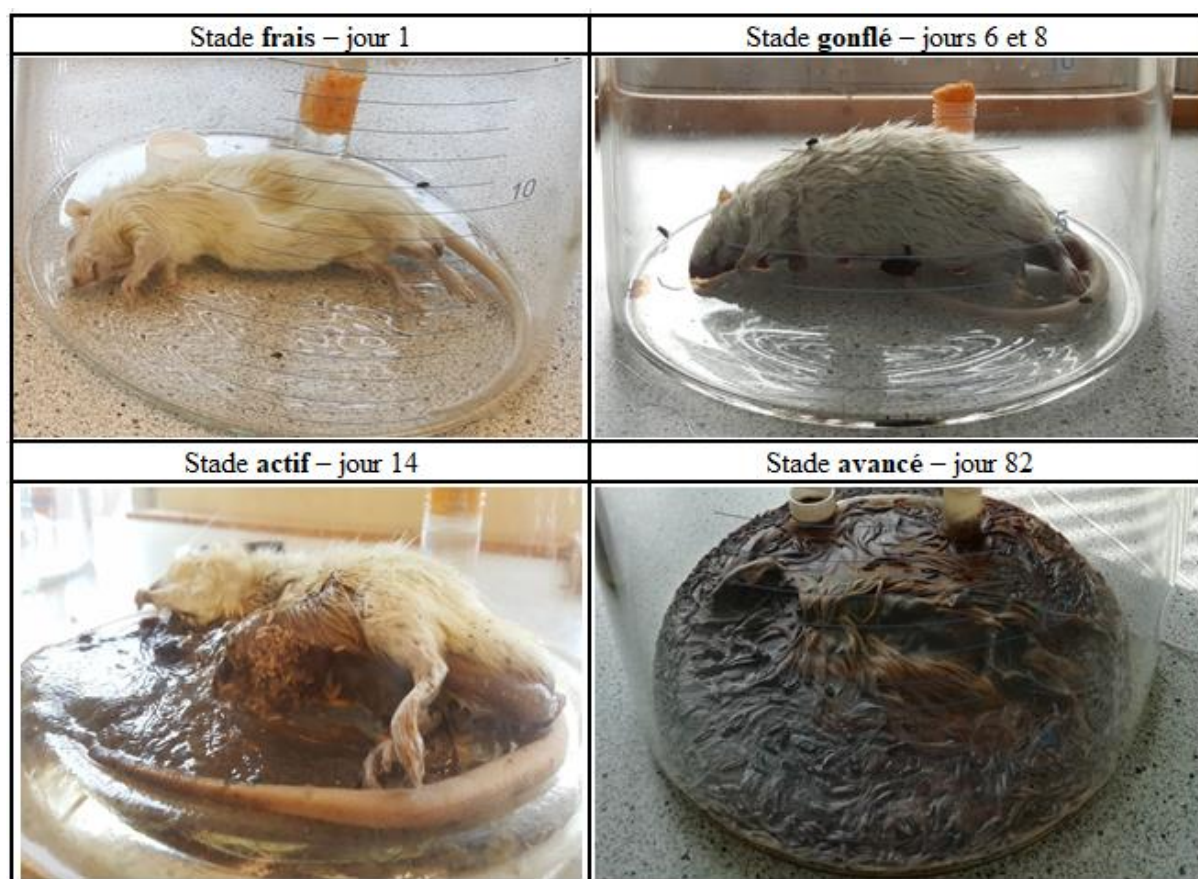
Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

Une partie des résultats présentés ci-dessous ont permis la publication d'un article (Martin *et al.*, 2020) (Annexe 4)

Description du processus de décomposition

Le processus de décomposition a débuté le 28 février 2019 et a été arrêté lorsque le stade de décomposition avancé a été identifié (24 mai 2019). La durée des différents stades de décomposition était variable. Le stade frais a en moyenne duré $7,0 \pm 0,6$ jours (*i.e.* jusqu'aux premiers gonflements). Le stade de gonflement a également en moyenne duré 7 ± 0.6 jours. En effet, les premiers dégonflements évidents caractérisant le début du stade actif ont été observés au jour 14 de l'expérimentation pour chaque rat. Pendant ce stade, des masses larvaires ainsi que des écoulements de fluides internes ont été observés. Des larves ont été expulsées avec les écoulements et leur taux de mortalité est monté à près de 100%. La durée de ce stade était d'environ deux mois. Au jour 82, il ne restait que de la peau, des poils et du cartilage, les rats étaient tous en stade avancé. Le processus de décomposition a été arrêté directement après l'identification du stade de décomposition avancé lorsqu'il ne restait que poils, peau et os (Tableau 1). La durée totale de ce stade n'a donc pas pu être déterminée. Une température moyenne de $18,0 \pm 1,6$ °C et une humidité moyenne de $45,1 \pm 4,9$ % ont été enregistrées pendant la décomposition.

Tableau 1. Illustration des différents stades de décompositions par lesquels sont passés les rats.



Tests électrophysiologiques

L'objectif de ces tests était d'évaluer la réponse électrophysiologique de *D. frischii* envers différents stades de décomposition (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé).

L'électroantennographie a permis d'observer que l'odeur des différents stades de décomposition était perçue différemment selon le stade. De plus, il a été observé que les mâles et les femelles ne répondent pas de manière similaire à l'odeur de ces stades de décomposition. En effet, les mâles *D. frischii* ont la capacité de percevoir l'odeur de chaque stade de décomposition à l'exception du stade frais. Aucune différence de réponse n'a été observée entre l'odeur du stade frais et l'odeur du contrôle ($t_{36} = -1,73$; $p = 0,09$). Par contre, l'odeur de tous les autres stades de décomposition induisait une réponse significativement différente du contrôle chez les mâles testés (gonflé vs contrôle: $t_{36} = -2,42$; $p = 0,02$; actif vs contrôle: $t_{36} = -4,14$; $p < 0,001$ et avancé vs contrôle: $t_{36} = -5,18$; $p < 0,001$). De plus, la réponse antennaire observée était plus importante lorsque les mâles étaient exposés aux odeurs des stades de décomposition les plus avancés. Ceci n'a pas été observé chez les femelles (Figure 9). A l'inverse les femelles perçoivent uniquement les composés émis lors du stade de décomposition avancé (frais vs contrôle : $t_{36} = -1,891$; $p = 0,067$; gonflé vs contrôle : $t_{36} = -1,164$; $p = 0,252$; actif vs contrôle : $t_{36} = -1,309$; $p = 0,199$; avancé vs contrôle : $t_{36} = -2,618$; $p = 0,013$) (Figure 9).

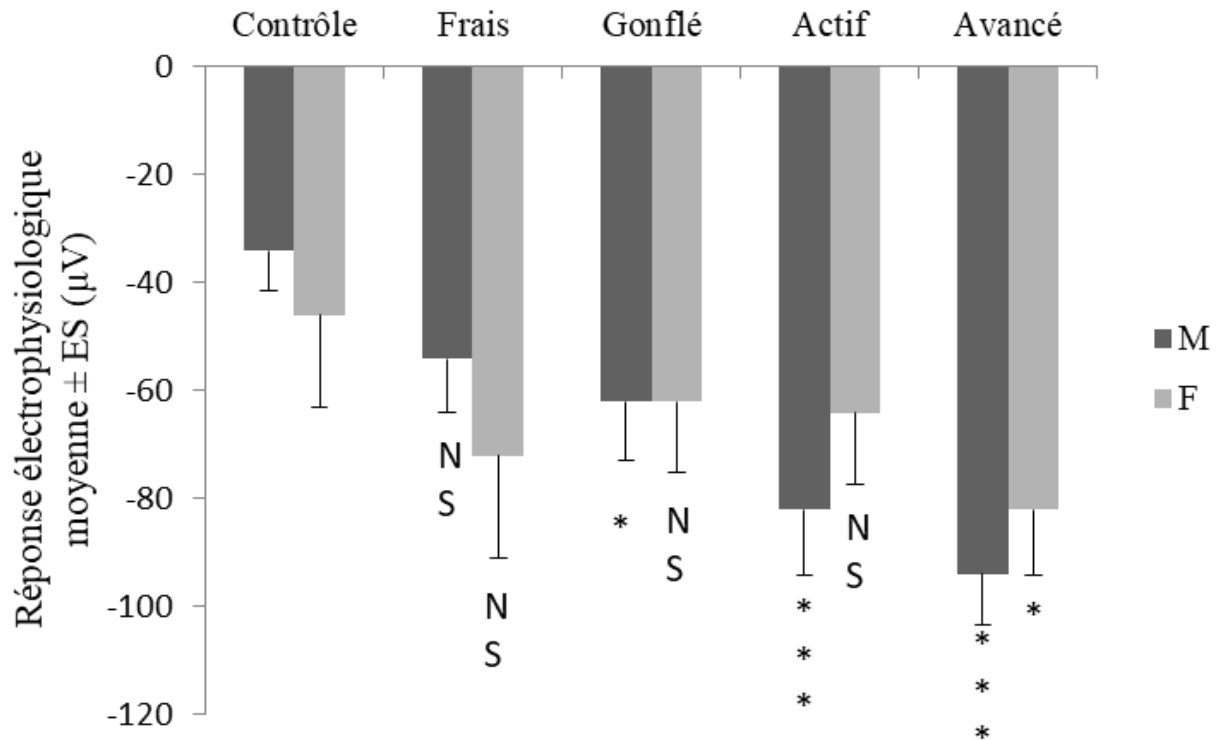


Figure 9. Réponse électrophysiologique moyenne des antennes mâles (M) et femelles (F) à l'odeur émise par les différents stades de décomposition ($\mu\text{V} \pm \text{ES}$). *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : Non Significatif. Figure adaptée de (Martin et al., 2020).

Tests comportementaux

Les tests comportementaux ont permis d'identifier les stades de décomposition attirant les individus mâles et femelles *D. frischii*.

Selon le stade de décomposition, l'attraction des Coléoptères nécrophages était variable (Figure 10). Le modèle linéaire généralisé à effets mixtes (GLMM) n'a mis en évidence aucun effet des facteurs aléatoires lors des tests comportementaux et cela peu importe le sexe de l'insecte testé ou le stade de décomposition. En effet, ni les lots d'insectes testés en même temps, ni les rats dont provenaient les compresses n'ont un effet sur la réponse comportementale des individus testés. Dès lors, le modèle linéaire généralisé simple (GLM) a pu être utilisé pour la suite des analyses statistiques. Dans un premier temps, la réponse comportementale des insectes aux différents stades de décomposition dépend de leur sexe ($F_{1,715}=8,56$; $p=0,003$). Comme les mâles et les femelles ne répondaient pas de la même manière, les analyses statistiques ont été réalisées séparément pour chaque sexe (Figure 10). Les individus mâles ont été attirés par les COVs émis lors des stades de décomposition actif et avancé et n'ont montré aucun intérêt pour les stades frais et gonflé (stade frais : $p=0,673$; stade gonflé : $p=0,293$; stade actif : $p=0,059$; stade avancé : $p=0,001$). En ce qui concerne les femelles, aucun des stades de décomposition testés ne les ont attirées significativement plus que l'odeur des compresses « contrôles » (stade frais : $p=0,0934$; stade gonflé : $p=0,883$; stade actif : $p=0,883$; stade avancé : $p=0,673$).

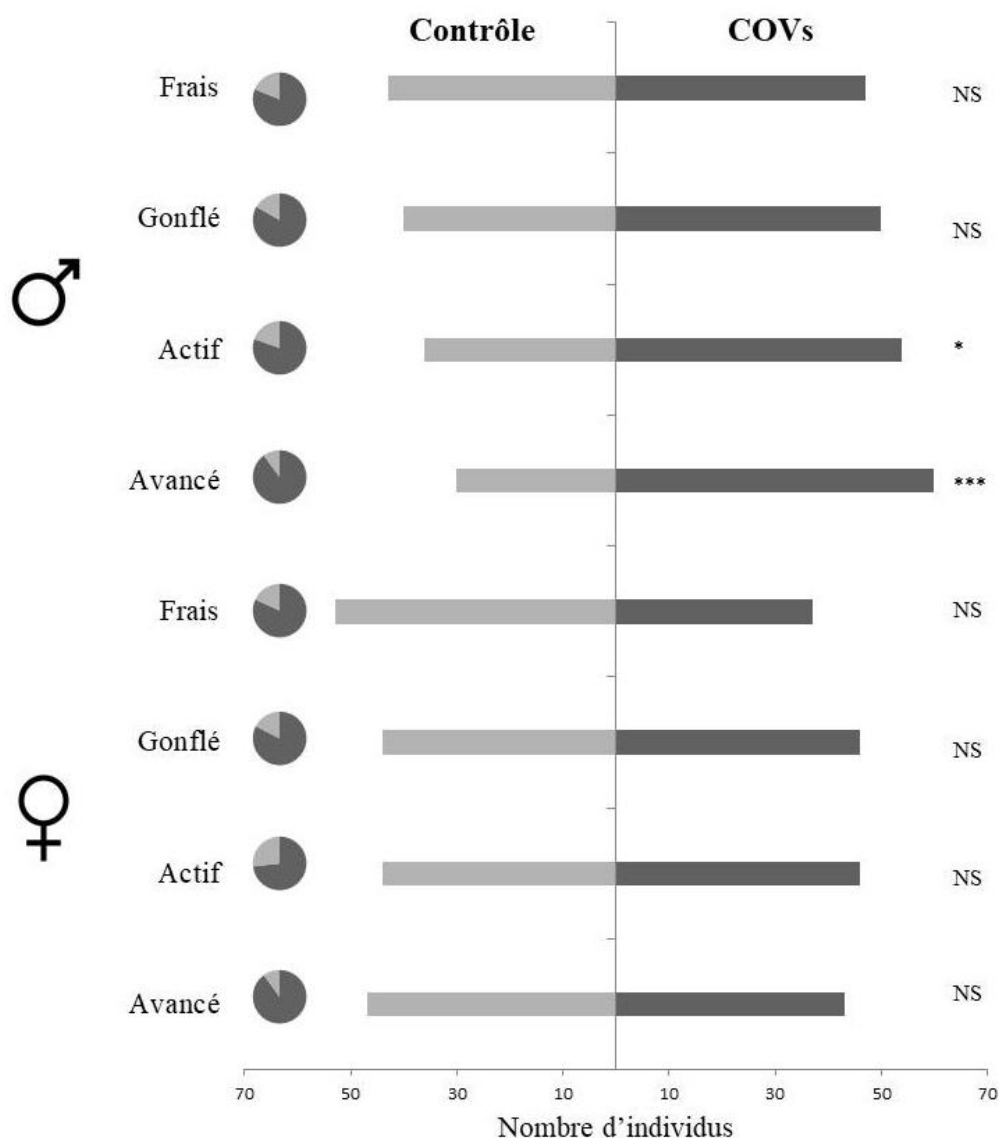


Figure 10. Illustration de l'attractivité des différents stades de décomposition (frais, gonflé, actif, avancé) pour les Coléoptères nécrophages *D. frischii* selon que l'individu soit de sexe mâle ou femelle. De gauche à droite, les diagrammes circulaires indiquent les proportions d'individus répondants ; les réponses comportementales des mâles et des femelles aux COVs associés à chaque stade de décomposition sont représentées à l'aide des diagrammes en bâtonnet. *** : $p < 0,001$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$; NS : non significatif. Figure adaptée de (Martin et al., 2020).

Analyses des COVs cadavériques émis par les différents stades de décomposition

Les prélèvements d'odeur et leur analyse en GC/ms avaient pour but de dresser le profil odorant de chaque stade de décomposition et de d'en identifier les différences. Les composés cadavériques adsorbés sur les compresses sont répertoriés dans le tableau 2. Selon les stades de décomposition le nombre de composés identifiés était relativement variable (stade frais : $n=9$; stade gonflé : $n=6$; stade actif : $n=4$; stade avancé : $n=7$) (tableau 2). Le stade frais était principalement constitué d'alcane (*i.e.* éicosane) et d'alcools (*i.e.* éthanol), tout comme le stade gonflé. Pendant le stade actif, acides carboxyliques (*i.e.* acide phosphonique), composés aromatiques (*i.e.* indole) et cétones (*i.e.* dihydroxyacétone) ont été détectés. Enfin, le profil

odorant du stade avancé contenait des acides carboxyliques (*i.e.* butanoïque) et des amines (*i.e.* la tétraméthylpyrazine).

Tableau 2. Ensemble des COVs détectés pour chacun des différents stades de décomposition étudiés.

COV	Frais	Gonflé	Actif	Avancé
Acides carboxyliques				
Acide propanoïque, 3-hydroxy-, methyl ester	x			
Acide acétique	x			
Acide phosphonique 1			x	
Acide phosphonique 2			x	
Acide propanoïque, 3-hydroxy-, methyl ester				x
Acide propanoïque 3				x
Acide butanoïque				x
Acide phosphonique 1				x
Alcools				
Ethanol	x			
1,2-Ethanediol	x			
1-Octanol, 2-butyl-	x			
Ethanol		x		
n-Tridecan-1-ol		x		
1-Octanol, 2-butyl-				x
Aldéhydes				
Octanal	x			
Composés aromatiques				
Benzene, n-butyl-		x		
Indole			x	
Cétones				
2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one		x		
Dihydroxyacetone			x	
Hydrocarbures				
Propane, 2-fluoro-	x			
Hexadecane, 1-iodo-	x			
Eicosane	x			
Eicosane		x		
Oxétanes				
2-Ethyl-oxetane		x		
Sulfure				
Pyrazine, tetramethyl-				x
2,3,5-Trimethyl-6-propylpyrazine				x
Total	9	6	4	7

La perMANOVA a permis de démontrer une différence de profil odorant entre les stades de décomposition ($F_{3,12}=3,648$; $p=0,001$). L'ACP (figure 11) illustre les différences identifiées à l'aide de la perMANOVA. En effet, aucune ellipse ne se chevauche. Le stade frais est le seul à se trouver à droite de la première dimension. Le stade gonflé peut être distingué des autres stades de décomposition selon la seconde dimension. Les stades actifs et avancés, quant à eux sont relativement proches et devraient donc présenter des profils odorants plus similaires comparativement aux autres.

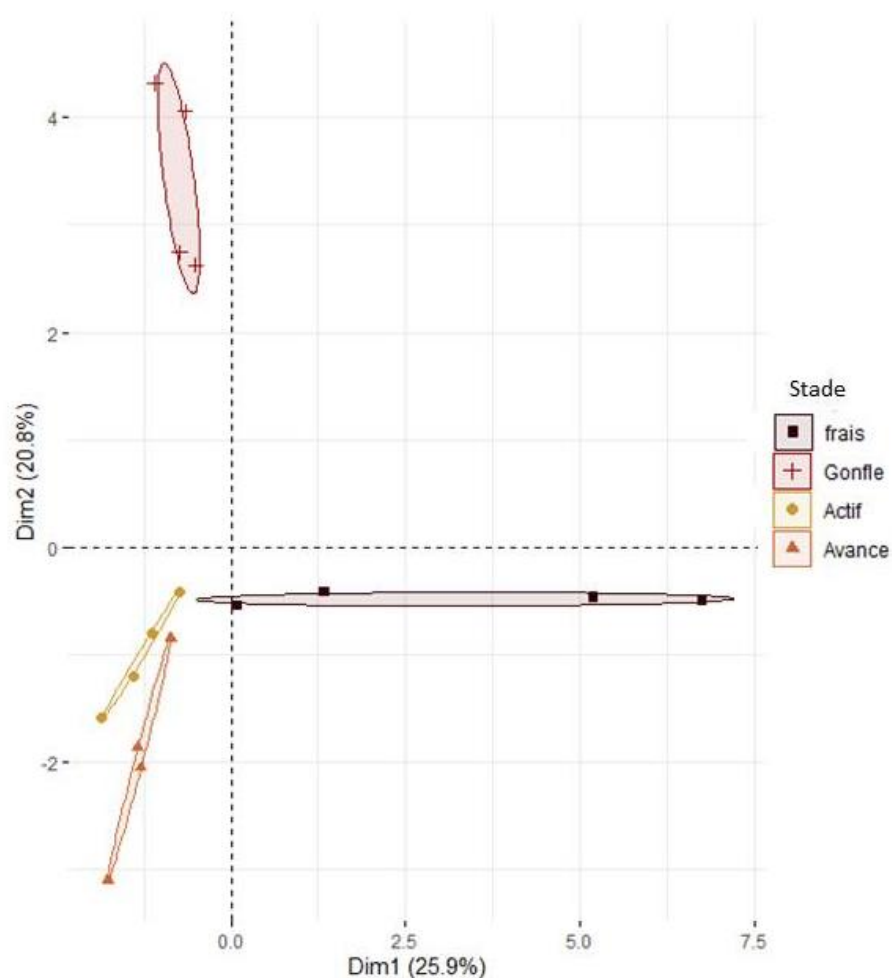


Figure 11. Analyse en composantes principales illustrant la différence de composition en COVs cadavériques adsorbés sur les compresses lors de chaque stade de la décomposition. Figure adaptée de (Martin *et al.*, 2020)

La première dimension est majoritairement représentée par des alcanes et des alcools mais aussi par quelques acides carboxyliques ainsi qu'un aldéhyde. Les composés qui expliquent au mieux cette dimension (>5%), par ordre décroissant de contribution sont : l'acide acétique, l'octanal, le 1,2-éthanediol, le 2-fluoropropane, l'écicosane, le 1-iodo-hexadecane, le 2-butyloctan-1-ol, l'éthanol et l'acide 3-hydroxy-méthylester-propanoïque. La seconde dimension est représentée par des acides carboxyliques, des alcools, des composés soufrés et un cétone. Les composés qui expliquent au mieux cette dimension (>5%), par ordre décroissant de contribution sont : le n-tridecan-1-ol, le 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one, le 2-éthylloxétane, l'acide butanoïque et l'éthanol.

Partie 2 : Etude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

Les résultats présentés ci-dessous ont contribué à la rédaction d'un article actuellement en cours de révision (Martin *et al.*, 2020)(Annexe 5).

La composition de chacun des sols a été déterminée. Le sol limoneux était composé de 33,3% de sable, 24,6% de limon grossier, 24,8% de limon fin et 17,3% d'argile. Le sol sablo-limoneux était composé de 63,2% de sable, 13,5% de limon grossier, 13,2% de limon fin et 10,1% d'argile.

Deux mois après le début de l'expérience, lors de l'exhumation des rats, il a été observé que tous les rats ont atteint le même stade de décomposition *i.e.* le stade « restes secs ». Seulement poils, de la peau et des os ont été retrouvés et ce, peu importe la texture du sol. Cependant, les rats retirés du sol sablo-limoneux étaient plus humides que ceux exhumés du sol limoneux. De plus, plus de bouts de sol étaient collés sur les rats issus du sol sablo-limoneux que sur ceux du sol limoneux. La température moyenne atteinte à 20 centimètres de profondeur était de $16,5 \pm 0,1$ °C.

L'analyse de la variance par permutation (perMANOVA), réalisée à l'aide des données issues des analyses chromatographiques en phase gazeuse (Annexe 3), montre que la présence d'un rat influence le profil odorant du sol peu importe sa texture ($F_{1,31}=3,6405$; $p=0,009$). Lorsqu'on répète les mêmes analyses mais avec distinction des couches cette fois, la présence d'un rat impacte le profil odorant du sol entre les différentes couches ($F_{3,31}=10,774$; $p=0,001$). En effet, une distinction significative de COVs émis par couche est observée. Dès lors, l'impact de la décomposition sur le sol dépend de la profondeur de prélèvement du substrat.

De plus, en fonction de la texture de sol, une différence significative d'émission des COVs est mise en évidence par la présence d'un rat ($F_{9,31}=2,63$; $p=0,001$). Par conséquent, les prochaines sections de ce mémoire seront traitées séparément pour le sol limoneux et le sol sablo-limoneux.

Caractérisation du profil odorant de tombe composée de sol limoneux

Une différence significative de profil odorant est observée selon qu'un rat en décomposition soit présent dans le sol ou non ($F_{1,15}=2,775$; $p=0,05$) (Figure 12). Il apparaît également que, selon la couche de sol considérée, l'impact du rat sur celle-ci n'est pas identique. La distance entre les restes en décomposition et le substrat de sol prélevé a donc un impact sur l'adsorption des composés ($F_{4,15}=3,042$; $p=0,004$). Ceci est illustré sur l'ACP (Figure 13). Bien que l'ensemble des couches semblent être impactées par la présence d'un rat (Figure 13), la couche 1 a un profil odorant proche de celui de la couche 2. Il en est de même entre les couches 3 et 4. L'ensemble des différents composés identifiés au sein de chacune des couches sont repris dans la table 3. La première ($n=22$) et seconde ($n=21$) couches sont principalement caractérisées par des alcanes et des alcools. La troisième couche ($n=39$) est la couche dans laquelle le plus de COVs ont été identifiés. Son profil odorant se compose principalement d'hydrocarbures mais également d'alcools, de cétones, de composés aromatiques, d'acides carboxyliques. Enfin, la quatrième couche ($n=35$) est la couche étant la plus diversifiée en termes de familles chimiques de COVs. On y retrouve notamment des hydrocarbures, alcools, cétones, esters, aldéhydes, acides carboxyliques. Certains composés comme le

diméthyldisulfure, le 2,4-diméthylhept-1-ène et le 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol sont retrouvés dans toutes les couches de sol limoneux.

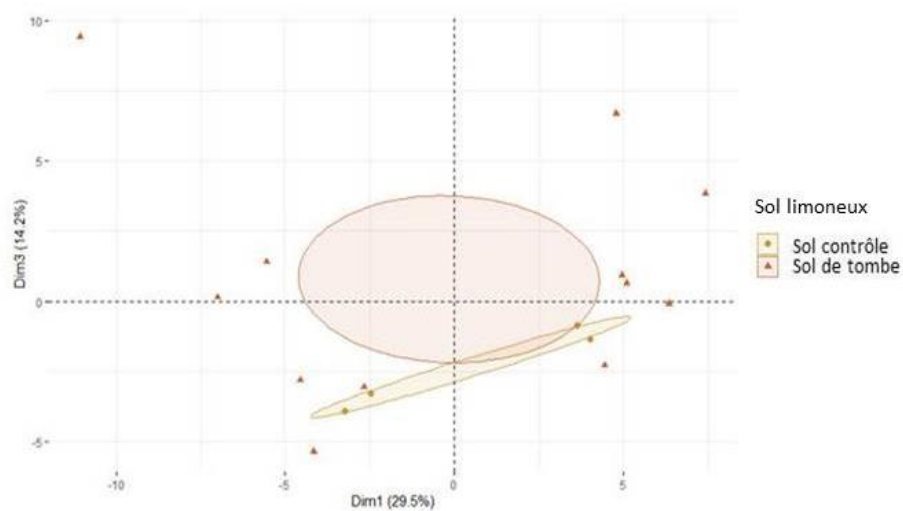


Figure 12. Analyse en composantes principales du sol limoneux en présence d'un rat d'une part (sol de tombe), en l'absence de ce dernier (sol contrôle) d'autre part.

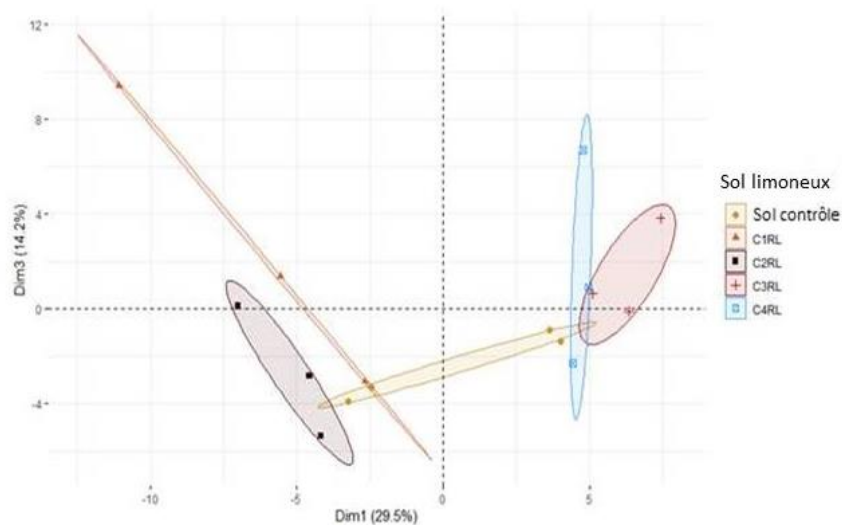


Figure 13. Analyse en composantes principales pour le sol limoneux différenciant le profil odorant de chaque couche de sol limoneux (C = couche ; RL = présence d'un rat dans un sol limoneux).

Tableau 3. Liste des COVs détectés dans les différentes couches de sol limoneux (L) et sablo-limoneux (S).

COVs	Contrôle L	L1	L2	L3	L4	Contrôle S	S1	S2	S3	S4
Acides carboxyliques										
Acide benzoïque					x				x	x
Acide formique, hexyl-ester-				x					x	
Acide octanoïque, octyl-ester				x					x	
Acide phtalamique					x					
Acide 1,2-Benzenedicarboxylique, bis-2-méthylpropyl ester			x						x	
Alcools										
Cyclobutanol, 2-éthyl-					x					x
Glycérol, 1,2-diacétate				x					x	
Tridecan-1-ol				x					x	
Decali-9-ol, 1,10-diméthyl-										x
Decan-1-ol, 2-méthyl-		x								
Octanol, 2,7-diméthyl-		x	x				x	x		
Octen-3-ol				x	x				x	x
Méthyl-dodecanol		x	x				x	x		
1-Heptanol, 2-isopropyl-5-méthyl-	x	x	x	x	x		x	x	x	x
Propanol, 1-méthoxy-				x					x	
Octanol					x					x
Aldéhydes										
Hexanal, 2-éthyl-					x					
Octenal, 2-butyl-	x									
Hydroxy-7-nonanal						x				
Benzaldéhyde				x	x					x
Anhydride phénylmaléique					x					
Composés aromatiques										
Ethylbenzène				x		x	x		x	
2,4-Di,tert-butylphénol	x			x					x	
Carbonic acid tridecyl vinyl ester					x					
Cétones										
Octen-3-one				x	x				x	x
Heptanone, 4-méthyl-			x						x	
Heptanone					x					x
Octanone				x	x				x	x
Acétophenone					x					x
Composés organosulfurés										
Diméthyltrisulfure				x					x	x
Diméthyl-disulfure	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Esters										
Dibutyladipate	x			x	x	x			x	x
2,2,4-Triméthyl-1,3-pentanediol diisobutyrate									x	
2-Ethylhexyl-acrylate					x					x
Hydrocarbures										

1,4,7-Cycloundecatriène, 1,5,9,9-tetraméthyl-					x					x
Ethyl-3-méthylcyclohexane					x					x
Ethyl-4-méthylcyclohexane					x				x	
Méthylène chloride	x		x	x					x	
D.Limonène									x	
Sesquiterpènes										
Caryophyllène		x			x	x		x		x x
Terpènes										
Acétate de linalyle				x	x		x		x	x
Total	17	22	21	39	35		15		23	13 46 25

Le modèle prédictif généré à partir des données issues des prélèvements d'odeurs sur les différentes couches de sol limoneux a une erreur de 37,5%. Les COVs indicateurs de la décomposition d'un corps dans un sol limoneux sont le diméthyldisulfure ($G=0,369$), le 2,3,7-triméthyl-octane ($G=0,342$), le 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol ($G=0,283$) et le 1-octen-3-one ($G=0,102$) par ordre d'importance.

Caractérisation du profil odorant de tombe composée de sol sablo-limoneux

Il ressort de la figure 14 que la présence d'un cadavre dans un sol sablo-limoneux n'affecte pas son profil odorant (Figure 14). Cette observation est soutenue par le test perMANOVA ($F_{1,15}=1,901$; $p=0,120$). Cependant, il apparaît tout de même que le volatilome des différentes couches est influencé par la présence d'un rat ($F_{4,15}=2,999$; $p=0,011$). En effet, après visualisation de l'ACP (Figure 15), les couches 3 et 4 semblent être les plus impactées par la présence d'un rat en décomposition. De plus, selon la couche de sol prélevée autour du rat, l'impact du rat sur le profil odorant de la couche n'est pas homogène au sein du sol ($F_{3,15}=5,259$; $p=0,001$).

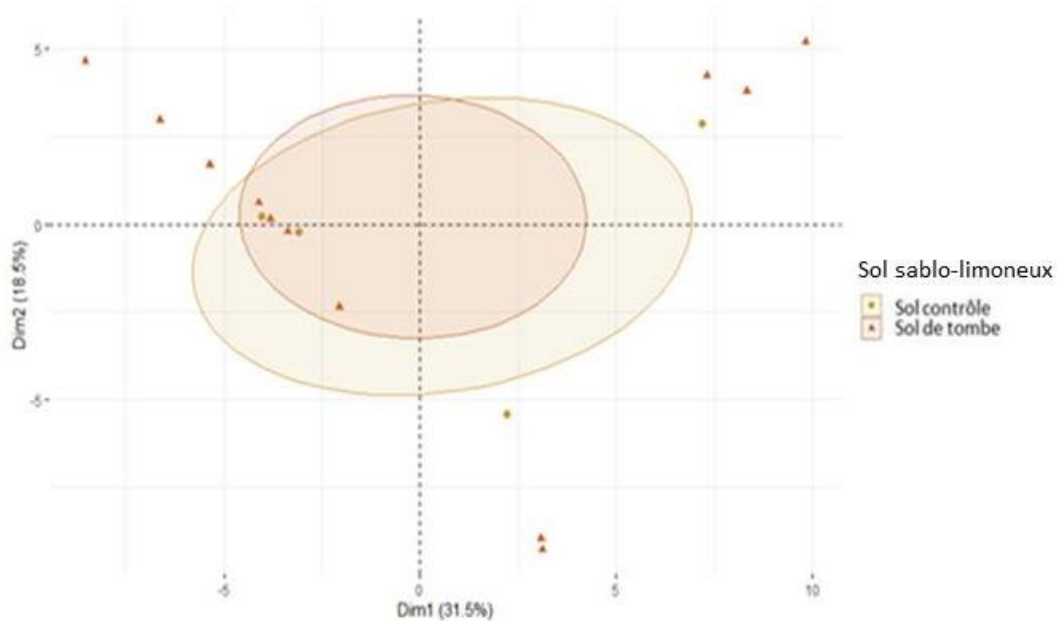


Figure 14. Analyse en composantes principales le sol sablo-limoneux en présence d'un rat (sol de tombe) d'une part, en l'absence de ce dernier (sol contrôle) d'autre part.

Lorsque les couches sont comparées entre elles, leurs profils odorants s'avèrent être tous distincts à l'exception de ceux des couches 1 et 2 (C1 vs C2 : $p=0,65$; C1 vs C3 : $p=0,03$; C1 vs C4 : $p=0,04$; C2 vs C3 : $p=0,04$; C2 vs C4 : $p=0,03$; C3 vs C4 : $p=0,03$). En effet, après observation de la figure 15, les ellipses ne se chevauchent pas à l'exception de celles des deux premières couches. De plus, la couche 3 semble être celle dont le profil odorant est le plus distinct des autres. De fait, cette couche est séparée des deux premières par la dimension 1 et de la couche 4 par la dimension 2.

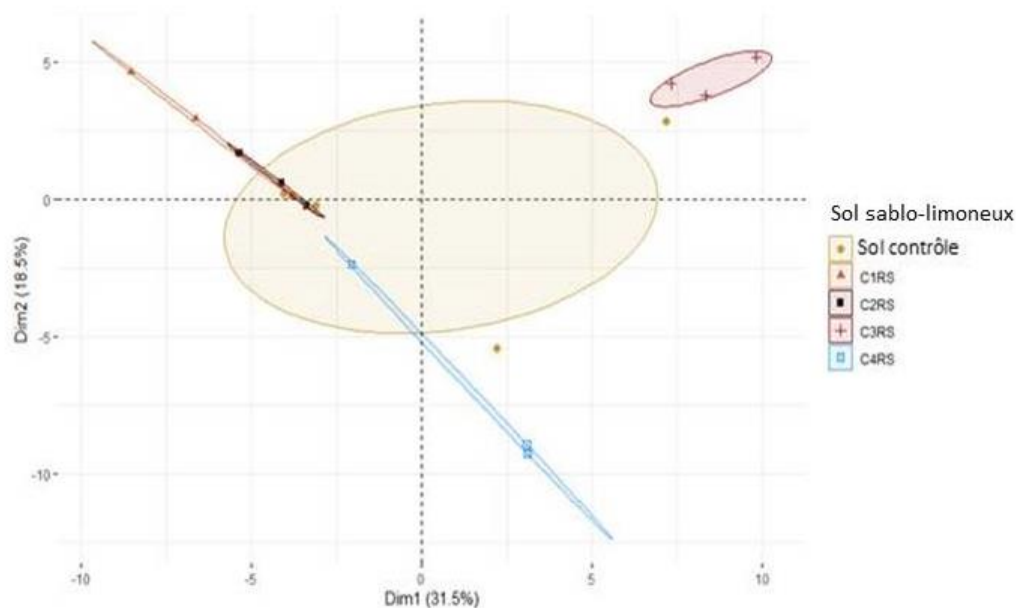


Figure 15. Analyse en composantes principales différenciant le profil odorant de chaque couche de sol pour le sol sablo-limoneux (C = couche, R = présence d'un rat, S = sol sablo-limoneux).

L'ensemble des composés émis par les différentes couches qui ont été identifiés sont répertoriés dans le tableau 3. Le profil odorant de la couche 1 (n=23) est principalement constitué d'hydrocarbures et d'alcools. La couche 2 (n=13) est celle où le moins de composés ont été détectés et est également la moins diversifiée. Elle est également composée d'hydrocarbures, d'alcools. Tout comme le sol limoneux, la troisième couche (n=46) est celle contenant le plus de composés différents. Elle se compose, par ordre d'abondance, d'hydrocarbures, d'alcools, d'acides carboxyliques, de cétones et de composés aromatiques. De nombreux composés identifiés ne se retrouvent que dans cette couche. Comme pour toutes les autres couches, la couche 4 (n=25) présente une majorité d'hydrocarbures mais aussi des alcools, des cétones, des composés organosulfurés et des esters. Le diméthyldisulfure se retrouve dans toutes les couches et le diméthyltrisulfure seulement dans les couches 3 et 4.

À nouveau, un modèle prédictif a été généré à partir des données issues des prélèvements d'odeurs sur les différentes couches de sol et présente une erreur de 31,25%. Seuls le diméthyldisulfure ($G=0,717$) et le 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol ($G=0,211$) semblent pouvoir être considérés comme prédicteurs de la décomposition d'un corps pour cette texture de sol.

Discussion

Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

L'objectif de cette partie était d'évaluer l'attractivité des différents stades de décomposition d'un cadavre envers les individus adultes *D. frischii*. Cet objectif implique de démontrer l'aptitude de ceux-ci à percevoir et à répondre aux COVs issus des différents stades (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé). Il est à noter que l'environnement était suffisamment contrôlé pour ne pas impacter le comportement des insectes puisqu'aucun effet « lot » n'a été révélé par les analyses statistiques alors que les tests ont été effectués sur plusieurs semaines. De plus, le profil odorant émis par chaque rat n'étant pas impacté par l'individu rat lui-même, les résultats présentés peuvent être considérés comme représentatifs et répétables.

Dans la présente étude, les quatre rats étudiés sont passés par les quatre stades de décomposition ciblés (*i.e.* frais, gonflé, actif et avancé). Cela reflète que la décomposition était représentative d'une décomposition naturelle. En effet, les changements physiques observés par les rats dans les cuves, ont globalement été similaires à ceux décrits dans les études déjà réalisées sur rats (Kocárek, 2003; Dupont *et al.*, 2012; Keshavarzi *et al.*, 2015) et autres vertébrés (Payne, 1965; Bourel *et al.*, 1999; Centeno *et al.*, 2002; Grassberger & Frank, 2004; Sharanowski *et al.*, 2008; Özdemir & Sert, 2009; Kelly *et al.*, 2013). Lors du stade frais, aucune odeur n'était perceptible et aucun changement physique n'a été observé pour les quatre rats étudiés. Cela coïncide avec les propos jusqu'à présent mentionnés dans la littérature (Grassberger & Frank, 2004; Sharanowski, *et al.*, 2008; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Özdemir & Sert, 2009). L'ensemble des rats sont passés par le gonflement caractérisant le stade gonflé. Ce gonflement a également été observé dans d'autres études en lien avec la décomposition (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Amendt *et al.*, 2010). Des masses larvaires étaient présentes sur les cadavres lors du stade actif. Ces masses ont déjà été référencées dans la littérature (Matuszewski *et al.*, 2008; Sharanowski *et al.*, 2008; Goff, 2009). Néanmoins, ces masses étaient situées au niveau sub-abdominal. Pourtant, dans de précédentes études, les masses larvaires sont généralement observées au niveau des orifices naturels (Amendt *et al.*, 2004; Leblanc & Logan, 2010; Charabidze *et al.*, 2011; Rivers & Dahlem, 2014). Il serait donc probable que, dans le cas de ce mémoire, les mouches aient pondu au niveau de l'anus et que les larves aient mangé les rats de l'intérieur et donc progressé jusqu'au niveau sub-abdominal. Le stade avancé a été marqué par un assèchement du cadavre ainsi que par l'observation de lambeaux de peau, d'os et de poils. En effet, les larves ne se nourrissent que des tissus mous des corps en décomposition (Matuszewski *et al.*, 2008; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2019). Une fois la chair consommée, le cadavre n'est plus une source de nourriture intéressante pour les larves de Diptères (Mann *et al.*, 1990; Matuszewski *et al.*, 2008).

L'ensemble du processus de décomposition s'est néanmoins déroulé plus lentement qu'en situation naturelle (*i.e.* dans le cas où le cadavre aurait été exposé et accessible à une

multitude d'arthropodes). Ce fait a déjà été observé et confirmé dans de précédentes études (Payne, 1965; Abell *et al.*, 1982; Kocárek, 2003; Kelly *et al.*, 2013). Les cuves étant hermétiques, il était impossible pour les insectes extérieurs d'atteindre les rats et donc seuls les individus de *L. sericata* insérés au début de l'expérience ont participé à la décomposition des rats morts. Dès lors, ces Diptères, connus pour faire partie des premiers colonisateurs de cadavres (Charabidze, 2008; Charabidze, 2013), ont été utiles pour débiter la décomposition. Deux rats ont atteint le stade gonflé après 6 jours et deux autres après 8 jours. Ce phénomène n'est pas exceptionnel. En effet, il a déjà été décrit que selon les cas et les conditions climatiques et environnementales, le stade gonflement n'est pas toujours phasé pour des cadavres qui ont été mis à décomposer au même moment (Wilson *et al.*, 2007; Sharanowski *et al.*, 2008). Certaines études ont démontré que l'exposition au soleil est également un facteur influençant le processus de décomposition et donc la durée des stades (Sharanowski *et al.*, 2008). Les cuves hermétiques étant placées devant une fenêtre, il se pourrait que les différents rats n'aient pas été exposés au soleil à période égale et cela pourrait donc expliquer le léger décalage observé entre la décomposition des cadavres. Malgré les nombreuses similarités observées avec d'autres études, chaque décomposition est unique car de nombreux facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer ce processus complexe (Rodriguez, 1982; Mann *et al.*, 1990; Tantawi *et al.*, 1996; Kocárek, 2003; Gunn, 2006; Rivers & Dahlem, 2014; Verheggen *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2019).

Dans la présente étude, les résultats obtenus montrent que les individus *D. frischii* ne sont pas attirés par tous les stades de décomposition. En effet, les stades de décomposition les plus avancés sont plus attractifs. Cela coïncide avec des études de terrains où les Dermestidae sont communément observés et recensés en fin de décomposition (*i.e.* à partir du stade actif ou avancé selon les études) (Campobasso *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2008; Sharanowski *et al.*, 2008; Yones *et al.*, 2010; Dupont *et al.*, 2012; Matuszewski *et al.*, 2013). Ce phénomène d'attraction préférentielle n'est pas uniquement observé chez *Dermestes frischii*. Les Silphidae ont également été référencés davantage lors de ces stades (Bourel *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2008; Sharanowski *et al.*, 2008; Feddern *et al.*, 2019). En ce qui concerne les Silphidae, des études de laboratoire visant à caractériser leur comportement ont révélé qu'ils étaient beaucoup plus attirés par l'odeur des stades de décomposition les plus avancés (von Hoermann *et al.*, 2013; von Hoermann *et al.*, 2016). Une seule étude s'est intéressée aux coléoptères de la famille des Dermestidae (von Hoermann *et al.*, 2012). Cette étude consacrée à *Dermestes maculatus* a également montré que les stades de décomposition avancés étaient plus attractifs que les stades de décomposition les plus précoces. Cela est en concordance avec ce qui a été observé lors de ce mémoire.

L'électroantennographie a montré une différence de capacité à percevoir les COVs des différents stades de décomposition entre les mâles et femelles *D. frischii*. En effet, une réponse antennaire était induite pour tous les stades à l'exception du stade frais chez les mâles alors que les femelles ne réagissaient qu'au stade avancé. Cette différence de réponses électrophysiologiques entre les sexes a déjà été observée pour *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Coléoptères Silphidae) (Dekeirsschieter *et al.*, 2013). Cependant, les tests comportementaux ont révélés les individus mâles *D. frischii* ne sont attirés que par les stades

de fin de décomposition alors que les femelles ne sont attirées par aucun de ces stades. De tels faits ont déjà été étudiés sur *Dermestes maculatus* De Geer (von Hoermann *et al.*, 2011). Deux hypothèses découlent de ces résultats : comme *D. frischii* n'est pas attiré par tous les stades de décomposition, il est probable qu'il ait besoin de percevoir non pas un seul mais un ensemble de COVs pour se rendre sur un corps en décomposition (Kalinová *et al.*, 2009; von Hoermann *et al.*, 2011; von Hoermann *et al.*, 2012). Une autre piste est qu'il soit capable de réagir différemment en fonction de la concentration des COVs cibles. De fait, la concentration des COVs émis détermine l'effet qu'un composé exerce sur les insectes nécrophages, *i.e.* s'il agit comme attractant ou comme répulsif (Boeckh *et al.*, 1965; Dekeirsschietter *et al.*, 2013; Verheggen *et al.*, 2017). Par exemple, la putrescine est répulsive pour les mâles *T. sinuatus* à une certaine dose et attractive à une autre dose (Dekeirsschietter *et al.*, 2013). En ce qui concerne les réponses des femelles, l'attraction de Coléoptères femelles vers une carcasse par émissions de phéromones par les mâles a déjà été la cible de plusieurs études mais leurs résultats respectifs divergent. En effet, cette attraction a été vérifiée sur *Nicrophorus vespilloides* Herbst (Coléoptères : Silphidae) par Haberer *et al.* (2008). Toutefois, les résultats de l'étude menée par Kalinová *et al.* (2009) suggèrent que tant les individus mâles que les individus femelles de *N. vespillo* et *N. vespilloides* pourraient localiser un cadavre sur base de mêmes sources d'informations. Dès lors, il se pourrait également que les phéromones relâchées par les individus mâles présents sur le cadavre soient des phéromones d'agrégation et non sexuelles. Les COVs émis par les dits mâles attireraient soit uniquement les femelles, soit les femelles ainsi que d'autres mâles. (Francke & Dettner, 2005; von Hoermann *et al.*, 2011). En l'absence de phéromones sexuelles émises par les mâles, les individus femelles pourraient ne présenter aucun signe d'attraction pour une source d'odeur cadavérique et ce, quel que soit le stade. Cette hypothèse coïncide avec les propos tenus dans l'étude menée par von Hoermann *et al.* (2012). Les mâles, une fois sur le cadavre, émettraient des signaux chimiques (*i.e.* phéromones) attirant les femelles. Ces derniers, couplés ou non à l'odeur cadavérique, attireraient les femelles sur le corps afin de s'y nourrir, s'y reproduire et y pondre (von Hoermann *et al.*, 2011; von Hoermann *et al.*, 2012). Des comportements similaires ont également été recensés chez *Anthrenus sarnicus* Mroczkowski, 1963, Dermestidae non nécrophage, où les femelles libèrent une phéromone sexuelle (*i.e.* décylbutyrate) afin d'attirer les mâles (Finnegan & Chambers, 1993). Fassotte *et al.* (2014) ont également démontré que les femelles *Harmonia axyridis* Pallas, 1773, Coléoptères Coccinellidae non nécrophages, présentent un comportement d'attraction similaire (*i.e.* attraction des mâles par émission de phéromone sexuelle). Deux pistes d'études se dégagent de ces résultats obtenus lors de ce mémoire. D'une part, la mise au point d'un dispositif confrontant les femelles *D. frischii* à une source d'odeur cadavérique seule versus une source d'odeur cadavérique sur laquelle des mâles sont présents permettrait de renforcer l'idée que les mâles émettent des phéromones attirant les femelles. D'autre part, une étude plus poussée utilisant la chromatographie à phase gazeuse bidimensionnelle aiderait à repérer et identifier la (les) phéromone(s) parmi l'ensemble des COVs émis par le complexe cadavre-insecte (Kalinová *et al.*, 2009; Dekeirsschietter *et al.*, 2012). Une fois déterminées, les mêmes expériences comportementales et électrophysiologiques pourront être menées avec des COVs individuels et/ou en mélange et à différentes concentrations.

L'ACP générée concernant le profil odorant de chaque stade permet de représenter 46% de la diversité des résultats. Ce n'est pas un taux de représentativité élevé mais, dans le domaine forensique, il y a une forte probabilité d'obtenir des échantillons relativement variables étant donné que beaucoup de composés sont émis (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012). Comme dans d'autres études, les résultats ont montré que chaque stade de décomposition présente un profil odorant différent des autres (Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Verheggen *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2019). Contrairement à ce que la littérature suggère, le profil odorant du stade frais est celui dont le plus grand nombre de COVs ont été identifiés et celui du stade actif est celui ayant le moins de COVs détectés alors qu'il est connu pour être le plus odorant (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Rosier *et al.*, 2016; Verheggen *et al.*, 2017). Il se pourrait que le coton des compresses n'ait pas suffi à absorber les COVs. Le stade gonflé semble avoir un profil odorant fort différent des autres. Il est séparé des autres par la seconde dimension, ce qui suggère que les composés n-tridecan-1-ol, 2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one seraient responsables de sa distinction avec les autres stades. La méthode utilisée pour collecter les composés émanant des rats en décomposition (*i.e.* l'imprégnation de compresses stériles) ne s'est pas avérée des plus efficaces pour les analyses en GC/ms. En effet, hormis le coton de la compresse, il n'y avait pas d'autre matériel d'absorption propre, une partie de l'information pourrait donc avoir été perdue. De plus, entre la période de collecte des COVs et la période de prélèvements sur les compresses, une coupure de courant généralisée de quelques heures s'est produite au laboratoire TERRA (30/06/2019) mais également une panne de congélateur le 13/09/2019. Il n'est donc pas impossible que certains composés se soient également évaporés à ce moment. Ensuite, lors des analyses GC/ms, il se pourrait que la concentration d'une majorité de composés était trop faible et ne dépassait donc pas la limite de détection de la machine. Cette méthode n'a donc pas permis d'établir un screening précis et une quantification de l'ensemble des COVs émis par les rats en décomposition. Néanmoins, certains composés sont connus pour être émis tout au long de la décomposition et d'autres sont propres à un stade spécifique (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Verheggen *et al.*, 2017). Bien qu'ils n'aient pas été détectés par GC/ms, différents composés soufrés tels que le DMDS et DMTS sont connus pour être émis à tous les stades et pourraient même être responsables de la dépolarisation des antennes des individus *D. frischii* (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Stefanuto *et al.*, 2015; Armstrong *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2019). Ils sont également connus comme attractants pour certaines espèces de Silphidae (Kalinová *et al.*, 2009; Podskalská *et al.*, 2009; Dekeirsschieter *et al.*, 2013; von Hoermann *et al.*, 2016). Quant au butyrate de benzyle, connu pour provoquer une réponse chez *D. maculatus* (von Hoermann *et al.*, 2011), il n'a pas non plus été retrouvé dans les profils odorants.

Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

L'ensemble des analyses réalisées ont mis une évidence que la présence d'un rat en décomposition influence le profil odorant associé au sol. Cette observation a déjà été vérifiée par de précédentes études sur les sols de tombe (Vass *et al.*, 2004; Brasseur *et al.*, 2012; Dubois *et al.*, 2018). Lors de l'exhumation, les rats étaient tous au stade « restes secs ». Les caractéristiques physiques observées étaient les mêmes que ceux mentionnés dans d'autres études (Payne, 1965; Dekeirsschieter *et al.*, 2009). À savoir, de la peau des poils et des os. Néanmoins, les restes issus du sol limoneux étaient plus humides que ceux issus du sol sablo-limoneux. Dès lors, il semblerait que le sol sableux permette une meilleure aération et donc permet une meilleure évacuation que le sablo-limoneux (Forbes *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2008). Comme l'ensemble des rats utilisés lors de la présente expérience avaient tous atteint le même stade de décomposition, il semblerait qu'ici la texture de sol n'ait pas été un facteur de grande influence sur la vitesse de décomposition. Cependant, ce facteur a déjà été déterminé comme influençant la décomposition (Dent *et al.*, 2004; Tumer *et al.*, 2013). En effet, les corps se décomposent mieux dans les sols limoneux et les sols organiques que dans les sols sableux et argileux (Tumer *et al.*, 2013). En effet, les sols riches en matières organiques présentent une plus grande diversité de microorganismes et donc la décomposition y est accélérée (Dent *et al.*, 2004; Tumer *et al.*, 2013). De plus, la détection de cadavres par les chiens pisteurs est plus rapide pour les sols sableux que pour les sols argileux, probablement à cause de l'étanchéité de ces derniers (Alexander *et al.*, 2016). Dans le cas de ce mémoire, il se pourrait que les textures des deux sols étudiés n'étaient pas suffisamment distinctes pour obtenir un impact de la texture sur la décomposition des rats. Il se pourrait également que la profondeur d'échantillonnage n'ait pas été suffisamment élevée pour apercevoir un effet de la texture.

Dans la présente étude, des COVs connus pour être associés à la décomposition (*e.g.* DMDS et DMTS) ont également été détectés (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Forbes & Perrault, 2014; Perrault *et al.*, 2014; Dubois *et al.*, 2018). En effet, le DMDS a été retrouvé dans toutes les couches des différents sols étudiés. Ce composé, avec le DMTS ont déjà été répertoriés dans l'air environnant un cadavre mais également dans le profil odorant du sol directement situé sous le cadavre (Forbes & Perrault, 2014). De manière générale, la répartition de l'ensemble de COVs émis à travers les différentes couches de sol prélevées n'est pas homogène. Des facteurs tels que la polarité des différentes molécules émises, le pH et l'humidité le long de la colonne de sol en sont sans doute responsables (Brasseur *et al.*, 2012; Stadler *et al.*, 2016). De plus, plus la polarité des COVs est élevée, plus ils sont adsorbés sur les particules de sol (Brasseur *et al.*, 2012; Stadler *et al.*, 2016). L'analyse des différents profils odorants à travers la colonne de sol a également permis une distinction de la répartition des COVs émis en fonction de la texture du sol, en présence d'un rat en décomposition. Au niveau du sol limoneux, il semblerait que les COVs libérés par le corps en décomposition tendent à se répartir de manière homogène le long de la colonne de sol. Quant au sol sablo-limoneux, les couches les plus proches des restes sont les plus influencées par la décomposition du cadavre

contrairement à celles proches de la surface (Brasseur *et al.*, 2012). Brasseur *et al.* (2012) ont identifié 20 COVs spécifiques directement sous le cadavre ainsi que la présence d'alcane à toute profondeur de sol, entre la surface et les restes. Deux faits similaires ont été observés lors de l'expérience réalisée lors de ce mémoire. D'une part, des alcanes ont été détectés à travers toutes les couches de sol. D'autre part, les couches 3 et 4, étant celles à proximité directe du cadavre recelaient le plus grand nombre de COVs émis. Les composés identifiés dans les couches 3 et 4 divergent de ceux retrouvés dans le sol témoin et proviendraient des fluides cadavériques, drainés vers le fond de la tombe (Dent *et al.*, 2004; Boumba *et al.*, 2008; Tumer *et al.*, 2013). La percolation des fluides sous le cadavre est due à la gravité (Brasseur *et al.*, 2012) et peut également s'expliquer par les différences de porosité et de perméabilité des deux sols (Alexander *et al.*, 2016). La granulométrie du sable joue un rôle dans la dispersion des COVs émis, le sable ayant une texture plus grossière que le limon. Un sol sablo-limoneux est plus poreux et tend donc à être plus aéré, drainant et perméable qu'un sol limoneux, permettant aux liquides et aux gaz de circuler plus aisément (Dekker & Ritsema, 1994; Dias, 2011). Certaines études affirment que des sols riches en matières organiques tendent à avoir une activité microbienne plus importante (Hopkins *et al.*, 2000; Adserias-Garriga *et al.*, 2017). En effet, à chaque sol correspond une population microbienne (Vass *et al.*, 2008). La différence de COVs émis entre les deux sols de textures différentes mais aussi leur répartition pourraient également être expliquées par la différence d'activité microbienne de ces sols.

Afin de localiser des corps enterrés, plusieurs études se sont basées sur l'impact d'un corps en décomposition sur certaines caractéristiques biochimiques du sol environnant (*e.g.* pH, concentration en nitrogène) (Benninger *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2013). D'autres ont identifié des composés émis propres à un cadavre (Rosier *et al.*, 2015). L'identification de COVs « marqueurs » a pour but d'améliorer les capacités des chiens pisteurs à localiser un corps en surface ou enfoui dans le sol (Cablak *et al.*, 2012; Perrault *et al.*, 2014; Rosier *et al.*, 2015; Stadler *et al.*, 2016; Nizio *et al.*, 2017). Dans la présente étude, le diméthylsulfure ainsi que le 2-isopropyl-5-méthyl-heptan-1-ol ont été déterminés comme indicateurs quelle que soit la texture du sol. En plus de ces deux COVs, le 2,3,7-triméthyl-octane et le 1-octen-3-one pourraient être considérés comme indicateurs uniquement pour les sols limoneux. Le DMDS est déjà connu pour être un composé émis tout au long de la décomposition d'un corps (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Verheggen *et al.*, 2017). Sachant qu'il est également repérable lorsque le corps est enfoui, il s'avère être un bon indicateur mais il est peut-être essentiel qu'il soit parfois soit couplé à d'autres COVs car ce composé est également détectable dans d'autres situations (Kadota & Ishida, 1972; Meinardi, 2003; Rouseff *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). La reproduction de ces expérimentations sur d'autres textures de sol permettrait de définir un ensemble de composés organiques volatiles indicateurs de la présence d'un corps enterré.

Conclusion

Partie 1 : Détermination de l'attractivité des stades de décomposition cadavérique envers les Coléoptères nécrophages.

Cette étude a permis de caractériser l'attrait de *D. frischii* pour les différents stades de décomposition cadavérique. Les résultats obtenus confirment la préférence des Coléoptères pour les corps dont la décomposition est avancée. Les antennes des mâles et celles des femelles réagissent différemment aux COVs associés aux différents stades. Même si une réponse est induite chez les mâles dès les premiers stades, ils ne sont attirés que par les stades actif et avancé. Bien que les femelles détectent les COVs émis que pour le stade avancé, aucun des stades ne les attirent. Dès lors, la présence de femelles sur un corps pourrait s'expliquer par l'émission de phéromones libérées par les individus mâles. Ces phéromones, non encore identifiées, pourraient être sexuelles ou d'agrégation. Cette étude a souligné une différence de profil odorant entre les différents stades de décomposition d'un corps. Il faudrait pouvoir définir si l'attraction des insectes est due à un (ou plusieurs) COV(s) agissant individuellement et/ou si un ensemble de COVs est nécessaire, mais également déterminer leur concentration nécessaire pour que les mâles se déplacent jusqu'au cadavre. Il serait également intéressant d'identifier les phéromones, émises par les mâles, qui seraient responsables de l'attraction des femelles sur le cadavre.

Partie 2 : Étude de l'impact de la décomposition de mammifères sur le profil odorant de sols.

Tout comme les caractéristiques du sol impactent la décomposition d'un corps, la présence d'un rat en décomposition enfouit dans un sol influence le profil odorant de ce sol, quelle que soit sa texture. Il a également été observé que la répartition des COVs émis lors du processus de décomposition n'est pas homogène entre les différentes couches et varie en fonction de la texture du sol. Dans un sol limoneux, l'ensemble des COVs émis est réparti le long de la colonne de sol alors que dans un sol sablo-limoneux, ce sont les couches les plus proches du cadavre qui sont les plus impactées. La différence de porosité ainsi que la granulométrie du sable pourraient être responsables de cette distinction. Il serait intéressant de caractériser le profil odorant d'autres textures de sol afin d'approfondir les connaissances dans le domaine et de fait, améliorer la détection de sols de tombe par analyses chimiques ou par les chiens pisteurs.

Références bibliographiques

- Abell, D. H. *et al.* (1982) 'Saprophagous Arthropod Fauna Associated with Turtle Carrion', *Applied Entomology and Zoology*, 17, pp. 301–307.
- Adams, V. (2017) 'Dying: What Happens to the Body After Death.', *Dying and Death in Oncology*, pp. 23–30. doi: 10.1007/978-3-319-41861-2.
- Adserias-Garriga, J. *et al.* (2017) 'Daily thanatomicrobiome changes in soil as an approach of postmortem interval estimation: An ecological perspective', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 278, pp. 388–395. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.07.017.
- Aitkenhead-Peterson, J. A. *et al.* (2012) 'Mapping the lateral extent of human cadaver decomposition with soil chemistry', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 216(1–3), pp. 127–134. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.09.007.
- Alexander, M. B. *et al.* (2016) 'The Effects of Soil Texture on the Ability of Human Remains Detection Dogs to Detect Buried Human Remains', *Journal of Forensic Sciences*, 61(3), pp. 649–655. doi: 10.1111/1556-4029.13084.
- Amendt, J. *et al.* (2010) *Current Concepts in Forensic Entomology*.
- Amendt, J., *et al.* (2004) 'Forensic entomology', *Naturwissenschaften*, 91, pp. 51–65. doi: 10.1007/s00114-003-0493-5.
- Archer, M. S. & Elgar, M. A. (1998) 'Cannibalism and delayed pupation in hide beetles, *Dermestes maculatus* DeGeer (Coleoptera: Dermestidae)', *Australian Journal of Entomology*, 37(2), pp. 158–161. doi: 10.1111/j.1440-6055.1998.tb01564.x.
- Archer, M. S. & Elgar, M. A. (2003a) 'Effects of decomposition on carcass attendance in a guild of carrion-breeding flies', *Medical and Veterinary Entomology*, 17(3), pp. 263–271. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00430.x.
- Archer, M. S. & Elgar, M. A. (2003b) 'Yearly activity patterns in southern Victoria (Australia) of seasonally active carrion insects', *Forensic Science International*, 132(3), pp. 173–176. doi: 10.1016/S0379-0738(03)00034-3.
- Armstrong, P. *et al.* (2016) 'Establishing the volatile profile of pig carcasses as analogues for human decomposition during the early postmortem period', *Heliyon*. Elsevier Ltd, 2(2), pp. 1–24. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00070.
- Arnaldos, M. I. . *et al.* (2005) 'Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence', *Forensic Science International*, 149, pp. 57–65. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.04.087.
- Ashworth, J. R. & Wall, R. (1994) 'Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits', *Medical and Veterinary Entomology*, 8(4), pp. 303–309. doi: 10.1111/j.1365-2915.1994.tb00093.x.
- Barsics, F. *et al.* (2012) 'Do root-emitted volatile organic compounds attract wireworms?', *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 77(4), pp. 561–565.
- Benninger, L. A. *et al.* (2008) 'The biochemical alteration of soil beneath a decomposing

carcass', *Forensic Science International*. Elsevier, 180(2–3), pp. 70–75. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.07.001.

Boeckh, J. *et al.* (1965) 'Insect olfactory receptors.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 30, pp. 263–280. doi: 10.1101/SQB.1965.030.01.028.

Boumba, V. A. *et al.* (2008) 'Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses', *Forensic Science International*, 174(2–3), pp. 133–151. doi: 10.1016/j.forsciint.2007.03.018.

Bourel, B. *et al.* (1999) 'Necrophilous Insect Succession on Rabbit Carrion in Sand Dune Habitats in Northern France', *Journal of Medical Entomology*, 36(4), pp. 420–425.

Brasseur, C. *et al.* (2012) 'Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses', *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1255, pp. 163–170. doi: 10.1016/j.chroma.2012.03.048.

Brodie, B. *et al.* (2014) 'Bimodal cue complex signifies suitable oviposition sites to gravid females of the common green bottle fly', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153(2), pp. 114–127. doi: 10.1111/eea.12238.

Brodie, B. S. *et al.* (2016) 'Acquired Smell? Mature Females of the Common Green Bottle Fly Shift Semiochemical Preferences from Feces Feeding Sites to Carrion Oviposition Sites', *Journal of Chemical Ecology*, 42(1), pp. 40–50. doi: 10.1007/s10886-015-0658-7.

Byrd, J. H. & Castner, J. L. (2001) 'Insects of forensic importance', *Forensic entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, pp. 43–79.

Cablk, M. E. *et al.* (2012) 'Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing animal remains, and compared with human remains', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 220(1–3), pp. 118–125. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.02.007.

Campobasso, C. *et al.* (2001) 'Factors affecting decomposition and Diptera colonization', *Forensic Science International*, 120, pp. 18–27. doi: 10.1109/CCECE.2006.277855.

Carter, D. O. *et al.* (2007) 'Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems', *Naturwissenschaften*, 94(1), pp. 12–24. doi: 10.1007/s00114-006-0159-1.

Carter, D. O. *et al.* (2008) 'Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils', *Applied Soil Ecology*. Elsevier, 40(1), pp. 129–137. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.03.010.

Carter, D. O. *et al.* (2010) 'Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 200(1–3), pp. 60–66. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.03.031.

Centeno, N. *et al.* (2002) 'Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina)', *Forensic Science International*, 126(1), pp. 63–70. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00037-3.

Charabidze, D. (2008) 'Etude de la biologie des insectes nécrophages et application à l'expertise en entomologie médico-légale.', *Thèse de doctorat, Université du Droit et de la*

Charabidze, D. (2013) 'La biologie des insectes nécrophages et leur utilisation pour dater le décès en entomologie La biologie des insectes nécrophages et leur utilisation pour dater le décès en entomologie médico-légale', (May). doi: 10.1080/00379271.2012.10697773.

Charabidze, D. *et al.* (2014) 'Involvement of larder beetles (Coleoptera : Dermestidae) on human cadavers : a review of 81 forensic cases', pp. 1021–1030. doi: 10.1007/s00414-013-0945-1.

Charabidze, D. *et al.* (2011) 'Larval-mass effect : Characterisation of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera : Calliphoridae) larval aggregates', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 211(1–3), pp. 61–66. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.04.016.

Cossé, A. A. & Baker, T. (1996) 'House Flies and Pig Manure Volatiles: Wind Tunnel Behavioral Studies and Electrophysiological Evaluations¹', *J Agric Entomol*, 13(4), pp. 301–317.

Cragg, J. B. & Ramage, G. R. (1945) 'Chemotropic studies on the blow-flies *Lucilia sericata* (Mg.) and *Lucilia caesar* (L.)', *Parasitology*, 36(3–4), pp. 168–175. doi: 10.1017/S0031182000012142.

Cragg, J. B. & Thurston, B. A. (1950) 'The reactions of blowflies to organic sulphur compounds and other materials used in traps', *Parasitology*, 40(1–2), pp. 187–194. doi: 10.1017/S0031182000018023.

Degreeff, L. E. & Furton, K. G. (2011) 'Collection and identification of human remains volatiles by non-contact, dynamic airflow sampling and SPME-GC/MS using various sorbent materials', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(4), pp. 1295–1307. doi: 10.1007/s00216-011-5167-0.

DeGreeff, L. E. *et al.* (2012) 'Creation of training aids for human remains detection canines utilizing a non-contact, dynamic airflow volatile concentration technique', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 217(1–3), pp. 32–38. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.09.023.

Dekeirsschieter *et al.* (2011) 'Large carrion beetles (Coleoptera, Silphidae) in Western Europe: a review', *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(3), pp. 435–447.

Dekeirsschieter, J. *et al.* (2009) 'Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes', *Forensic Science International*, 189(1–3), pp. 46–53. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.03.034.

Dekeirsschieter, J. *et al.* (2012) 'Comment les insectes communiquent-ils au sein de l ' " écosystème-cadavre " ? L' écologie chimique des insectes nécrophages et nécrophiles', *Faunistic Entomology*, 65, pp. 3–13.

Dekeirsschieter, J. *et al.* (2012) 'Enhanced characterization of the smell of death by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS)', *PLoS ONE*, 7(6), p. 39005. doi: 10.1371/journal.pone.0039005.

Dekeirsschieter, J. *et al.* (2013) 'Electrophysiological and Behavioral Responses of *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Coleoptera : Silphidae) to Selected Cadaveric Volatile Organic Compounds', *Journal of Forensic Sciences*, 58(4), pp. 917–923. doi: 10.1111/1556-4029.12123.

Dekeirsschieter, J. (2013) 'Etude des interactions entre l'entomofaune et un cadavre: approches biologique, comportementale et chémo-écologique du coléoptère nécrophage, *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Col., Silphidae)', *Thèse de doctorat, Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech*. Available at: <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/140720>.

Dekeirsschieter, J. *et al.* (2010) 'Volatile collection of cadaveric compounds', *Communication poster, Journée scientifique annuelle de la société royale de chimie - Chimie verte*.

Dekker, L. W. & Ritsema, C. J. (1994) *How water moves in a water repellent sandy soil 1. Potential and actual water repellency*, *Water Resources Research*.

Dellicour, S. & Lecocq, T. (2013) 'GCALIGNER 1.0: An alignment program to compute a multiple sample comparison data matrix from large eco-chemical datasets obtained by GC', *Journal of Separation Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(19), p. n/a-n/a. doi: 10.1002/jssc.201300388.

Dent, B. B. *et al.* (2004) 'Review of human decomposition processes in soil', *Environmental Geology*, 45(4), pp. 576–585. doi: 10.1007/s00254-003-0913-z.

Denys, C. (2002) 'Taphonomy and experimentation', *Archaeometry*, 44(3), pp. 469–484. doi: 10.1111/1475-4754.00079.

Dias, K. (2011) 'The forensic characterisation of the soil microbial community in response to cadaver decomposition', *Doctoral Thesis, University of Western Australia*. Available at: http://research-repository.uwa.edu.au/files/3245735/Dias_Kerith-Rae_2011.pdf.

Donovan, S. K. (2002) 'Fossils explained 41: Taphonomy', 1. *Geology Today*, 18(6), pp. 226–231.

Dubois, L. M. *et al.* (2018) 'Characterizing decomposition odor from soil and adipocere samples at a death scene using HS-SPME-GC×GC-HRTOFMS', *Forensic Chemistry*. Elsevier B.V., 8(48), pp. 11–20. doi: 10.1016/j.forc.2018.01.001.

Dupont, F. Y. F. *et al.* (2012) 'Biodiversity study of arthropods collected on rat carrion in Yaounde , Cameroon: first study on forensic entomology in Central Africa', *International Journal of Biosciences*, 2(1), pp. 1–8.

Fancher, J. P. *et al.* (2017) 'An evaluation of soil chemistry in human cadaver decomposition islands: Potential for estimating postmortem interval (PMI)', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 279, pp. 130–139. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.08.002.

Fassotte, B. *et al.* (2014) 'First evidence of a volatile sex pheromone in lady beetles', *PLoS ONE*, 9(12), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0115011.

Feddern, N. *et al.* (2019) 'Decomposition and insect colonization patterns of pig cadavers lying on forest soil and suspended above ground'. doi: 10.1007/s12024-019-00121-6.

Fiedler, S. & Graw, M. (2003) 'Decomposition of buried corpses, with special reference to the formation of adipocere', *Naturwissenschaften*, 90, pp. 291–300. doi: 10.1007/s00114-003-0437-0.

Finnegan, D. E. & Chambers, J. (1993) 'Identification of the sex pheromone of the guernsey carpet beetle, *Anthrenus sarnicus* Mroczkowski (Coleoptera: Dermestidae)', *Journal of*

Chemical Ecology. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, 19(5), pp. 971–983. doi: 10.1007/BF00992532.

Forbes, S. L. *et al.* (2005) ‘The effect of soil type on adipocere formation’, *Forensic Science International*. Elsevier, 154(1), pp. 35–43. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.108.

Forbes, S. L. & Perrault, K. A. (2014) ‘Decomposition Odour Profiling in the Air and Soil Surrounding Vertebrate Carrion’, *PLoS One*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0095107.

Francke, W. & Dettner, K. (2005) ‘Chemical Signalling in Beetles’, *Topics in Current Chemistry*, 240, pp. 85–166. doi: 10.1007/b98316.

Frederickx, C. *et al.* (2012) ‘Responses of *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) to Cadaveric Volatile Organic Compounds’, *Journal of Forensic Sciences*, 57(2), pp. 386–390. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.02010.x.

Gadenne, C. *et al.* (2016) ‘Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell?’, *Annual Review of Entomology*, 61(1), pp. 317–333. doi: 10.1146/annurev-ento-010715-023523.

Gaudry, E. *et al.* (2007) ‘L’entomologie légale : lorsque insecte rime avec indice’, *Revue Francophone des Laboratoires*, 392, pp. 23–32.

Gennard, D. E. (2007) ‘Forensic entomology - An introduction’, *John Wiley & Sons Ltd., England*.

Gfeller, A. *et al.* (2013) ‘Characterization of Volatile Organic Compounds Emitted by Barley (*Hordeum vulgare* L.) Roots and Their Attractiveness to Wireworms’, *Journal of Chemical Ecology*, 39(8), pp. 1129–1139. doi: 10.1007/s10886-013-0302-3.

Goff, M. L. (2009) ‘Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers’, *Experimental and Applied Acarology*, 49(1–2), pp. 21–36. doi: 10.1007/s10493-009-9284-9.

Grassberger, M. & Frank, C. (2004) ‘Initial Study of Arthropod Succession on Pig Carrion in a Central European Urban Habitat’, *Journal of Medical Entomology*, 41(3), pp. 511–523. doi: 10.1603/0022-2585-41.3.511.

Gunn, A. (2006) ‘Essential Forensic Biology’, *John Wiley & Sons, Ltd., Chichester*.

Gunn, A. (2018) ‘The exploitation of fresh remains by *Dermestes maculatus* De Geer (Coleoptera, Dermestidae) and their ability to cause a localised and prolonged increase in temperature above ambient’, *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Elsevier, 59(June), pp. 20–29. doi: 10.1016/j.jflm.2018.07.013.

Haberer, W. *et al.* (2008) ‘Ethyl 4-Methyl Heptanoate: A Male-Produced Pheromone of *Nicrophorus vespilloides*’, *Journal of Chemical Ecology*, 34(1), pp. 94–98. doi: 10.1007/s10886-007-9406-y.

Hall, E. R. & Russel, W. C. (1933) ‘Dermestid beetles as an aid in cleaning bones’, *Journal of Mammalogy*, 14(4), pp. 372–374.

Hansson, B. S. & Stensmyr, M. C. (2011) ‘Evolution of insect olfaction’, *Neuron*. Elsevier Inc., 72(5), pp. 698–711. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.003.

Haslam, T. C. F. & Tibbett, M. (2009) ‘Soils of contrasting pH affect the decomposition of

buried mammalian (*Ovis aries*) skeletal muscle tissue', *Journal of Forensic Sciences*, 54(4), pp. 900–904. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01070.x.

Hefti, E. *et al.* (1980) 'Use of dermestid beetles for cleaning bones', *Calcified Tissue International*, 31(1), pp. 45–47. doi: 10.1007/BF02407166.

von Hoermann, C. *et al.* (2013) 'Too Fresh Is Unattractive! The Attraction of Newly Emerged *Nicrophorus vespilloides* Females to Odour Bouquets of Large Cadavers at Various Stages of Decomposition', *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0058524.

von Hoermann, C. *et al.* (2011) 'The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer)', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 212(1–3), pp. 173–179. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.06.009.

von Hoermann *et al.* (2012) 'The attraction of virgin female hide beetles (*Dermestes maculatus*) to cadavers by a combination of decomposition odour and male sex pheromones', *Frontiers in Zoology*, 9. doi: 10.1186/1742-9994-9-18.

von Hoermann *et al.* (2016) 'Volatile Organic Compounds of Decaying Piglet Cadavers Perceived by *Nicrophorus vespilloides*', *Journal of Chemical Ecology*. Journal of Chemical Ecology, 42(8), pp. 756–767. doi: 10.1007/s10886-016-0719-6.

Hopkins, D. W. *et al.* (2000) 'Microbial characteristics of soils from graves: An investigation at the interface of soil microbiology and forensic science', *Applied Soil Ecology*. Elsevier, 14(3), pp. 283–288. doi: 10.1016/S0929-1393(00)00063-9.

Huchet, J. (2014) 'L'archéontomologie funéraire.', In: Charabidze, D. & Gosselin, M. (eds), *Insectes, cadavres et scènes de crime, Principes et applications de l'entomologie médico-légale*. Editions De Boeck: Bruxelles, pp. 201–224

Huntington, T. E. (2008) 'Testing Multigenerational Colonisation of Carrion By Blow Flies in the Great Plains', *Great Plains Research*, 18, pp. 33–38.

Janaway, R. C. *et al.* (2009) *Microbiology and aging*. doi: 10.1007/978-1-59745-327-1.

Johansen, H. *et al.* (2014) 'Blow fly responses to semiochemicals produced by decaying carcasses', *Medical and Veterinary Entomology*, 28(1), pp. 26–34. doi: 10.1111/mve.12016.

Kadota, H. & Ishida, Y. (1972) 'Production of volatile sulfur compounds by microorganisms', *Annual Review of Microbiology*, 26, pp. 127–138.

Kalinová, B. *et al.* (2009) 'Irresistible bouquet of death-how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses', *Naturwissenschaften*, 96(8), pp. 889–899. doi: 10.1007/s00114-009-0545-6.

Kasper, J. (2013) 'Examination of decomposition-processes and the olfactory sense of the necrophagous fly *Lucilia caesar* (L.) (Diptera: Calliphoridae) in relationship to the fly's physiological state', *Doctoral Thesis, Humboldt University of Berlin*.

Kasper, J. *et al.* (2012) 'The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions', *Forensic Science International*, 223(1–3), pp. 64–71. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.08.001.

Kelly, J. A. *et al.* (2008) 'The Influence of Clothing and Wrapping on Carcass Decomposition

and Arthropod Succession : A Winter Study in Central South Africa.’, *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 41(3), pp. 135–147. doi: 10.1080/00085030.2008.10757171.

Keshavarzi, D. *et al.* (2015) ‘A Checklist of Forensic Important Flies (Insecta: Diptera) Associated with Indoor Rat Carrion in Iran’, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(3), pp. 140–142.

Kocárek, P. (2003) ‘Decomposition and Coleoptera succession on exposed carrion of small mammal in Opava , the Czech Republic’, 39, pp. 31–45.

Kulshrestha, P. & Satpathy, D. K. (2001) ‘Use of beetles in forensic entomology’, *Forensic Science International*, 120, pp. 15–17. doi: 10.1016/S0379-0738(01)00410-8.

Kumara, T. K. *et al.* (2009) ‘The infestation of *Dermestes ater* (De Geer) on a human corpse in Malaysia’, *Tropical Biomedicine* 26(1):, 26(1), pp. 73–79.

Larson, D. O. *et al.* (2011) ‘Advanced scientific methods and procedures in the forensic investigation of clandestine graves’, *Journal of Contemporary Criminal Justice*, 27(2), pp. 149–182. doi: 10.1177/1043986211405885.

Leblanc, H. N. & Logan, J. G. (2010) ‘Exploiting Insect Olfaction in Forensic Entomology’, *Current Concepts in Forensic Entomology*, pp. 205–221.

Levy, A. D. *et al.* (2010) ‘Postmortem imaging: MDCT features of postmortem change and decomposition’, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 31(1), pp. 12–17. doi: 10.1097/PAF.0b013e3181c65e1a.

Lutz, L. *et al.* (2018) ‘Carcass concealment alters assemblages and reproduction of forensically important beetles’, *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 291, pp. 124–132. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.08.014.

Macdonald, B. C. T. *et al.* (2014) ‘Carrion decomposition causes large and lasting effects on soil amino acid and peptide flux’, *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd, 69, pp. 132–140. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.042.

Magni, P. A. *et al.* (2015) ‘A Biological and Procedural Review of Forensically Significant *Dermestes* Species (Coleoptera: Dermestidae)’, *Journal of Medical Entomology*, 52(5), pp. 755–769. doi: 10.1093/jme/tjv106.

Mann, R. W. *et al.* (1990) ‘Time Since Death and Decomposition of the Human Body : Variables and Observations in Case and Experimental Field Studies’, *Journal of Forensic Science*, 35(1), pp. 103–111.

Martin-Vega, D. *et al.* (2017) ‘Effect of Temperature on the Survival and Development of Three Forensically Relevant *Dermestes* Species (Coleoptera : Dermestidae)’, *Journal of Medical Entomology*, 54(May), pp. 1140–1150. doi: 10.1093/jme/tjx110.

Martin, C. (2017) ‘Thanatochimie: impact des insectes sur l’émission des composés volatils cadavériques et valorisation pour le dressage des chiens cadavres’, *Travail de Fin d'Etudes, Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech*.

Martin, C. *et al.* (2019) ‘Impact of necrophagous insects on the emission of volatile organic compounds released during the decaying process’, *Entomologia generalis*, 39(1), pp. 19–31. doi: 10.1127/entomologia/2019/0663.

- Martin, C. *et al.* (2020) 'Behavioral and electrophysiological responses of the fringed larder beetle *Dermestes frischii* to the smell of a cadaver at different decomposition stages', *Insects*, 11(4). doi: 10.3390/insects11040238.
- Martin, C. *et al.* (2020) 'Forensic taphonomy: characterization of the gravesoil chemistry through a multivariate approach combining mineral and volatile analyses', *Under review*.
- Martin, C. & Verheggen, F. (2018) 'Odour profile of human corpses: A review', *Forensic Chemistry*, pp. 27–36. doi: 10.1016/j.forc.2018.07.002.
- Matuszewski, S. *et al.* (2008) 'An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe', 180, pp. 61–69. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.06.015.
- Matuszewski, S. & Szafałowicz, M. (2013) 'Temperature-dependent appearance of forensically useful beetles on carcasses', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 229(1–3), pp. 92–99. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.034.
- Matuszewski, S. *et al.* (2013) 'Insects colonising carcasses in open and forest habitats of Central Europe : Search for indicators of corpse relocation', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 231(1–3), pp. 234–239. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.05.018.
- Meillour, P. N. (2002) 'Le rôle des protéines liant les odeurs (OBP) dans la transduction olfactive', *L'Année Biologique*, 37(2), pp. 69–93. doi: 10.1016/s0003-5017(98)80001-9.
- Meinardi, S. (2003) 'Dimethyl disulfide (DMDS) and dimethyl sulfide (DMS) emissions from biomass burning in Australia', *Geophysical Research Letters*. American Geophysical Union, 30(9), p. 1454. doi: 10.1029/2003GL016967.
- Meyer, J. *et al.* (2013) 'Seasonal variation of carcass decomposition and gravesoil chemistry in a cold (Dfa) climate', *Journal of Forensic Sciences*, 58(5), pp. 1175–1182. doi: 10.1111/1556-4029.12169.
- Midgley, J. M. & Villet, M. H. (2009) 'Development of *Thanatophilus micans* (Fabricius 1794) (Coleoptera : Silphidae) at constant temperatures', *International Journal of Legal Medicine*, 123, pp. 285–292. doi: 10.1007/s00414-008-0280-0.
- Nilssen, A. C. *et al.* (1996) 'Dimethyl trisulphide is a strong attractant for some calliphorids and a muscid but not for the reindeer oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe*', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79(2), pp. 211–218. doi: 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00828.x.
- Nizio, K. D. *et al.* (2017) 'The analysis of textiles associated with decomposing remains as a natural training aid for cadaver-detection dogs', *Forensic Chemistry*. Elsevier B.V., 5, pp. 33–45. doi: 10.1016/j.forc.2017.06.002.
- Oksanen, J. *et al.* (2017) 'vegan: community ecology package', *R package*.
- Özdemir, S. & Sert, O. (2009) 'Determination of Coleoptera fauna on carcasses in Ankara province, Turkey', *Forensic Science International*, 183(1–3), pp. 24–32. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.09.018.
- Paczkowski, S. & Schütz, S. (2011) 'Post-mortem volatiles of vertebrate tissue', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), pp. 917–935. doi: 10.1007/s00253-011-3417-x.

- Pask, G. M. & Ray, A. (2016) 'Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry and Biology', *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*, pp. 101–122. doi: 10.1016/B978-0-12-801694-7.00006-8.
- Pasquerault, T. *et al.* (2008) 'Répartition des espèces du genre *Dermestes* L., 1758 récoltées sur des cadavres humains (Coleoptera Dermestidae)', *L'entomologiste*, 64(4), pp. 221–224.
- Payne, J. A. (1965) 'A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus', *Ecology*, 46(5), pp. 592–602.
- Perrault, K., Stuart, B. and Forbes, S. (2014) 'A Longitudinal Study of Decomposition Odour in Soil Using Sorbent Tubes and Solid Phase Microextraction', *Chromatography*, 1(3), pp. 120–140. doi: 10.3390/chromatography1030120.
- Picimbon, J. F. (2002) 'Les péri-récepteurs chimiosensoriels des insectes', *Medecine/Sciences*, 18(11), pp. 1089–1094.
- Podskalská, H. *et al.* (2009) 'Use of infochemicals to attract carrion beetles into pitfall traps', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132(1), pp. 59–64. doi: 10.1111/j.1570-7458.2009.00871.x.
- Prado e Castro, C. *et al.* (2013) 'Coleoptera of forensic interest: A study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal', *Forensic Science International*, 232, pp. 73–83. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.06.014.
- Ranst, E. *et al.* (1999) *Manual for the soil chemistry and fertility laboratory: analytical methods for soils and plants equipment, and management of consumables. International Training Centre for Post-Graduate Soil Scientists.*
- Rattenbury, A. E. (2018) *Forensic Taphonomy, Forensic Ecogenomics*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-809360-3.00002-3.
- Dos Reis, S. F. *et al.* (1999) 'Larval aggregation and competition for food in experimental populations of *Chrysomya putoria* (Wied.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Dipt., Calliphoridae)', *Journal of Applied Entomology*, 123(8), pp. 485–489. doi: 10.1046/j.1439-0418.1999.00397.x.
- Ren, L. *et al.* (2018) 'A brief review of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae)', *Forensic Sciences Research*. Taylor & Francis, 3(1), pp. 16–26. doi: 10.1080/20961790.2018.1432099.
- Richardson, M. S. & Goff, M. L. (2001) 'Effects of Temperature and Intraspecific Interaction on the Development of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae) Effects of Temperature and Intraspecific Interaction on the Development of *Dermestes maculatus* (Coleoptera: Dermestidae)', *Journal of Medical Entomology*, 38(3), pp. 347–351.
- Rivers, D. B. & Dahlem, G. A. (2014) *The science of forensic entomology*.
- Rodriguez, W. C. (1982) 'Insect Activity and Its Relationship to Decay Rates of Human Cadavers in East Tennessee', *Journal of Forensic Sciences*, 28(2).
- Rosenbaum, F. *et al.* (2015) 'Ecologie des Dermestidae, une famille de Coléoptères nécrophages associée aux cadavres squelettisés', *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*. Taylor & Francis, 51(4), pp. 294–302. doi: 10.1080/00379271.2015.1096751.

- Rosier, E. *et al.* (2014) 'Development and validation of a new TD-GC/MS method and its applicability in the search for human and animal decomposition products Forensic Toxicology', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), pp. 3611–3619. doi: 10.1007/s00216-014-7741-8.
- Rosier, E. *et al.* (2015) 'The search for a volatile human specific marker in the decomposition process', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0137341.
- Rosier, E. *et al.* (2016) 'Time-dependent VOC-profile of decomposed human and animal remains in laboratory environment', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 266, pp. 164–169. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.05.035.
- Rouseff, R. L. *et al.* (2008) 'Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: Possible defense mechanism', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 56(19), pp. 8905–8910. doi: 10.1021/jf801735v.
- Santarsiero, A. *et al.* (2000) 'Hygienic aspects related to burial', in *Microchemical Journal*. Elsevier, pp. 135–139. doi: 10.1016/S0026-265X(00)00109-0.
- Saukko, P. and Knight, B. (2013) 'Knights forensic pathology', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Schroeder, H. *et al.* (2002) 'Larder beetles (Coleoptera, Dermestidae) as an accelerating factor for decomposition of a human corpse', *Forensic Science International*, 127(3), pp. 231–236. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00131-7.
- Segura, N. A. *et al.* (2009) 'Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia', *Forensic Science International*, 187(1–3), pp. 66–72. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.02.018.
- Sharanowski, B. J. *et al.* (2008) 'Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons', *Forensic Science International*, 179(2–3), pp. 219–240. doi: 10.1016/j.forsciint.2008.05.019.
- Sincerbox, S. N. & DiGangi, E. A. (2017) '*Forensic taphonomy and ecology of North American scavengers*', pp. 1–16. Academic Press doi: 10.1016/b978-0-12-813243-2.00001-4.
- Spicka, A. *et al.* (2011) 'Carcass mass can influence rate of decomposition and release of ninhydrin-reactive nitrogen into gravesoil', *Forensic Science International*, 209(1–3), pp. 80–85. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.01.002.
- Stadler, S. *et al.* (2016) 'Forensic Analysis of Volatile Organic Compounds from Decomposed Remains', in Kars, H. and van den Eijkel, L. (eds) *Soil in Criminal and Environmental Forensics*. Springer International Publishing Switzerland 2016, pp. 297–316. doi: 10.1007/978-3-319-33115-7.
- Statheropoulos, M. *et al.* (2007) 'Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition', *Science of the Total Environment*, 385(1–3), pp. 221–227. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.07.003.
- Statheropoulos, M. *et al.* (2011) 'Combined chemical and optical methods for monitoring the early decay stages of surrogate human models', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 210(1–3), pp. 154–163. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.02.023.

- Stefanuto, P.-H. *et al.* (2015) 'GC × GC-TOFMS and supervised multivariate approaches to study human cadaveric decomposition olfactive signatures', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(16), pp. 4767–4778. doi: 10.1007/s00216-015-8683-5.
- Stefanuto, P. *et al.* (2014) 'Developing the sixth sense of thanato-chemistry', *Journée de l'École Doctorale Thématique CHIM*.
- Stefanuto, P. & Focant, J. (2016) 'Soil in Criminal and Environmental Forensics', *Soil in Criminal and Environmental Forensics*, pp. 317–329. doi: 10.1007/978-3-319-33115-7.
- Stokes, K. L. *et al.* (2009) 'Decomposition Studies Using Animal Models in Contrasting Environments: Evidence from Temporal Changes in Soil Chemistry and Microbial Activity', In *Criminal and Environmental Soil Forensics*, pp. 357–377. doi: 10.1007/978-1-4020-9204-6_23.
- SYNTECH, O. R. I. (2004) *Electroantennography - A practical introduction*. Hilversum, The Netherlands.
- Szelecz, I. *et al.* (2018) 'Soil chemistry changes beneath decomposing cadavers over a one-year period', *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd, 286, pp. 155–165. doi: 10.1016/j.forsciint.2018.02.031.
- Tantawi, T. I. *et al.* (1996) 'Arthropod Succession on Exposed Rabbit Carrion in Alexandria , Egypt', *Journal of Medical Entomology*, 33(4), pp. 566–580.
- Tibbett, M. & Carter, D. O. (2009) 'Research in forensic taphonomy: A soil-based perspective', in *Criminal and Environmental Soil Forensics*. Springer Netherlands, pp. 317–331. doi: 10.1007/978-1-4020-9204-6_20.
- Tomberlin, J. K. *et al.* (2017) 'Special Collection : Filth Fly – Microbe Interactions A Review of Bacterial Interactions With Blow Flies (Diptera : Calliphoridae) of Medical , Veterinary , and Forensic Importance', *Annals of the Entomological Society of America*, 110(1), pp. 19–36. doi: 10.1093/aesa/saw086.
- Tumer, A. R. *et al.* (2013) 'Effects of different types of soil on decomposition: An experimental study', *Legal Medicine*. Elsevier, 15(3), pp. 149–156. doi: 10.1016/j.legalmed.2012.11.003.
- Vass, A. *et al.* (2004) 'Decompositional Odor Analysis Database', *Journal of Forensic Sciences*, 49(4), pp. 1–10. doi: 10.1520/jfs2003434.
- Vass, A. (2001) 'Beyond the grave – understanding human decomposition', *Microbiology Today*, 28, pp. 190–193.
- Vass, A. *et al.* (2008) 'Odor analysis of decomposing buried human remains', *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), pp. 384–391. doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00680.x.
- Verheggen, F. *et al.* (2017) 'The Odor of Death : An Overview of Current Knowledge on Characterization and Applications', *BioScience*, 67(7), pp. 600–613. doi: 10.1093/biosci/bix046.
- Wang, D. *et al.* (2009) 'Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens', *Plant and Soil*. Springer, 324(1), pp. 185–197. doi: 10.1007/s11104-009-9943-y.

- Wilson, A. S. *et al.* (2007) 'Modelling the buried human body environment in upland climes using three contrasting field sites', *Forensic Science International*. Elsevier, 169(1), pp. 6–18. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.07.023.
- Wilson, D. S. & Fudge, J. (1984) 'Burying beetles: intraspecific interactions and reproductive success in the field', *Ecological Entomology*, 9(2), pp. 195–203. doi: 10.1111/j.1365-2311.1984.tb00715.x.
- Wolff, M. *et al.* (2001) 'A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia', *Journal of Forensic Science*, 120, pp. 53-59.
- Woodcock, L. *et al.* (2013) 'Egg laying preferences and larval performance in *Dermestes maculatus*', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148(2), pp. 188–195. doi: 10.1111/eea.12089.
- Yones, D. A. *et al.* (2010) 'Identification of forensically important beetles on exposed human left over parts in Assiut, Egypt', *Assiut medical Journal*, 34(1), pp. 123–132. doi: 10.13140/2.1.1587.1041.
- Zhantiev, R. D. (2009) 'Ecology and Classification of Dermestid Beetles (Coleoptera , Dermestidae) of the Palaearctic Fauna', *Entomological Review*, 89(2), pp. 157–174. doi: 10.1134/S0013873809020055.
- Zhu, J. J. *et al.* (2013) 'Identification of Oviposition Attractants of the Secondary Screwworm, *Cochliomyia macellaria* (F.) Released from Rotten Chicken Liver', *Journal of Chemical Ecology*, 39(11–12), pp. 1407–1414. doi: 10.1007/s10886-013-0359-z.
- Zito, P. *et al.* (2014) 'Dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide: so similar yet so different in evoking biological responses in saprophilous flies', *Chemoecology*, 24(6), pp. 261–267. doi: 10.1007/s00049-014-0169-y.
- Zurgani, E. K. A. (2018) 'Documentation of the Body Transformations during the Decomposition Process: From the Crime Scene to the Laboratory', *Doctoral thesis, University of Huddersfield*.

Annexes

Annexe 1: Dimorphisme sexuel chez *Lucilia sericata* (à gauche la femelle avec les yeux écartés et à droite le mâle avec les yeux rapprochés)



Annexe 2: Dimorphisme sexuel chez *Dermestes frischii* (à gauche le mâle disposant de poils jaunes dans un cercle au niveau du quatrième sternite abdominale ; à droite la femelle sans aucun cercle)



Annexe 3: Tableau des COVs émis par les sols contrôles et par les différentes couches de sols limoneux et sablo-limoneux en présence d'un rat en décomposition (ng de COV/g de sol). (L = sol limoneux, S = sol sablo-limoneux, 1,2,3,4 = numéro des couches). Adapté de (Martin *et al.*, 2020)

COVs	Contrôle L	Contrôle S	L1	S1	L2	S2	L3	S3	L4	S4
Acides carboxyliques										
Acide benzoïque	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,1	1 ± 0,1	0,2 ± 0
Acide formique, hexyl-ester-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Octanoic acid, octyl-ester	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Acide phtalique	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,2	0 ± 0
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis-2-methylpropyl ester	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,6 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Alcools										
Cyclobutanol, 2-ethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	17,8 ± 4,1	26,5 ± 13,3
Glycerol, 1,2-diacetate	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,3	1,7 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0
Tridecan-1-ol	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Decali-9-ol, 1,10-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,2
Decan-1-ol, 2-methyl-	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octanol, 2,7-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	6,6 ± 4,4	5,7 ± 3,1	4 ± 2,6	3,5 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octen-3-ol	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,9 ± 1,3	1 ± 0,8	1,4 ± 0,5	2,2 ± 1,7
Methyldodecanol	0 ± 0	0 ± 0	6,5 ± 4,4	5,4 ± 3	3,7 ± 2,3	3,4 ± 1,9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1-Heptanol, isopropyl-5-methyl-	0,2 ± 0	0 ± 0	6 ± 3,1	4,5 ± 2,4	6,4 ± 4	5,9 ± 2,7	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,7	1,6 ± 1,2	0,4 ± 0,4
Propanol, 1-methoxy-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0
Octanol	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,4
Aldéhydes										
Benzaldehyde	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Hexanal, 2-ethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,3	0 ± 0
Hydroxy-7-nonanal	0 ± 0,8	0,6 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octenal, 2-butyl-	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Anhydrides										
Anhydride phénylmaléique	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,3	0 ± 0
Aromatiques										
Ethylbenzene	0 ± 1,2	0,9 ± 0,5	0 ± 0	2,7 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0

2,4-Di,tert-butylphenol	0,6 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Carbonates										
Acide carbonique tridecyl vinyl ester	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,2	0 ± 0
Cétones										
Acetophenone	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Heptanone	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,5
Heptanone, 4-methyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octanone	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3,5 ± 1,3	2 ± 0,9	10,8 ± 5,2	8,2 ± 4,6
Octen-3-one	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,9 ± 0,4	0,4 ± 0,3	2 ± 1,4	1,3 ± 0,8
Composés organosulfurés										
Trisulfure, dimethy-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,2 ± 0	0 ± 0	1,3 ± 0,4
Disulfure, dimethyl-	0,9 ± 2	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,7	8 ± 2,4	3,6 ± 0,9	16,4 ± 6,8	0,6 ± 0,2	2,6 ± 1,4	1,7 ± 0,7	5,5 ± 2,2
Esters										
Dibutyladipate	1,6 ± 1,5	1 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,7 ± 0	0,7 ± 0	0,7 ± 0	0,5 ± 0,3
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2-Ethylhexyl-acrylate	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0
Hydrocarbures										
1,4,7-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1-Heptene, 2,4-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	16,5 ± 5,2	12 ± 6,8	13,6 ± 7,2	11 ± 6,2	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,4	1,5 ± 0,9	0 ± 0
Benzene, 1,3-bis-1,1-dimethylethyl-	0 ± 0	0 ± 0	16,3 ± 9,2	14 ± 8,5	24,1 ± 14	27,2 ± 15	3,2 ± 2	2,8 ± 1,7	3,2 ± 2,4	1,3 ± 1,1
Benzene, 3,3-dimethylbutyl-	0 ± 1,9	1,3 ± 1	0,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,1 ± 0	1,2 ± 0,9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Binaphthalene	0 ± 3,4	2,3 ± 1,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,4 ± 0,8	0,9 ± 0,4	2 ± 1	1,9 ± 0,5
Chlorure de methylene	4,4 ± 0	0 ± 0	6,2 ± 1,7	6 ± 1,6	7,9 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Cyclohexane, 1,1-dimethyl-2-propyl,	0 ± 0	0 ± 0	0,7 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Cyclohexane, 1,3,5-trimethyl-	0,3 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Cyclohexane, 1,3-dimethyl-	0,8 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Cyclohexane, methyl-	3,7 ± 2,6	1,8 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4
Cyclohexane, propyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
D.Limonene	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Decane, 2,8,8-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	3,5 ± 2,2	2,8 ± 1,7	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Decane, 3,3,6-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 8,4	10 ± 5,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Dodecane, 2-cyclohexyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Dodecane, 4,6-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,6 ± 1	1 ± 0,6	1,8 ± 1,3	0 ± 0
Dodecane, 4-methyl-	0 ± 0	0 ± 0	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eicosane	2,4 ± 2,5	1,8 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1 ± 0	0,8 ± 0,4
Ethane, 1,1-diethoxy-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	3,8 ± 0,8	3,5 ± 2,2	8,4 ± 6,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ethyl-3-methylcyclohexane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
Ethyl-4-methylcyclohexane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Heptadecane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Heptane, 2,4-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,8 ± 0,8	1,8 ± 0,9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Heptane, 2,5,5-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	12,3 ± 8	10 ± 5,6	15,2 ± 9,1	14,1 ± 8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Heptane, 3-methyl-	0,8 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0 ± 0
Heptane, 3-methylene-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1
Heptane, 4-methyl	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,4 ± 0,7	0 ± 0
Hexacosane, 1-iodo-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0,1
Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Hexane, 2,3,3-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0 ± 0
Methylhentriacontane	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0	0,2 ± 0	0 ± 0
Methylheptacosane	0 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Methylnonadecane	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Methylpentacosane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0	0,1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3
Octane, 2,3,7-trimethyl-	0,5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 2,3-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 2,4,6-trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 2,5-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	3,2 ± 2	3 ± 1,5	2,7 ± 1,1	2,2 ± 1,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 3,4,5,6-tetramethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 3,5-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octane, 5-ethyl-2-methyl-	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0,7	1 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Octene, 2,6-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Pentane	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	26,3 ± 0,1	24 ± 4,3	0 ± 0	0 ± 0
Pentane, 2,2,4-trimethyl-	3,4 ± 3,4	2,4 ± 1,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,4 ± 0	1,5 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Pentane, 2,3-dimethyl-	62,3 ± ###	### ± 24	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	22,8 ± 0,7	25 ± 3,1	26 ± 2,7	22,4 ± 11,5

Pentane, 2,4-dimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,3 ± 0,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Tetratriacontane	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0	0,2 ± 0,1
Tridecane, 2,6,10-Trimethyl-	0 ± 0	0 ± 0	1,7 ± 1,1	1,3 ± 0,8	2,5 ± 1,7	2,4 ± 1,3	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
Undecene, 8-methyl-	0 ± 0	0 ± 0	2,6 ± 1,8	2,2 ± 1,1	1,6 ± 1	0 ± 0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0 ± 0
Sesquiterpènes										
Caryophyllene	1,2 ± 1,2	0,8 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0,2
Terpènes										
Acetate de linalyle	0 ± 1,9	1,3 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,9 ± 1	2,2 ± 1,1	2,6 ± 1,6	0 ± 0	0 ± 0	0,3 ± 0,1	0 ± 0

Annexe 4: Article publié: “Behavioral and Electrophysiological Responses of the Fringed Larder Beetle *Dermestes frischii* to the Smell of a Cadaver at Different Decomposition Stages” (Martin *et al.*, 2020)



insects



Article

Behavioral and Electrophysiological Responses of the Fringed Larder Beetle *Dermestes frischii* to the Smell of a Cadaver at Different Decomposition Stages

Clément Martin [†], Damien Minchilli [†], Frédéric Francis and François Verheggen ^{*}

Gembloux Agro-Bio Tech, TERRA, University of Liège, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium; cmartin@uliege.be (C.M.); minchdam@gmail.com (D.M.); frederic.francis@uliege.be (F.F.)

^{*} Correspondence: fverheggen@uliege.be; Tel.: +32-81622662

[†] These authors contributed equally to this work.

Received: 26 March 2020; Accepted: 9 April 2020; Published: 10 April 2020



Abstract: A cadaver is colonized by a wide diversity of necrophagous insects. It is well documented that Dipterans are attracted by the volatile organic compounds (VOCs) released by a corpse during the first minutes following death. Coleopterans are known to be attracted by highly decomposed cadavers, but have received less attention regarding the olfaction-based mechanisms underlying these interactions. In the present study, we impregnated gauzes with VOCs collected from each decomposition stage of dead rats: fresh, bloated, active, and advanced decay. We collected the VOCs released by the gauze and confirmed what was previously known from the literature: the decomposition stages are associated with contrasting chemical profiles. We exposed *Dermestes frischii* Kugelann (Coleoptera: Dermestidae) male and female antennae to the same gauzes and found that stronger electrical responses were recorded when using the smell of the advanced decay stage. Finally, we performed two choices behavioral assays. Females showed no preference for the four decomposition stages, while males were attracted by the smell associated with active and advanced decay stages. These results suggest that specific VOCs released by a decaying body guide necrophagous coleopterans to their feeding site. Whether *D. frischii* males release pheromones to attract females remains to be tested.

Keywords: Dermestidae; electrophysiology; forensic entomology; necrophagous coleopteran

1. Introduction

The decomposition of a corpse is associated with the release of hundreds of chemicals including volatile organic compounds (VOCs) [1–5]. The abundance and composition of the cadaveric volatilome are impacted by biotic (e.g., microorganism, insects) and abiotic factors (e.g., temperature, humidity), but also differs according to the decomposition stage the cadaver is undergoing (fresh, bloated, active decay, advanced decay, and dry remains) [6–12]. For instance, a cadaver under the bloated stage typically releases higher amounts of alcohols, ketones, amines, and carboxylic acids, while a corpse under active decay releases higher quantities of aromatic compounds (e.g., indole) [10–14].

Various necrophagous insect species use cadaveric volatile compounds to find a feeding and/or mating site [15]. They are attracted to the cadaver in a relatively predictable sequence called the entomofaunal succession [16]. Dipterans are the first colonizers, with blowflies (Calliphoridae) arriving on the corpse within the first minutes following death. They are usually followed by flesh flies (Sarcophagidae) and houseflies (Muscidae). The importance of putrefactive sulfur-based compounds (e.g., dimethyl trisulfide, dimethyl disulfide) in the attraction of blowflies was confirmed in various studies [17–20]. Dipterans are not alone on the corpse. They are quickly joined by coleopterans.

However, coleopterans are more likely to arrive on a corpse during the later stages of decomposition: active decay, advanced decay, and dry remains [16,21–23]. Through these stages, the corpse dries more and more. As a consequence, dry protein-rich organic matter (e.g., skin and tissues) are most abundant and are known to be the favorite feeding source for coleopterans, such as Dermestidae [23–25]. The number of chemo-ecological studies investigating coleopteran species is relatively low compared with those on blowflies, and among them, Silphidae are the most studied [15]. Silphidae (e.g., *Thanatophilus sinuatus*) have sensitive chemosensors located on their antennae adapted to detect cadaveric organic compounds [26,27], and both males and females respond behaviorally to polysulfide compounds, such as dimethyl disulfide [28,29]. Dermestidae have received very limited attention. However, it has been documented that *Dermestes maculatus* use saponificated triacyl glycerides and long-chained fatty acids to locate a cadaver, including benzylbutyrate [15,30,31]. Males *D. maculatus* arrive on a corpse before females [30]. Females are then attracted by a combination of cadaveric volatiles and possibly the odor emitted by males [30]. However, Dermestidae can also be found on an early decay cadaver, suggesting their ability to detect cadaveric VOCs associated with early stages [23,32,33].

In the present research, we aimed at evaluating the ability of *Dermestes frischii* (Coleoptera: Dermestidae) to perceive and forage for a cadaver using the odor associated with all stages of decomposition. To the author best knowledge, this is the first study to investigate the olfaction-based mechanisms underlying the interactions between *D. frischii* and a cadaver.

2. Materials and Methods

2.1. Insect Rearing

D. frischii were mass-reared in a sealed plastic box (50 × 30 × 40 cm) containing wood chips and polystyrene. The box was permanently placed in an incubator, in the dark, at 30.0 ± 0.1 °C and at controlled humidity (40 ± 1%) [12]. They were fed twice a month with a dead rat which was used as oviposition site and food source for the larvae [12]. *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) were purchased as larvae in a fishery (Lacroix Pêche, Perwez, Belgium). They were placed in a group of 100 individuals in a Petri dish (d = 20 cm) at 23 ± 1 °C under a 8:16 h light:dark photoperiod. They were daily fed with pig liver until pupation [34]. Pupae were collected and placed in a net cage (30 × 30 × 30 cm) until emergence. Adults were sexed and placed separately in similar net cages.

2.2. Rat Decomposition

Four male laboratory rats (408.05 ± 30.15 g) (*Rattus norvegicus*, Berkenhout, 1769) were raised and euthanized at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liège (ethic agreement n° 18-2021), by CO₂ asphyxia, before being frozen until the start of the experiment. Each rat was defrosted in a hot water bath (≈ 40 °C) and let to decompose inside 30-L glass cylindrical tanks. In order to mimic natural decomposition, five couples of newly emerged *L. sericata* were introduced into all-glass tanks [12]. Water and sugar were also added in each tank to ensure the survival of adult flies. A fifth tank was also set up as a control, under the same conditions but containing no rat. Temperature and relative humidity were measured using Data logger® sensors (Lutron®, Taipei, Taiwan).

2.3. Odor Collection and Analysis

In order to collect the VOCs released during the different decomposition stages, sterile gauzes (n = 90 per tank) (1/3, 5 × 5 cm; Stella®; Lohmann & Rausher s.a.; Liège-Rocourt; Belgium) were suspended using a fishing line in the headspace of each tank, as suggested in previous reports [35,36]. The decomposition stage (i.e., fresh, bloated, active and advanced decay) of each rat was evaluated daily [10]. At the start of each decomposition stage, new gauzes were placed for 24 h at a distance of 10 cm from the cadaver, before being removed and stored in sealed glass Petri dishes (d = 20 cm) placed at −20 °C.

In order to confirm that the four groups of sterile gauzes are carrying contrasted blends of cadaveric VOCs, half a gauze was directly inserted in an empty VOC sampling tube (length 8.9 cm; external diameter 0.64 cm; Markes international®; Llantrisant; UK) for gas chromatography analyses (Shimadzu; Kyoto; Japan). VOCs were thermodesorbed at 280 °C during eight minutes, before being cryofocused by Peltier effect at −20 °C, and heated at 280 °C to be injected on a capillary column (5% diphenyl; 30 m × 0.25 mm I.D.; film thickness 0.25 µm) (Filter service®; Eupen; Belgium). The gas chromatograph setup, temperature program, quantification and identification methodology were previously described in Martin et al., 2019 [12].

2.4. Electroantennography

Electroantennography assays were performed to compare the ability of *D. frischii* to discriminate the VOC blend from each decomposition stage, by measuring the total antennal response to each blend. The setup used was completely described in Verheggen et al. (2008) [37]. Glass electrodes were shaped to fit Coleoptera antennae [29,38,39]. The head of each insect was cut off from the entire body and connected to the ground electrode, while the extremities of both antennae were placed in contact with the working electrode. The electrical responses of ten males and ten females were recorded. Six stimulations were performed in random order on each antenna, separated by 30 s: Each antenna was exposed to the VOCs of the four decomposition stages (provided by a 0.25 × 0.5 cm piece of sterile gauze) as well as to a positive and negative control. The positive control consisted of 110 ng of dimethyl disulfide (purity > 99%; Sigma-Aldrich®; Saint-Louis, MO, USA) placed on a piece of sterile gauze. The negative control was a piece of gauze taken from the control tank.

2.5. Behavioral Assays

The bioassays were performed using a glass cylindrical olfactometer (32.0 cm long; 3.6 cm internal diameter) (Figure 1) [40,41]. The central opening (GL14) of the olfactometer allowed a single insect to be introduced. One additional opening was located at both ends of the olfactometer, connected with beakers containing a piece of gauze (0.25 cm²). Each piece of gauze was used only once. Parafilm covered both beakers to concentrate the odor into the olfactometer. The odor of each decomposition stage was tested against a control (clean gauze). The positions of the control and the odor-impregnated gauzes were randomly assigned. Before being introduced in the olfactometer, each insect (n = 90 males and 90 females for each decomposition stage) was placed on the ice for 30 s, to reduce escape and stress effects. The insect was allowed to move for 30 min in the olfactometer. Ten olfactometers were used at the same time. All behavioral tests were performed in the dark to avoid light bias. Each individual was tested once. Between each bioassay, the olfactometers were cleaned with pentane (purity = 99.8%; Sigma-Aldrich®; Saint-Louis, MO, USA).

2.6. Statistical Analysis

All the results were statistically processed using RStudio® software (3.6.1 version). Behavioral data were analyzed with a generalized linear mixed model (GLMM) (function “glmer”, R-package “lmerTest”) [42] to evaluate the effect from two random factors: sets of trials and rats. Since these effects were not significant, a simple generalized linear model (GLM) was used (function “glm”, R-package “lme4”) to assess the impact of sex and stage of decomposition. In order to highlight differences between the odor profiles of the different stages of decomposition, a principal component analysis (PCA) followed by a multivariate analysis by permutation test (PERMANOVA) were performed.

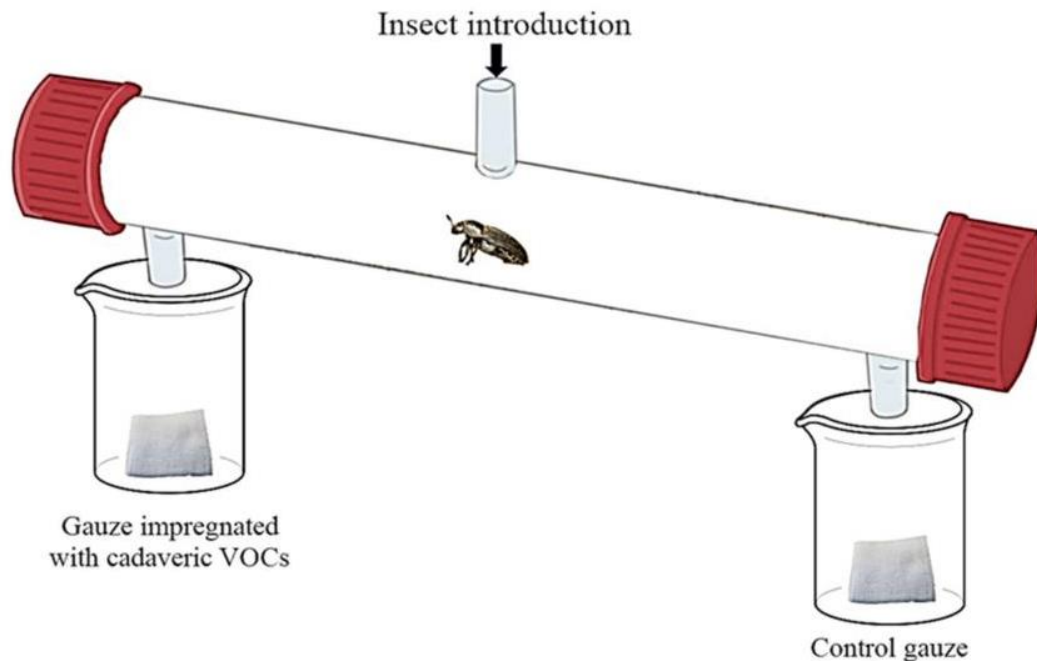


Figure 1. The dual choice olfactometer used to assess the preferences of *Dermestes frischii* for the volatile cues associated with each decomposition stage.

3. Results

The PERMANOVA analysis shows that the volatile compositions of the sterile gauzes associated with each decomposition stage were statistically different ($F_{3,12} = 3.648$; $p = 0.001$). This conclusion is displayed by the PCA (Figure 2). Because of the specific method used to trap the volatile compounds (i.e., impregnation of sterile gauze), many VOCs were identified under the limit of quantification. Carboxylic acids (e.g., propionic acid, butanoic acid, acetic acid) and amines (e.g., Pyrazine, tetramethyl) were specifically identified during the advanced decay stage. Indole was only detected during the active stage. The bloated stage was characterized by alcohol (e.g., ethanol) and alkanes (e.g., eicosane). Alkanes were also detected during the fresh stage.

Male antennae produced different electrical responses to each of the four stages of decomposition ($F_{4,36} = 8.262$; $p < 0.001$). With the exception of the fresh stage, the smell of all decomposition stages elicited electrical responses different from the control (fresh: $t_{36} = -1.725$; $p = 0.093$; bloated: $t_{36} = -2.415$; $p = 0.021$; active decay: $t_{36} = -4.140$; $p < 0.001$ and advanced decay: $t_{36} = -5.175$; $p < 0.001$) (Figure 3). Female antennae did elicit response only for the advanced stage of decomposition ($t_{36} = -2.618$; $p = 0.013$) but not for the other stages (fresh: $t_{36} = -1.891$; $p = 0.067$; bloated: $t_{36} = -1.164$; $p = 0.252$; active decay: $t_{36} = -1.309$; $p = 0.199$) (Figure 3).

None of the random factors (i.e., rat used for VOCs collection and batch of bioassays) impacted beetles' behavioral responses. Since males and females did not exhibit the same behavioral responses ($F_{1,715} = 8.562$; $p = 0.003$), they were analyzed separately (Figure 4). Males responded to the VOCs associated with a cadaver under active ($p = 0.050$) and advanced decay ($p = 0.001$) decomposition, but did not respond to earlier decomposition stages including fresh ($p = 0.673$) and bloated ($p = 0.293$). Females were not attracted to the volatile cues associated with any decomposition stage (fresh: $p = 0.093$; bloated: $p = 0.883$; active decay: $p = 0.883$; advanced: $p = 0.673$).

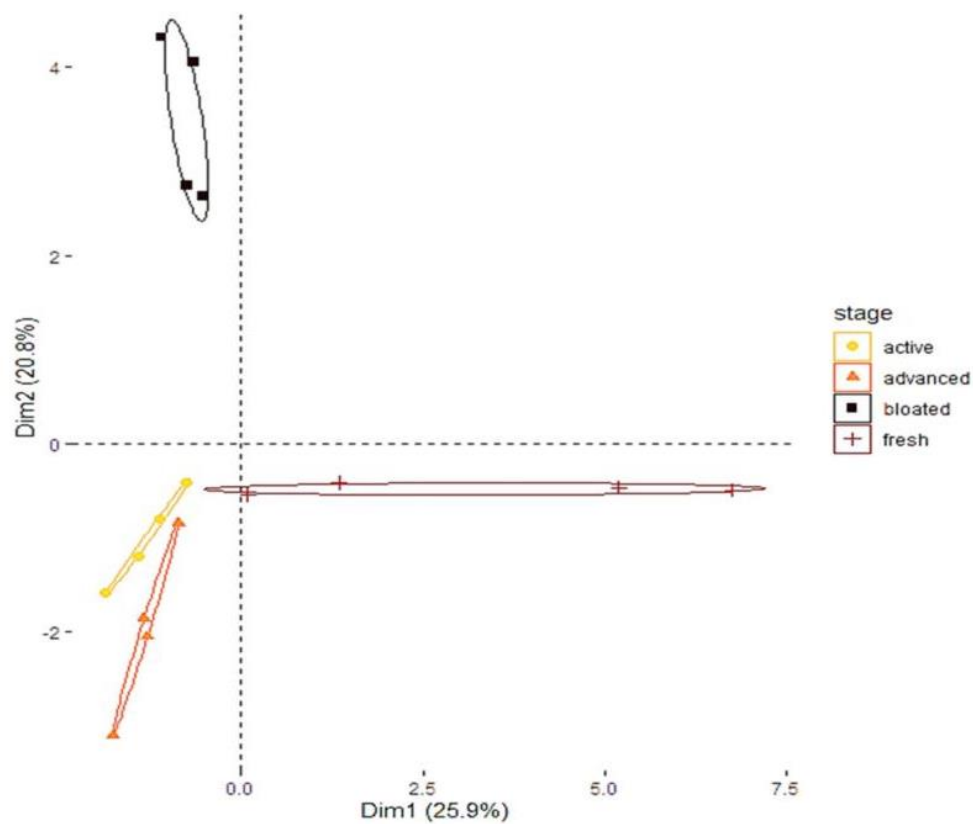


Figure 2. Principal component analysis displaying the contrasted composition of the cadaveric COVs collected from each stage of decomposition.

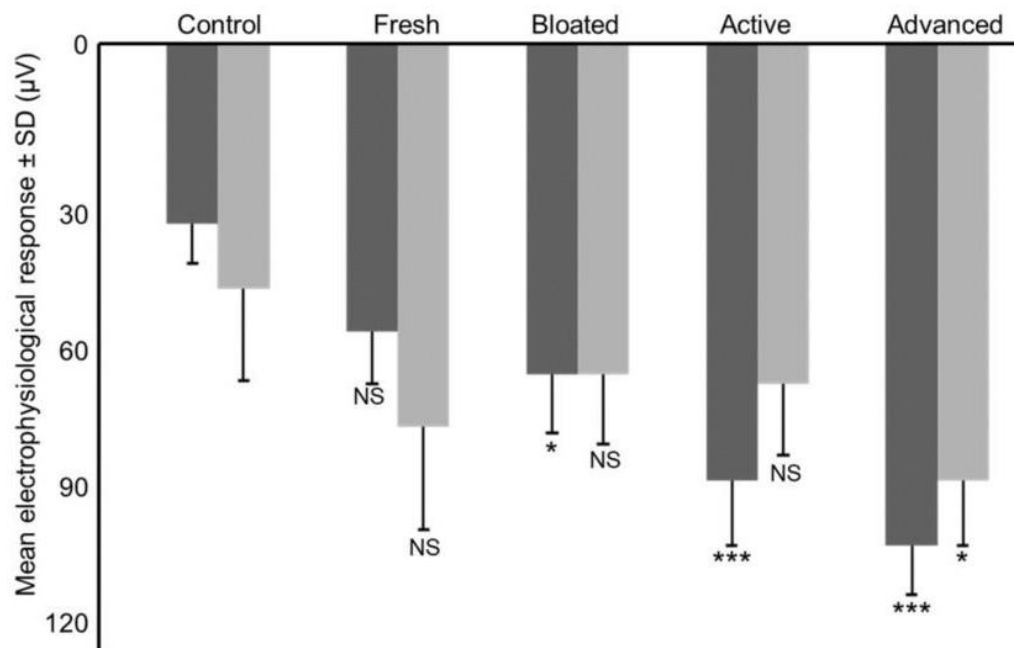


Figure 3. Mean electrophysiological response of male (dark grey) and female (light grey) antennae towards the scent of the different stages of decomposition ($\mu\text{V} \pm \text{SD}$). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; NS Not Significant.

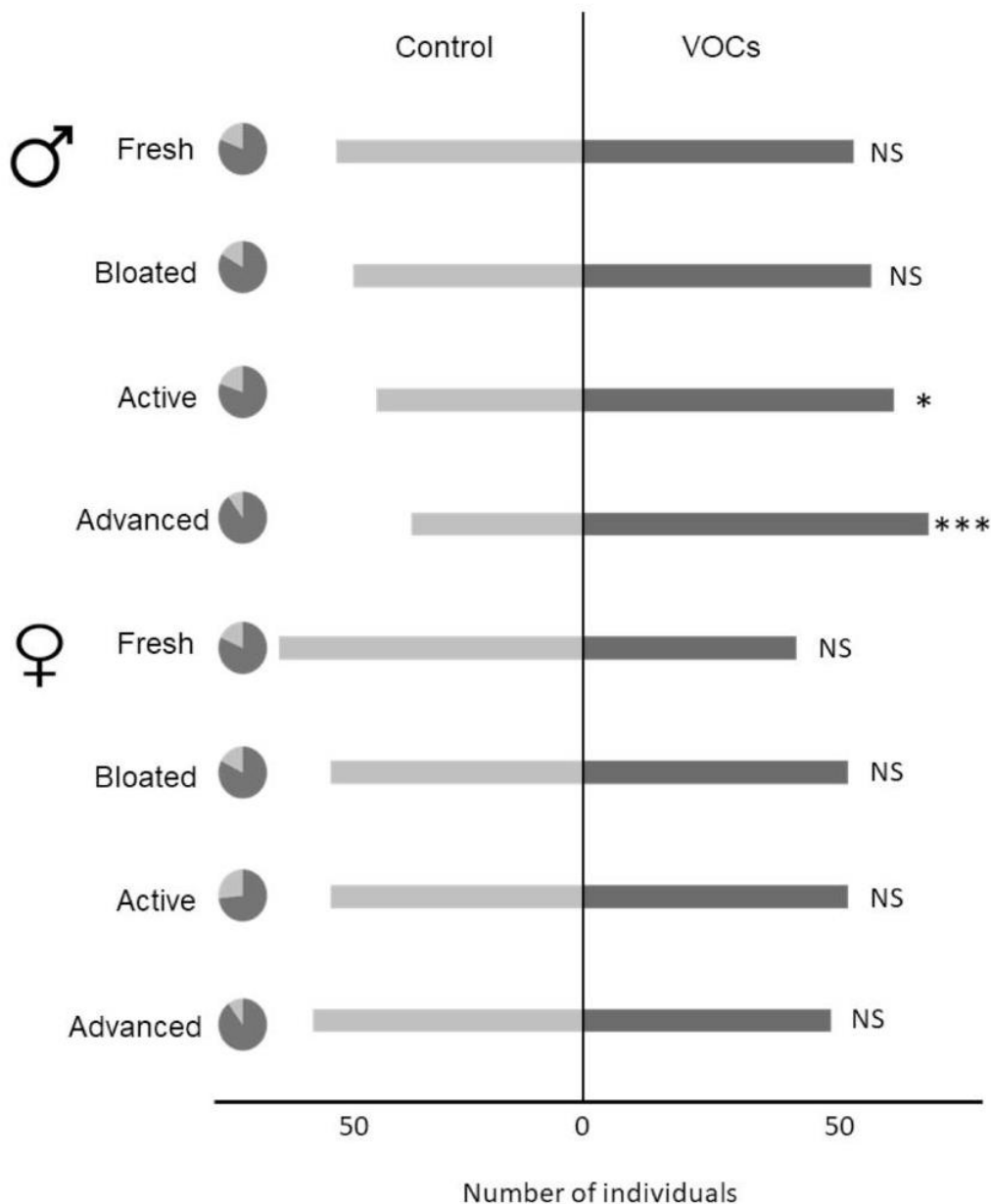


Figure 4. Female and male behavioral responses to the volatile cues associated with each decomposition stage. Dark grey areas in pie charts display proportions of responding individuals. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; NS Not Significant.

4. Discussion

The main objective of the present study was to evaluate the ability of *D. frischii* to perceive and respond to the volatile compounds associated with the different stages of decomposition of a cadaver. It aimed at confirming a common observation: necrophagous beetles are more likely to colonize a corpse during the advanced decay stage [43–48].

The electrophysiological experiment revealed differences in the ability of the olfactory apparatus of females and males to perceive the chemical cues released during the entire decomposition process. Unfortunately, really poor information is available on the structural characterization of the diversity of sensilla in this species. Such data may explain why females perceive the chemical compounds released during the advanced decay stage, while males perceive the smell of a cadaver at the earliest stages of

decomposition. Males and females in the species *Thanatophilus sinuatus* Fabricius, a necrophagous beetle belonging to the Silphidae family, were already shown to have different abilities to perceive cadaveric compounds [29]. However, here also, the structural characterization of the antennae was not performed.

We wanted to have sterile compresses impregnated with cadaveric odors to be able to carry out electrophysiological and behavioral assays. This method of volatile capture is, however, not adapted to perform a fine screening and quantification of the volatile organic compounds released by dead rats. As a consequence, many VOCs were identified but were found to be under the limit of quantification. Based on the quantifiable compounds, all decomposition stages were shown to have distinct volatile signature, confirming many previous reports [12,21].

The behavioral trials showed that even if males can detect compounds from the early stages of decomposition, they are only attracted by a cadaver under active and advanced decay stages. On the other hand, even if females perceive cadaveric VOCs from the advanced stage, they are not attracted by this stage. These information confirm the common observation that necrophagous coleopterans prefer colonizing advanced decay corpses [43–48].

Our behavioral and electrophysiological data confirm previous field observations stating that males are the first to colonize a corpse. One could raise the hypothesis that females do not respond to the smell of a cadaver unless they detect the presence of males. Upon encounter with a cadaver, males might be releasing pheromones that attract females and possibly reinforcing males' attraction. This pheromonal cue could act in synergy with cadaver VOCs, to inform females about the presence of a mating site where they can both reproduce or lay their eggs. Such a chemical communication has been shown in *Nicrophorus vespilloides* Herbst (Coleoptera: Silphidae) and *D. maculatus* [27,30,49]. The existence and composition of such a pheromone is yet to be characterized [27,50]. Futures studies using two-dimensional gas chromatography could help to detect the pheromonal compounds in such a complex blend of volatile molecules [51].

While *D. frischii* males perceive the volatiles from a cadaver at any decomposition stage, they do not behaviorally respond to each of them. How *D. frischii* differentiates between the early stages and the latter stages remains to be solved. Some specific chemical compounds might be used to evaluate the decomposition stage of the cadaver. While some compounds are continuously released during the entire decomposition process, some specific compounds are associated with a specific decomposition stage [10,15]. Sulfured compounds (such as dimethyl trisulfide and dimethyl disulfide) are released during the entire process of decomposition and are probably responsible for the electrical depolarization recorded from male and female antennae [10,12,52,53]. Indeed, several other necrophagous coleopterans are able to perceive these compounds. For instance, Silphidae commonly use these compounds to target a potential corpse to colonize [15,27,28,54]. However, since *D. frischii* is attracted by specific decomposition stages and not all of them. This might be explained by the perception of additional compounds and/or by the ability of *D. frischii* to perceive variation in the relative concentrations of each volatile compound. Some chemicals may be attractive or repellent to necrophagous insects, according to their concentration [15,29]. Also, some necrophagous coleopterans respond to saponificated long chain fatty acids such as benzylbutyrate (e.g., *D. maculatus*) [30]. These compounds are released during the later stages of decomposition and could act in synergy to inform *D. frischii* to the best moment to colonize the corpse [10,15].

5. Conclusions

D. frischii male and female antennae elicited strong electrical depolarization during exposure to the smell of a cadaver at the advanced decay stage. While female *D. frischii* were not attracted to the smell of a cadaver (in any stage of decomposition), males were attracted by the smell associated with the active and advanced decay stages. These results suggest that specific VOCs released by a decaying body guide necrophagous coleopterans to their feeding site. These results lend support to

the hypothesis that females do not respond to the smell of a cadaver unless they detect the presence of males, releasing either sex or aggregation pheromones.

Author Contributions: C.M. and F.V. designed the experimental protocol. D.M. and C.M. carried out the experimental work. C.M. and D.M. analyzed the data. C.M., D.M. and F.V. wrote the manuscript. F.F. is the head of the Department. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank Yves Brostaux and Georgia Purcaro for their advices on statistics and volatile collection, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Dent, B.; Forbes, S.; Stuart, B. Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.* **2004**, *45*, 576–585. [\[CrossRef\]](#)
- Statheropoulos, M.; Agapiou, A.; Spiliopoulou, C.; Pallis, G.; Sianos, E. Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. *Sci. Total Environ.* **2007**, *385*, 221–227. [\[CrossRef\]](#)
- Janaway, R.C.; Percival, S.; Wilson, A. Decomposition of human remains. In *Microbiology and Aging: Clinical Manifestations*, 1st ed.; Perceval, S.L., Ed.; Springer Nature: Basel, Switzerland, 2009; pp. 313–334. [\[CrossRef\]](#)
- Martin, C.; Verheggen, F. Odour profile of human corpses: A review. *Forensic Chem.* **2018**, *10*, 27–36. [\[CrossRef\]](#)
- Adams, V. Dying: What happens to the body after death. In *Dying and Death in Oncology*, 1st ed.; Berk, L., Ed.; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2017; pp. 23–30. [\[CrossRef\]](#)
- Payne, J. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus. *Ecology* **1965**, *46*, 592–602. [\[CrossRef\]](#)
- Vass, A. Beyond the grave—Understanding human decomposition. *Microbiol. Today* **2001**, *28*, 190–193.
- Amendt, J.; Krettek, R.; Zehner, R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften* **2004**, *91*, 51–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Grassberger, M.; Frank, C. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *J. Med. Entomol.* **2004**, *41*, 511–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dekeirsschieter, J.; Verheggen, F.; Gohy, M.; Hubrecht, F.; Bourguignon, L.; Lognay, G.; Haubruge, E. Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic Sci. Int.* **2009**, *189*, 46–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cernosek, T.; Eckert, K.; Carter, D.; Perrault, K. Volatile organic compound profiling from postmortem microbes using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Forensic Sci.* **2019**, *65*, 134–143. [\[CrossRef\]](#)
- Martin, C.; Vanderplanck, M.; Boullis, A.; Francis, F.; Haubruge, E.; Verheggen, F. Impact of necrophagous insects on the emission of volatile organic compounds released during the decaying process. *Entomol. Gen.* **2019**, *39*, 19–31. [\[CrossRef\]](#)
- Forbes, S.; Perrault, K.; Stefanuto, P.; Nizio, K.; Focant, J. Comparison of the decomposition VOC profile during winter and summer in a moist, mid-latitude (Cfb) climate. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Forbes, S.; Perrault, K. Decomposition odour profiling in the air and soil surrounding vertebrate carrion. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [\[CrossRef\]](#)
- Verheggen, F.; Perrault, K.; Megido, R.; Dubois, L.; Francis, F.; Haubruge, E.; Forbes, S.L.; Focant, J.-F.; Stefanuto, P.-H. The odor of death: An overview of current knowledge on characterization and applications. *Bioscience* **2017**, *67*, 600–613. [\[CrossRef\]](#)
- Anderson, G. Insects succession on carrion and its relationship to determining time of death. In *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigation*, 1st ed.; Castner, E., Byrd, J., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2000; pp. 143–175. [\[CrossRef\]](#)
- Brodie, B.; Gries, R.; Martins, A.; Vanlaerhoven, S.; Gries, G. Bimodal cue complex signifies suitable oviposition sites to gravid females of the common green bottle fly. *Entomol. Exp. Appl.* **2014**, *153*, 114–127. [\[CrossRef\]](#)
- Zhu, J.; Chaudhury, M.; Tangtrakulwanich, K.; Skoda, S. Identification of oviposition attractants of the secondary screwworm, *Cochliomyia macellaria* (F.) released from rotten chicken liver. *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 1407–1414. [\[CrossRef\]](#)

19. Frederickx, C.; Dekeirsschieter, J.; Verheggen, F.; Haubruge, E. Responses of *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) to cadaveric volatile organic compounds. *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 386–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Nilssen, A.; Tømmerås, B.; Schmid, R.; Evensen, S. Dimethyl trisulphide is a strong attractant for some calliphorids and a muscid but not for the reindeer oestrids *Hypoderma tarandi* and *Cephenemyia trompe*. *Entomol. Exp. Appl.* **1996**, *79*, 211–218. [[CrossRef](#)]
21. Dekeirsschieter, J.; Verheggen, F.; Haubruge, E.; Brostaux, Y. Carrion beetles visiting pig carcasses during early spring in urban, forest and agricultural biotopes of Western Europe. *J. Insect Sci.* **2011**, *11*, 1–13. [[CrossRef](#)]
22. Charabidzé, D.; Colard, T.; Vincent, B.; Pasquerault, T.; Hedouin, V. Involvement of larder beetles (Coleoptera: Dermestidae) on human cadavers: A review of 81 forensic cases. *Int. J. Legal Med.* **2014**, *128*, 1021–1030. [[CrossRef](#)]
23. Magni, P.; Voss, S.; Testi, R.; Borrini, M.; Dadour, I. A biological and procedural review of forensically significant Dermestes species (Coleoptera: Dermestidae). *J. Med. Entomol.* **2015**, *52*, 755–769. [[CrossRef](#)]
24. Martin-Vega, D.; Diaz-Aranda, L.; Baz, A.; Cifrian, B. Effect of temperature on the survival and development of three forensically relevant Dermestes species (Coleoptera: Dermestidae). *J. Med. Entomol.* **2017**, *54*, 1140–1150. [[CrossRef](#)]
25. Kulshrestha, P.; Satpathy, D. Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* **2001**, *120*, 15–17. [[CrossRef](#)]
26. Boeckh, J.; Kaissling, K.E.; Schneider, D. Insect olfactory receptors. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1965**, *30*, 263–280. [[CrossRef](#)]
27. Kalinová, B.; Podskalská, H.; Růžička, J.; Hoskovec, M. Irresistible bouquet of death-how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: *Nicrophorus*) attracted by carcasses. *Naturwissenschaften* **2009**, *96*, 889–899. [[CrossRef](#)]
28. Podskalská, H.; Růžička, J.; Hoskovec, M.; Šálek, M. Use of infochemicals to attract carrion beetles into pitfall traps. *Entomol. Exp. Appl.* **2009**, *132*, 59–64. [[CrossRef](#)]
29. Dekeirsschieter, J.; Frederickx, C.; Lognay, G.; Brostaux, Y.; Verheggen, F.; Haubruge, E. Electrophysiological and behavioral responses of *Thanatophilus sinuatus* Fabricius (Coleoptera: Silphidae) to selected cadaveric volatile organic compounds. *J. Forensic Sci.* **2013**, *58*, 917–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Von Hoermann, C.; Ruther, J.; Reibe, S.; Madea, B.; Ayasse, M. The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). *Forensic Sci. Int.* **2011**, *212*, 173–179. [[CrossRef](#)]
31. Zanetti, N.; Visciarelli, E.; Centeno, N. Trophic roles of scavenger beetles in relation to decomposition stages and seasons. *Rev. Bras. Entomol.* **2015**, *59*, 132–137. [[CrossRef](#)]
32. Kumara, T.; Abu Hassan, A.; Che Salmah, M.; Bhupinder, S. The infestation of *Dermestes ater* (De Geer) on a human corpse in Malaysia. *Trop. Biomed.* **2009**, *26*, 73–79. [[PubMed](#)]
33. Rosenbaum, F.; Devigne, C.; Charabidzé, D. Ecologie des Dermestidae, une famille de Coléoptères nécrophages associée aux cadavres squelettisés. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **2015**, *51*, 294–302. [[CrossRef](#)]
34. Martin, C.; Verheggen, F. Behavioural response of *Lucilia sericata* to a decaying body infested by necrophagous insects. *Physiol. Entomol.* **2018**, *43*, 188–195. [[CrossRef](#)]
35. Degreeff, L.; Furton, K. Collection and identification of human remains volatiles by non-contact, dynamic airflow sampling and SPME-GC/MS using various sorbent materials. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1295–1307. [[CrossRef](#)]
36. DeGreeff, L.; Weakley-Jones, B.; Furton, K. Creation of training aids for human remains detection canines utilizing a non-contact, dynamic airflow volatile concentration technique. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *217*, 32–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Verheggen, F.; Arnaud, L.; Bartram, S.; Gohy, M.; Haubruge, E. Aphid and plant volatiles induce oviposition in an aphidophagous hoverfly. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 301–307. [[CrossRef](#)]
38. Verheggen, F.; Fagel, Q.; Heuskin, S.; Lognay, G.; Francis, F.; Haubruge, E. Electrophysiological and behavioral responses of the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis* pallas, to sesquiterpene semiochemicals. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 2148–2155. [[CrossRef](#)]
39. De Backer, L.; Bawin, T.; Schott, M.; Gillard, L.; Markó, I.; Verheggen, F. Betraying its presence: Identification of the chemical signal released by *Tuta absoluta*-infested tomato plants that guide generalist predators toward their prey. *Arthropod Plant Interact.* **2016**, *11*, 111–120. [[CrossRef](#)]

40. Barsics, F.; Latine, R.; Gfeller, A.; Laloux, M.; Lognay, G.; Whatelet, J.; Haubruge, E.; Verheggen, F. Do root-emitted volatile organic compounds attract wireworms? *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2012**, *77*, 561–565.
41. Gfeller, A.; Laloux, M.; Barsics, F.; Kati, D.; Haubruge, E.; Du Jardin, P.; Verheggen, F.; Lognay, G.; Wathélet, J.-P.; Fauconnier, M.-L. Characterization of volatile organic compounds emitted by barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their attractiveness to wireworms. *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 1129–1139. [[CrossRef](#)]
42. Kuznetsova, A.; Brockhoff, P.; Christensen, R. lmerTest package: Tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* **2017**, *82*, 1–26. [[CrossRef](#)]
43. Campobasso, C.; Di Vella, G.; Introna, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci. Int.* **2001**, *120*, 18–27. [[CrossRef](#)]
44. Sharanowski, B.; Walker, E.; Anderson, G. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *179*, 219–240. [[CrossRef](#)]
45. Yones, A.; Rasha, A.; Lamia, A.; Saly, Y. Identification of forensically important beetles on exposed human leftover parts in Assiut, Egypt during spring/summer season. *Assiut Med. J.* **2010**, *34*, 123–131.
46. Matuszewski, S.; Szafałowicz, M.; Jarmusz, M. Insects colonising carcasses in open and forest habitats of Central Europe: Search for indicators of corpse relocation. *Forensic Sci. Int.* **2013**, *231*, 234–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dupont, F.; Felix, B.; Daniel, C.; Champlain, D.-L. Biodiversity study of arthropods collected on rat carrion in Yaounde, Cameroon: First study on forensic entomology in Central Africa. *Int. J. Biosci.* **2012**, *2*, 1–8.
48. Kelly, J.; Linde, T.; Van Der Anderson, G. The influence of clothing and wrapping on carcass decomposition and arthropod succession: A winter study in Central South Africa. *Can. Soc. Forensic Sci. J.* **2008**, *41*, 135–147. [[CrossRef](#)]
49. Haberer, W.; Schmitt, T.; Peschke, K.; Schreier, P.; Müller, J.K. Ethyl 4-methyl heptanoate: A male-produced pheromone of *Nicrophorus vespilloides*. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 94–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Francke, W.; Dettner, K. Chemical signalling in beetles. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *240*, 85–166. [[CrossRef](#)]
51. Dekeirsschieter, J.; Stefanuto, P.-H.; Brasseur, C.; Haubruge, E.; Focant, J.-F. Enhanced characterization of the smell of death by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)]
52. Stefanuto, P.-H.; Perrault, K.; Stadler, S.; Pesesse, R.; Leblanc, H.; Forbes, S.; Focant, J.-F. GC × GC-TOFMS and supervised multivariate approaches to study human cadaveric decomposition olfactory signatures. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4767–4778. [[CrossRef](#)]
53. Armstrong, P.; Nizio, K.; Perrault, K.; Forbes, S. Establishing the volatile profile of pig carcasses as analogues for human decomposition during the early postmortem period. *Heliyon* **2016**, *2*, 1–24. [[CrossRef](#)]
54. Von Hoermann, C.; Ruther, J.; Ayasse, M. The attraction of virgin female hide beetles (*Dermestes maculatus*) to cadavers by a combination of decomposition odour and male sex pheromones. *Front. Zool.* **2012**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 5: Article en cours de révision: “Forensic taphonomy: characterization of the gravesoil chemistry through a multivariate approach combining mineral and volatile analyses”
(Version du 10/04/2020)

Clément Martin^a, Philippe Maesen^b, Damien Minchilli^a, Frédéric Francis^a and François Verheggen^a

^a Gembloux Agro-Bio Tech, TERRA, University of Liège. Avenue de la Faculté d'Agronomie 2B, 5030 Gembloux, Belgium (C. Martin : « cmartin@uliege.be » ; D. Minchilli : « minchdam@gmail.com » ; F. Verheggen : « fverheggen@uliege.be »)

^b BEAGX, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège. Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgium (philippe.maesen@ulg.ac.be)

Corresponding Author :

François Verheggen

2, Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

fverheggen@uliege.be

+3281622662 (tel)

Abstract

The detection of clandestine graves remains an important challenge for police forces. A better understanding of the chemical modifications occurring in the soil of a grave is needed to develop new methods of recovering buried cadavers.

In this work, we aimed at characterizing the impact of the presence of a decaying corpse on the global chemistry of two different soils (a sandy loam soil and a loamy soil) following a multidisciplinary approach combining physico-chemical, mineral and volatile analyses.

Dead rats were buried and left to decompose during two months. During the excavation, three soil layers were sampled above the rats and one layer was sampled under the rats. Each layer underwent a wide group of analyses, including (1) granulometry; (2) pH, dry matter and conductivity; (3) mineral composition (K, Na, N, Mg, Ca, P, organic carbon); and (4) volatile organic compounds.

Our multivariate analyses (permMANOVA) reveal that a decaying rat impacts the chemical characteristics of both soil type depending on the soil layer. The layers located near to the cadaver are the most impacted while the layers located near to the surface are almost not impacted by the decomposition. Our results suggest that the soil volatile compounds are more reliable than minerals to predict the presence of a grave soil. However, by combining mineral and volatile analyses the error rate of the predictive model reach only 10%, and allows to identify the key features that indicate the presence of a corpse in a soil (in order of importance): organic carbon, calcium, pH, conductivity, dimethyl-disulfide. These data suggest that several compounds could be targeted during the analysis of clandestine gravesoil and be used as PMI or gravesoil indicators.

Introduction

Forensic taphonomy is a scientific discipline that focuses on the study of postmortem processes which affect the preservation, observation, or recovery of dead organisms, allowing the reconstruction of the circumstances of their death (Carter et al., 2006; Haglund and Sorg, 1997; Ubelaker, 1997). Forensic taphonomy is considered as a key development in the field of forensic anthropology, as this young discipline provides a broader and deeper conceptual framework, commonly considered as a true paradigm shift (Dirkmaat et al., 2008). In this context, the interest for vertebrate decomposition has increased (Carter et al., 2006; Fancher et al., 2017; Stokes et al., 2009; Szelecz et al., 2018a; Tumer et al., 2013).

On one hand, many studies have focused on bodies decomposing in the open air (facilitating many observations) over a long period of time (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Forbes and Perrault, 2014; Macdonald et al., 2014; Meyer et al., 2013; Szelecz et al., 2018b). On the other hand, the decomposition under the ground have received less attention (Meyer et al., 2013), especially as regard to the chemistry of a soil hosting a decomposing corpse. Such studies would be valuable, since soil scientists have suggested that the chemistry of a gravesoil could be used to determine post-mortem intervals or even to locate clandestine graves (Adserias-Garriga et al., 2017; Carter et al., 2008; Fancher et al., 2017; Iqbal et al., 2017; Szelecz et al., 2018b; Turner and Wiltshire, 1999). But thanatochemistry is another young discipline and we are still missing information on the chemical changes occurring in a soil as a consequence of the presence of a decomposing corpse (Meyer et al., 2013). The available literature on the chemistry of grave soil is typically focused on either mineral or volatile analyses (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Forbes and Perrault, 2014; Macdonald et al., 2014; Perrault et al., 2014) and so far, no studies investigated the chemical changes under a multivariate approach combining both methods.

Studies focusing on mineral changes in soil related to the decomposition of remains highlights changes in the inorganic compounds amount. An increase in the nitrogen amounts in gravesoil is usually observed (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Carter et al., 2010, 2008; Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013) and has already been suggested as a target compound to predict the PMI (Fancher et al., 2017). In addition, variation of pH is already well documented (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017; Hopkins et al., 2000; Stokes et al., 2009; Tumer et al., 2013). However, authors did not observed tendency in the variation of pH as the pH may increase or decrease through the decomposition process (Fancher et al., 2017). This variation of pH is meanly related to the release of NH_4^+ in the soil during the decomposition of the corpse (Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013). Increase of the amount of calcium, phosphor and magnesium is also reported but only during the latter stage of decomposition (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013). Regarding studies focusing on the cadaveric volatilome of gravesoil, the interest is lower than for the mineralogy of gravesoils. However, changes in the soil volatilome were previous reported in the literatures (Brasseur et al., 2012; Dubois et al., 2018; Forbes et al., 2016; Nizio et al., 2017; Vass et al., 2004). Usual cadaveric compounds as sulfur compounds, alkanes, alcohols and ketones were also identified in gravesoil (Brasseur et al., 2012; Dekeirsschieter et al., 2009; Dubois et al., 2018; Forbes and

Perrault, 2014; Perrault et al., 2014). Despite the recent interest in the inorganic and organic changes occurring in gravesoil, no study investigating the global chemical changes in gravesoil through the soil column and in different soil types was found.

In this study, we aim at determining the effect of mammal decomposition on the soil physico-chemistry, by combining mineral and volatile analyses, through a multivariate approach. We also considered the longitudinal changes occurring through the soil column, which has never been considered so far. We included the soil texture into account during this assay by replicating all physico-chemical analyses in two different types of soil. We finally discuss the existence of chemical markers that could be used to discriminate a grave from a normal soil.

Material and methods

Biological material

Six laboratory rats (3–5 months old, 208.9 ± 16.4 g), were raised and euthanized at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liège (ethic agreement n°18-2021), by CO₂ asphyxia, before being frozen until the start of the experiment. Each rat was defrosted in a hot water bath ($\approx 40^{\circ}\text{C}$) before being buried.

Site description

The experiment took place in a greenhouse at the faculty of Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium. The greenhouse was 5m long, 3m wide, and was divided in fifteen squared areas (1×1 m) (Figure 1). To avoid cross contaminations, graves were not installed in areas next to each other. Two soil modalities were considered: a loam soil and a sandy loam soil. For each type of soil, four graves were dug: a dead rat was placed in three of them, while the fourth grave was used as a control. The graves area was 40×20 cm, and was 30 cm deep. The soil of each grave was collected and introduced in different containers. In one of the containers, sand (granulometry: 0.7 mm) was introduced at a ratio of 60/40 v/v (soil/sand), to increase the granulometry of the soil (see results section), which will later be named “the sandy loam soil” (Staff, 2017). The soil in the second container remained unchanged, and will later be referred to “the loam soil”. Each soil was homogenized by stirring the soil in each container. Ten centimetres of soil was introduced in all 8 graves. Rats (n=6) were then placed in six of them. Then, 20cm of soil were added (Figure 1). In both control graves, a data logger (EL-USB-2+®) was placed at a depth of 20cm to measure temperature.

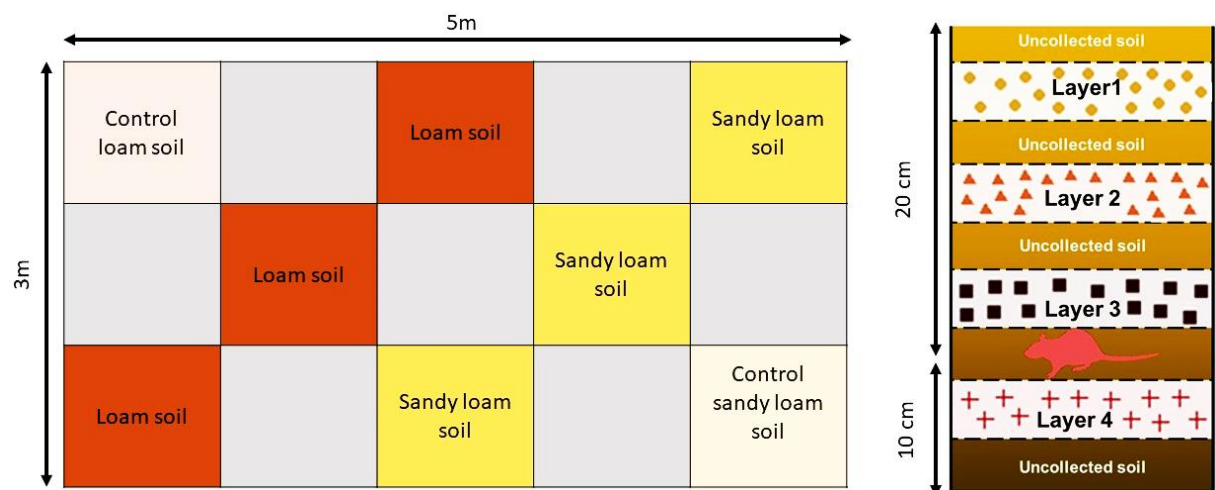


Figure 1. (Left) Graves were set up in a greenhouse. A dead rat was placed in each grave except the two control graves. (Right) After two months, rats were exhumed and different layers of soil were collected.

Rats excavation and gravesoil sampling

After two months, rats were exhumed and four different layers of soil were collected to perform chemical analyses (Figure 1). The first four centimetres of soil were removed and discarded. Then, 1kg of soil was collected from a layer of 3cm (later called soil layer 1), the soil surplus of this layer was discarded. We then removed 3 cm of soil. We repeated that procedure to collect soil layer 2 and soil layer 3. When the rat remains were reached, all remains were removed. We finally collected a fourth sample of soil (soil layer 4), consisting in the 3cm of soil directly located under the remains. All samples were kept in sealed glass bottle and stored in -20°C until analyses.

Mineral analysis

The dry matter was measured by placing each soil sample in a proofer at 60°C for two days. Then, electrical conductivity and soil water pH were measured on 1:2.5 (w:w) soil to water extracts (Pansu and Gautheyrou, 2006; Szelecz et al., 2018a). A pH-meter was first calibrated with standard solutions at pH of 4, 7 and 10. To measure conductivity, the pH-meter was calibrate using a standard solution with a conductivity of 140 μ S. After calibration, pH and conductivity were measured in the water extracts. Major compounds (organic carbon, phosphate, calcium, potassium, magnesium and sodium) were dosed by mineralizing 0.5g of dry soil in 5ml of aqua regia (1:3 (v:v) Nitric acid : chloridric acid) during 2h. A 10% dilution was performed before analysing the samples. Organic carbon, phosphate, calcium, magnesium and sodium measurements were performed on an atomic absorption spectrometer (AAS) (Perkinelmer AAnalyst200®). Potassium measurements were performed on an emission spectrometer (Perkinelmer AAnalyst200®). All dosages were performed using calibration curves. The following length wave were used: $\lambda_K = 766.49$ nm; $\lambda_{Na} = 589.00$ nm; $\lambda_{Ca} = 422.67$ nm; $\lambda_{Mg} = 285.21$ nm; $\lambda_P = 285.21$ nm. Nitrogen amount was determined using Kjeldahl method.

Physical analysis

To determine the clay, silt and sand fraction in the loam and sandy loam soil, one sample of each soil type was taken. As loam and sandy loam soils were homogenized before to fill the grave, one replicate of each soil type was representative to determine particle size. The pipette method was applied on the samples to obtain the particle size (Ranst et al., 1999).

Volatile analysis

To analyse the volatilome of each soil layer, 20.0 ± 0.5 g of soil were introduced in a 400 mL glass chamber (d=10cm; h=5cm). A dynamic sampling of the headspace air was then performed at 23°C, after an equilibrium time of 20 min. The air flow was adjusted at 200 mL/min. The cadaveric VOCs from the soil were trapped on a hydrophobic TenaxTa/Carbograph tube (Markes International®, Llantrisant, UK) (Perrault et al., 2014). After 120 minutes of sampling, tubes were sealed and stored in a fridge at 4°C to avoid desorption of the compounds. Tubes were then analysed by GC/ms (QP2020 NX, Shimadzu®, Kyoto, Japan). Thermodesorption was performed on a TD30R module (Shimadzu®, Kyoto, Japan). Compounds were separated on a Rtx-5ms capillary column (30.0x0.25x0.25; Agilent technology®, Santa Clara, California, USA). Table 1 lists all analytical parameters. All chromatograms were aligned with the software GCaligner® (Dellicour and Lecocq, 2013).

Table 1. Analytical parameters of the TD30R-GC/MS analysis.

TD30R	GC-MS (QP2020 NX)
Temperature: 280°C during 8min	Carrier gas: Helium
Trap temperature: -30°C – 280°C	Column: Rtx-5ms 30.0x0.25x0.25
Transfer line temperature: 250°C	Initial temperature: 40°C held during 3min
Desorption mode: split	First ramp: 4°C/min until 220°C
Slip ratio: 3	Second ramp: 10°C/min until 300°C held during 2 min
	Mass scan: m/z 30-350
	Ion source temperature: 200°C
	Detector voltage: 0.1kV

Statistics

All statistical analyses were performed on R version 3.4.2 (R Foundation for Statistical Computing). In this study, we aimed at evaluating the impact of the presence of a cadaver on the mineral composition and on the volatilome of a soil grave. To do so, the same multivariate statistical analyses were performed first on the mineral and on the volatile results, separately. Then, the two data sets were merged to perform a global analysis. We aimed at evaluating the accuracy of a multidisciplinary analysis to highlight the presence of a corpse in a soil. Additional univariate analyses were performed on the mineral data set.

Principal component analyses (PCA) were conducted on the different data set (“Fviz_pca_ind” command, R-packages: ggplot2, Factoextra (ver. 1.0.3)). Three PCAs were

obtained: one on each type of soil and a third one on the combination of both data sets. For each PCA, a correlation circle was generated to explain the selected dimension.

Permutational multivariate analyses of variance (i.e. perMANOVA) were conducted using an Euclidian distance matrix and 999 permutations (“adonis” command, R-package vegan, (Oksanen et al., 2017)) to test for potential differences in the chemistry of both treatments (with or without a cadaver), soil layers and types of soil. P-values were adjusted using Bonferroni's correction to avoid increases in type error I due to multiple testing. When the returned p-value was significant ($p < 0.05$), multivariate pairwise analyses were performed to identify which modality is different from the others (“pairwise.adonis” command, R-package vegan, (Oksanen et al., 2017)). As this analysis is tough to the violation of data normality, only homoscedasticity was checked using the “betadisper” function. When homoscedasticity was not respected, Euclidean method was replaced by a Bray-Curtis method in the permMANOVA. Therefore, in the case of a Bray-Curtis analysis, the PCA were replaced by a non-metric multidimensional scaling (NMDS) (“orditorp” command, R-package vegan, (Oksanen et al., 2017)) to respect the conditions of application. The p-values of theses comparisons underwent Bonferroni's adjustment to avoid type I errors due to multiple analyses. Indicator compounds were identified by the creation of a random forest (“randomForest” command, R-package randomForest) which allows to evaluate the proximities among data points by generating 500 trees and using a number of variables at each branch of 3.

Two-way ANOVAs were also performed on the data of the mineral analyses to identify those compounds that were impacted by the presence of a corpse.

Finally, a last analysis was performed on the third data set (combining mineral and volatile data) by selecting the marker compounds revealed by the random forest analyses previously performed to see if we can refine the detection method of clandestine grave by measuring fewer mineral or volatile compounds.

Results

Environmental condition

Two months after the beginning of the experiment, all rats were exhumed and their decomposition stage was estimated based on qualitative data (Dekeirsschieter et al., 2009). In both types of soil, rats reached the dry remains stage: hairs, dry skin and bones only were found in the grave. However, we observed that the rats which decayed in sandy loam soil were wetter with soil sticking on the remain, while rats in the loam soil were drier with less soil stuck on the remains. The average temperature during the experiment reached 16.5 ± 0.1 °C at 20 cm depth, for both soil types.

Physical analysis

For both types of soil, we determined the portion of clay (0-2 µm), coarse silt (2-20 µm), fine silt (20-50 µm) and sand (>50 µm). The loamy soil was composed of 33.3 % of sand, 24.6 %

coarse silt, 24.8 % fine silt and 17.3 % clay. The sandy soil was composed of 63.2 % sand, 13.5 % coarse silt, 13.2 % fine silt and 10.1 % clay.

Mineralogy analysis

Firstly, we performed a global analysis of the results by merging both loam and sandy loam soils. The Bray-Curtis method was applied because the conditions of application of the permMANOVA with Euclidean methods (homoscedasticity and normality) were not respected. For the same reason, results are displayed in Figure 2 following a NMDS (stress value = 0.06). Despite the intrinsic difference between both types of soil ($F_{1,31} = 14.48$; p -value = 0.005), the presence of remains in both soils impacted the mineralogy of both soils ($F_{1,31} = 6.42$; p -value = 0.011), but in different ways ($F_{1,31} = 12.12$; p -value = 0.004). As a consequence, we decided to analyse the impact of a cadaver on the two soils independently.

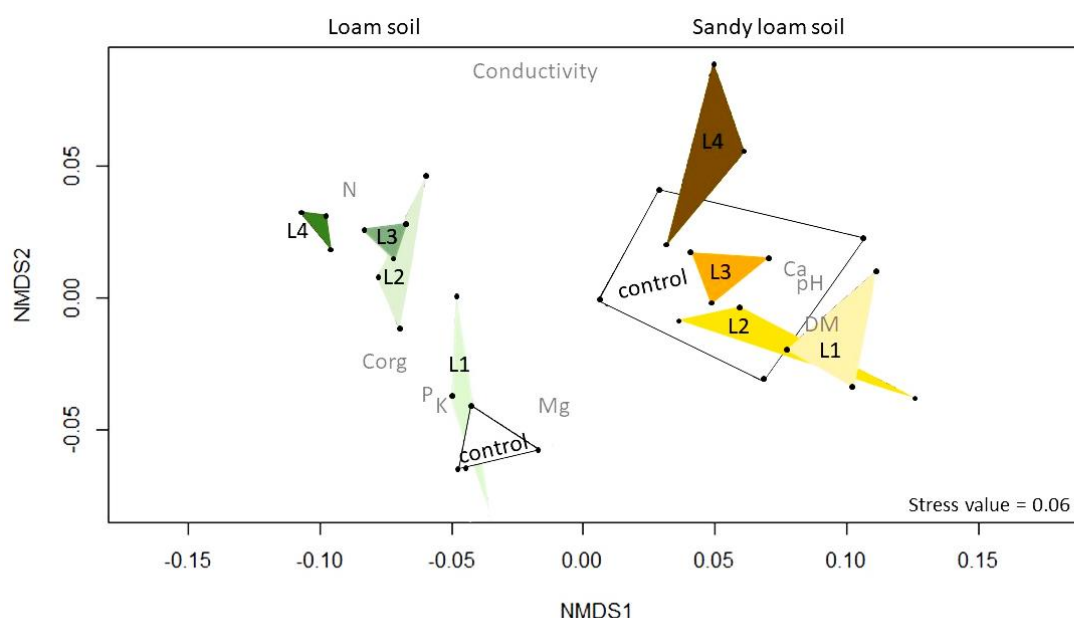


Figure 2. Non-metric multidimensional scaling representing the mineral analysis of the soil samples (soil layer 4 = L4, soil layer 3 = L3, soil layer 2 = L2, soil layer 1 = L1) for the two types of soil (yellow-brown = loam soil ; green = sandy loam soil).

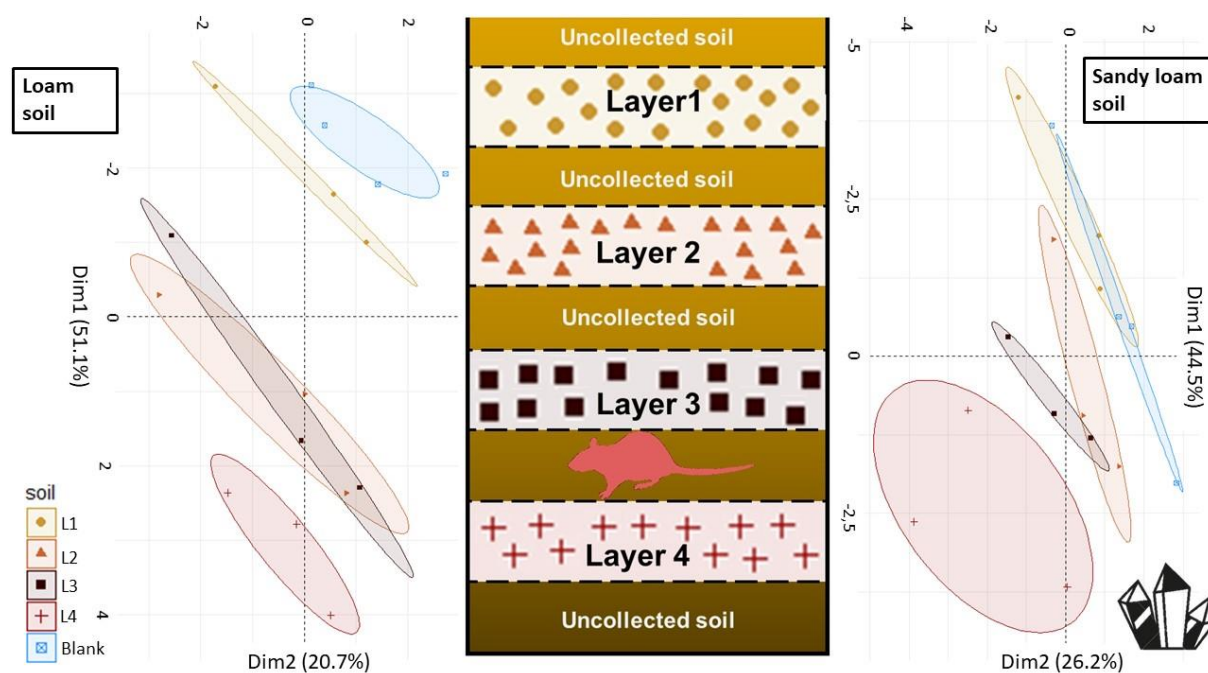


Figure 3. Principal component analyses illustrating the mineral changes of gravesoil in different depth (Layer 4, Layer 3, Layer2, Layer 1) within two types of soil: Left: Loam soil. Right: Sandy loam soil.

Secondly, we analysed the data for the two types of soil separately. The sample distribution allowed to perform a permMANOVA with a Euclidean method. So, all soil samples were represented on two PCA (one per type of soil, Figure 3). In both loam and sandy loam soils, the presence of the remains impacts the mineralogy of the soil (natural: $F_{4,15} = 5.92$; p -value = 0.011; sandy loam soil: $F_{4,15} = 6.11$; p -value = 0.007). The comparison of the two PCA suggests that all soil layers are not similarly impacted in both types of soil. The presence of a cadaver mainly impacts layer #4, i.e. the one under the remains. This impact is more pronounced in loam soil than in sandy loam soil (Figure 3). As a general observation, one can say that the mineralogy of the soil layers is more impacted by the presence of a cadaver in the loam soil. The mineralogy of the layers located above the cadavers (layer 2 and layer 3) is also impacted by the presence of a cadaver in both soil types (no overlap with the control). The mineralogy of the first layer (L1), the nearest to the surface, is not impacted by the decomposition of a corpse located deeper in the soil (i.e. 20 cm)

The univariate analyses performed on each soil type reveal the chemical parameters that were impacted by the presence of a corpse include dry matter (loam soil: $F_{4,11} = 5.23$; p -value = 0.013; sandy loam soil: $F_{4,11} = 15.49$; p -value < 0.001), nitrogen (loam soil: $F_{4,11} = 32.89$; p -value < 0.001; sandy loam soil: $F_{4,11} = 4.51.490$; p -value = 0.021), pH (loam soil: $F_{4,11} = 23.36$; p -value < 0.001; sandy loam soil: $F_{4,11} = 105.80$; p -value < 0.001) and conductivity (loam soil: $F_{4,11} = 5.23$; p -value = 0.013; sandy loam soil: $F_{4,11} = 15.49$; p -value < 0.001). The chemical parameters that were not impacted by the presence of a cadaver include phosphor (loam soil: $F_{4,11} = 1.91$; p -value = 0.18; sandy loam soil: $F_{4,11} = 0.87$; p -value =

276 0.513), magnesium (loam soil: $F_{4,11} = 0.44$; p-value = 0.78; sandy loam soil: $F_{4,11} = 1.03$; p-
277 value = 0.431), potassium (loam soil: $F_{4,11} = 1.98$; p-value = 0.167; sandy loam soil: $F_{4,11} =$
278 0.41; p-value = 0.80) and sodium (loam soil: $F_{4,11} = 0.464$; p-value = 0.761; sandy loam soil:
279 $F_{4,11} = 0.546$; p-value = 0.706). We found two chemical parameters that were soil dependant:
280 Organic carbon (loam soil: $F_{4,11} = 19.18$; p-value < 0.001; sandy loam soil: $F_{4,11} = 1.49$; p-
281 value = 0.274) and calcium (loam soil: $F_{4,11} = 1.69$; p-value = 0.221; sandy loam soil: $F_{4,11}$
282 = 5.00; p-value = 0.015).

283 Figure 4 displays all mineral measurements, for both types of soil and all four soil layers.

284 To help us identifying potential indicator compounds (those that are the most impacted by the
285 presence of the corpses), we generated a predictive model, for which the accuracy is evaluated
286 by an error rate. The model merging mineral analysis of both soil types had an error rate of
287 25%, and suggest calcium, pH, organic carbon and conductivity as key indicators of the
288 presence of a cadaver in the soil (in order of importance). If we separate the two soil types in
289 two different predictive models, the error rate decreases to 12.5% for both soil model. The
290 indicator compounds become (in order of importance): calcium > organic carbon > pH >
291 conductivity (in sandy loam soil) and organic carbon > conductivity > nitrogen > pH (in loam
292 soil).

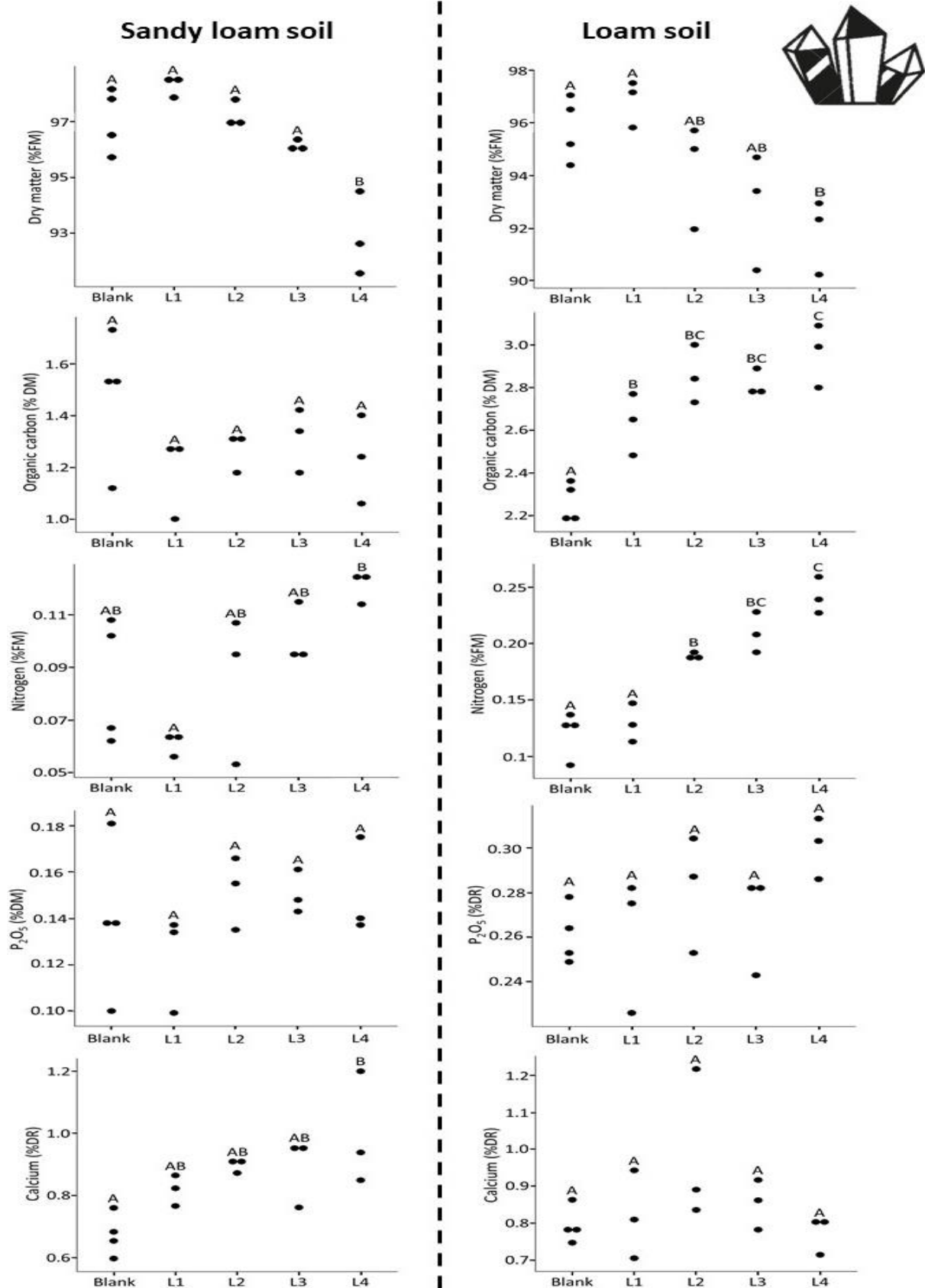


Figure 4. Single compounds analysis on the different layers (layer 4 = L4, Layer 3 = L3, Layer2 = L2, Layer 1 = L1) of the two types of soil (Loam and Sandy loam soil). All layers

are comparing to the blank of the respective soil type. Modalities sharing the same letter are not significantly different.

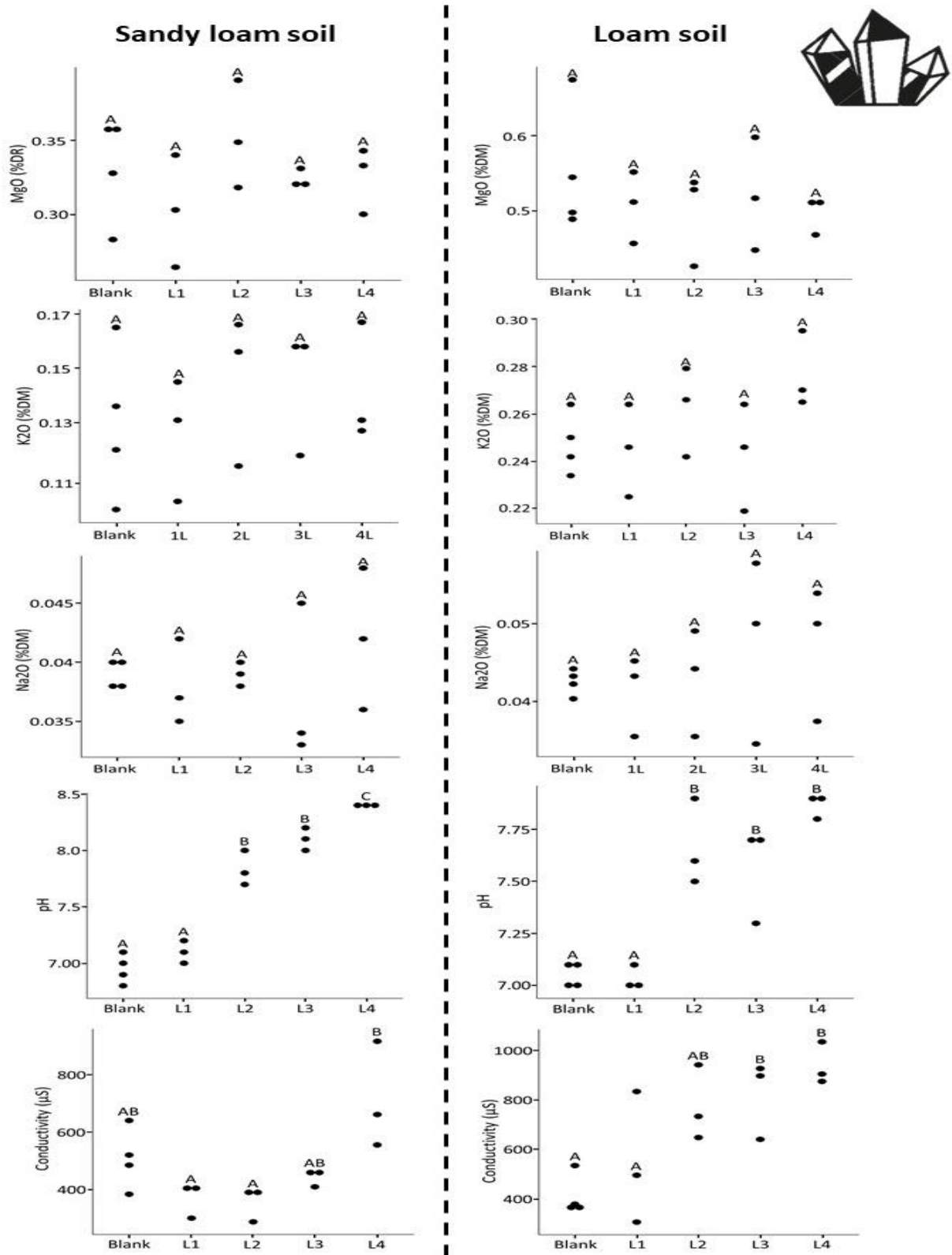


Figure 4 (continued).

Volatile analysis

The presence of remains impacts the volatilome in both types of soil ($F_{1,31} = 3.64$; $p\text{-value} = 0.009$). In addition, no impact of the type of soil on the cadaveric volatilome was observed ($F_{1,31} = 0.98$; $p\text{-value} = 0.397$). The volatilome of each layer of soil was found to be affected by a cadaver, but not similarly in both types of soil ($F_{9,31} = 2.63$; $p\text{-value} = 0.001$). For this reason, both types of soil were analysed separately (Figure 5).

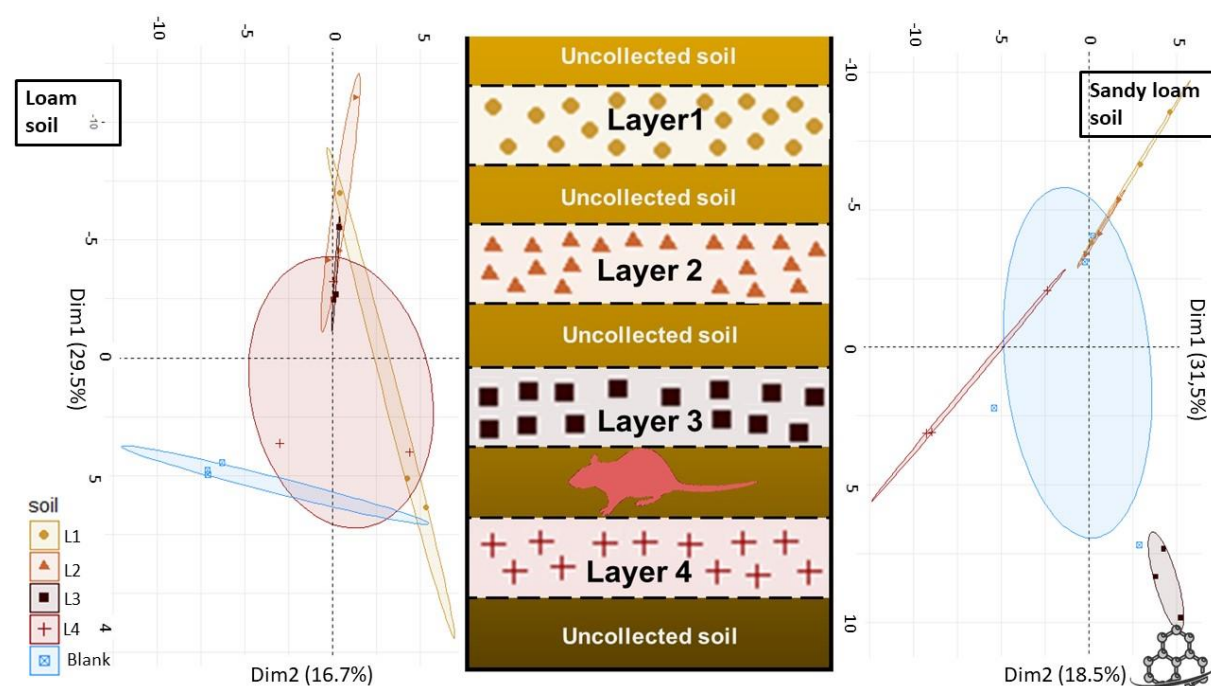


Figure 5. Principal component analyses illustrating the volatile changes of gravesoil in different depth (Layer 4, Layer 3, Layer 2, Layer 1) within two types of soil: Left: Loam soil. Right: Sandy loam soil.

The samples distribution allows to perform a permMANOVA through an Euclidean method, leading samples to be represented on two PCAs (one per type of soil) (Figure 5). The presence of remains impacted the volatilome of the soil, but differently according to the soil layer (loam soil: $F_{1,15} = 2.77$; $p\text{-value} = 0.050$; sandy loam soil: $F_{4,15} = 2.60$; $p\text{-value} = 0.011$). A deeper look at the PCA suggests that the volatilomes of all soil layers are impacted by the presence of remains in the loam soil, while layer 4 was only impacted in the sandy loam soil.

As we did for the mineral data, we identified potential indicator volatile compounds (those that are the most impacted by the presence of the corpses) by generating a predictive model. The model merging volatile analysis of both soil types had an error rate of 16% and suggests dimethyl-disulfide, 2-isopropyl-5-methyl-heptan-1-ol, 2-4-dimethyl-hept-1-ene, 2,5-dimethyl-octane and dimethyl-trisulfide, as key indicators of the presence of a cadaver in the soil (in order of importance). If predictive analyses are generated by separating the different types of soil (loam vs. sandy loam), the error rate increases to 30%, and highlights dimethyl-disulfide

as only good predictor for the sandy loam soil. Regarding the loam soil, the following indicator compounds are suggested (in order of importance): dimethyl-disulfide, 2,3,7-trimethyl-octane and 2-isopropyl-5-methyl-heptan-1-ol.

Integrated soil chemistry analysis

After merging the mineral and volatile analyses, and performing the same statistical analyses as listed above, we ended up with similar conclusions:

A decomposing rat impacts the chemical characteristics of a soil (all soil types and layers combined) ($F_{9.31}=2.63$; $p\text{-value} = 0.001$). This conclusion is supported in the loam soil ($F_{4.15}=3.04$; $p\text{-value} = 0.008$) as well as in the sandy loam soil ($F_{4.15}=2.60$; $p\text{-value} = 0.012$). Layer 4 (located below the cadaver) is the most impacted. The chemistry of layer 3 (directly above the cadaver) is significantly impacted by the remains, but layer two and layer one are not. When the predictive analyses are performed on the data set combining both volatile and mineral analyses, the error rate reach 19%. If both soil type are separated, the error rate of the model reaches 19% and 25%, for loam and sandy loam soil respectively. The combination of mineral and volatile analyses decreased the error rate of the model to 10%, and allows to identify the key features that indicate the presence of a corpse in a soil (in order of importance): organic carbon, calcium, pH, conductivity, dimethyl-disulfide, 2-isopropyl-5-methyl-heptan-1-ol and 2,3,7-trimethyl-octane.

Discussion

Soil texture – The sandy loam soil is characterized by a higher porosity than the loamy soil, resulting in a higher drainage of the cadaveric fluids (Dekker and Ritsema, 1994; Dias, 2011). This is confirmed by our dry matter measurements: in the sandy loam soil, the presence of a cadaver increased humidity of the soil layer located below the rat cadaver (layer 4) only. In the loamy soil, all layers located around the cadaver (below and above it) were wetter than the control, resulting from a radial diffusion of the fluids. The remains decaying in the sandy loam soil were also drier than in the loamy soil, suggesting a stronger evacuation in the former (Bohun et al., 2010; Carter et al., 2010; Dekker and Ritsema, 1994). The fact that cadaveric fluids are drained differently according to the type of soil explains why the physico-chemistry of the different soil layers are impacted differently by the presence of remains.

We know from previous reports that the soil composition affects the decomposition process of a corpse (Tumer et al., 2013). Because all rats reached the same decomposition stage, whatever the proportion of sand the soil was made of, we suggest that this parameter has only a limited impact on the decomposition process. We raise the hypothesis that the concentration of organic matter already present in the soil has a stronger impact on the decomposition. Soils presenting high concentrations of organic matters have typically a wider diversity of microorganisms that will accelerate the decomposition process (Adserias-Garriga et al., 2017; Boumba et al., 2008; Dent et al., 2004; Tumer et al., 2013).

Mineral analysis – The mineral composition of both types of soil was impacted by the presence of a cadaver. A similar conclusion was drawn in clayey soil in previous studies

(Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013). The present study provides additional information as it shows that the impact of decaying remains is not homogeneous through the soil column. This is mainly due to the drainage of the fluids, as explained earlier (Bohun et al., 2010; Carter et al., 2010; Dekker and Ritsema, 1994). A common conclusion for both types of soil is that pH, nitrogen and conductivity are good indicators of the presence of a cadaver. They are all increased in presence of a cadaver. They may have importance to determine the post-mortem interval (PMI) or to predict the presence of clandestine graves (Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017). The increase of nitrogen amount was already reported in several studies (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Carter et al., 2010, 2008; Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013) and has already been suggested as a target compound to predict the PMI (Fancher et al., 2017). A carrion is a rich source of nitrogen (Benninger et al., 2008). Rat remains typically contain 32 gKg⁻¹ of nitrogen distributed in nucleic acids, amino acids, sugars and proteins (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Widdowson, 1950). Protein breakdown is performed by microorganisms and leads to a long-lasting nitrogen release (Dent et al., 2004; Szelecz et al., 2018a). Microorganisms being more abundant in a loam soil, so is the amount of nitrogen (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Hopkins et al., 2000; Stokes et al., 2009; Tumer et al., 2013).

We found pH to be affected by the presence of a cadaver, and this was already well documented (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017; Hopkins et al., 2000; Stokes et al., 2009; Tumer et al., 2013). While some studies concluded on a decrease of the pH as a result of the presence of a cadaver (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Benninger et al., 2008; Szelecz et al., 2018a), most of the published reports highlight an increased pH (Benninger et al., 2008; Carter et al., 2010; Hopkins et al., 2000; Szelecz et al., 2018a). In some cases, the pH may increase or decrease along the decomposition process (Fancher et al., 2017). The variation of pH is the result of the accumulation of NH₄⁺ in the soil, which are released by microbial decomposition of the corpse. However, it remains unclear why contrasting results are observed from the literature (Fancher et al., 2017; Hopkins et al., 2000; Tumer et al., 2013). These contrasting results could be related to the PMI (Benninger et al., 2008), the intrinsic pH of the soil (Aitkenhead-Peterson et al., 2012) and the creation of ammonium salt. This last explanation could be confirmed by the variation of the soil conductivity observed in the present study.

We found an increase in the conductivity as a result of the presence of a cadaver, especially in the loam soil. This phenomenon was already reported in the literature (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Fancher et al., 2017; Stokes et al., 2009; Tumer et al., 2013). The increase of the conductivity is mainly due to the release of organic nitrogen during the decomposition of the remains (Aitkenhead-Peterson et al., 2012).

While pH, conductivity and nitrogen are all impacted in both types of soil, some others are impacted in one type of soil only. The amount of organic carbon only increases in loam soil. Several studies also observed a variation of organic carbon in a grave soil, but they mostly failed to explain the origin of this variation (Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017; Macdonald et al., 2014). In our opinion, it is directly linked to the abundance of cadaveric fluids in the soil. This hypothesis is reinforced by the fact that the variation is only recorded in

loam soil in which cadaveric fluids are more retained. Calcium concentration also increases in presence of a cadaver, but in the sandy loam soil only. Calcium is usually released at the end of the decomposition process, when bones are decomposing. It suggests that in sandy loam soil some bones were damaged while it was not the case in loam soil (Fancher et al., 2017; Szelecz et al., 2018a). The present study does not highlight variation of phosphor, magnesium, potation and sodium. The increase of phosphor and magnesium amounts were only reported in the later stage of decomposition (Aitkenhead-Peterson et al., 2012; Benninger et al., 2008; Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013). Finally, the variation of potassium and sodium were never deeply investigated (Fancher et al., 2017; Tumer et al., 2013).

Volatile analysis_ The volatilomes of both types of soil are impacted by the presence of a corpse, confirming previous reports (Brasseur et al., 2012; Dubois et al., 2018; Forbes et al., 2016; Nizio et al., 2017; Vass et al., 2004). The present study reveals that previously-reported cadaveric volatile compounds are found in both types of soil, including sulfur compounds, alkanes, alcohols and ketones (Brasseur et al., 2012; Dekeirsschieter et al., 2009; Dubois et al., 2018; Forbes and Perrault, 2014; Perrault et al., 2014). At the depth of sampling, we found no impact of the soil type on the volatilome. However, it is known that the type of soil impacts the detection of the corpse by detection dogs (Alexander et al., 2016): human remain detection dogs are less likely to detect a cadaver in clayed soil, probably because a clayed soil is highly airtight.

We found that the cadaveric volatilome is not homogenous through the soil column (Brasseur et al., 2012). We also found that the volatile distribution along the soil column was not similar in both types of soil. We hypothesize that these differences are explained the different values of porosity.

While some compounds are more abundant in the cadaver proximity (e.g. Dimethyl-trisulfide), others are detected at similar amounts through the soil column (e.g. Heptan-1-ol, 2-isopropyl-5-mehtyl-). In the sandy loam soil, the most impacted layer of soil is the one located under the remains, suggesting that the detected VOCs mainly originate from the cadaveric fluids, which are drained to the lowest part of the grave. In the loam soil, the cadaveric VOCs are more likely to diffuse homogenously through the column, suggesting that cadaveric VOCs diffuse around the remains (Adserias-Garriga et al., 2017; Boumba et al., 2008; Dent et al., 2004; Tumer et al., 2013). Polarity also explains the adsorption of cadaveric VOCs on the soil particles (Brasseur et al., 2012).

Prediction of clandestine graves_ There is a great interest in the literature to find predictive compounds of gravesoil, with pH and nitrogen amount having been suggested at multiple occasions (Benninger et al., 2008; Carter et al., 2010, 2008; Janaway et al., 2009; Meyer et al., 2013; Perrault et al., 2014; Rosier et al., 2015). However, a complete comprehension of the variation of impacted mineral and volatile compounds is required to improve the potential use of these compounds as grave predictors (Carter et al., 2010). For the first time, we provide here an integrative study of the impact of a cadaver on the mineral and volatile composition of the soil. Our results suggest that the soil volatile compounds are more reliable than minerals to predict the presence of a grave soil. Indeed, the error rate associated with our model on

volatile analysis is almost twice lower than the one associated with the mineral analysis. More interestingly, the combination of both volatile and mineral analyses provides a more accurate prediction of the presence of a cadaver. In other words, targeting several key volatile and inorganic compounds, would allow the detection of a grave, as suggested by the model accuracy (over 90%, the highest we were able to reach).

Bibliography

Adserias-Garriga, J., Hernández, M., Quijada, N.M., Rodríguez Lázaro, D., Steadman, D., Garcia-Gil, J., 2017. Daily thanatomicrobiome changes in soil as an approach of postmortem interval estimation: An ecological perspective. *Forensic Science International* 278, 388–395. doi:10.1016/j.forsciint.2017.07.017

Aitkenhead-Peterson, J.A., Owings, C.G., Alexander, M.B., Larison, N., Bytheway, J.A., 2012. Mapping the lateral extent of human cadaver decomposition with soil chemistry. *Forensic Science International* 216, 127–134. doi:10.1016/j.forsciint.2011.09.007

Alexander, M.B., Hodges, T.K., Wescott, D.J., Aitkenhead-Peterson, J.A., 2016. The Effects of Soil Texture on the Ability of Human Remains Detection Dogs to Detect Buried Human Remains. *Journal of Forensic Sciences* 61, 649–655. doi:10.1111/1556-4029.13084

Benninger, L.A., Carter, D.O., Forbes, S.L., 2008. The biochemical alteration of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic Science International* 180, 70–75. doi:10.1016/j.forsciint.2008.07.001

Bohun, S.C., Barons, M.J., Gideon, A., Khan, Z.H., Smith, N., 2010. Modelling a cadaver decomposition island to estimate time of death 1–12.

Boumba, V.A., Ziavrou, K.S., Vougiouklakis, T., 2008. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Science International* 174, 133–151. doi:10.1016/j.forsciint.2007.03.018

Brasseur, C., Dekeirsschietter, J., Schotsmans, E.M.J., de Koning, S., Wilson, A.S., Haubruge, E., Focant, J.-F., 2012. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. *Journal of Chromatography A* 1255, 163–170. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.048

Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett, M., 2010. Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil. *Forensic Science International* 200, 60–66. doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.031

Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett, M., 2008. Using ninhydrin to detect gravesoil. *Journal of Forensic Sciences* 53, 397–400. doi:10.1111/j.1556-4029.2008.00681.x

Carter, D.O., Yellowlees, D., Tibbett, M., 2006. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*. doi:10.1007/s00114-006-0159-1

486 Dekeirsschietter, J., Verheggen, F.J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay, G.,
487 Haubruge, E., 2009. Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig
488 carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. *Forensic Science International* 189, 46–
489 53. doi:10.1016/j.forsciint.2009.03.034

490 Dekker, L.W., Ritsema, C.J., 1994. How water moves in a water repellent sandy soil: 1.
491 Potential and actual water repellency. *Water Resources Research* 30, 2507–2517.
492 doi:10.1029/94WR00749

493 Dellicour, S., Lecocq, T., 2013. GCAAligner 1.0: An alignment program to compute a multiple
494 sample comparison data matrix from large eco-chemical datasets obtained by GC.

495 Dent, B.B., Forbes, S.L., Stuart, B.H., 2004. Review of human decomposition processes in
496 soil. *Environmental Geology* 45, 576–585. doi:10.1007/s00254-003-0913-z

497 Dias, K., 2011. The forensic characterisation of the soil microbial community in response to
498 cadaver decomposition.

499 Dirkmaat, D.C., Cabo, L.L., Ousley, S.D., Symes, S.A., 2008. New perspectives in forensic
500 anthropology. *American Journal of Physical Anthropology* 137, 33–52.
501 doi:10.1002/ajpa.20948

502 Dubois, L.M., Stefanuto, P.-H., Heudt, L., Focant, J.-F., Perrault, K.A., 2018. Characterizing
503 decomposition odor from soil and adipocere samples at a death scene using HS-SPME-
504 GC×GC-HRTOFMS. *Forensic Chemistry* 8, 11–20. doi:10.1016/j.forc.2018.01.001

505 Fancher, J.P., Aitkenhead-Peterson, J.A., Farris, T., Mix, K., Schwab, A.P., Wescott, D.J.,
506 Hamilton, M.D., 2017. An evaluation of soil chemistry in human cadaver decomposition
507 islands: Potential for estimating postmortem interval (PMI). *Forensic Science International*
508 279, 130–139. doi:10.1016/j.forsciint.2017.08.002

509 Forbes, S.L., Perrault, K.A., 2014. Decomposition odour profiling in the air and soil
510 surrounding vertebrate carrion. *PLoS ONE* 9, 21–22. doi:10.1371/journal.pone.0095107

511 Forbes, S.L., Troobnikoff, A.N., Ueland, M., Nizio, K.D., Perrault, K.A., 2016. Profiling the
512 decomposition odour at the grave surface before and after probing. *Forensic Science*
513 *International* 259, 193–199. doi:10.1016/j.forsciint.2015.12.038

514 Haglund, W.D., Sorg, M.H., 1997. Method and theory of forensic taphonomic research, in:
515 Haglund, W.D., Sorg, M.H. (Eds.), *Forensic Taphonomy - The Postmortem Fate of Human*
516 *Remains*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 13–26.

517 Hopkins, D.W., Wiltshire, P.E.J., Turner, B.D., 2000. Microbial characteristics of soils from
518 graves: An investigation at the interface of soil microbiology and forensic science. *Applied*
519 *Soil Ecology* 14, 283–288. doi:10.1016/S0929-1393(00)00063-9

520 Iqbal, M.A., Nizio, K.D., Ueland, M., Forbes, S.L., 2017. Forensic decomposition odour
521 profiling: A review of experimental designs and analytical techniques. *TrAC - Trends in*
522 *Analytical Chemistry* 91, 112–124. doi:10.1016/j.trac.2017.04.009

523 Janaway, R.C.R.C., Percival, S.L.S., Wilson, A.S.A.S., 2009. Microbiology and Aging.
524 *Helicobacter* 275–289. doi:10.1007/978-1-59745-327-1

525 Macdonald, B.C.T., Farrell, M., Tuomi, S., Barton, P.S., Cunningham, S.A., Manning, A.D.,
526 2014. Carrion decomposition causes large and lasting effects on soil amino acid and peptide
527 flux. *Soil Biology and Biochemistry* 69, 132–140. doi:10.1016/j.soilbio.2013.10.042

528 Meyer, J., Anderson, B., Carter, D.O., 2013. Seasonal variation of carcass decomposition and
529 gravesoil chemistry in a cold (Dfa) climate. *Journal of Forensic Sciences* 58, 1175–1182.
530 doi:10.1111/1556-4029.12169

531 Nizio, K.D., Ueland, M., Stuart, B.H., Forbes, S.L., 2017. The analysis of textiles associated
532 with decomposing remains as a natural training aid for cadaver-detection dogs. *Forensic*
533 *Chemistry* 5, 33–45. doi:10.1016/j.forc.2017.06.002

534 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin,
535 P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2017. Package
536 ‘vegan.’ *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.0-7.

537 Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. *Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and*
538 *inorganic methods*. Springer.

539 Perrault, K.A., Stuart, B.H., Forbes, S.L., 2014. A Longitudinal Study of Decomposition
540 Odour in Soil Using Sorbent Tubes and Solid Phase Microextraction. *Chromatography* 1,
541 120–140. doi:10.3390/chromatography1030120

542 Ranst, E., van Verloo, M., Demeyer, A., Pauwels, J.M., 1999. *Manual for the soil chemistry*
543 *and fertility laboratory: analytical methods for soils and plants equipment, and management*
544 *of consumables*. International Training Centre for Post-Graduate Soil Scientists.

545 Rosier, E., Loix, S., Develter, W., Van De Voorde, W., Tytgat, J., Cuypers, E., 2015. The
546 search for a volatile human specific marker in the decomposition process. *PLoS ONE* 10, 1–
547 15. doi:10.1371/journal.pone.0137341

548 Staff, S. science division, 2017. *Soil Survey Manual*. USDA Handbook, Washington, D.C.

549 Stokes, K.L., Forbes, S.L., Tibbett, M., 2009. Freezing skeletal muscle tissue does not affect
550 its decomposition in soil: Evidence from temporal changes in tissue mass, microbial activity
551 and soil chemistry based on excised samples. *Forensic Science International* 183, 6–13.
552 doi:10.1016/j.forsciint.2008.08.013

553 Szelecz, I., Koenig, I., Seppely, C.V.W., Le Bayon, R.C., Mitchell, E.A.D., 2018a. Soil
554 chemistry changes beneath decomposing cadavers over a one-year period. *Forensic Science*
555 *International* 286, 155–165. doi:10.1016/j.forsciint.2018.02.031

- Szelecz, I., Lösch, S., Seppey, C.V.W., Lara, E., Singer, D., Sorge, F., Tschui, J., Perotti, M.A., Mitchell, E.A.D., 2018b. Comparative analysis of bones, mites, soil chemistry, nematodes and soil micro-eukaryotes from a suspected homicide to estimate the post-mortem interval. *Scientific Reports* 8, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-18179-z
- Tumer, A.R., Karacaoglu, E., Namli, A., Keten, A., Farasat, S., Akcan, R., Sert, O., Odabaşı, A.B., 2013. Effects of different types of soil on decomposition: An experimental study. *Legal Medicine* 15, 149–156. doi:10.1016/j.legalmed.2012.11.003
- Turner, B.D., Wiltshire, P., 1999. Experimental validation of forensic evidence: A study of the decomposition of buried pigs in a heavy clay soil. *Forensic Science International* 101, 113–122. doi:10.1016/S0379-0738(99)00018-3
- Ubelaker, D.H., 1997. Taphonomic Applications in Forensic Anthropology, in: CRC Press LLC (Ed.), *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*.
- Vass, A.A., Smith, R.R., Thompson, C. V., Burnett, M.N., Wolf, D.A., Synstelien, J.A., Dulgerian, N., Eckenrode, B.A., Dulgerian, N., 2004. Decompositional odor analysis database. *Journal of Forensic Sciences* 49, 760–769. doi:JFS2003434
- Widdowson, E.M., 1950. Chemical composition of newly born mammals. *Nature* 166, 626–628.

588 **Supplemental data**589 **Table 1 soil volatilome (ng/g of soil)**

590

COVs	loam control	sandy loam control	loam L1	sandy loam L1	loam L2	sandy loam L2	loam L3	sandy loam L3	loam L4	sandy loam L4
Acetophenone	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Benzaldehyde	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Benzene, 3,3-dimethylbutyl-	0,0 ± 1,9	1,3 ± 1,0	0,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Benzene, 1,3-bis-1,1-dimethylethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	16,3 ± 9,2	13,5 ± 8,5	24,1 ± 14,0	27,2 ± 14,9	3,2 ± 2,0	2,8 ± 1,7	3,2 ± 2,4	1,3 ± 1,1
Benzoic acid	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,0
Carbonic acid tridecyl vinyl ester	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0
Caryophyllene	1,2 ± 1,2	0,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,2
Cyclobutanol, 2-ethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	17,8 ± 4,1	26,5 ± 13,3
Cyclohexane, 1,1-dimethyl-2-propyl,	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cyclohexane, 1,3,5-trimethyl-	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cyclohexane, 1,3-dimethyl-	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Cyclohexane, methyl-	3,7 ± 2,6	1,8 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4
Cyclohexane, propyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
D.Limonene	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Decane, 2,8,8-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,5 ± 2,2	2,8 ± 1,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Decane, 3,3,6-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	13,0 ± 8,4	10,0 ± 5,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Dibutyladipate	1,6 ± 1,5	1,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,3
Trisulfide, dimethy-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,4
Disulfide, dimethyl-	0,9 ± 2,0	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,7	8,0 ± 2,4	3,6 ± 0,9	16,4 ± 6,8	0,6 ± 0,2	2,6 ± 1,4	1,7 ± 0,7	5,5 ± 2,2
Dodecane, 2,6,11-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Dodecane, 2-cyclohexyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Dodecane, 4,6-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 1,0	1,0 ± 0,6	1,8 ± 1,3	0,0 ± 0,0
Dodecane, 4-methyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Eicosane	2,4 ± 2,5	1,8 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,8 ± 0,4
Ethane, 1,1-diethoxy-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,8 ± 0,8	3,5 ± 2,2	8,4 ± 6,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ethylbenzene	0,0 ± 1,2	0,9 ± 0,5	0,0 ± 0,0	2,7 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Formic acid, hexyl-ester-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Glycerol, 1,2-diacetate	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,3	1,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptadecane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptane, 2,4-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,8	1,8 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptane, 2,5,5-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,3 ± 8,0	10,1 ± 5,6	15,2 ± 9,1	14,1 ± 8,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptane, 3-methyl-	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptane, 3-methylene-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1
Heptane, 4-methyl	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0
Hexacosane, 1-iodo-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Hexanal, 2-ethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0
Hexane, 2,3,3-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Linalyl acetate	0,0 ± 1,9	1,3 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,9 ± 1,0	2,2 ± 1,1	2,6 ± 1,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0

Methylene chloride	4,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,2 ± 1,7	6,0 ± 1,6	7,9 ± 3,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Tridecan-1-ol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3	
Octane, 2,3,7-trimethyl-	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 2,3-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 2,4,6-trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 2,5-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,2 ± 2,0	3,0 ± 1,5	2,7 ± 1,1	2,2 ± 1,1	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 3,4,5,6-tetramethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 3,5-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octane, 5-ethyl-2-methyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,7	1,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octanoic acid, octyl-ester	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	26,3 ± 0,1	24,4 ± 4,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentane, 2,2,4-trimethyl-	3,4 ± 3,4	2,4 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentane, 2,3-dimethyl-	62,3 ± ###	### ± 24,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	22,8 ± 0,7	24,5 ± 3,1	26,0 ± 2,7	22,4 ± 11,5	
Pentane, 2,4-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Phenylmaleic anhydride	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Phthalamic acid	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Tetratriacontane	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	
Decali-9-ol, 1,10-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis-2-methylpropyl ester	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1,4,7-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Decan-1-ol, 2-methyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ethyl-3-methylcyclohexane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Ethyl-4-methylcyclohexane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octanol, 2,7-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,6 ± 4,4	5,7 ± 3,1	4,0 ± 2,6	3,5 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octen-3-ol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,9 ± 1,3	1,0 ± 0,8	1,4 ± 0,5	2,2 ± 1,7
Octen-3-one	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,4	0,4 ± 0,3	2,0 ± 1,4	1,3 ± 0,8
Octene, 2,6-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Methylnonadecane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Methyldodecanol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,5 ± 4,4	5,4 ± 3,0	3,7 ± 2,3	3,4 ± 1,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Methylpentacosane	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Binaphthalene	0,0 ± 3,4	2,3 ± 1,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,8	0,9 ± 0,4	2,0 ± 1,0	1,9 ± 0,5
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4-Di,tert-butylphenol	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1-Heptene, 2,4-dimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	16,5 ± 5,2	11,9 ± 6,8	13,6 ± 7,2	11,0 ± 6,2	0,9 ± 0,5	0,7 ± 0,4	1,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0
Tridecane, 2,6,10-Trimethyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,7 ± 1,1	1,3 ± 0,8	2,5 ± 1,7	2,4 ± 1,3	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2-Ethylhexyl-acrylate	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Heptanone, 4-methyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1-Heptanol, isopropyl-5-methyl-	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	6,0 ± 3,1	4,5 ± 2,4	6,4 ± 4,0	5,9 ± 2,7	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,7	1,6 ± 1,2	0,4 ± 0,4
Methylhentriacontane	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Methylheptacosane	0,0 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Octenal, 2-butyl-	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Propanol, 1-methoxy-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Heptanone	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,5
Octanol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,4
Octanone	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,5 ± 1,3	2,0 ± 0,9	10,8 ± 5,2	8,2 ± 4,6

Undecene, 8-methyl-	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 1,8	2,2 ± 1,1	1,6 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Hydroxy-7-nonanal	0,0 ± 0,8	0,6 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0