

La chimie de la transformation du tissu adipeux humain : la formation de l'adipocire

E. VANDERBORGHT*, J. ANTOINE^{1,2}, V. LAMOTHE¹,
S. SOUMIREU-LARTIGUE¹

RÉSUMÉ

Le gras de cadavre ou adipocire, est un mélange solide d'acide gras et de savons, formé par la dégradation post mortem du tissu adipeux placé dans des conditions adéquates. L'étude présentée ici s'attache à décrire, par l'analyse chimique, les processus de transformations apparaissant durant les premières semaines de dégradation pour des échantillons de tissu adipeux humain et de graisse de porc (saindoux) placés dans six environnements différents. La spectrométrie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est choisie pour mettre en évidence ces modifications chimiques. L'étude confirme que la décomposition des tissus adipeux est initiée très rapidement, dans les milieux favorables. D'autre part, les modifications observées nous ont permis d'envisager une deuxième voie dans le processus de formation de l'adipocire. Enfin, l'utilisation de la technique ATR permet d'envisager d'établir des profils quantitatifs de la dégradation des lipides et de leur transformation à des fins d'aide pour l'estimation du délai post mortem, en complément des méthodes médico-légales classiquement utilisées.

Mots-clés : Adipocire, décomposition, sciences forensiques, microspectrométrie infrarouge, spectrométrie infrarouge par réflexion (mode ATR).

* Faculté de St Jérôme-chimie analytique et spectroscopique, AIX MARSEILLE I, avenue Escadrille Normandie Niémen, 13397 MARSEILLE Cedex 20.

1. Institut national de Police Scientifique, Laboratoire de Police Scientifique de Marseille, 97 bd Camille Flammarion, BP 30, 13245 MARSEILLE Cedex 4.

2. *Correspondance* : J. ANTOINE, Institut national de Police Scientifique, Laboratoire de Police Scientifique de Marseille, 97 bd Camille Flammarion, BP 30, 13245 MARSEILLE Cedex 4.

SUMMARY

CHEMICAL TRANSFORMATIONS ADIPOSE TISSUES: A NEW APPROACH OF ADIPOCERE FORMATION

Adipocere is the result of the postmortem decomposition consisting of a solid mixture of fatty acids and soaps. In adequate conditions, adipocere is formed because of the decomposition of adipose tissues.

This article aims to identify the formation of adipocere stage by stage in six different ambient conditions. Human and pig adipose tissues are used to do the different experiments and Fourier Transform Infrared microspectrometry is used to show the chemical modifications.

The results highlight the fact that good conditions can promote the formation of adipocere in short time after the death. Furthermore, interpretations of F.T.I.R. spectra introduce a new approach of the degradation of adipose tissue.

Finally, FTIR in mode Attenuated Total Reflectance allows the establishment of quantitative profile lipid evolution and may provide a clue to the determination of post mortem interval with an eye to completing medicolegal methods.

Key-words: *Adipocere, decomposition, forensic sciences, infrared microspectroscopy, ATR infrared spectroscopy.*

INTRODUCTION

Après la mort, le corps humain subit de nombreuses modifications. Les transformations les plus connues sont sans aucun doute l'ensemble des processus biochimiques relatifs au phénomène de la putréfaction. Celle-ci se caractérise, entre autre, par la dégradation bactérienne des substances azotées. Les protéines du corps humain sont scindées sous l'action des ferments protéolytiques qui libèrent les différents acides mono et di-aminés. Ces acides aminés sont décomposés par élimination d'azote et/ou par raccourcissement de la chaîne carbonée pour former des composés tels que la putrescine ou la cadavérine et en final libérer des composés ammoniacaux.

En fonction des conditions d'entreposage du corps, du gras de cadavre peut se former et limiter le phénomène de putréfaction.

L'ammoniac libéré lors de la putréfaction rend le milieu alcalin, il facilite la formation de gras de cadavre

en favorisant la saponification des graisses présentes. Cependant, la saponification ne suffit pas à expliquer toute la formation de l'adipocire, en effet, cette réaction ne permet d'obtenir que 35% d'acides gras et de savon en poids des acides gras totaux [8]. Un autre mécanisme faisant intervenir des bactéries anaérobies est aussi très important dans cette formation.

L'adipocire est obtenue par le biais des cellules adipeuses (adipocytes) qui libèrent des triglycérides [3]. L'hydrolyse de ces derniers, via des enzymes bactériennes, libère des acides gras insaturés comme l'acide palmitoléique, oléique et linoléique. Ces acides, alors obtenus, sont hydrogénés en acides gras saturés c'est-à-dire en acide myristique, palmitique et stéarique majoritairement (figure 1).

Les bactéries anaérobies du genre Clostridium contribuent le plus à la formation de l'adipocire. Elle sont retrouvées dans les sols, les végétaux, l'eau douce, l'eau de mer et l'intestin humain.

Les acides gras hydroxy- et oxo- obtenus vont être responsables de la stabilité de l'adipocire grâce aux interactions entre les groupements hydroxyles ajoutés et le carboxyle (COOH) terminal des acides gras. Ces liaisons hydrogènes augmentent les points de fusion et par conséquent la stabilité de l'adipocire [6]. L'acide gras « oxo » (=O) possède un point de fusion supérieur à celui des acides gras « hydroxy » donc d'autant plus stable. Enfin, lors des clivages des acides gras, des sels de sodium et potassium sont formés (savons). Si la décomposition est longue, ces cations peuvent être remplacés par des ions calcium [3].

Il est à noter que la présence de bactéries aérobies peut inhiber la formation de l'adipocire.

Les études antérieures [1, 8, 9, 12, 13] sur la formation de l'adipocire et sa caractérisation ont été réalisées par chromatographie sur couche mince (CCM) et par couplage chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM). Plus récemment, d'autres auteurs [2, 3, 7, 4] ont utilisé la spectrométrie infrarouge en transmission ou en mode réflexion (DRIFT, ATR), pour l'étude de la dégradation de la graisse de porc (similaire chimiquement à la composition du tissu adipeux humain) en milieu lacustre ou humide.

C'est cette méthode que nous appliquons à notre étude comparative de la dégradation du saindoux et du tissu adipeux humain, dans différents milieux. En effet, la spectrométrie infrarouge présente un double avantage : elle demande une préparation d'échantillon simplifiée et permet, par l'interprétation des spectres obtenus, de mettre en évidence les transformations chimiques successives provenant de la dégradation des graisses. Nous essaieront enfin d'appliquer la spec-

trométrie infrarouge en mode ATR, comme technique complémentaire des méthodes médico-légales, pour l'estimation du délai post mortem.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

150 mg de tissu adipeux humain (issu de la paroi abdominale) et de saindoux (récupéré chez un boucher) sont échantillonnés et placés dans six milieux différents : terre argileuse, sable, humus, eau de mer, eau douce et enfin un simple dépôt sur un support en papier filtre placé dans un environnement humide ($\phi > 88\%$). Les contenants étant des bocaux neufs d'un volume de 500ml.

Les milieux d'enfouissement sont régulièrement humidifiés pour qu'ils soient favorables à la formation d'adipocire.

La création de conditions humides pour les échantillons laissés à l'air libre est réalisée simplement en positionnant les prélèvements sous une cloche en verre avec deux récipients d'eau et un hygromètre.

Les températures restent celles de la pièce ou sont entreposés les récipients : 20-22°C

Notre étude portant sur les premières étapes de la transformation des graisses, l'expérience est limitée à trois mois.

Méthodes

Toutes les semaines, les corps gras sont analysés par Spectrométrie infrarouge (IRTF). Quelques mg de tissu adipeux sont utilisés pour l'obtention des spectres au moyen d'un spectromètre IRTF de marque Bruker modèle Equinox 55 couplé à un microscope optique IRSCOPE 2 et d'un accessoire ATR mono-réflexion Golden Gate. Cet appareil est équipé de deux détecteurs :

- un détecteur Deutérium Triglycine Sulfate (DTGS) pour les analyses en ATR,
- un détecteur Mercure Cadmium Tellure (MCT) pour les analyses en microscopie.

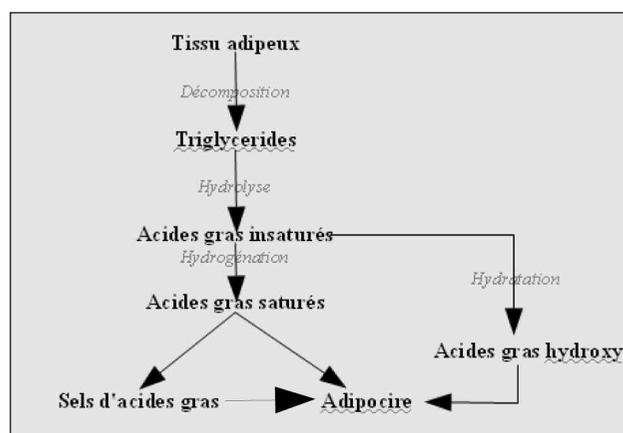


Figure 1 : Processus de la formation de l'adipocire.

En ce qui concerne les analyses en mode transmission, par microscopie, le prélèvement est déposé sur une cellule de compression diamant, elle-même placée dans le trajet optique du microscope. Les échantillons sont analysés à une résolution de 4 cm^{-1} avec une accumulation de 64 scans. La plage d'analyse est comprise entre 650 et 4000 cm^{-1} .

Pour les analyses en mode réflexion (ATR) au moyen de l'accessoire Golden Gate, le prélèvement

de tissu adipeux ou de saindoux est positionné sur la fenêtre en diamant. Il est analysé dans les mêmes conditions que précédemment. La plage d'analyse est comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} .

Le logiciel d'acquisition des spectres est OPUS 6.5. Les spectres sont interprétés par le biais du logiciel Know It All version 8.

Les résultats sont notés T_0 (temps initial), T_1, T_2, \dots, T_{12} (pour les semaines suivantes). Les analyses sont répliquées quatre fois. Le saindoux et le tissu adipeux se modifient visuellement au cours du temps. Pour les échantillons enfouis dans la terre argileuse, humus et sable, la partie jaune/blanc laiteuse est prélevée. Pour les échantillons de tissu adipeux placés dans l'eau de mer et dans l'eau douce, un prélèvement est réalisé à la surface, aux niveaux de petits agrégats blanc dans

le cas de l'eau de mer, en évitant les zones couvertes de moisissures dans le cas de l'eau du robinet.

RÉSULTATS

1. Spectrométrie infrarouge par transmission

a. Cas du tissu adipeux humain

Le spectre infrarouge d'un tissu adipeux non dégradé (appelé tissu adipeux T_0) est présenté en figure 2. Le tableau I résume la correspondance entre les nombre d'ondes des vibrations caractéristiques et les fonctions chimiques.

La figure 3, correspondant au spectre au temps T_1 , du tissu adipeux enfoui dans le sable, montre par le biais d'un épaulement à 1710 cm^{-1} (bande liée à l'élongation $\text{C}=\text{O}$ d'acides gras libres), le début de la formation des acides gras insaturés.

A partir de la deuxième semaine, dans presque tous les milieux, on retrouve la bande d'absorption à 1710 cm^{-1} et il est observé celles correspondant aux élonga-

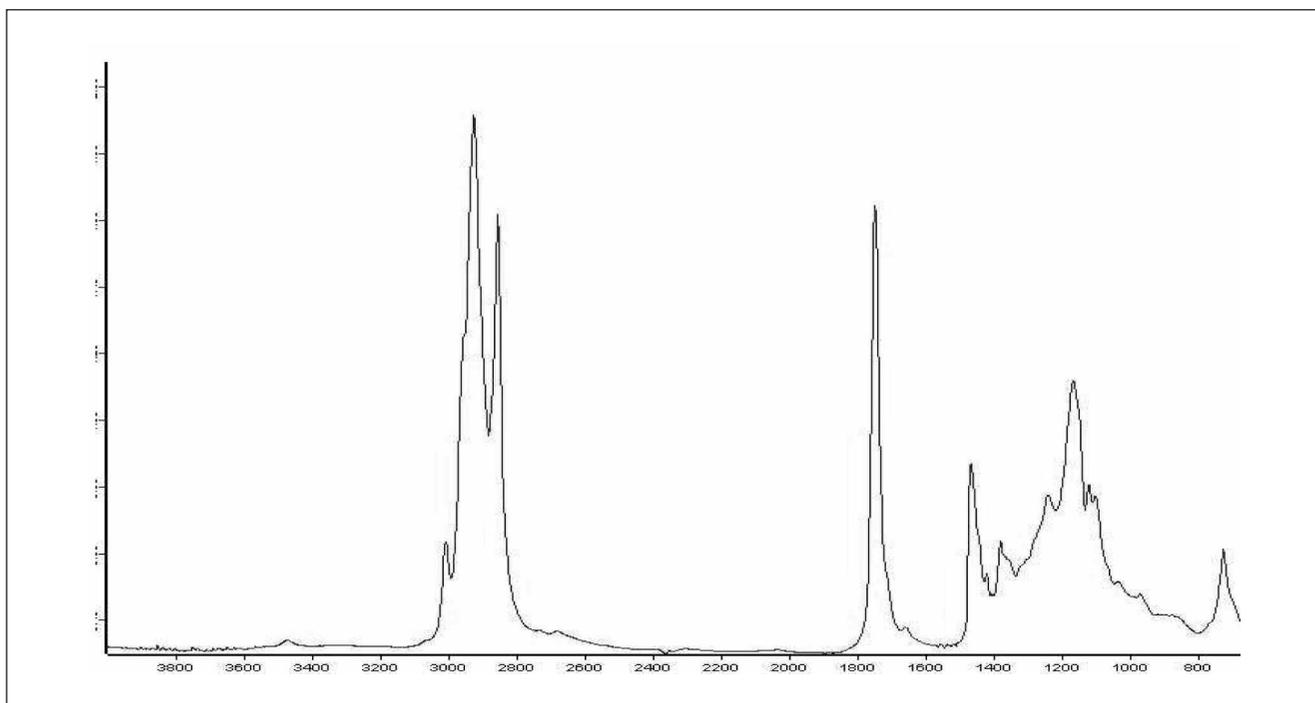


Figure 2 : Spectre du tissu adipeux humain à T_0 .

Nombres d'onde ($\pm 2\text{cm}^{-1}$)	Fonctions
3007	Elongation symétrique C=CH cis
2922	Elongation asymétrique CH ₂
2853	Elongation symétrique CH ₂
1744	Elongation C=O ester
1377	Déformation symétrique CH ₃
1159	Elongation C-O ester
1119	Déformation dans le plan CH ₃

Tableau I : Correspondance nombres d'onde et fonctions.

tions C-O des sels d'acides gras (1540cm^{-1} et 1575cm^{-1}). Ces dernières montrent que les acides gras ont formé des savons.

Enfin, la bande à 1730cm^{-1} est une illustration de la formation de composés intermédiaires tels que les diglycérides et monoglycérides pendant l'hydrolyse.

Les différents milieux d'enfouissements ou d'immersion ont été favorables à une transformation rapide

des graisses, hormis l'échantillon laissé à l'air libre qui n'a pas évolué. L'étude montre que les modifications chimiques sont initiées plus rapidement dans l'eau de mer par rapport à l'eau douce (eau du robinet). Notons que le chlore présent en très faible quantité dans l'eau du robinet de la ville de MARSEILLE a une activité négligeable. Il en est de même pour l'influence du pH situé autour de 8 pour les deux eaux, l'eau de la mer Méditerranée étant légèrement plus basique que

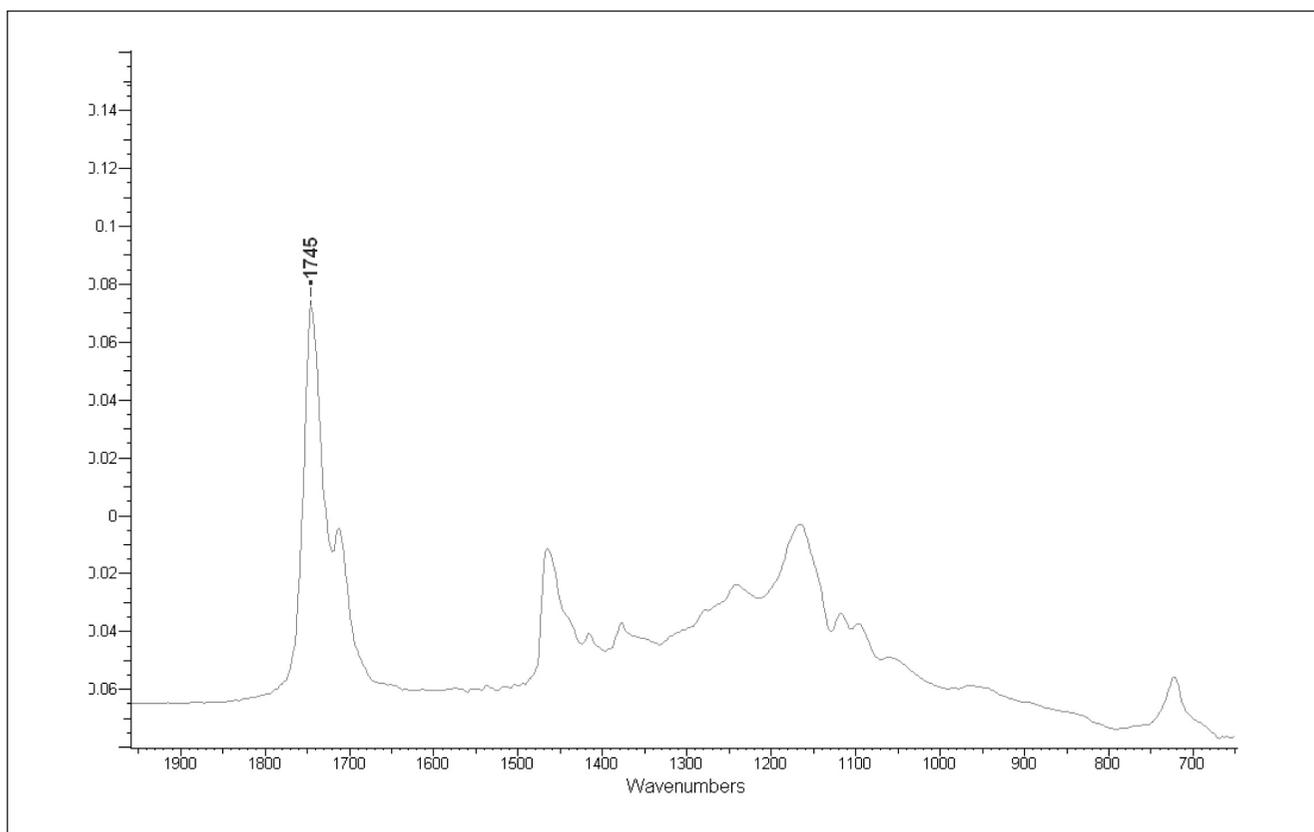


Figure 3 : Tissu adipeux humain enfoui dans le sable, temps T1.

l'eau du robinet de la ville de Marseille (respectivement pH 8,2 et pH 7,8).

Pour les milieux d'enfouissement, le sable par des propriétés de drainage importantes, permet également une transformation plus rapide. Dans deux milieux (le sable et l'argile), les sels de calcium apparaissent rapidement (bande d'absorption à 873 cm^{-1}). Le tableau II présente l'ensemble des vibrations apparues, au cours du temps, dans les différents milieux.

On note l'apparition à partir de T4, de bandes correspondants aux élongations OH (bandes à $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ et $2700\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$). Ces dernières sont attribuées aux acides gras hydroxy. Elles montrent que la formation de l'adipocire est à un stade déjà avancé pour une dégradation de 4 semaines (figure 4).

Au bout de trois mois (figure 5) le spectre du tissu adipeux enfoui dans le sable permet de remarquer que l'élongation C=O des acides gras libres prend le pas sur l'élongation C=O des triglycérides. Les élongations C-O des sels d'acides gras, quant à elles, sont devenues intenses, remplaçant l'élongation C-O ester à 1159 cm^{-1} . La présence des bandes à 2954 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} résultant de la conversion des acides gras insaturés en acides gras saturés nous confirme que l'adipocire est bien un mélange ou prédominent les acides gras saturés.

b. Cas du saindoux

Les élongations observées précédemment dans le tissu adipeux sont, là encore, observables. Toutefois, elles apparaissent plus tardivement, après 4 semaines d'expérimentation, et seulement dans certains milieux. Ces résultats apparaissent en contradiction avec des données précédentes [5]. Il faut alors s'interroger sur notre échantillon : le saindoux pris comme modèle d'adipose animale. Le traitement thermique qu'il subit a détruit les bactéries présentes initialement dans les graisses et a ralenti le processus de formation d'adipocire.

Une synthèse des observations spectrales les plus importantes est présentée dans le tableau III.

c. Discussion

Cette expérience a permis d'observer, qu'il s'agisse du tissu adipeux humain ou du saindoux, la saponification des acides gras et l'hydrolyse des triglycérides en acides gras insaturés.

Nous avons remarqué que les vibrations à 1540 cm^{-1} et 1575 cm^{-1} attribuées aux sels d'acides gras apparaissent en même temps voire avant la vibration à 1710 cm^{-1} des acides gras libres. Cela laisse penser qu'une partie des sels d'acides gras se forme juste après la formation des acides gras insaturés. L'hypothèse d'une nouvelle voie peut donc être envisagée, ce qui permet de compléter le schéma de la formation de l'adipocire présenté précédemment (étape notée en pointillé-figure 6).

Cependant l'étape d'hydrogénation est difficilement observable au niveau des bandes correspondants aux élongations symétriques et asymétriques C-H₂ ($2950\text{ - }2850\text{ cm}^{-1}$). Pour vérifier la progression de cette étape à ce niveau, nous menons une étude complémentaire en utilisant le mode réflexion totale atténuée (ATR) au moyen de l'accessoire Golden Gate. Par ce mode, la profondeur de pénétration de l'échantillon dépend de la longueur d'onde du faisceau incident, les spectres sont alors comparables par l'intensité des bandes d'absorption.

2. Spectrométrie infrarouge par réflexion (ATR)

150mg de tissu adipeux humain sont enfouis dans du sable, selon la méthodologie précédemment définie, pendant cinq semaines. Des prélèvements sont effectués et analysés chaque semaine. La figure 7 montre un comparatif, pour les temps T₀, T₃ et T₅, de l'intensité des bandes d'absorption liées aux transformations chimiques étudiées. Les spectres obtenus à des intervalles réguliers (temps T₀, T₁, T₂, T₃...) peuvent être considérés comme les barreaux d'une échelle de temps. Il est alors possible d'envisager de comparer le spectre issu d'un tissu adipeux inconnu avec un ensemble de spectres pris comme références, acquis en des temps croissants, à partir de graisses fraîches placées dans un milieu de dégradation le plus proche possible de celui de l'inconnu. Dans ce cas, une telle comparaison basée sur l'étude chimique permettrait de déterminer le délai nécessaire à l'obtention des dégradations mises en évidence au niveau de l'échantillon inconnu.

En ce qui concerne les bandes d'absorption liées aux élongations symétriques et asymétriques CH₂, il n'est pas noté d'augmentation de leur intensité mais il est mis en évidence un décalage progressif de celles-ci, qui devient supérieur à notre résolution spectrale à partir de T₅. Une prochaine étude menée avec une meilleure résolution spectrale (2 cm^{-1}) doit nous permettre de valider ce dernier résultat.

	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₆	T ₈	T ₁₀	T ₁₂
Tissu adipeux								
Sable	Épaulement 1710	1730		3300		2954		
		1540-1575	1450	2730-2600				
			873					
Terre argileuse		Épaulement 1710		3300		2954	873	
		1540-1575		2730-2600				
					1450			
Humus		1730			3300	2954	873	
			Épaulement 1710		2730-2600			
	1540-1575 faible	1540-1575			1450			
Eau de mer	3300							
	1710							
	1539-1574							
		1450-1400						
Eau douce					3300	2954		
		1710	1450		2730-2600			
		1540-1575						
Air-humidité	-	-	-	-	-	-	-	-
- : inactif								

Tableau II : Vibrations caractéristiques observées au cours du temps dans les différents milieux - cas du tissu adipeux humain.

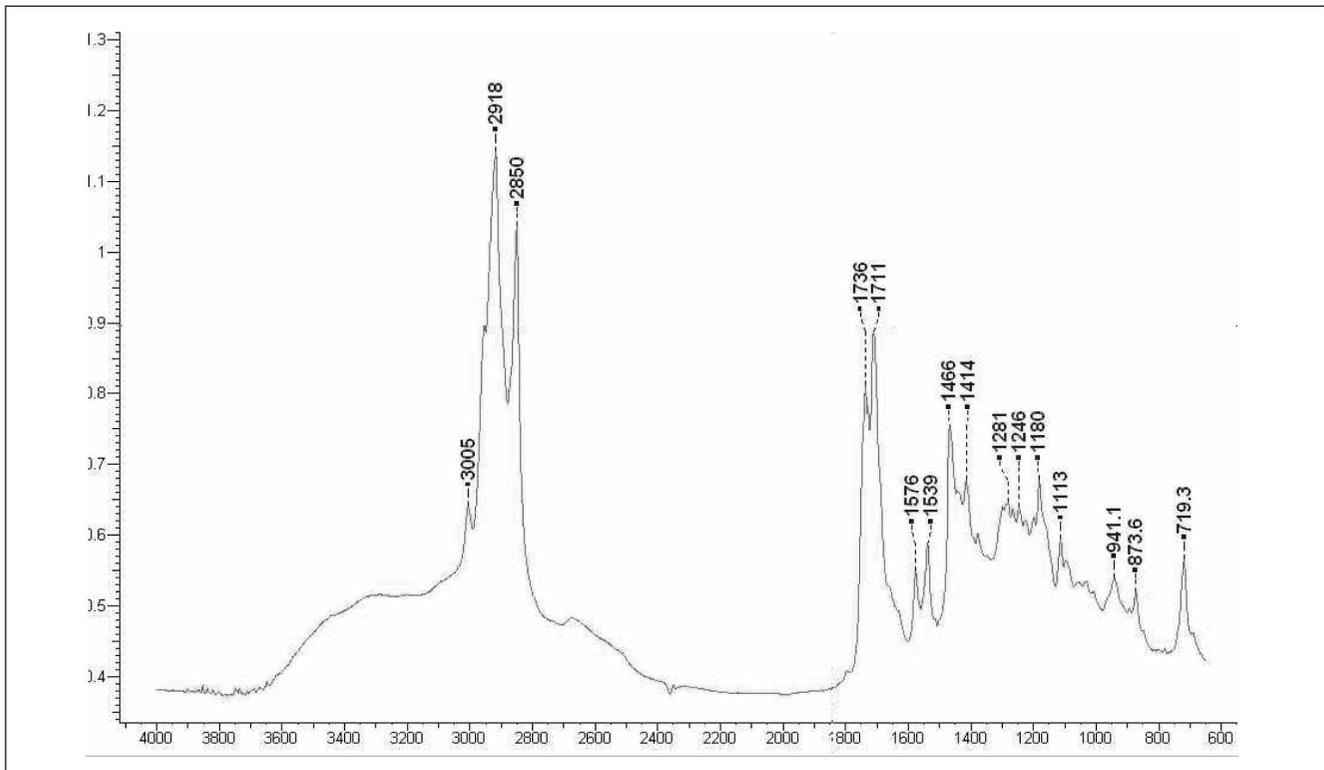


Figure 4 : Tissu adipeux humain dans le sable, temps T4.

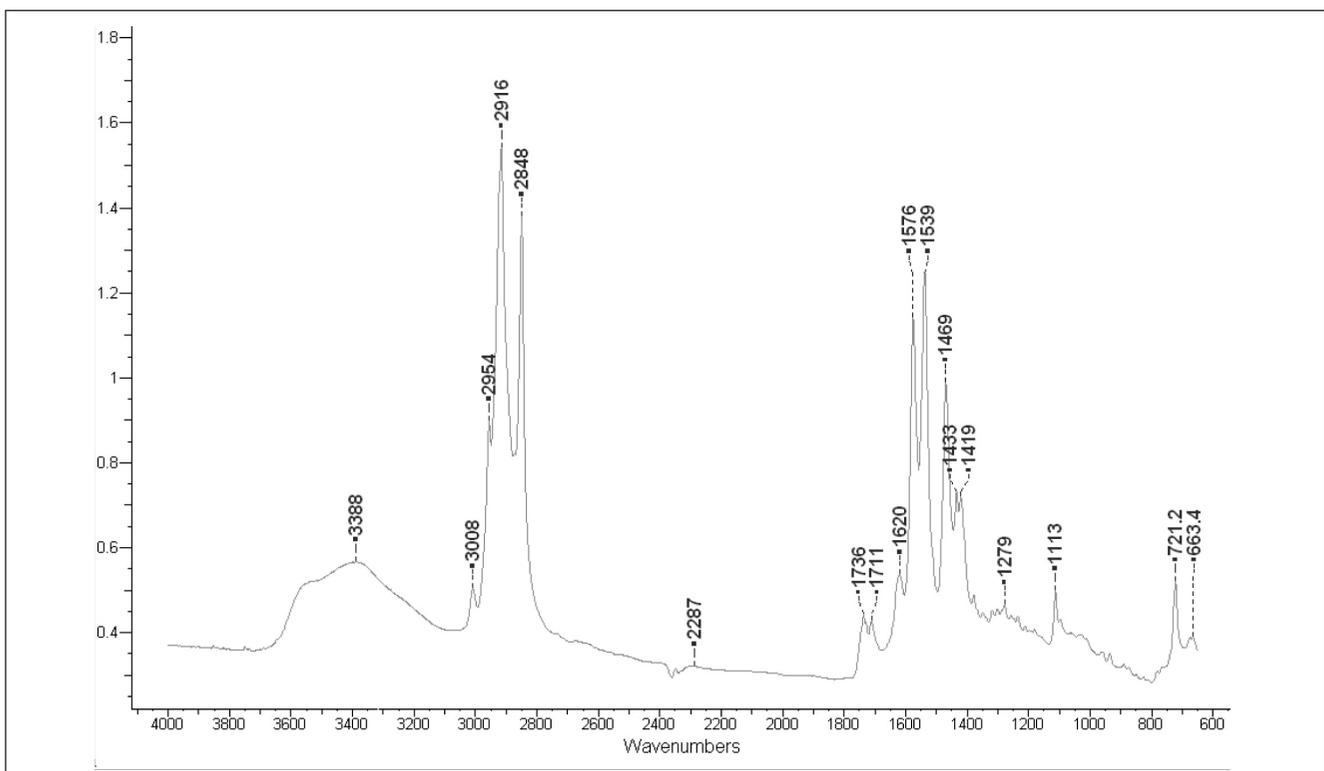


Figure 5 : Tissu adipeux humain dans le sable, temps T12.

Saindoux	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₁₀	T ₁₂
Sable	-	-	-	-	-	-
Terre argileuse		épaulement 1710		3300		
				1540-1575		
Humus			3300,			
		épaulement 1710			1732	
		1540 - 1575				
Eau de mer	1540 -1575				3300	
					2730-2600	
					épaulement 1710	
					1730	
Eau douce	-	-	-	-	-	-
Air-humidité	-	-	-	-	-	-

- : inactif

Tableau III : Vibrations caractéristiques observées au cours du temps dans les différents milieux - cas du saindoux.

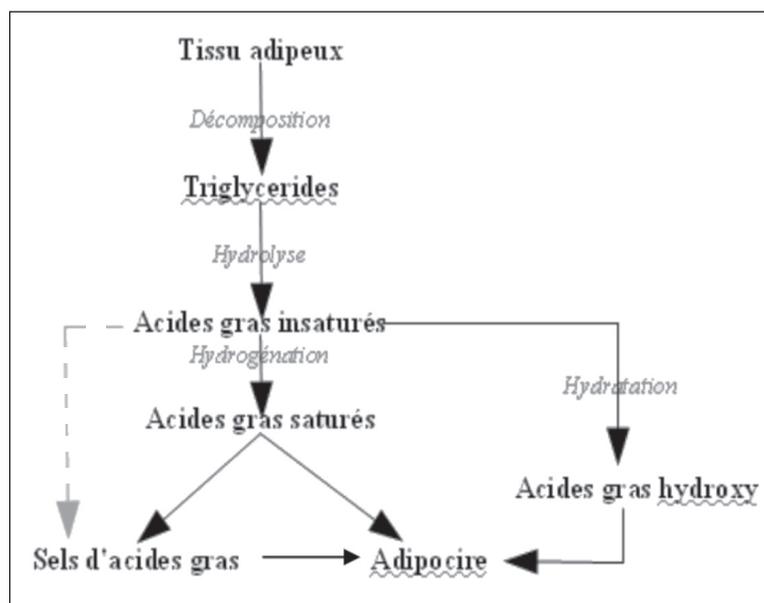


Figure 6 : Processus de la formation de l'adipocire.

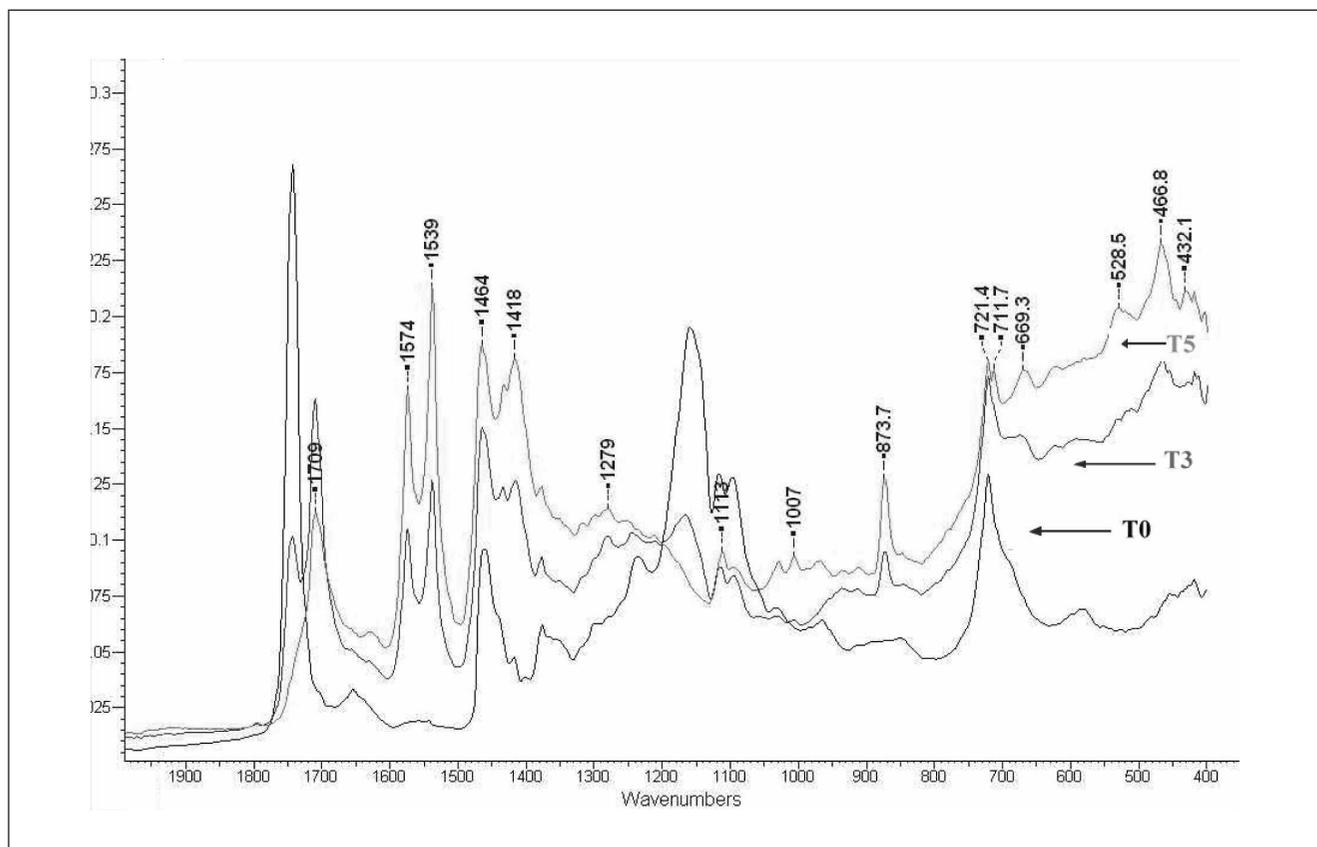


Figure 7 : Tissu adipeux humain dans le sable - spectre ATR - temps T0, T3, T5.

CONCLUSION

La spectrométrie infrarouge (IRTF) nous a permis de suivre de façon pertinente l'évolution de la transformation des graisses aboutissant à la production d'adipocire sur les 12 semaines de notre expérimentation. Les modifications chimiques liées aux étapes de ce processus ont été mis en évidence de façon rapide et précise et nous avons pu envisager une nouvelle voie permettant de compléter le schéma généralement admis de la formation de l'adipocire. Comme il était prévisible, ces transformations sont variables en vitesse et en intensité en fonction du milieu étudié.

En ce qui concerne les analyses en réflexion par la méthode ATR, les spectres étant comparables au niveau de l'intensité des bandes d'absorption, l'établissement de profils quantitatifs de la dégradation des lipides et de leur transformation peut être une aide pour l'estimation du délai post mortem, en complément des méthodes médico-légales classiquement utilisées.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur PIERCECCHI-MARTI de l'Institut de Médecine Légale de MARSEILLE pour nous avoir fourni des échantillons de tissus adipeux. ■

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] BASS W.M. – Outdoor decomposition rates in Tennessee. In : *Forensic taphonomy: the postmortem fate of humans remains*, Haglund WD, Sorg MH editors-FL : CRS Press, 1997, 459-68
- [2] FORBES S.L., STUART B.H., DENT B.B. – The identification of adipocire in grave soils. *Forensic Sci Int* 2002, 127, 225-30.
- [3] FORBES S.L., STUART B.H., DADOUR I.R., DENT B.B. – A preliminary investigation of the stages of adipocere formation. *Forensic Science*, 2004, vol. 49, No. 3.

- [4] FORBES S.L., WILSON M.E.A., STUART B.H. – Examination of adipocere formation in a cold water environment, *Int J Legal Med*, 2011, 125, 643-650.
- [5] NOTTER S.J., STUART B.H., TOWE R., LANGLOIS N. – The initial changes of fats deposits during the décomposition of human and pig remains - *J Forensic Sci* 2009, vol 54, No 1.
- [6] PFEIFFER S., MILNE S., STEVENSON R.M. – The natural decomposition of adipocere. *J Forensic Sci* 1998, 43(2), 368-370.
- [7] STUART B.H., FORBES S.L., DENT B.B., HODGSON G. – Studies of diffuse reflectance infrared spectroscopy, *Vib. Spectrosc.*, 2000, 24, 233-242.
- [8] TAKATORI T., YAMAOKA A. – The mechanism of adipocere formation 1. Identification and chemical properties of hydroxy fatty acids in adipocere, *Forensic Science*, 1977, 9, 63-73.
- [9] TAKATORI T., YAMAOKA A. – The mechanism of adipocere formation 2. Separation and identification of oxo fatty acids in adipocere, *Forensic Science*, 1977, 10, 117-125.
- [10] TAKATORI T., ISHIGURO N., TARAO H., MATSUMIYA H. – Microbial production of hydroxy and oxo fatty acids by several microorganisms as a model of adipocere formation. *Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.*, 1986.
- [11] TAKATORI T. – Relationship between postmortem change and biological reaction. *Nippon Hoigaku Zasshi*, 1993, 47(2), 435-44.
- [12] TAKATORI T. – Investigations on the mechanism of adipocere formation and its relation to other biochemical reactions. *Forensic Science International*, 1996, 80, 49-61.
- [13] YAN F., McNALLY R., ELIAS B.S., KONTANIS E.J., SADIK O.A. – Preliminary quantitative investigation of post-mortem adipocere formation, *Forensic Science*, 2001, 46(3), 609-614.