

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2018

**MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

(Décret du 23 Janvier 2003)

et

**THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

(Décret du 16 Janvier 2004)

Présentés et soutenus publiquement
Le 19 Octobre 2018 à Poitiers
par Madame **SAUVAGEON Ysé**

INTÉRÊT DE L'HUMEUR VITRÉE DANS LA RECHERCHE DES CAUSES DE LA MORT :
ANALYSES BIOCHIMIQUES ET TOXICOLOGIQUES

Composition du Jury

Président : Monsieur le Professeur Thierry Hauet
Membres : Madame le Docteur Stéphanie Pain
Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux
Monsieur le Docteur Patrick Mura
Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Bertrand Brunet

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2018

**MÉMOIRE DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

(Décret du 23 Janvier 2003)

et

**THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

(Décret du 16 Janvier 2004)

Présentés et soutenus publiquement

Le 19 Octobre 2018 à Poitiers

par Madame **SAUVAGEON Ysé**

INTÉRÊT DE L'HUMEUR VITRÉE DANS LA RECHERCHE DES CAUSES DE LA MORT :
ANALYSES BIOCHIMIQUES ET TOXICOLOGIQUES

Composition du Jury

Président : Monsieur le Professeur Thierry Hauet

Membres : Madame le Docteur Stéphanie Pain
Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux
Monsieur le Docteur Patrick Mura

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Bertrand Brunet

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le Doyen,

Année 2018-2019

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers en médecine

AGIUS Gérard, bactériologie-virologie	PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
ALLAL Joseph, thérapeutique	PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
BATAILLE Benoît, neurochirurgie	PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
BRIDOUX Frank, néphrologie	PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
ROBERT René, réanimation	RICHER Jean-Pierre, anatomie
BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie	RIGOARD Philippe, neurochirurgie
CARRETIER Michel, chirurgie générale	ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire	ROBLOT Pascal, médecine interne
CHRISTIAENS Luc, cardiologie	RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation	SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation	SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
DEBIAIS Françoise, rhumatologie	TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
DROUOT Xavier, physiologie	THIERRY Antoine, néphrologie
DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie	THILLE Arnaud, réanimation
FAURE Jean-Pierre, anatomie	TOUGERON David, gastro-entérologie
FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation	TOURANI Jean-Marc, cancérologie
FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique	WAGER Michel, neurochirurgie
GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique	
GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie	
GILBERT Brigitte, génétique	
GOMBERT Jean-Marc, immunologie	
GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques	
GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale	
HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	
HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire	
HOUETO Jean-Luc, neurologie	
INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale	
JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes	
JABER Mohamed, cytologie et histologie	
JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	
KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie	
KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation	
KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale	
LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire	
LELEU Xavier, hématologie	
LEVARD Guillaume, chirurgie infantile	
LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie	
LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie	
LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques	
MACCHI Laurent, hématologie	
MARECHAUD Richard, médecine interne	
MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire	
MEURICE Jean-Claude, pneumologie	
MIGEOT Virginie, santé publique	
MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique	
MIMMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation	
NEAU Jean-Philippe, neurologie	
ORIOT Denis, pédiatrie	
PACCALIN Marc, gériatrie	

Maître de conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers en médecine

ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
BEN-BRIK Éric, médecine du travail (en détachement)
BILAN Frédéric, génétique
BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
COUDROY Rémy, réanimation
CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
DIAZ Véronique, physiologie

FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
FROUIN Éric, anatomie et cytologie pathologiques
GARCIA Magali, bactériologie-virologie
LAFAY Claire, pharmacologie clinique
PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
SAPANET Michel, médecine légale
SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

BINDER Philippe

GOMES DA CUNHA José

Maître de conférences des universités de médecine générale

BOSSAGEON Rémy

Professeurs associés de médecine générale

BIRAULT François
PARTHENAY Pascal

VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

AUDIER Pascal
ARCHAMBAULT Pierrick
BRABANT Yann

FRECHE Bernard
MIGNOT Stéphanie
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié

SIMMONDS Kevin, maître de langue étrangère

Professeurs émérites en médecine

DORE Bertrand, urologie (08/2020)
EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
GIL Roger, neurologie (08/2020)
GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)

MARECHAUD Richard, médecine interne (11/2020)
POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2018)
SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires en médecine

ALCALAY Michel, rhumatologie
ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
BURIN Pierre, histologie
CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice médicale
DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
GRIGNON Bernadette, bactériologie
GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
GUILLET Gérard, dermatologie
JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie
KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)

KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
MARILLAUD Albert, physiologie
MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
PAQUEREAU Joël, physiologie
POINTREAU Philippe, biochimie
REISS Daniel, biochimie
RIDEAU Yves, anatomie
SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le Doyen,

Année 2018-2019

Professeurs des Universités-en pharmacie

COUET William, pharmacie clinique PU-PH
DUPUIS Antoine, pharmacie clinique PU-PH
MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH
CARATO Pascal, chimie thérapeutique PR
FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR

IMBERT Christine, parasitologie PR
OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
SARROUILHE Denis, physiologie PR
SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maître de conférences des Universités-en pharmacie

BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH
BARRIER Laurence, biochimie MCF
BODET Charles, bactériologie MCF
BON Delphine, biophysique MCF
BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
BUYCK Julien, microbiologie, MCF
CHARVET Caroline, physiologie MCF
DEBORDE-DELAGE Marie, sciences physico-chimiques MCF
DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF

DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie MCF
HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés – officine

DELOFFRE Clément, pharmacien

HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Attaché Temporaire d'Enseignement et de recherche (ATER)

JUIN Camille, parasitologie

Professeur 2nd degré – anglais

DEBAIL Didier

Maître de Langue – anglais

SIMMONDS Kevin

REMERCIEMENTS

Ainsi s'achève ce travail de thèse et débute ce manuscrit.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury.

A Monsieur le Professeur Thierry Hauet, vous me faites l'honneur de présider ce jury, je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.

A Madame le Docteur Stéphanie Pain, je vous prie d'accepter mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux, veuillez trouver l'expression de mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail mais également, au-delà de ce travail de thèse, pour l'ensemble des enseignements reçus dans le cadre du DIU de biologie médico légale.

A Monsieur le Docteur Mura, merci pour m'avoir dès le début ouvert les portes du laboratoire de toxicologie et celles plus fermées de la toxicologie médico légale. Je tiens à te remercier pour tout le soutien apporté pendant ces deux années passées dans le laboratoire de toxicologie.

Enfin, j'adresse particulièrement mes remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur Bertrand Brunet. Merci Bertrand pour avoir accepté de diriger cette thèse durant deux ans ainsi que pour tes corrections très justes qui ont permis de valoriser ce travail. Merci également pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta rigueur scientifique qui m'ont permis d'évoluer pendant ces deux années. Le travail à ton contact fut très formateur.

Mes remerciements vont également à mes collègues de travail et amis. Merci Jeremy pour m'avoir initié à toute la partie analytique de la toxicologie. J'ai encore beaucoup de chemin à parcourir et j'espère pouvoir continuer à travailler avec toi encore un bon bout de temps ! Merci pour ton soutien, ton aide et aussi toutes les autres choses comme les BK, les parties de tekken et les drames impliquant les Harribos !

Merci également à capt'ain Quinine et troisième membre de la team 89. Tu m'as toujours soutenue dans mes projets de recherche (même les plus farfelus !), j'espère que l'on continuera à avoir nos fructueuses discussions scientifiques entre médecin et pharmacien.

Ma reconnaissance va également à l'ensemble du personnel du laboratoire de toxicologie-pharmacologie.

Merci à Sandrine Marchand et Nicolas Venisse pour leur enseignement dans le service, leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à nos secrétaires si efficaces : la retraitée et ses bons légumes du potager ainsi que Marina et Céline !

Une mention spéciale pour l'équipe haute en couleurs des technicien(nes) du laboratoire.

Aux vieux : Laurène (merci pour tout !), Pascool et ses melons et Guigui : merci pour tout ce que vous m'avez appris !

Et aux jeunes qui arrivent : Isa, Audrey, Sandra, Flash : merci pour la bonne ambiance au sein du laboratoire.

Enfin, mes derniers remerciements vont à mes proches.

A mes amis de longue date : Ophélie et Carl, Anne Chat, Loulou, Virginie, Didi, Toinou, Mélanie mon caribou préféré, Viviane et Momo : merci pour tous les bons moments passés ensemble depuis la PACES ou depuis plus longtemps encore pour certains !

A mon cérébral de frère, tu es et resteras mon exemple de rigueur scientifique, mais également je l'avoue mon exemple à mario kart... Merci pour ton aide, ta patience et ton soutien pendant toutes ces années !

A mes parents, je ne saurais dire combien je vous aime et combien vous m'avez apporté depuis le début.

Merci pour votre soutien tout au long de ces études mais également pour tout le reste aussi : les cours de maths, les doubles de tennis et les corrections d'orthographe !

Enfin à mon mari, merci d'avoir toujours été là, à veiller sur moi, merci pour ton amour et tout le soutien que tu me donnes depuis toujours.

« Il n'est pas nécessaire d'espérer pour entreprendre ni de réussir pour persévérer »

PLAN DE THESE

I.	INTRODUCTION GENERALE	1
II.	PRESENTATION DES MILIEUX ETUDIES	2
II-1.	Humeur vitrée	2
II-1-1.	Introduction	2
II-1-2.	Anatomie, composition de l'humeur vitrée et évolution selon l'âge	2
II-1-3.	Diffusion et élimination antemortem des xénobiotiques dans l'humeur vitrée	8
II-1-4.	Variations postmortem de l'humeur vitrée	12
II-1-5.	L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale	12
II-2.	Sang et liquide hématique	13
II-2-1.	Introduction	13
II-2-2.	Données de pharmacocinétique antemortem	13
II-2-3.	Données de pharmacocinétiques en postmortem	17
II-2-4.	Phénomènes agoniques	18
II-2-5.	Phénomènes de redistribution postmortem	19
II-2-6.	Intérêt en toxicologie médico-légale	19
III.	PRINCIPAUX MARQUEURS TOXICOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES ETUDIES	21
III-1.	Marqueurs toxicologiques	21
III-1-1.	Éthanol et éthylglucuronide	21
III-2.	Infarctus du myocarde et marqueurs biochimiques d'intérêt	22
III-2-1.	Données générales	22
III-2-2.	Diagnostic d'infarctus du myocarde en postmortem	22
III-2-3.	Marqueurs biochimiques cardiaques d'intérêt	23
IV.	MATERIELS ET METHODES	28
IV-1.	Prélèvements	28
IV-1-1.	Prélèvements sanguins	28
IV-1-2.	Prélèvements d'humeur vitrée	28
IV-1-3.	Identification des prélèvements autopsiques	28
IV-1-4.	Conservation des prélèvements autopsiques	28
IV-2.	Analyses qualitatives dans le sang périphérique postmortem et l'humeur vitrée	29
IV-2-1.	Prétraitement des échantillons postmortem	29
IV-2-2.	Analyse chromatographique des prélèvements de sang et d'humeur vitrée	30
IV-3.	Analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée	31
IV-3-1.	Analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée	31
IV-3-2.	Analyse quantitative des marqueurs biochimiques dans le sang et dans l'humeur vitrée	35
V.	RESULTATS QUALITATIFS	39
V-1.	Résultats des analyses qualitatives toxicologiques dans le sang et l'humeur vitrée	39
V-1-1.	Benzodiazépines	39
V-1-2.	Opiacés, amphétamines et analgésiques	40
V-1-3.	Bétabloquants	40
V-1-4.	Antidépresseurs et antipsychotiques	41
V-1-5.	Autres molécules	42

VI.	RESULTATS QUANTITATIFS.....	44
VI-1.	Résultats des analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et l'humeur vitrée.....	45
VI-1-1.	Benzodiazépines	45
VI-1-2.	Bétabloquants	47
VI-1-3.	Antidépresseurs et antipsychotiques	48
VI-1-4.	Opiacés, cocaïne et amphétamines.....	50
VI-1-5.	Éthanol et éthylglucuronide	52
VI-2.	Résultats quantitatifs des marqueurs biochimiques.....	54
VI-2-1.	Myoglobine.....	54
VI-2-2.	CK.....	56
VI-2-3.	NT pro BNP	58
VI-2-4.	Copeptine	60
VI-2-5.	Troponine T hs	61
VII.	DISCUSSION.....	62
VII-1.	Discussion : résultats qualitatifs et quantitatifs toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée.....	62
VII-1-1.	Benzodiazépines	62
VII-1-2.	Opiacés, amphétamines, cocaïniques et analgésiques	65
VII-1-3.	Bétabloquants	70
VII-1-4.	Antidépresseurs et antipsychotiques.....	72
VII-1-5.	Autres xénobiotiques.....	74
VII-1-6.	Étude du passage des xénobiotiques étudiés selon leurs propriétés physico-chimiques	75
VII-1-7.	Éthanol et éthylglucuronide dans le sang et dans l'humeur vitrée	78
VII-2.	Discussion : résultats qualitatifs et quantitatifs des marqueurs biochimiques dans le sang et dans l'humeur vitrée	79
VII-2-1.	Myoglobine.....	79
VII-2-2.	CK.....	80
VII-2-3.	NT pro BNP	80
VII-2-4.	Copeptine	81
VII-2-5.	Troponine T hs	81
VIII.	CONCLUSION	82
IX.	REFERENCES	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Anatomie de l'œil et de la chambre postérieure	3
Figure 2 Anatomie de l'angle irido-cornéen et de la vascularisation de la chambre antérieure de l'œil	3
Figure 3 Structure de l'acide hyaluronique	4
Figure 4 Structure en triple hélice du tropocollagène	5
Figure 5: Structure de la Barrière Hémato-Rétinienne	9
Figure 6 Systématisation informatique de la diffusion d'un xénotique en antemortem chez l'être humain par la voie antérieure (A) et postérieure (B)	11
Figure 7 : Représentation schématique des mouvements des xénotiques dans l'humeur vitrée	11
Figure 8 Métabolisme non oxydatif de l'éthanol	21
Figure 9 Pré-provasopressine	23
Figure 10 Synthèse de la copeptine et de l'AVP	24
Figure 11 Formation de la phosphocréatine	25
Figure 12 Évolution des enzymes cardiaques	27
Figure 13 Principe du dosage de la copeptine	36
Figure 14 Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Oxazépam	46
Figure 15 Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Diazépam	46
Figure 16 Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les benzodiazépines	46
Figure 17 Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les bêtabloquants.	47
Figure 18 Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Cyamémazine	49
Figure 19 Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les antidépresseurs et antipsychotiques.	49
Figure 20 Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en	51
Figure 21 Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les opiacés, antalgiques, cocaïnes et amphétamines.	51
Figure 22 Relation concentrations en éthylglucuronide dans le sang périphérique et l'humeur vitrée postmortem	53
Figure 23 Relation Myoglobine dans l'humeur vitrée et troponine dans le sang périphérique postmortem	55
Figure 24 Relation entre les CK dans l'humeur vitrée et troponine dans le sang périphérique postmortem	57
Figure 25 Relation entre les concentrations de NT pro BNP dans l'humeur vitrée et de troponine dans le sang périphérique postmortem	59
Figure 26 Relation entre les concentrations de copeptine dans l'humeur vitrée et de troponine dans le sang périphérique postmortem	61
Figure 27 Relation entre la liaison protéique et le passage dans l'humeur vitrée	63
Figure 28 Relation entre le passage dans l'humeur vitrée et le LogP	64
Figure 29 Relation entre le passage dans l'humeur vitrée et le poids moléculaire	64
Figure 30 Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les amphétamines, cocaïne et MDMA	67
Figure 31 Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les amphétamines, cocaïne et MDMA	67
Figure 32 Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les amphétamines, cocaïne et MDMA	67
Figure 33 Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les opiacés	69
Figure 34 Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les opiacés	69
Figure 35 Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les bêtabloquants	70
Figure 36 Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les bêtabloquants	71
Figure 37 Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les bêtabloquants	71
Figure 38 Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les antidépresseurs et antipsychotiques	73
Figure 39 Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les antidépresseurs et antipsychotiques	73
Figure 40 Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les antidépresseurs et antipsychotiques	74
Figure 41 Passage dans l'humeur vitrée en fonction du poids moléculaire	76
Figure 42 passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique	76
Figure 43 Passage dans l'humeur vitrée en fonction du LogP	77
Figure 44 Passage dans l'humeur vitrée en fonction de la charge globale	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition des différents types de collagène dans l'organisme _____	5
Tableau 2 : Demi-vie des molécules dans l'humeur vitrée selon leur poids moléculaire _____	10
Tableau 3 : Caractéristiques des xénobiotiques et absorption _____	14
Tableau 4 : Caractéristiques liées à l'individu influençant l'absorption _____	14
Tableau 5 : Variation des NT pro BNP selon l'âge et le sexe _____	26
Tableau 6 : Nombre d'échantillons avec présence de benzodiazépines _____	39
Tableau 7 : Nombre d'échantillons avec présence d'amphétamines, opiacés, analgésiques _____	40
Tableau 8 : Nombre d'échantillons retrouvant des bêtabloquants _____	40
Tableau 9 : Nombre d'échantillons retrouvant des antidépresseurs et antipsychotiques _____	41
Tableau 10 : Nombre d'échantillons retrouvant des xénobiotiques autres _____	42
Tableau 11 : Résultats quantitatifs des benzodiazépines _____	45
Tableau 12 : Résultats quantitatifs des bêtabloquants _____	47
Tableau 13 : Résultats quantitatifs des antidépresseurs et antipsychotiques _____	48
Tableau 14 : Résultats quantitatifs des opiacés, cocaïniques, amphétamines _____	50
Tableau 16 : Résultats quantitatifs de l'éthylglucuronide _____	52
Tableau 17 : Résultats quantitatifs de la myoglobine _____	54
Tableau 18 : Résultats quantitatifs des CK _____	56
Tableau 19 : Résultats quantitatifs des NT pro BNP _____	58
Tableau 20 : Résultats quantitatifs de la copeptine _____	60
Tableau 21 : Résultats quantitatifs de la Troponine T hs _____	61
Tableau 22 : Passage des xénobiotiques dans l'humeur vitrée selon les caractéristiques physico-chimiques _____	75

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

Symboles	Signification
ACTH	Hormone corticotrope hypophysaire
ADH	Hormone Antidiurétique
AH	Acide Hyaluronique
BHR	Barrière hémato rétinienne
CK	Créatine Kinase
CPG FID	Chromatographie en Phase Gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme
OPJ	Officier de Police Judiciaire
ECG	Électrocardiogramme
FAEE	Ester Éthylique d'Acides Gras
GAG	Glycosaminoglycane
HTIC	Hypertension Intra Crânienne
HV	Humeur Vitreuse
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
r	Coefficient de corrélation
SLRP	<i>Leucin Rich Proteoglycan</i>
T hs	Troponine hautement sensible
UGT	glucuronyl transférase
ULC-HRMS	Chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution.

I. Introduction générale

Si la toxicologie est étudiée depuis le IX^{ème} siècle, la composante médico-légale de la toxicologie s'est développée plus récemment (XVIII^{ème} siècle). Aujourd'hui, les résultats d'analyses toxicologiques représentent un élément important dans divers aspects de la médecine légale (recherche des causes de la mort, soumission chimique, dopage...)

Suite à une autopsie, l'analyse toxicologique postmortem apporte des résultats qualitatifs permettant d'identifier les xénobiotiques et des résultats quantitatifs permettant de connaître l'implication du xénobiotique dans l'origine du décès.

L'analyse toxicologique peut être menée sur des échantillons variés : sang périphérique, sang cardiaque, humeur vitrée, urines, cheveux, contenu gastrique, tissus (poumon, foie, cerveau)...

Le sang périphérique reste le milieu de référence pour l'analyse quantitative et l'interprétation des résultats quantitatifs. Cependant dans de nombreuses situations, d'autres matrices alternatives sont utilisées : cheveux pour l'analyse rétrospective, humeur vitrée pour le dosage d'éthanol.

L'humeur vitrée, encore appelée corps vitré est une substance viscoélastique, essentiellement composée d'eau, qui est située dans la chambre postérieure de l'œil.

Son intérêt en toxicologie médico-légale n'est pas nouveau puisqu'en 1963 avaient lieu les premières tentatives de dosage d'électrolytes pour estimer le délai postmortem.

Depuis, l'humeur vitrée est principalement utilisée pour le dosage de l'éthanol, et reste considérée comme une matrice intéressante pour la recherche qualitative d'autres molécules.

Cette étude a comme objectif de définir l'intérêt de l'humeur vitrée comme matrice alternative en postmortem, lors de la réalisation de screenings par méthode ULC-HRMS et lors de la réalisation de dosages quantitatifs en postmortem.

Dans l'optique d'une recherche élargie des causes de la mort, une étude des marqueurs cardiaques dans l'humeur vitrée a aussi été menée.

II. Présentation des milieux étudiés

II-1. Humeur vitrée

II-1-1. Introduction

L'humeur vitrée est un milieu transparent, avasculaire dès la naissance et intervenant dans le maintien de la pression intraoculaire et dans les échanges avec les milieux voisins [1].

La diffusion des xénobiotiques se fait à travers les barrières hémato-oculaires et notamment à travers la barrière hémato-rétinienne dont les jonctions serrées protègent le milieu des contaminations extérieures.

Ainsi, l'humeur vitrée est isolée du milieu extérieur, peu sujette aux remaniements postmortem et aux contaminations microbiennes [2].

II-1-2. Anatomie, composition de l'humeur vitrée et évolution selon l'âge

Anatomie de l'humeur vitrée

L'humeur vitrée (HV) est une structure qui occupe un volume d'environ 4,5 mL dans la chambre postérieure de l'œil (Figure 1). Elle représente les 2/3 du volume du globe oculaire [3].

Elle est entourée dans le sens antéro-postérieur par le cristallin et la rétine. De nombreuses structures anatomiques sont incluses dans le terme « corps vitré »: le canal de Cloquet ou canal hyaloïde (reliquat embryologique intra vitréen), le vitré central, le vitré basal, le cortex, l'interface vitro-rétinien et les zonules [1].

Le vitré central constitue la majeure partie du corps vitré. Il contient le canal de Cloquet. Les fibres de collagène qui le constituent sont en plus faible concentration que dans les autres parties. Elles traversent le vitré central dans le sens antéro-postérieur.

Le vitré basal est une zone annulaire qui chevauche la jonction entre la rétine et la *pars plana*. Il est caractérisé par la présence de denses faisceaux de fibres de collagènes.

Le cortex est une fine couche qui entoure le vitré central. Il se distingue du vitré central par sa haute concentration en fibres de collagène et par leurs orientations différentes [4].

Les zonules font le lien entre la *pars plana*, la *pars plicata* et la partie basale du vitré (Figure 2).

Le vitré est normalement acellulaire excepté au niveau du cortex et du vitré basal où l'on retrouve des hyalocytes et des fibroblastes. Ce sont des cellules spécialisées dans la production de mucopolysaccharides (en particulier d'acide hyaluronique) et dans la production de précurseurs du collagène [1].

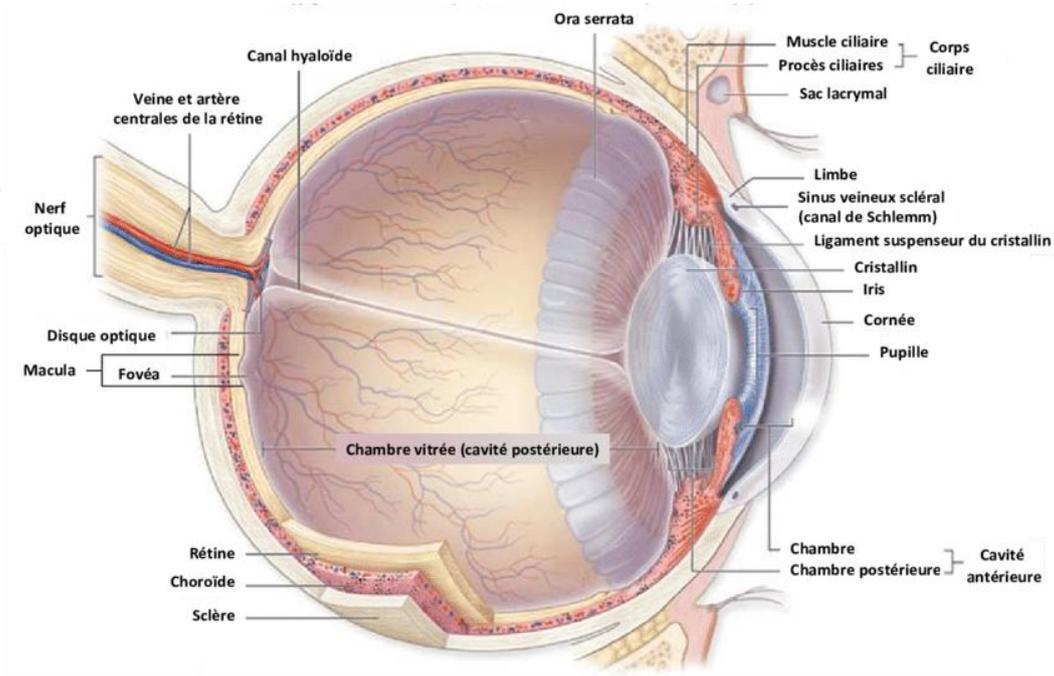


Figure 1 Anatomie de l'œil et de la chambre postérieure[5]

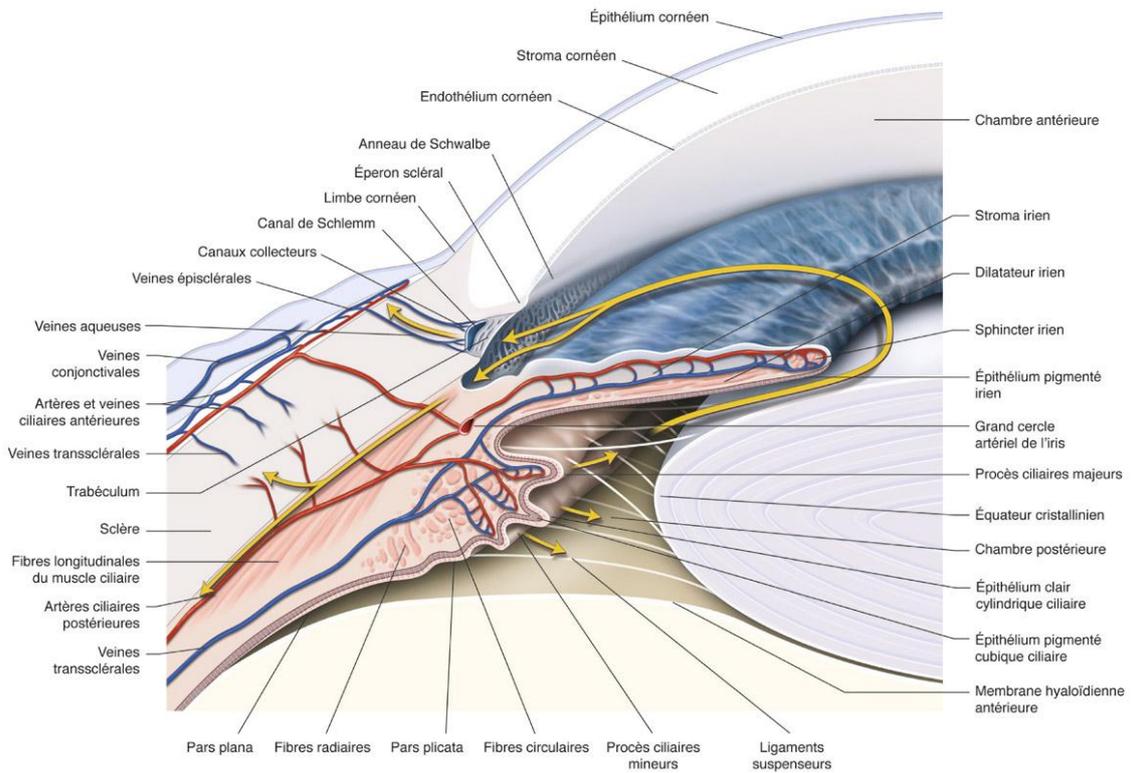


Figure 2 Anatomie de l'angle irido-cornéen et de la vascularisation de la chambre antérieure de l'œil[6]

Composition de l'humeur vitrée

Bien que le vitré soit composé à 98 % d'eau, il possède une consistance viscoélastique due à la présence de glycosaminoglycanes (GAG) et de collagène. Le principal GAG présent est l'acide hyaluronique, mais de la chondroïtine sulfate et de l'héparane sulfate sont également retrouvés [4].

Le corps vitré est un réseau tridimensionnel lâche de fibrilles de collagène parsemé d'importants amas de molécules d'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est hydrophile et il existe probablement une liaison électrostatique entre l'acide hyaluronique chargé négativement et le collagène chargé positivement [7].

La composition de l'humeur vitrée comprend des électrolytes (sodium, potassium, chlore), ascorbates, lactates, phosphates, sucres et quelques protéines [1].

Acide hyaluronique

L'humeur vitrée est constituée de glycosaminoglycanes (GAG) dont l'élément prédominant est représenté par l'acide hyaluronique (AH). Il s'agit d'un long polymère de fractions disaccharidiques qui se répètent (acide glucuronique beta (1,3)- N- acétyl glucosamine) réunis par des liaisons beta 1-4 (Figure 3).

Il s'agit d'une molécule poly-anionique hydrophile formant un réseau dont sont exclues les molécules de grande taille. La composition du vitré en AH varie selon l'âge. Normalement l'acide hyaluronique n'est pas un polymère libre in vivo mais il présente une liaison covalente avec un noyau protéique, l'ensemble portant le nom de protéoglycane [1].

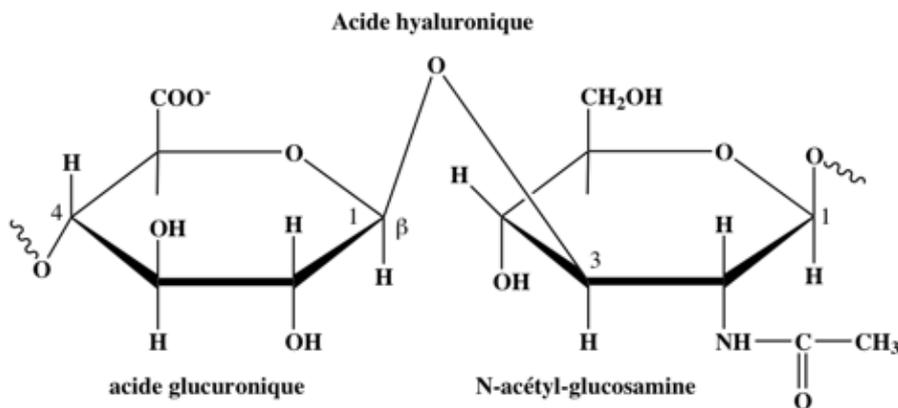


Figure 3 Structure de l'acide hyaluronique[8]

Collagène

Le collagène est une protéine de la matrice extracellulaire. Il a été décrit 19 types de collagènes différents, répartis dans différents tissus de l'organisme (Tableau 1). Le collagène est une microfibrille constituée de trois hélices contenant chacune 1050 acides aminés notamment la glycine, la proline et l'hydroxyproline (Figure 4). L'association de ces trois hélices forme une molécule mature de tropocollagène.

L'assemblage de plusieurs monomères de collagène dans la matrice extracellulaire forme des réseaux fibreux. Dans l'humeur vitrée les réseaux sont majoritairement formés par du collagène de type II, V/XI et IX [4].

Tableau 1 : Répartition des différents types de collagène dans l'organisme [9]

Type	Famille	Origine
I	A	Tissus conjonctifs: Tendon, os, peau, ligaments, cornée (90%)
II	A	Humeur vitrée, cartilage, disques vertébraux
III	A	Vaisseaux sanguins, peau, poumons
IV	B	Membranes basales
V	A	Tissus conjonctifs (composant mineur, humeur vitrée)
VI	D	Tissus conjonctifs (composant mineur, humeur vitrée)
VII	E	Fibrilles d'ancrage
VIII	B	Endothélium
IX	C	Tissus conjonctifs (composant mineur, humeur vitrée)
X	B	Cartilage hypertrophique
XI	A	Humeur vitrée, cartilage

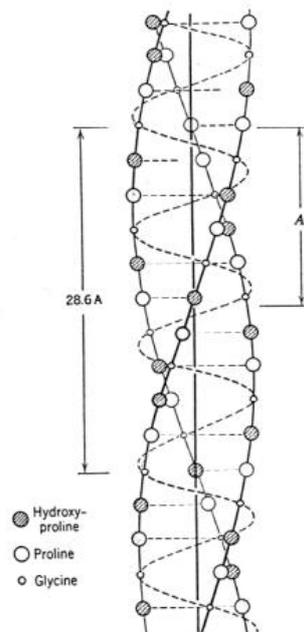


Figure 4 Structure en triple hélice du tropocollagène [9]

Le collagène de type II représente 75 % du collagène de l'humeur vitrée. Les monomères sont formés de trois chaînes alpha1 identiques. Il se présente sous la forme de fines fibrilles orientées au hasard dans une matrice de protéoglycanes. Cette distribution renforce la résistance aux forces de compression et à la déformation et donne à l'humeur vitrée une viscosité quatre fois plus élevée que celle de l'eau [4].

L'humeur vitrée se compose également d'un hybride des collagènes V et XI qui représente environ 10 % du collagène dans le vitré, il forme des polymères fibrillaires et se cantonne au vitré central. Ces deux collagènes sont très proches en termes de structure et de fonction. Le collagène de type V est formé de différentes combinaisons entre des chaînes alpha 1(V), alpha2(V), alpha 3(V). Le collagène de type XI est retrouvé dans des associations avec les collagènes de type II et se compose de différentes associations entre les chaînes alpha1(XI), alpha2(XI) et alpha3(XI)[4].

Le collagène de type IX est composé de trois chaînes alpha1(IX), alpha2(IX), et alpha3(IX). Il représente environ 15% du collagène total du vitré. Il peut être relié à un GAG type chondroïtine sulfate pour former un protéoglycane [4].

Enfin, il est à noter la présence de microfibrilles de collagène de type VI. Ces fibrilles sont essentiellement composées de monomères de collagène de type VI. Bien qu'elles soient moins représentées que les polymères de collagène, leur rôle est majeur puisqu'elles permettent de relier les polymères de collagène entre eux ou de relier les polymères de collagène aux réseaux créés par les GAG [4].

Autres composants

Fibrillin1

Bien que le vitré soit composé en majeure partie de collagène et de GAG, les microfibrilles telles que la fibrillin-1 sont probablement plus abondantes que les microfibrilles de collagène de type VI [4].

Il s'agit d'une glycoprotéine sécrétée par les fibroblastes et qui permet l'adhésion des différents composants de la matrice extra cellulaire.

Opticin

Cette protéine récemment découverte appartient à la famille des SLRP (*Leucin Rich Proteoglycan*). Elle joue un rôle majeur dans la liaison des fibres de collagène. D'autres macromolécules comme VIT1 jouent également un rôle structural au niveau des fibres de collagène [4].

Fibronectine

La fibronectine est également présente dans l'humeur vitrée. Quelques-unes de ces glycoprotéines sont associées aux fibres de collagènes [1].

Évolution de l'humeur vitrée en fonction de l'âge

En période post natale, une augmentation du volume du vitré est corrélée avec une augmentation du taux d'acide hyaluronique. Il existe également une dilution du collagène formé, avec un arrêt de sa néosynthèse [1].

Avec l'âge le vitré a tendance à se liquéfier [3]. À partir de 14 ans, seul 20 % du vitré est liquide. À partir de 40 ans le volume du vitré diminue et vers l'âge de 80 ans c'est plus de la moitié du vitré qui se liquéfie [1]. Il existe aussi un affaiblissement de l'adhésion entre l'interface vitro-rétinienne et le cortex vitréen [1].

Les mécanismes de liquéfaction ont été peu étudiés. Des variations structurales des fibres de collagène pourraient être à l'origine de cette liquéfaction.

II-1-3. Diffusion et élimination antemortem des xénobiotiques dans l'humeur vitrée

Les phénomènes de diffusion dans l'humeur vitrée ont été étudiés pour certains xénobiotiques du fait de leur implication dans le traitement de certaines affections oculaires : diabète, DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), endophtalmies.

Le corps vitré ou humeur vitrée est un milieu protégé anatomiquement. Lors de pathologies atteignant la chambre postérieure de l'œil, les traitements sont le plus souvent instillés par des collyres ou par des injections intra-vitréennes pour atteindre des concentrations efficaces. Ainsi les mécanismes de diffusion de certaines molécules telles que le ganciclovir ou des anti VEGF ont été bien étudiés du fait de leur impact thérapeutique [10] [11].

Au contraire, la majeure partie des molécules retrouvées lors d'expertises médico-légales proviennent de la circulation générale et les phénomènes de diffusion d'un grand nombre de molécules d'intérêt médico-légales restent peu connus.

À partir de la circulation systémique, la diffusion des molécules jusqu'à l'humeur vitrée se fait au travers des barrières hémato-oculaires.

Les barrières hémato-oculaires

Les barrières hémato-oculaires comprennent la barrière hémato-aqueuse et la barrière hémato-rétinienne. Les molécules provenant de la circulation systémique pénètrent principalement par l'intermédiaire de la rétine via la barrière hémato-rétinienne (BHR). D'autres voies de diffusion sont décrites, notamment via la barrière hémato-aqueuse et l'humeur aqueuse [12].

La barrière hémato-rétinienne

La barrière hémato-rétinienne (Blood Retinal Barrier ou BRB) permet de protéger le globe oculaire de la pénétration de pathogènes mais aussi de réguler l'homéostasie entre les différents compartiments et d'apporter les nutriments nécessaires au bon fonctionnement de la rétine. Il s'agit d'une barrière sélective située entre la rétine et la circulation sanguine. Elle possède une grande analogie structurale avec la barrière hémato encéphalique [12].

La barrière hémato-rétinienne possède deux types de vaisseaux : ceux de la choroïde et ceux de la rétine.

Elle peut être partagée en une barrière interne constituée par l'endothélium des capillaires rétiniens de type non fenestré et une barrière externe représentée par la couche des cellules de l'épithélium pigmentaire séparant la rétine de la choroïde. Les cellules de l'épithélium pigmentaire sont reliées les unes aux autres par des jonctions serrées. Ces jonctions serrées interdisent le passage intercellulaire de molécules même de petites tailles [10]. L'épithélium pigmentaire adhère fortement à la membrane de Bruch, membrane perméable vascularisée à partir des vaisseaux de la choroïde (figure 5).

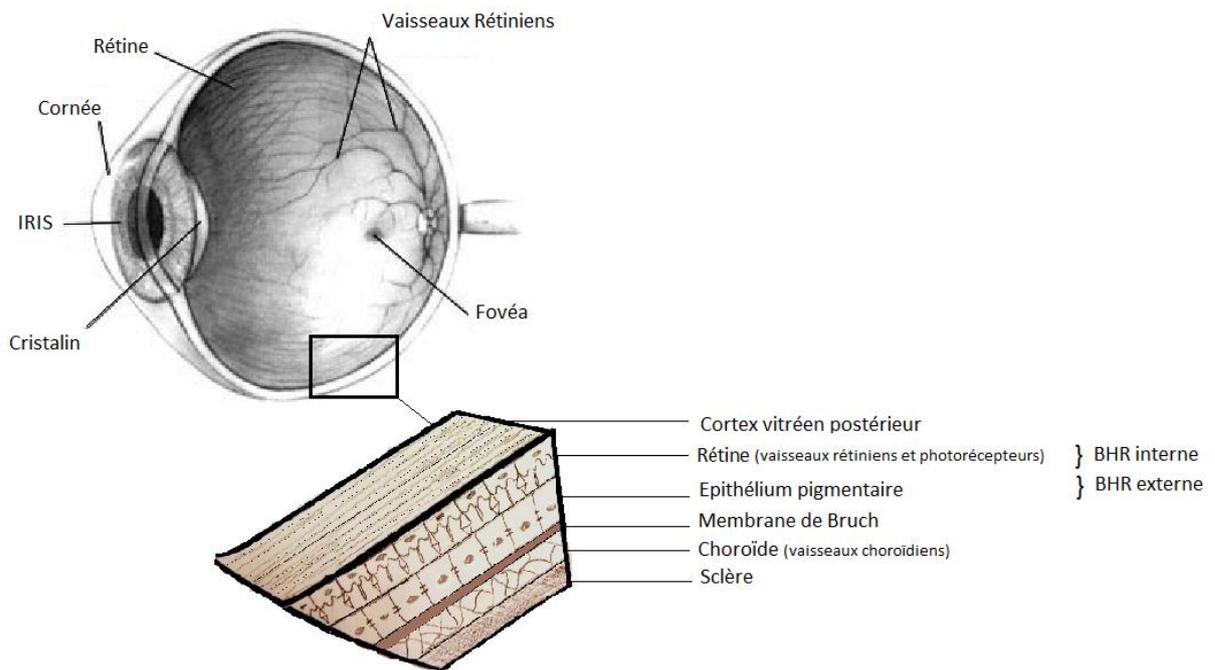


Figure 5: Structure de la Barrière Hémato-Rétinienne

Interface vitro-rétinienne

Il s'agit de la limite entre le cortex vitréen postérieur (constitué de fibres de collagènes tassées en structure lamellaire) et les cellules rétiniennes adjacentes.

La barrière hémato-aqueuse

Elle est constituée par les capillaires vascularisant l'épithélium ciliaire et par l'épithélium postérieur de l'iris. L'épithélium ciliaire est constitué d'une couche pigmentaire externe et d'une couche interne de cellules claires. Il repose sur une membrane basale. Les connexions cellulaires sont particulièrement importantes. L'épithélium de l'iris ressemble à la couche de cellules claires ciliaires. Les jonctions intercellulaires sont de type jonctions serrées. Les capillaires iriens sont constitués de cellules endothéliales réunies par des jonctions serrées [12].

Diffusion antemortem des xénobiotiques dans l'humeur vitrée

La majeure partie de la diffusion a lieu entre les vaisseaux rétiens et l'humeur vitrée par la barrière hémato-rétinienne (voie postérieure).

Il existe deux types de transports. Un transport passif qui se fait essentiellement via des canaux protéiques membranaires par simple diffusion et un transport actif qui s'effectue contre un gradient de concentration et grâce à un transporteur. Seule la diffusion par transport actif est saturable [12].

La pénétration des molécules dans l'humeur vitrée dépend de nombreux facteurs : liaison aux protéines plasmatiques, liposolubilité, taille des molécules, volume de distribution, concentration plasmatique, perméabilité de la barrière hémato-rétinienne [13].

En effet plus une molécule est de haut poids moléculaire, plus sa diffusion dépendra du transport actif [12]. De plus, la diffusion est aisée pour les substances lipophiles. En effet, une substance liposoluble se lie facilement aux lipoprotéines de membrane et pénètre plus facilement la barrière hémato-rétinienne. Dans leur étude Pitkanen et coll. ont montré que les bêtabloquants les plus hydrophiles de l'étude avaient des coefficients de perméabilité 7 à 8 fois plus faibles que les bêtabloquants les plus lipophiles [14]. De plus les bêtabloquants les plus lipophiles pénétraient plus vite qu'ils ne ressortaient de l'humeur vitrée [14].

Käsdorf et coll. ont également montré que pour des molécules de même taille, les molécules ayant une charge globale positive étaient plus rapidement immobilisées que les molécules ayant une charge globale négative. En effet, dans l'humeur vitrée, les particules chargées positivement ont une mobilité réduite du fait de l'interaction avec le réseau de GAG chargés négativement. Il a été prouvé que la digestion enzymatique des GAG permettait de diminuer le phénomène de « *trapping* » des molécules chargées positivement et d'augmenter leur mobilité [7].

Plusieurs études se sont intéressées à la diffusion des molécules dans l'humeur vitrée. Xu et coll. ont mis en évidence une diffusion plus faible dans l'humeur vitrée que dans l'eau. La diffusion des molécules dans l'humeur vitrée serait plus lente pour les molécules de haut poids moléculaire [15]. Une étude de systématisation mathématique a permis d'évaluer la diffusion des molécules dans l'humeur vitrée et de calculer selon leur masse, leur demi-vie dans l'humeur vitrée (Tableau 2). De plus, il apparaît que la plus forte concentration en molécules (environ 90% des molécules) se trouve dans le vitré central lorsque la molécule passe par la barrière hémato-rétinienne (Figure 6) [16].

Tableau 2 Demi-vie des molécules dans l'humeur vitrée selon leur poids moléculaire [16]

Poids moléculaire (Da)	Estimation de la demi-vie (Heure)
100	2
500	4
1000	5
10000	10
100000	21

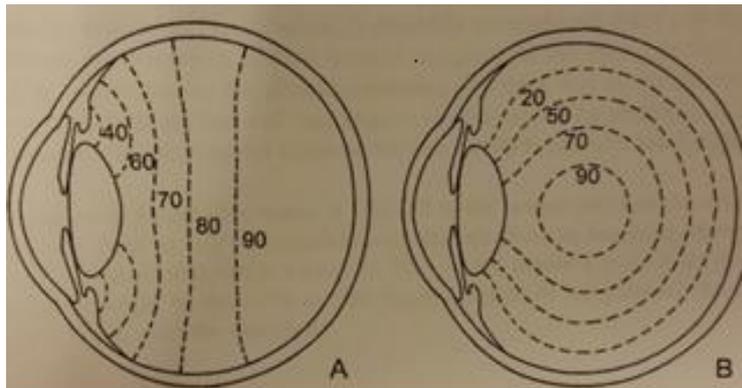


Figure 6 : Systématisation informatique de la diffusion d'un xénobiotique en antemortem chez l'être humain par la voie antérieure (A) et postérieure (B)[16]

Élimination antemortem des xénobiotiques dans l'humeur vitrée

L'élimination des xénobiotiques se fait majoritairement par le renouvellement de l'humeur aqueuse. Deux voies sont décrites : la voie antérieure par diffusion vers l'humeur aqueuse et la voie postérieure en passant en sens inverse la BHR. Il existe au sein du vitré un courant de diffusion lent antéro-postérieur (Figure 7).

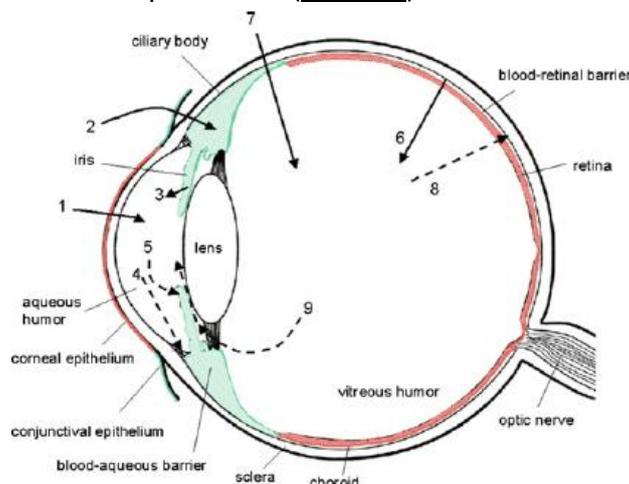


Figure 7 : Représentation schématique des mouvements des xénobiotiques dans l'humeur vitrée [17]

- 1) Diffusion vers la chambre antérieure via le flux lacrymal.
- 2) Diffusion depuis la conjonctive et la sclère jusqu'à la chambre antérieure.
- 3) Diffusion depuis le sang et la barrière rétinienne vers la chambre antérieure
- 4) Élimination des xénobiotiques depuis la chambre antérieure vers le canal de Sclemm.
- 5) Élimination des xénobiotiques via la chambre antérieure vers la barrière hémato aqueuse.
- 6) Diffusion depuis le sang et la barrière rétinienne vers l'humeur vitrée
- 7) Administration intra vitréenne de xénobiotiques.
- 8) Élimination des xénobiotiques depuis l'humeur vitrée vers les vaisseaux rétiens.
- 9) Élimination des xénobiotiques depuis l'humeur vitrée vers la chambre antérieure.

II-1-4. Variations postmortem de l'humeur vitrée

En postmortem l'humeur vitrée a tendance à se liquéfier. La présence de hyaluronidases pourrait concourir à cette liquéfaction. L'intensité et la rapidité de liquéfaction dépendent des conditions ambiantes et du délai postmortem.

Phénomènes de redistribution postmortem

L'étude de De Letter au sujet de la redistribution postmortem de la MDMA a permis de mettre en évidence des phénomènes de redistribution au niveau oculaire chez le lapin. Certains réservoirs oculaires seraient à l'origine d'une augmentation de la concentration vitrénne en MDMA en fonction du délai postmortem [18]. Il a également été avancé l'hypothèse d'échanges et d'accumulation vers la rétine et la chambre antérieure depuis l'humeur vitrée [17]. Ces phénomènes de redistribution ont été peu étudiés et apparaissent comme étant mineurs comparés à ceux observés dans d'autres organes.

II-1-5. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale

L'humeur vitrée est considérée comme une matrice alternative en toxicologie médico-légale depuis 50 ans. En effet, de par sa situation et son anatomie, le corps vitré est un milieu protégé et isolé. L'humeur vitrée étant constituée à 98 % d'eau, il s'agit d'un milieu stable en postmortem, peu propice aux phénomènes de remaniements, aux contaminations bactériennes ou chimiques (embaumement), ou aux phénomènes enzymatiques [13]. Sa situation éloignée des viscères permet d'éviter certaines contaminations en postmortem. Il est également un milieu facile à prélever, sans effraction vasculaire et aisé à conserver. De plus, l'humeur vitrée reste parfois l'une des seules matrices utilisables comme par exemple en présence de cadavres exsangues, lors d'état de putréfaction avancée, de plaies multiples ou de traumatismes importants. Le dosage des électrolytes et notamment du potassium a été le sujet de nombreuses études depuis 1963, dans le but de déterminer le délai postmortem [19]. Ce dosage n'est pas réalisé en pratique courante et le délai postmortem ne peut être suggéré qu'à partir d'un faisceau d'arguments. D'autres études ont été menées dans le même but : dosage de l'hypoxantine seule [20-21] ou associé au dosage du potassium [22], dosage de la créatinine [23]. Les dosages des corps cétoniques, glucose, lactates, catécholamines ou amylase peuvent être réalisés à visée diagnostique [24-25]. Cependant le paramètre le plus souvent dosé en toxicologie médico-légale reste l'éthanol. La corrélation sang humeur vitrée a largement été étudiée. La correspondance entre les concentrations d'éthanol dans le sang périphérique et l'humeur vitrée est bien établie et reste un atout majeur dans l'interprétation des résultats d'expertises médico-légales. L'utilisation qualitative de l'humeur vitrée est établie, l'étude de Pelander et coll. a montré que de nombreuses molécules étaient retrouvées grâce à l'utilisation de méthode ultra-sensible type ULC-HRMS par temps de vol [26]. Toutefois l'interprétation de résultats quantitatifs reste floue et mal systématisée.

II-2. Sang et liquide hématique

II-2-1. Introduction

Le sang est composé d'éléments figurés du sang (99 % d'hématies) et du plasma qui contient les protéines circulantes.

Lors d'une autopsie, l'un des milieux le plus souvent prélevé est le sang qui se réduit souvent à un liquide hématique. Il s'agit d'un milieu de choix pour la recherche de xénobiotiques et l'interprétation des concentrations. En effet il existe un très grand nombre de travaux sur ce milieu. Il est donc aisé de comparer les concentrations retrouvées en postmortem avec les concentrations toxiques et létales proposées par les banques de données issues de la littérature.

En médecine légale il peut être prélevé du sang cardiaque ou du sang périphérique.

II-2-2. Données de pharmacocinétique antemortem

Le devenir des xénobiotiques dans l'organisme est étudié par la pharmacocinétique. 4 étapes de pharmacocinétique peuvent être distinguées [27]:

- l'absorption
- la distribution dans l'organisme
- le métabolisme
- l'élimination

Absorption

L'absorption est le processus par lequel un xénobiotique est transféré de son site d'administration à la circulation générale en traversant les membranes biologiques [28].

Le passage du xénobiotique de son lieu d'administration à la circulation générale peut s'effectuer selon une diffusion passive du compartiment où il est le plus concentré vers le compartiment où il l'est le moins (sans consommation d'énergie, sans notion de compétition, saturation ou spécificité) ; selon une diffusion facilitée par l'intermédiaire de transporteurs (OAT, ASBT, P-gp/MRP) ou selon un transport actif (contre un gradient, nécessitant de l'énergie, avec notion de saturation, spécificité et compétition) [27].

L'absorption est influencée par de nombreux facteurs: voie d'administration du xénobiotique, caractéristiques du xénobiotique et débit splanchnique, acidité gastrique, activité enzymatique lors de la résorption orale et certains facteurs liés à l'individu. Les voies d'administration sont variées.

D'autres facteurs influencent l'absorption.

- facteurs liés au xénobiotique [28] :

Tableau 3 Caractéristiques des xénobiotiques et absorption

Caractéristique du xénobiotique	Facilitation d'absorption	Diminution d'absorption
Galénique	Sirop, comprimé, gélules...	
Physico chimique (état d'ionisation)	Forme non ionisée	Forme ionisée
Hydro/lipo solubilité	Hydrosolubilité	Liposolubilité
Masse molaire	Vitesse d'absorption inversement proportionnelle à la masse molaire.	

- facteurs liés à l'individu [28] :

Tableau 4 Caractéristiques liées à l'individu influençant l'absorption

Individu	Exemples influençant l'absorption.
pH digestif	Modification par IPP, infections bactériennes.
Vitesse de vidange gastrique	Modification par ralentisseurs du transit, alimentation.
Alimentation	Repas riche en graisses
Âge	Âges extrêmes de la vie
Pathologies	Pathologies digestives, pathologie ORL...

La biodisponibilité

Elle se définit comme étant la fraction de la dose de médicament administré qui atteint la circulation générale et la vitesse à laquelle elle l'atteint.

La quantité de xénobiotiques atteignant la circulation générale est fonction de la quantité absorbée mais également :

- des mécanismes de dégradation dans la lumière intestinale, du métabolisme entérocytaire.
- du captage hépatique (captation d'une fraction de la dose absorbée par les hépatocytes avant d'atteindre la circulation générale, effet de premier passage hépatique).

Le facteur vitesse est apprécié par la constante de vitesse K_a ou par la C_{max} et par la T_{max} .

C_{max} : Concentration maximale atteinte dans le sang.

T_{max} : Temps nécessaire pour atteindre la C_{max} .

Distribution

La distribution tissulaire

Lorsque la circulation systémique est atteinte, les xénobiotiques vont se distribuer dans l'organisme. De nombreux paramètres influencent la distribution tissulaire.

Fixation aux protéines plasmatiques

Différentes protéines plasmatiques sont impliquées dans la distribution tissulaire. L'albumine, l'alpha1 glycoprotéine acide ou encore les lipoprotéines peuvent se lier avec les xénobiotiques absorbés. La fixation protéique dépend de la liposolubilité : plus un xénobiotique est liposoluble, plus il est fixé. Concernant les acides faibles, l'albumine est la principale protéine porteuse, l'affinité est grande et le nombre de sites de fixation faible. Concernant les bases faibles, ils se fixent à de très nombreuses protéines circulantes. Vis-à-vis de l'albumine, l'affinité est faible, le nombre de sites élevé. Quant aux xénobiotiques amphotères, à pH physiologique, ils se fixent sur l'albumine avec une faible affinité.

Caractéristiques du xénobiotique

Elle varie en fonction du poids moléculaire du xénobiotique (facilité de franchissement inversement proportionnelle au poids moléculaire), de la liposolubilité du xénobiotique (molécule liposoluble ayant plus d'affinité avec les membranes cellulaires), de son volume de distribution et de son degré d'ionisation [27].

Débit sanguin

Plus le débit sanguin est élevé plus la distribution sera facilitée.

Tissus et organes cibles

La diffusion des xénobiotiques va également dépendre des caractéristiques des organes cibles : liposolubilité ou hydrosolubilité permettant une rétention plus ou moins longue des xénobiotiques, degré d'irrigation de l'organe, types de jonctions dans les parois cellulaires (exemple des jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique ne laissant passer que 50% du glucose) [27]. Ainsi le foie et le tractus digestif reçoivent environ 25% du flux cardiaque total, le cerveau environ 13%, les reins entre 20 et 25% et les muscles au repos environ 20%.

Métabolisme

Schématiquement on distingue deux phases: réactions de phase 1 et réactions de phase 2.

Réactions de phase 1

Les réactions d'oxydation passent généralement par le cytochrome P450, elles consomment de l'oxygène et du NADPH et sont localisées au niveau des hépatocytes.

Les réactions de réduction peuvent avoir lieu au niveau hépatique mais également dans le système digestif (flore microbienne).

Les réactions d'hydrolyse sont réalisées par des enzymes (estérases) présentes au niveau hépatique mais également dans le plasma et dans différents tissus.

Ces différentes phases sont regroupées sous le nom de « métabolisme de phase 1 ». Les métabolites de phase 1 sont le plus souvent des dérivés avec groupements hydroxyles (-OH), amines (-NH₂) ou carboxyles (-COOH).

Réactions de phase 2

Les groupements issus des réactions de phase 1 peuvent être conjugués. Le plus souvent il s'agit d'une glucuroconjugaison (conjugaison avec l'acide glucuronique) qui concerne les molécules possédant un groupement hydroxyle, carboxyle, amine.

Élimination

Hépatique

Le foie participe activement à l'élimination des xénobiotiques dans la bile. Après excrétion de la bile, le médicament se retrouve dans le duodénum. Les substances conjuguées peuvent subir une hydrolyse et redonner la molécule mère qui peut être réabsorbée. C'est le cycle entéro-hépatique.

Rénale

L'élimination rénale est la principale voie d'élimination. Le plus souvent, les xénobiotiques ou leurs produits de dégradation sont filtrés par le glomérule. La fixation aux protéines est un facteur limitant lors de la filtration glomérulaire.

Certains xénobiotiques peuvent également être éliminés par sécrétion active tubulaire au niveau du tube contourné proximal.

Autres voies d'excrétion

De nombreuses autres voies participent à l'excrétion d'un xénobiotique (sueur, poumon, salive...) mais sont négligeables par rapport aux voies précédemment décrites.

II-2-3. Données de pharmacocinétiques en postmortem

Les concentrations sanguines mesurées en postmortem ne sont pas forcément le reflet des concentrations antemortem. De nombreux mécanismes physiologiques sont à l'origine de phénomènes de redistribution postmortem des xénobiotiques : lyse cellulaire, relargage à partir d'organes réservoirs (tractus gastro-intestinal, foie, poumon, myocarde). La redistribution peut être une diffusion via des structures vasculaires ou simplement par contiguïté.

Absorption

Elle se fait selon le pH et l'épaisseur membranaire. En postmortem, l'acidification intracellulaire et plasmatique, la déstructuration des membranes cellulaires et donc des structures tissulaires entraînent une modification de la diffusion passive. Le phénomène de filtration (concernant les petites molécules hydrosolubles) est stoppé une fois l'équilibre des concentrations atteint entre les différents compartiments. Quant au transport actif, l'arrêt du métabolisme aérobie et la baisse d'ATP entraînent un blocage de ce mécanisme de transfert quelques minutes à quelques heures après le décès [29].

Distribution

En postmortem le taux de protéines plasmatiques diminue (protéolyse bactérienne et libération d'enzymes protéolytiques dans le secteur vasculaire) et la fixation protéique diminue rendant plus importante la fraction libre des xénobiotiques. Les phénomènes de coagulation et de lyse survenant après le décès influencent également les phénomènes de distribution des molécules à fixation érythrocytaires [30].

Métabolisme peri et postmortem

Le décès est défini comme la cessation définitive des fonctions vitales, déterminant d'importantes lésions tissulaires et cellulaires. La frontière n'est pas nette entre le passage de la vie à la mort et la phase terminale qui conduit au décès est divisée en 4 étapes : la phase pré-agonique, la phase agonique, la mort cérébrale puis le décès. Durant la phase pré-agonique, il existe une activation du système sympathique (tachycardie, hypertension, HTIC, syndrome de Cushing), puis apparaît durant la phase agonique une sympatholyse avec défaillance cardiaque, hypotension et arrêt de la perfusion des organes vitaux. Durant la phase agonique et dès le début de la période postmortem, les lésions d'ischémie sont à l'origine d'un métabolisme cellulaire anaérobie, d'une lyse cellulaire (nécrose et apoptose) entraînant le relargage des composés intracellulaires et de la formation d'espèces oxygénées réactives. L'autolyse des cellules par leurs propres enzymes débute quelques minutes après le décès, notamment dans certains organes comme le pancréas [31]. Le métabolisme cellulaire aérobie cesse complètement quelques minutes à quelques heures après le décès [29].

Élimination postmortem

Les voies d'élimination usuelles en antemortem ne sont plus sollicitées. Les lésions cellulaires puis tissulaires entraînent rapidement une dégradation des fonctions des organes impliqués dans l'élimination des xénobiotiques.

II-2-4. Phénomènes agoniques

Lyse cellulaire

L'hypoxie présente au niveau cellulaire en postmortem est corrélée avec le début du métabolisme anaérobie et la production intracellulaire d'acide pyruvique et lactique et donc une baisse du pH cellulaire. Le dysfonctionnement des pompes Na-K et la dégradation des organites telles que les mitochondries entraînent une dégradation de la membrane cellulaire et une libération des xénobiotiques et des macromolécules vers les secteurs interstitiel et plasmatique [30].

Coagulation et fibrinolyse postmortem

La sédimentation et la coagulation en postmortem peuvent entraîner la formation de caillots et entraîner des variations de concentrations pour les xénobiotiques à forte fixation érythrocytaire.

Circulation « posthume »

Le phénomène appelé « circulation posthume » peut être à l'origine d'une égalisation des concentrations des xénobiotiques entre les différents compartiments : la rigidité cadavérique, l'augmentation de la pression intestinale et la distension abdominale tendent à refouler le sang des viscères.

Prolifération microbienne postmortem

La prolifération en postmortem de bactéries et levures commensales, entraîne la synthèse et la dégradation de molécules. La production d'éthanol par la dégradation du glucose présent en quantité importante dans certains organes (foie et cerveau) en est le principal exemple. Les benzodiazépines sont également concernées par ce processus. L'éthylglucuronide peut également être dégradé par des micro-organismes contenant des β -glucuronidases lorsque la température est favorable à l'activité enzymatique de ces micro-organismes [32].

II-2-5. Phénomènes de redistribution postmortem

Redistribution à partir du foie

Les xénobiotiques présents au niveau hépatique au moment du décès peuvent passer dans le système porte puis dans la veine cave inférieure. Ils peuvent également diffuser aux organes de voisinage tels que la vésicule biliaire, l'estomac, le duodénum proximal [29].

Redistribution à partir du myocarde

En postmortem les xénobiotiques à tropisme cardiaque (digitaliques, antidépresseurs tricycliques, barbituriques...) peuvent être relargués dans le sang cardiaque et dans la veine sous-clavière [29]. Une redistribution des organes de voisinage, notamment de l'estomac ou des poumons vers le myocarde peut avoir lieu.

Redistribution à partir des poumons

En postmortem les molécules accumulées dans le parenchyme pulmonaire se redistribuent vers la circulation de façon rapide et intense, notamment dans l'aorte et dans les cavités cardiaques gauches. Il existe une redistribution à travers le réseau veineux pulmonaire et une diffusion vers les organes de contact [29].

Redistribution à partir de l'estomac

Il existe une redistribution vers les organes de proximité : lobe inférieur pulmonaire, cavités cardiaques, segments II et III hépatiques ainsi que vers l'aorte abdominale et la veine cave inférieure. Enfin la relaxation du sphincter inférieur de l'œsophage et la régurgitation du contenu gastrique dans les voies aériennes peuvent entraîner des variations des concentrations dans la circulation pulmonaire [29].

II-2-6. Intérêt en toxicologie médico-légale

Sang cardiaque

Il peut être prélevé en grande quantité dans la majeure partie des cas et permet une recherche qualitative initiale. Les prélèvements effectués doivent individualiser les cavités gauches des cavités droites. Au vu des phénomènes de redistribution, les prélèvements dans les cavités cardiaques droites doivent être favorisés. Le prélèvement sera effectué avec une seringue de 10 ou 20 mL au niveau du cœur droit et recueilli dans un ou deux flacons en verre.

Sang sous clavier

Le sang sous clavier est prélevé grâce à une seringue de 10 à 20 mL au niveau de la veine sous-clavière. Ce prélèvement peut permettre une analyse qualitative. Cependant, au vu des phénomènes de redistribution postmortem, il est préférable de ne pas utiliser ce site de prélèvement pour une analyse quantitative. En effet, certains xénobiotiques à tropisme cardiaque peuvent être relargués depuis le myocarde et il est observé une augmentation constante de la concentration de certains xénobiotiques (digitaliques, inhibiteurs calciques) dans les veines sous-clavières [29].

Sang périphérique

Selon Pounder, l'échantillon sanguin idéal est prélevé rapidement après le décès, sur une veine fémorale ligaturée afin d'éviter la contamination par les veines iliaques [33]. L'analyse de sang périphérique est indispensable à l'analyse quantitative. La concentration sanguine permet au toxicologue d'imputer ou non le décès à un xénobiotique après consultation de banques de données de cas cliniques issus de la littérature. Le sang périphérique reste le milieu le plus important à prélever n'étant ni sujet au relargage postmortem des cellules cardiaques ni à la diffusion postmortem depuis le contenu gastrique. La connaissance des phénomènes de redistribution postmortem, les banques de données permettant l'interprétation des concentrations postmortem font du sang périphérique un milieu majeur pour la toxicologie médico-légale. Cependant au fur et à mesure que le délai postmortem s'allonge le sang périphérique est de plus en plus difficile à prélever. Dans certaines situations (corps putréfié, corps exsangue...) le prélèvement de sang périphérique est impossible.

III. Principaux marqueurs

toxicologiques et biochimiques étudiés

III-1. Marqueurs toxicologiques

III-1-1. Éthanol et éthylglucuronide

L'intérêt de la quantification de l'éthanol dans l'humeur vitrée a été largement étudié [34]. Le ratio normal de l'éthanol dans l'humeur vitrée sur celui du sang est compris entre 0,8 et 1,3 [35]. La quantification de l'éthanol dans l'humeur vitrée permet de rechercher une consommation d'alcool antemortem.

Après absorption, l'éthanol atteint le foie grâce à la circulation portale. Le foie élimine environ 80% de l'alcool ingéré. Le métabolisme oxydatif se déroule au niveau des hépatocytes, essentiellement dans la mitochondrie. En parallèle, un métabolisme non oxydatif a lieu dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. L'alcool réagit avec les acides gras à longue chaîne et forme des esters éthyliques d'acides gras (FAEE ou *Fat Acid Ethyl Ester*) qui persistent longtemps après une consommation d'alcool [36]. L'éthylglucuronide est produit suite à la conjugaison d'un acide glucuronique avec l'éthanol via les UDP-glucuronyltransférases (UGT) (Figure 8).

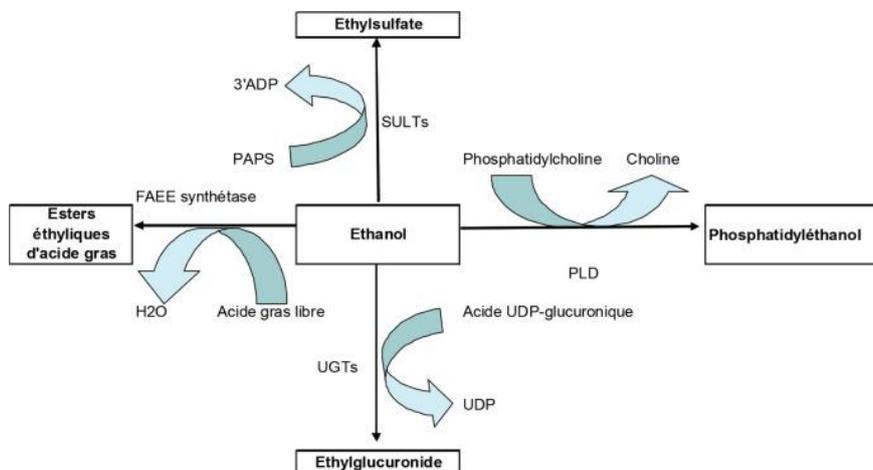


Figure 8 : Métabolisme non oxydatif de l'éthanol [36]

III-2. Infarctus du myocarde et marqueurs biochimiques d'intérêt

III-2-1. Données générales

L'infarctus du myocarde correspond à une nécrose myocardique dans un contexte clinique d'ischémie myocardique aiguë, le plus souvent suite à une thrombose occlusive brutale d'une artère coronaire.

En France, environ 120 000 personnes sont atteintes d'infarctus du myocarde chaque année, entraînant 10% de décès lors de la crise ou dans un intervalle d'un an.

Les critères diagnostiques sont nombreux et associent un tableau clinique typique (douleur constrictive rétro sternale, irradiant aux épaules, mâchoire et dos) ainsi que des signes ECG et également une perturbation des dosages biochimiques (troponine, copeptine, créatine kinase, myoglobine).

De nombreux marqueurs d'ischémie cardiaque ont été développés dans le but d'aider au diagnostic d'infarctus du myocarde.

III-2-2. Diagnostic d'infarctus du myocarde en postmortem

En postmortem, le diagnostic d'infarctus du myocarde se pose le plus souvent grâce à un ensemble de données issues des résultats de l'autopsie, de l'étude anatomopathologique voire parfois de l'imagerie. Ainsi dans un contexte de mort subite, il sera recherché la notion d'antécédents de pathologies cardiaques ou vasculaires. À l'examen macroscopique lors de l'autopsie, la visualisation du thrombus intra coronaire, de plaques athéromateuses, de plages hémorragiques ou de nécrose de coagulation orienteront vers un diagnostic d'infarctus du myocarde. Lors de l'étude des lames d'anatomo-pathologie, la visualisation du thrombus (tête, corps et queue), son adhésion à l'endothélium, le degré d'oblitération vasculaire, la présence de remaniements (organisation fibreuse ou épaissement de la paroi vasculaire si thrombus plus ancien), la présence de plages œdémateuses dans les myocytes et d'infiltrat de polynucléaires seront également des arguments en faveur d'un décès d'origine cardiaque. L'imagerie est également possible, ainsi selon une étude suisse menée par l'équipe de Christian Jackowski l'IRM 3 *tesla* postmortem permet de visualiser les zones myocardiques touchées non visibles lors d'une autopsie [37]. La réalisation de dosages biochimiques (troponine T) reste peu réalisée en routine car encore peu étudiée [38].

III-2-3. Marqueurs biochimiques cardiaques d'intérêt

Vasopressine et copeptine

La vasopressine, encore appelée ADH (hormone anti diurétique) ou AVP (arginine vasopressine) est une hormone peptidique de 9 acides aminés. La vasopressine est une hormone clé. Via la réabsorption d'eau (effet anti diurétique), la vasoconstriction vasculaire et la régulation de l'ACTH, l'ADH agit sur l'homéostasie cardio-vasculaire.

La copeptine représente la partie C terminale du précurseur de la vasopressine, la pré-pro vasopressine. Elle est composée de 39 acides aminés.

Synthèse de la vasopressine et copeptine

La pré-provasopressine est composée de trois domaines et d'un peptide signal (Figure 9).

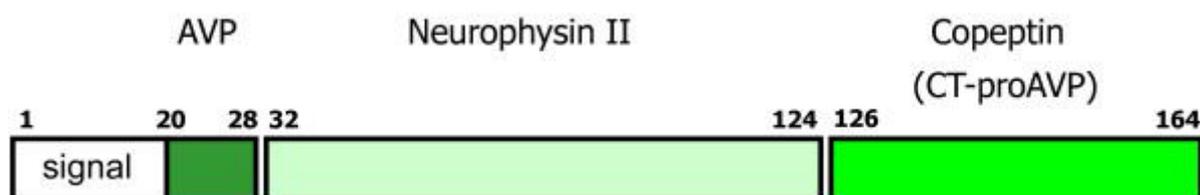


Figure : 9 Pré-provasopressine [39]

La pré-provasopressine est synthétisée dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus selon deux voies (Figure 10) :

- voie de synthèse A : la pré-provasopressine est synthétisée dans les neurones magnocellulaires.
- voie de synthèse B : la pré-provasopressine est synthétisée dans les neurones parvocellulaires.

Le peptide signal est clivé pour obtenir une pré-hormone qui est transportée vers la neurohypophyse via la tige pituitaire où la copeptine est libérée à concentration équimolaire avec l'AVP.

Dans la voie de synthèse A, l'AVP et la copeptine sont transportées dans la partie postérieure de l'hypophyse, puis stockées dans des granules. Suite à un état de stress, l'AVP et la copeptine seront libérées dans la circulation générale [40].

Dans la voie de synthèse B, l'AVP et la copeptine sont libérées dans la circulation porte et rejoignent la partie antérieure de la neurohypophyse où elles stimulent les cellules endocrines sécrétant l'ACTH [40].

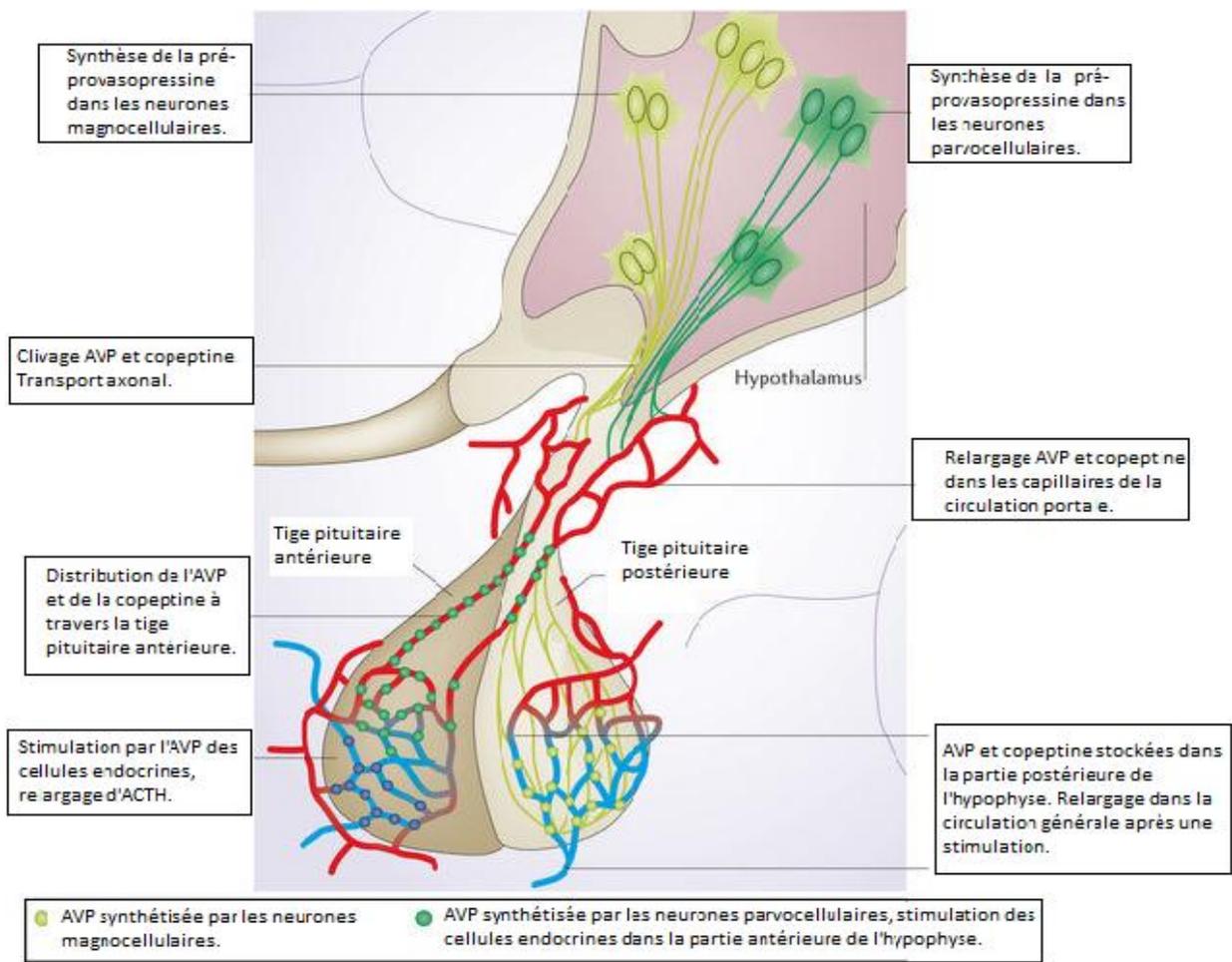


Figure 10 : Synthèse de la copeptine et de l'AVP [40]

La forte liaison de la vasopressine aux plaquettes sanguines, sa demi-vie courte (environ 20 minutes) et sa faible stabilité font du dosage de la vasopressine un véritable challenge. Pour ces raisons, une méthode a été développée pour le dosage de la copeptine. La copeptine est présente à l'état physiologique à des taux faibles dans le sang (inférieurs à 5 $\mu\text{mol/L}$).

Le profil de libération de la copeptine est intéressant dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde. Dès l'apparition de la douleur thoracique, le taux sanguin de copeptine s'élève pour décroître dès les premières heures et retourner à une valeur basale physiologique en cinq jours.

Ainsi son dosage a fait l'objet de nombreuses études lors de la prise en charge de l'infarctus du myocarde. La copeptine possède une bonne valeur prédictive négative. Ainsi, une copeptine inférieure à 8 $\mu\text{mol/L}$ associée à une troponine < 0,014 $\mu\text{g/L}$ ne sont pas en faveur d'un infarctus du myocarde [39].

À notre connaissance, aucune étude de la copeptine dans l'humeur vitrée n'est présente dans la littérature. Il est donc difficile de connaître les mécanismes de diffusion antemortem et postmortem de cette molécule dans l'humeur vitrée. Il est cependant possible qu'en cas d'infarctus du myocarde antemortem, la copeptine libérée dans la circulation sanguine atteigne l'humeur vitrée.

Créatine kinase

La créatine kinase (CK), encore appelée créatine phosphokinase est une enzyme localisée dans le cytosol ou les mitochondries des cellules. Elle catalyse la réaction ci-dessous (Figure 11).

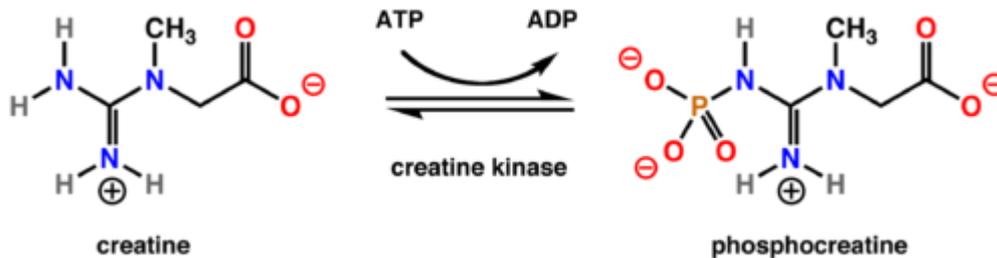


Figure 11 : Formation de la phosphocréatine

Elle est présente dans de nombreux tissus de l'organisme, mais est majoritaire dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque. La créatine kinase est une enzyme constituée de 360 acides aminés et formée de deux sous-unités M (*muscular*) et B (*brain*). Il existe 3 isoenzymes selon la structure du dimère : CK-MM (largement retrouvé dans le muscle squelettique), CK-MB (retrouvé en grande proportion dans le muscle cardiaque) et CK-BB (cerveau, système respiratoire, tractus gastro-intestinal, vessie ...)

La CK-MM représente 95 % des CK retrouvés dans le sérum chez un sujet sain. Les CK-MM et CK-MB sont présentes physiologiquement dans le sérum. Le taux basal des CK se trouve chez la femme entre 60 et 140 UI/L et chez l'homme entre 80 et 200 UI/L. Lors d'un infarctus du myocarde, la nécrose des cellules cardiaque entraîne une libération importante de CK. Le taux de CK commence à s'élever environ 3 heures après le début de la douleur et atteint son maximum en 26 heures puis se normalise en 72 heures. Le dosage des CK permet d'aider au diagnostic d'infarctus du myocarde. Cependant les CK s'élèvent également dans des pathologies musculaires, lors d'une rhabdomyolyse ou dans certains cancers.

L'étude de Qi Wang et coll. montre que l'élévation des CK en postmortem est en faveur d'un décès d'origine cardiaque, électrocution, hyperthermie et permet d'évaluer les dommages cardiaques et des muscles squelettiques. Cependant l'élévation des CK en postmortem est fonction du délai de prise en charge entre le décès et l'autopsie et de l'avancée de la lyse musculaire [41].

Myoglobine

Il s'agit d'une métalloprotéine de faible poids moléculaire (17 kDA) constituée d'une partie héminique et d'une chaîne de globine. La partie héminique permet la liaison de l'oxygène pour le métabolisme aérobie. Elle est retrouvée dans le cytoplasme des cellules musculaires squelettiques et du muscle cardiaque. Elle assure la fonction de transport et de stockage de l'oxygène dans les muscles. Bien que non spécifique du muscle cardiaque, sa forte concentration dans les cellules cardiaques en fait un marqueur sensible lors de la suspicion d'un infarctus du myocarde. Sa cinétique d'apparition est rapide (entre 2 et 4 heures après l'apparition de la douleur) et son taux est maximal à 12 heures. Tout comme la copeptine, sa valeur prédictive négative est intéressante. En cas de non augmentation dans les 3 heures suivant la douleur, elle n'est pas en faveur d'un infarctus du myocarde. La myoglobine peut toutefois s'élever dans de nombreux cas (chirurgie cardiaque, exercice physique, rhabdomyolyse...). En pratique, le dosage est souvent couplé à celui de la troponine et des CK. En postmortem l'étude de Qi Wang et coll. a montré que l'élévation de la myoglobine dans le sang périphérique et le LCR était corrélée avec la survenue d'un décès d'origine cardiaque et avec l'intensité des dommages musculaires [41]. L'élévation de la myoglobine dans le sang périphérique n'est cependant pas spécifique d'un décès d'origine cardiaque et est fortement dépendante de l'importance de la lyse musculaire tout comme l'est l'élévation des CK.

BNP et NT pro BNP

Le BNP est produit par les cardiomyocytes de l'oreillette et du ventricule et les fibroblastes en réponse à l'étirement des fibres cardiaques (surcharge volumique, augmentation de la pression ventriculaire). Le BNP a une action diurétique et natriurétique et un effet vasodilatateur artériel et veineux. Le NT pro BNP représente la partie N terminale du pro BNP, précurseur du BNP. Les deux molécules sont produites de façon équimolaire. Le NT pro BNP est une glycoprotéine de 76 acides aminés sans action biologique connue. Sa demi-vie et sa stabilité sont plus importantes que le BNP. Le NT pro BNP est dosé dans l'insuffisance cardiaque (visée diagnostique, pronostique, évolution) ou dans la stratification du risque des patients ayant fait un infarctus du myocarde. Les valeurs de référence chez les sujets sains varient selon l'âge et le sexe (tableau 5). L'étude de Sara Sabatasso et coll. a permis de mettre en évidence un intérêt dans le dosage des NT pro BNP en postmortem dans le sang périphérique, l'humeur vitrée et l'épanchement péricardique [42]. En effet, selon les auteurs, malgré une faible sensibilité (50,7%) et spécificité (72,6 %) l'augmentation des NT pro BNP en postmortem permet d'orienter l'étiologie du décès vers une cause cardiaque.

Tableau 5 Variation des NT pro BNP selon l'âge et le sexe

NT pro BNP (pg/mL)	
Âge < 50 ans	Âge > 65 ans
Hommes < 84 pg/mL	Hommes < 194 pg/mL
Femmes < 155 pg/mL	Femmes < 222 pg/mL

Troponine

La troponine est un complexe protéique intervenant dans la contraction musculaire. Elle est présente dans les muscles squelettiques mais également au niveau cardiaque.

Il s'agit d'une protéine hétéro-trimérique constituée de trois sous unités : troponine I, T et C. Ce complexe est lié à la tropomyosine et à l'actine, formant un complexe macromoléculaire. La troponine T se lie à la tropomyosine et à la troponine C. La troponine C fixe le calcium et le magnésium, indispensables à la contraction des fibres musculaires. La troponine I se fixe à la tropomyosine, à l'actine, à la troponine T et C. Les troponines sont réparties dans l'appareil contractile et dans le cytoplasme cellulaire. Ainsi lors d'un infarctus, la nécrose cellulaire et la protéolyse induite par l'ischémie prolongée entraînent la libération des troponines et l'augmentation de leur taux plasmatique.

Après un infarctus du myocarde, la troponine se positive en 1 heure, atteint son maximum en 12 heures et retourne à l'état basal en 6 jours environ (Figure 12).

À l'état basal, le taux mesurable de troponine est faible voire nul.

Plusieurs études ont été réalisées sur le dosage de la troponine I et de la troponine T dans le sang péricardique en postmortem et concluent que l'élévation de la troponine dans ce milieu est corrélée avec la survenue d'un décès d'origine cardiaque [28].

Parmi les marqueurs utilisés de façon courante lors du diagnostic de l'infarctus du myocarde, seule la troponine apparaît comme un marqueur sensible et spécifique lors des dosages effectués en postmortem. L'élévation des autres marqueurs dans le sang périphérique, le LCR, ou sang le péricardique en postmortem (CK-MB, NT pro BNP et myoglobine) est influencée par la lyse des cellules musculaires. Cependant l'élévation de ces marqueurs associée aux données de l'autopsie permet d'orienter vers un décès d'origine cardiaque.

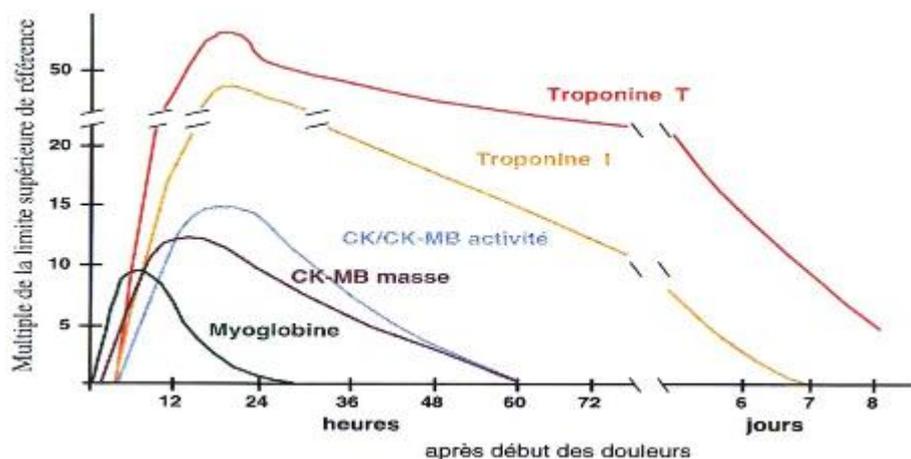


Figure 12 : Évolution des enzymes cardiaques

IV. Matériels et méthodes

IV-1. Prélèvements

Tous les prélèvements ont été effectués par un médecin légiste sur réquisition d'un magistrat ou OPJ (Officier de police judiciaire). Les prélèvements étaient analysés sous la responsabilité d'un expert auprès des tribunaux pour rechercher les causes de la mort suite à une réquisition judiciaire.

IV-1-1. Prélèvements sanguins

Le prélèvement postmortem est réalisé à la seringue. Quelques millilitres (5 à 10 mL) de sang périphérique (intra-iliaque pour l'ensemble des prélèvements) sont transférés dans un flacon en verre.

IV-1-2. Prélèvements d'humeur vitrée

La seringue est positionnée au coin externe de l'œil dans le corps vitré, l'aspiration est douce pour éviter le prélèvement des cellules épithéliales issues de l'iris ou de la rétine. 1 à 2 mL d'humeur vitrée par œil sont prélevés dans un même tube. L'humeur vitrée prélevée, bien que peu propice aux contaminations bactériennes est conservée dans un tube contenant du fluorure de sodium afin d'éviter une activité enzymatique. Du sérum physiologique sera injecté à la seringue dans la chambre postérieure de l'œil pour conserver l'aspect morphologique.

IV-1-3. Identification des prélèvements autopsiques

Les prélèvements sont identifiés : nom marital et patronymique, prénom, date naissance, sexe, date de prélèvement sur chaque tube ou pot en verre. Le nom du médecin légiste et le numéro d'expertise sont également renseignés.

IV-1-4. Conservation des prélèvements autopsiques

Les prélèvements de sang et d'humeur vitrée sont conservés au froid à 4 °C le temps nécessaire pour réaliser l'ensemble des analyses demandées (environ 2 semaines) puis congelés à - 20 °C.

IV-2. Analyses qualitatives dans le sang périphérique postmortem et l'humeur vitrée

Les screenings sur le sang périphérique et l'humeur vitrée ont été réalisés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution avec détecteur de masse en temps de vol (Xevo G2-XS QTOF, Waters®, USA).

Concernant les critères de positivité lors de la lecture des screenings, une variation de masse exacte inférieure à 5 ppm, une réponse du détecteur (aire) > 1000 et la présence d'au moins un fragment ont été retenus comme critères pour accepter la molécule identifiée.

IV-2-1. Prétraitement des échantillons postmortem

Prélèvements sanguins

Concernant le prétraitement des échantillons sanguins, 250 µL de sang sont prélevés. 20 µL d'étalon interne contenant de l'amiodarone-d4 (1µg/mL), du nordiazepam-d5 (1µg/mL) et de la morphine-d3 (1µg/mL) sont ajoutés ainsi que 2,5 mL de solvant de précipitation, mélange de méthanol et d'acétonitrile. Après précipitation et centrifugation pendant 5 min à 3500 rpm, le surnageant est repris et mis à évaporer sous azote. Le résidu est récupéré par 250 µL d'un mélange de phases mobiles A et B (80% de phase A d'une solution d'eau UPLC, 0,2 % de formiate d'ammonium et 0,2 % d'acide formique et 20% de phase B d'une solution d'acétonitrile UPLC avec 0,2 % d'acide formique et 0,2 % de formiate d'ammonium) puis centrifugé. 20 µL sont injectés.

Chaque série de prélèvement était encadrée par un témoin négatif (sang issu de l'EFS) et deux contrôles. Chaque contrôle contenait les molécules suivantes : diazepam, nordiazepam, venlafaxine, hydroxyzine, propranolol, MDMA, amiodarone, morphine, cyamémazine, mirtazapine.

Prélèvements d'humeur vitrée

Concernant le prétraitement d'humeur vitrée 100 µL d'humeur vitrée ont été prélevées et diluées dans 900 µL d'un mélange de phases A et B. Il a été ajouté 20 µL d'étalon interne comportant de l'amiodarone-d4 (1µg/mL), du nordiazepam-d5 (1µg/mL) et de la morphine-d3 (1µg/mL). Après avoir été vortexés et centrifugés pendant 5 min à 3500 rpm, 20 µL ont été injectés.

En raison de la difficulté à obtenir une matrice blanche pour l'humeur vitrée, chaque série de prélèvements d'humeur vitrée était encadrée par deux contrôles urinaires et un témoin négatif urinaire issu d'un volontaire sain ne prenant aucun traitement, après consentement. Chaque contrôle contenait les molécules suivantes diazepam, nordiazepam, venlafaxine, hydroxyzine, propranolol, MDMA, amiodarone, morphine, cyamémazine, mirtazapine.

IV-2-2. Analyse chromatographique des prélèvements de sang et d'humeur vitrée

Les échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique postmortem ont été analysés par ULC-HRMS avec détecteur par temps de vol sur un Xevo G2-XS QTOF, (Waters®, USA). La colonne analytique utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Waters® de type Acquity®, UPLC HSS C18 de 1,8 µm 2,1 x 150 mm. La phase mobile était composée d'une phase A (eau UPLC, formiate d'ammonium et acide formique) et d'une phase B (acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique). L'ionisation était effectuée par une source électro spray en mode positif.

IV-3. Analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée

IV-3-1. Analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée

Chaque analyse quantitative réalisée dans le sang total ou l'humeur vitrée nécessitait la réalisation d'un blanc, de contrôles qualités internes ainsi que la réalisation d'une gamme d'étalonnage.

Pour se faire, un pool de sang total exempt de xénobiotique et d'éthylglucuronide a été réalisé grâce à du sang provenant de l'EFS. Le pool d'humeurs vitrées négatives utilisé pour la quantification des xénobiotiques était constitué par des prélèvements postmortem pour lesquels le screening réalisé par ULC-HRMS ne retrouvait pas de molécule. Les analyses quantitatives des molécules ont été réalisées dans le sang total et l'humeur vitrée postmortem. Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur un API 3200 Qtrap (Sciex®, France).

Quantification des bêtabloquants

Une méthode a été développée au CHU de Poitiers dans le but de quantifier les huit bêtabloquants les plus souvent prescrits en France (Aténolol, Acébutolol, Bisoprolol, Métoprolol, Nadolol, Pindolol, Propranolol, Sotalol) dans le sang total et dans l'humeur vitrée postmortem. Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur un API 3200 Qtrap (Sciex®, France).

Concernant le prétraitement des échantillons de sang et d'humeur vitrée, 250 µL sont prélevés. 20 µL d'une solution d'étalons internes deutérés (solutions d'Aténolol-D7 et Propranolol-D7 à 1mg/mL dilués afin d'obtenir une solution à 2,5 µg/mL) sont ajoutés. 1 mL d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N est ajouté, ainsi que 1 mL d'eau distillée. Après agitation au vortex, l'échantillon est déposé sur des colonnes SPE MCX Oasis® 3cc conditionnées par du méthanol et de l'eau distillée stérile. L'élution est réalisée par un mélange Acétonitrile/Ammoniaque 95/5. Après évaporation sous courant d'azote, le résidu est repris avec 100 µL d'un mélange de phase A/B (80% de phase A : eau UPLC, formiate d'ammonium 1M et acide formique à 0,2% et 20% de phase B : Acétonitrile, formiate d'ammonium et acide formique à 0,2%). Après agitation au vortex, 10 µL sont injectés. La colonne analytique utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Restek Allure PFP Propyl de 5 µm 50 x 2.1 mm. La phase mobile utilisée était un mélange de phases mobiles A et B. L'ionisation était effectuée par une source *electrospray* en mode positif. Deux contrôles internes à 30 ng/mL et 200 ng/mL étaient réalisés. Les limites de quantifications et les points de gamme étaient compris entre 20 et 800 ng/mL.

Quantification des benzodiazépines, antidépresseurs, antipsychotiques

Une méthode a été développée au CHU de Poitiers dans le but de quantifier les benzodiazépines, antidépresseurs et antipsychotiques dans le sang total et dans l'humeur vitrée postmortem. Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur un API 3200 Qtrap (Sciex®, France).

Concernant le prétraitement des échantillons, 200 µL de sang ou d'humeur vitrée sont prélevés. 20 µL d'étalon interne sont ajoutés. Après vortex, 3mL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6 sont ajoutés.

L'étalon interne utilisé pour la quantification des benzodiazépines était composé de nordiazépam-D5 (100 µg/mL) ; oxazépam-D5 (100 µg/mL) ; alprazolam-D5 (100 µg/mL) ; témazépam-D5 (100 µg/mL) ; zolpidem-D6 (100 µg/mL) ; bromazépam-D4 (1 mg) ; zopiclone-D4 (100 µg/mL) ; midazolam-D4 (100 µg/mL) dilués dans du méthanol afin d'obtenir une solution à 2,5 µg/mL.

L'étalon interne utilisé pour la quantification des antidépresseurs et antipsychotiques était composé de Venlafaxine-D6 (100 µg/mL) ; Clomipramine-D3 (100 µg/mL) ; Miansérine-D3 (100 µg/mL) ; Sertraline-D3 (100 µg/mL) ; Fluoxétine-D6 (100 µg/mL) ; Clozapine-D4 (100 µg/mL) ; Citalopram-D6 (100 µg/mL) ; Olanzapine-D8 (100 µg/mL) ; Amisulpride-D5 (1 mg) ; Hydroxyzine-D8 (1 mg) ; Cyamémazine-D6 ; Halopéridol-D4 (100 µg/mL) ; Rispéridone-D4 (100 µg/mL) ; Quétiapine-D8 (100 µg/mL).

Après centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant de l'échantillon est déposé sur des colonnes SPE CLEAN SCREEN UCT ZSDAU020® (CDL®, Marseille, France) conditionnées par du méthanol, de l'eau distillée et du tampon phosphate pH 6. Après lavage des colonnes par un mélange tampon phosphate de sodium à pH 6 et acétonitrile, l'élution est réalisée par un mélange Isopropanol/Ammoniaque/Dichlorométhane 20/2/78. Après évaporation sous courant d'azote, le résidu est repris avec 100 µL d'un mélange de phase A et B (80% de phase A : eau UPLC, formiate d'ammonium 1M et acide formique à 0,2% et 20% de phase B : Acétonitrile, formiate d'ammonium et acide formique à 0,2%). Après agitation au vortex, 10 µL sont injectés. La colonne analytique utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Restek® Allure PFP Propyl de 5 µm 50 x 2,1 mm. La phase mobile utilisée était un mélange de phases mobiles A et B. L'ionisation était effectuée par une source *electrospray* en mode positif. Pour la quantification des benzodiazépines des contrôles internes à 1,5 ng/mL ; 25 ng/mL ; 200 ng/mL étaient effectués. Les limites de quantifications et les points de gamme étaient compris entre 1 ng/mL et 250 ng/mL. Pour la quantification des antidépresseurs, des contrôles internes à 6 ng/mL ; 25 ng/mL et 300 ng/mL encadraient la série passée. Les limites de quantification et les points de gamme étaient compris entre 5 et 500 ng/mL.

Pour les antipsychotiques, les contrôles réalisés étaient à 6 ng/mL ; 25 ng/mL et 300 ng/mL. Les limites de quantification et points de gamme étaient compris entre 5 ng/mL et 500 ng/mL.

Quantification des amphétamines, opiacés, antalgiques

Cette technique a été développée au CHU de Poitiers et permet l'identification et la quantification des amphétamines (amphétamines, métamphétamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB), méphédrone, kétamine, cocaïne et métabolites (benzoylecgonine, ecgonineméthylester), opiacés (morphine, codéine, 6-mono acétylmorphine, dihydrocodéine) et analgésiques (tramadol, fentanyl, buprénorphine, norbuprénorphine, méthadone, EDDP, hydromorphone, oxycodone, hydrocodone, oxymorphone, pholcodine, éthylmorphine). L'ensemble des analyses a été effectué par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur un API 3200 Qtrap (Sciex®, France).

Le prétraitement et l'extraction sont réalisés de la même façon pour l'ensemble des composés.

200 µL de sang total postmortem et d'humeur vitrée sont prélevés. 20 µL d'étalon interne sont ajoutés. Après agitation au vortex, 3 mL de tampon phosphate à pH 6 sont ajoutés.

L'étalon interne utilisé pour la quantification est composé d'amphétamine-D5 (100 µg/mL), métamphétamine-D5 (100 µg/mL), MDA-D5 (100 µg/mL), MDMA-D5 (100 µg/mL), MDEA-D5 (100 µg/mL), MBDB-D5 (100 µg/mL), kétamine-D4 (100 µg/mL), cocaïne-D3 (1 mg/mL), benzoylecgonine-D3 (100 µg/mL), ecgonineméthylester-D3 (100 µg/mL), morphine-D3 (100 µg/mL), codéine-D3 (100 µg/mL), mono acétylmorphine-D3 (100 µg/mL), dihydrocodéine-D6 (100 µg/mL), tramadol-C¹³D3 (100 µg/mL), fentanyl-D5 (100 µg/mL), buprénorphine-D4 (100 µg/mL), norbuprénorphine-D3 (100 µg/mL), méthadone-D9 (100 µg/mL), EDDP-D3 (100 µg/mL), hydromorphone-D3 (100 µg/mL), oxycodone-D6 (100 µg/mL).

Après centrifugation pendant 5 minutes à 3500 rpm, le surnageant de l'échantillon est déposé sur des colonnes SPE CLEAN SCREEN® UCT ZSDAU020 conditionnées par du méthanol, de l'eau distillée et du tampon phosphate pH 6.

Après lavage des colonnes par de l'eau distillée stérile, acide acétique 0,1 M et du méthanol, l'élution est réalisée par un mélange Dichlorométhane/Isopropanol/Ammoniaque 78/20/2. Après évaporation sous courant d'azote, le résidu est repris avec 150 µL de la phase A: eau UPLC, formiate d'ammonium 1M et acide formique à 0,2%. Après agitation au vortex, 30 µL sont injectés. La colonne analytique utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Restek Allure PFP Propyl de 5 µm 50 x 2,1 mm. La phase mobile utilisée était un mélange de phases mobiles A et B. L'ionisation était effectuée par une source *electrospray* en mode positif.

Des contrôles à 1 ng/mL ; 50 ng/mL et 400 ng/mL encadraient les séries.

Les limites de quantification et points de gamme étaient compris entre 0,5 ng/mL et 500 ng/mL.

Quantification de l'éthanol

Cette technique a été développée au CHU de Poitiers et permet l'identification et la quantification de l'éthanol dans le sang total, l'humeur vitrée. L'ensemble des analyses ont été effectuées par chromatographie phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID Agilent®).

Concernant le pré traitement de l'échantillon, 200 µL de sang total postmortem ou d'humeur vitrée sont prélevés. 200 µL d'étalon interne (propanol-1 à 0,79 g/L) sont ajoutés. Après agitation au vortex, les flacons *head-space* sont sertis, agités au vortex et placés dans l'injecteur. La température est réglée à 250 °C en mode *split*. La colonne utilisée est une colonne DB-ALC1® de 30 mètres de longueur 0,32 mm de diamètre interne. La température du four est réglée à 80°C. Le débit de la colonne est réglé à 2,5 mL/min d'hélium.

Des contrôles internes à 0,24g/L, 0,8g/L et 2 g/L étaient passés à chaque série. Les limites de quantification et les points de gamme étaient compris entre 0,125 g/L et 4 g/L concernant les prélèvements de sang total et d'humeur vitrée.

Quantification de l'éthylglucuronide

Cette technique a été développée au CHU de Poitiers et permet l'identification et la quantification de l'éthylglucuronide dans le sang total et l'humeur vitrée. L'ensemble des analyses ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur un API 3200 Qtrap (Sciex®, France).

Concernant le pré traitement de l'échantillon, 200 µL de sang total postmortem ou d'humeur vitrée sont prélevés. 20 µL d'étalon interne (Éthylglucuronide D5 à 1 mg/mL) sont ajoutés. Après agitation au vortex et centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes, 2 mL de mélange de conditionnement (eau avec 1% d'acide formique) sont déposés sur des colonnes UCT Clean Screen® Graphite. Le surnageant de l'échantillon prétraité est déposé sur les colonnes. Après lavage des colonnes avec de l'eau et séchage pendant 10 minutes, l'élution est réalisée par un mélange méthanol-1% d'acide formique. Après évaporation sous courant d'azote, le résidu est repris avec 100 µL d'un mélange de phase A/B (80% de phase A : eau UPLC, formiate d'ammonium 1M et acide formique à 0.2% et 20% de phase B : Acétonitrile, formiate d'ammonium et acide formique à 0.2%). Après agitation au vortex, 30 µL sont injectés. La colonne analytique utilisée pour la séparation chromatographique était une colonne Uptisphere Strategy® Si de 5 µm 250 x 4,6 mm. La phase mobile utilisée était un mélange de phases mobiles A et B. L'ionisation était effectuée par une source électrospray en mode positif.

Des contrôles internes à 25 ng/mL ; 200 ng/mL ; 1000 ng/mL étaient effectués. Les limites de quantification et les points de gamme étaient compris entre 25 ng/mL et 1000 ng/mL concernant les prélèvements de sang total et d'humeur vitrée.

IV-3-2. Analyse quantitative des marqueurs biochimiques dans le sang et dans l'humeur vitrée

Groupe 1 : décès d'origine cardiaque

Les cas inclus étaient diagnostiqués décès d'origine cardiaque par le service de médecine légale et devaient présenter un contexte évoquant un malaise cardiaque (malaise brutal, malaise durant un effort physique).

À l'autopsie la présence d'un caillot dans une artère coronaire, d'une plage d'ischémie ou de nécrose cardiaque devaient être retrouvés.

La troponine T hs mesurée dans le sang périphérique devait être $> 40 \mu\text{g/L}$ [43]. Les cas étant renseignés comme ayant bénéficié d'un massage cardiaque ou ayant présenté un traumatisme violent ont été exclus (accident voie publique, défenestration...).

Groupe 2 : décès d'origine non cardiaque

Les cas inclus dans le groupe 2 ne présentaient aucun argument en faveur d'un décès par infarctus du myocarde.

À l'autopsie, aucun argument en faveur d'une souffrance ou atteinte myocardique ne devait être retrouvé.

La concentration en troponine dans le sang périphérique devait être $< 0,014 \mu\text{g/L}$.

Pour chaque groupe, le sang devait être centrifugeable afin d'obtenir du plasma peu hémolysé permettant une analyse de la troponine T hs sur un automate Cobas module c 601 (Roche®, France).

Dosage de la copeptine dans l'humeur vitrée

Concernant les échantillons, 250 µL d'humeur vitrée sont prélevés et dilués dans 250 µL d'une solution de NaCl 0,09% au vu de la viscosité de certains échantillons.

Après agitation au vortex, l'échantillon est passé sur un automate B.R.A.H.M.S KRYPTOR compact PLUS® (Roche®, France). Il s'agit d'un immunodosage type « sandwich » permettant la mesure du fragment précurseur de l'extrémité C terminale de la vasopressine. Après excitation du milieu réactionnel à 337 nm par un laser à azote, le cryptate émet un signal fluorescent de l'ordre de quelques millisecondes à 620 nm tandis que l'accepteur (XL) émet un signal de courte durée à 707 nm. Lors de la formation d'un complexe immunologique il y a une augmentation du signal de l'accepteur (XL) qui est mesurable et qui est proportionnel à la concentration de l'analyte à doser (Figure 13). La trousse contient du K-conjugué composé d'anticorps de mouton polyclonaux anti CT-proAVP conjugué avec une structure de type cryptate renfermant un ion terbium (Lumi®4-Tb), des IGG bovin, IGG de souris, IGG de mouton, Tréhalose, D-mannitol. Elle contient également du conjugué XL composé d'anticorps de souris monoclonal anti CT-proAVP conjugué avec Cy 5.5, des IGG bovin, IGG de souris, IGG de mouton, Tréhalose, D-mannitol. Chaque série est encadrée par des contrôles Copeptin proAVP KRYPTOR QC® à 6,12 pmol/L et 110 pmol/L. La limite de détection est évaluée à 0,69 pmol/L, les limites de quantification se trouvent entre 1,23 pmol/L et 500 pmol/L.

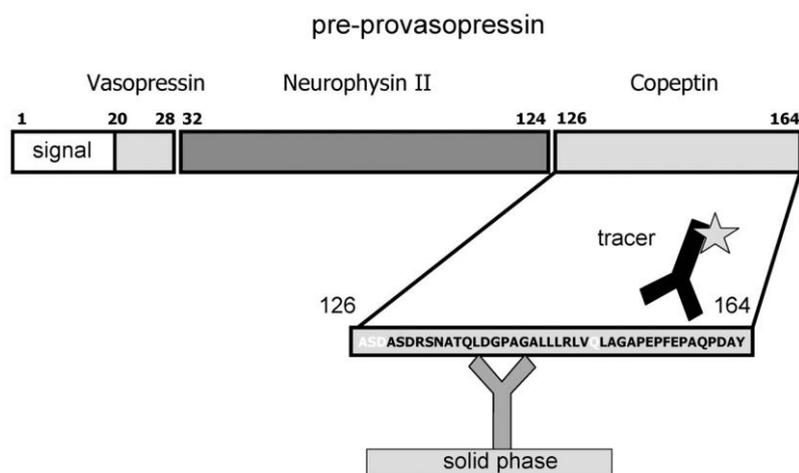


Figure 13 : Principe du dosage de la copeptine

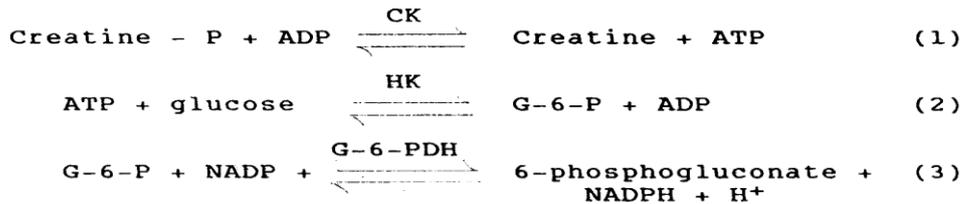
Dosage des CK

Concernant les échantillons, 250 µL d'humeur vitrée sont prélevés et dilués dans 250 µL d'une solution de NaCl 0,09% au vu de la viscosité de certains échantillons.

Les échantillons sont passés sur un automate Cobas module c 701 (Roche®, France).

Le test utilisé était un test CK®.

La méthode de dosage utilisée est basée sur la vitesse de formation du NADPH, suivant la réaction ci-dessous :



La vitesse de formation du NADPH est proportionnelle à l'activité de la CK et est déterminée par photométrie. Deux contrôles sont passés à 162 et 296 UI/L. Le domaine de mesure et les limites de quantification sont fixés à 7 et 2000 UI/L.

Dosage de la myoglobine

Concernant les échantillons, 250 µL d'humeur vitrée sont prélevés et dilués dans 250 µL d'une solution de NaCl 0,09% au vu de la viscosité de certains échantillons.

Le dosage de la myoglobine a été réalisé par immuno turbidimétrie sur particules de latex sur un automate Cobas module c 501 (Roche®, France). Le test utilisé est un test MYO2®.

Les anticorps anti-myoglobine de lapin liés au latex réagissent avec l'antigène de l'échantillon et forment des complexes antigènes-anticorps. L'agglutination est mesurée par turbidimétrie. Deux contrôles Myoglobin Control Set® niveau 1 et niveau 2 à 60,9 et 249 µg/L. Le domaine de mesure et les limites de quantification sont fixés à 15 et 500 µg/L.

Dosage des NT pro BNP et troponine T hs

Concernant les échantillons, 250 µL d'humeur vitrée sont prélevés et dilués dans 250 µL d'une solution de NaCl 0,09% au vu de la viscosité de certains échantillons. Concernant le sang périphérique, après 15 minutes de centrifugation à 4500 rpm, 400 µL de plasma sont prélevés.

Le dosage du NT pro BNP et de la troponine T hs ont été réalisés par électrochimiluminescence « ECLIA » sur un automate Cobas module c 601 (Roche®, France).

Pour le dosage des NT pro BNP, le test utilisé est un test Elecsys proBNP II® contenant deux anticorps monoclonaux de souris et de mouton, reconnaissant les épitopes présents sur la partie N-terminale du proBNP. L'antigène est lié entre un anticorps monoclonal de souris spécifique du NT pro BNP marqué à la biotine et un anticorps monoclonal de mouton spécifique du NT pro BNP marqué au ruthénium. Des contrôles PreciControl Cardiac II® sont passés à 131 et 4098 pg/mL. Les limites de quantification sont fixées à 5 et 35000 pg/mL. Pour le dosage de la troponine T hs, le test utilisé est un test Elecsys troponine T hs® contenant des anticorps monoclonaux de souris et de mouton anti troponine T cardiaque. L'antigène est lié entre un anticorps monoclonal de souris spécifique de la troponine T cardiaque marqué à la biotine et un anticorps monoclonal de mouton spécifique de la troponine T cardiaque marqué au ruthénium. Des contrôles PreciControl Troponin® sont passés à 0,03 et 2 µg/L. Le domaine de mesure et les limites de quantification sont fixés entre 0,014 µg/L et 10 µg/L avant dilution et jusqu'à 100 une fois dilué.

V. Résultats qualitatifs

V-1. Résultats des analyses qualitatives toxicologiques dans le sang et l'humeur vitrée

252 prélèvements d'humeur vitrée et 252 prélèvements de sang ont été analysés de façon qualitative. L'ensemble des échantillons de sang et d'humeur vitrée ont été analysés par screening réalisé par chromatographie liquide ultraperformante couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (ULC-HRMS). Les molécules présentant une différence notable sont présentés en gras.

V-1-1. Benzodiazépines

Tableau 6 : Nombre d'échantillons avec présence de benzodiazépines

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Midazolam	12	12
Oxazépam	25	24
Bromazépam	15	14
Alprazolam	12	12
Zopiclone	16	16
Lormétazépam	2	2
Lorazépam	3	2
Zolpidem	8	6
Diazépam	14	11
Nordiazépam	13	12
Clobazam	2	2
Norclobazam	2	2
Témazépam	14	7

V-1-2. Opiacés, amphétamines et analgésiques

Tableau 7 : Nombre d'échantillons avec présence d'amphétamines, opiacés, analgésiques

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Morphine	21	19
Méthadone	10	10
EDDP	8	5
Buprénorphine	6	4
Norbuprénorphine	6	6
Kétamine	1	1
Codéine	5	5
Héroïne	0	0
6 Monoacétyl morphine	3	7
Tramadol	10	9
MDMA	3	3
MDA	3	3
Amphétamine	2	2
Méthamphétamine	1	1
5apb/6apb	1	0
Cocaine	9	9
Benzoylécgonine	9	8
Ecgonine methyl ester	9	8

V-1-3. Bétabloquants

Tableau 8 : Nombre d'échantillons retrouvant des bétabloquants

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Aténolol	4	3
Bisoprolol	10	10
Propranolol	3	3
Métoprolol	3	3
Sotalol	2	2

V-1-4. Antidépresseurs et antipsychotiques

Tableau 9 : Nombre d'échantillons retrouvant des antidépresseurs et antipsychotiques

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Méprobamate	1	1
Alimémazine	4	4
Cyamémazine	13	11
Pipamperone	1	1
Risperidone	5	5
9 OH Risperidone	4	2
Venlafaxine	7	7
Desmethylvenlafaxine	5	5
Citalopram	9	9
Paroxétine	8	6
Prégabaline	5	4
Mirtazapine	8	8
Quétiapine	6	5
Amitryptiline	3	2
Nortryptiline	3	2
Amisulpride	1	1
Hydroxyzine	7	5
Cétirizine	6	2
Doxylamine	3	3
Halopéridol	6	5
Fluoxétine	3	3
Clozapine	2	2
Clomipramine	3	3
Olanzapine	5	5
Levomépromazine	1	1
Acépromazine	1	1
Loxapine	4	3
Amoxapine	3	3
Aripiprazole	2	2
Doxylamine	1	1

V-1-5. Autres molécules

Les autres molécules retrouvées sont présentées dans les Tableau 10 :

Tableau 10 : Nombre d'échantillons retrouvant des xénobiotiques autres

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Ceftriaxone	2	1
Roxithromycine	1	1
Lévofloxacine	1	1
Amoxicilline	3	3
Métronidazole	2	2
Quinine et ses dérivés	3	3
Levamisole	1	1
Paracétamol	58	57
Kétoprofen	2	0
Warfarine	3	3
Rivaroxaban	3	0
Metformine	7	5
Gliclazide	3	3
Sitagliptine	3	3
Amiloride	1	1
Chlorthalidone	1	0
Lercanidipine	1	0
Ramipril	1	0
Enalapril	1	1
Amlodipine	7	1
Losartan	1	0
Irbersartan	4	3
Valsartan	4	3
Telmisartan	1	0
Atorvastatine	4	0
Rosuvastatine	1	0
Urapidil	1	1
Spirolactone	1	0
Amiloride	1	1
Chlortalidone	1	0
Lercanidipine	1	0
Ramipril	1	0
Enalapril	1	1
Verapamil	2	2
Nimodipine	1	0
Naftidrofuryl	1	1
Ivabredine	1	1
Amiodarone	9	1
Atropine	1	0
Dobutamine	1	1
Etomidate	5	0
Sildenafil	1	0
Tadalafil	1	0

Molécule retrouvée lors du screening	Nombre d'échantillons de sang périphérique avec présence de la molécule	Nombre d'échantillons d'humeur vitrée avec présence de la molécule
Alfuzosin	1	1
Oxybutynine	1	0
Lopéramide	4	3
Dompéridone	2	2
Ondansetron	1	1
Pantoprazole	2	0
Noscapine	1	1
Dextrometorphane	1	1
Brompheniramine	1	1
Terbutaline	1	0
Irinotecan	1	1
Benserazide	1	0
Amantadine	1	1
Trihexyphenydile	1	1
Rivastigmine	1	1
Strychnine	1	1

VI. Résultats quantitatifs

208 prélèvements d'humeur vitrée et de sang périphérique ont été analysés de façon quantitative. Les moyennes des ratios entre les concentrations vitréennes et les concentrations sanguines postmortem ont été calculées pour chacune des molécules. Les valeurs minimales et maximales de ces ratios ainsi que les concentrations minimales et maximales retrouvées dans le sang périphérique postmortem et l'humeur vitrée sont présentées sous forme d'intervalles. Les coefficients de corrélation entre les concentrations vitréennes et sanguines périphériques postmortem ont été calculés. L'ensemble de ces données sont présentées dans les tableaux ci-dessous. La relation entre les concentrations vitréennes et les concentrations sanguines périphériques postmortem sont présentées pour certaines molécules sous forme de graphique. Pour chacune des molécules, la médiane, la variance, l'écart type, le premier et le troisième quartile ainsi que les valeurs minimales et maximales des ratios entre les concentrations retrouvées dans l'humeur vitrée et les concentrations sanguines périphériques postmortem ont été calculés et sont présentés sous forme de « *Box plot* » dans les graphiques respectifs.

VI-1. Résultats des analyses quantitatives toxicologiques dans le sang et l'humeur vitrée

VI-1-1. Benzodiazépines

Les quantifications en benzodiazépines ont été réalisées sur 73 prélèvements de sang périphérique postmortem et d'humeur vitrée.

Résultats quantitatifs des benzodiazépines

Tableau 11 : Résultats quantitatifs des benzodiazépines

[C]Hv/[C]sgpm¹	N	Moyenne des ratios [C]Hv/[C]sgpm	Intervalle des ratios calculés	Intervalle [C]Hv (ng/ml)	Intervalle [C]sgpm (ng/ml)	r
Oxazépam	24	0,18	[0,05;0,37]	[1 ; 350]	[2,6 ; 2800]	0,98
Bromazépam	14	0,48	[0,19;0,95]	[3,4 ; 1332]	[3,4 ; 2940]	0,98
Alprazolam	12	0,52	[0,24;1,08]	[3 ; 62,5]	[3,7 ; 186]	0,99
Zopiclone	16	1,05	[0,05;2,11]	[2,1 ; 630]	[6,8 ; 578]	0,99
Lormetazépam	2	0,24	0,12 et 0,36	[18 et 20,5]	49,6 et 173	//
Lorazépam	2	0,09	[0,07;0,12]	[1,6 ; 13,4]	[14,4 ; 110]	//
Zolpidem	6	0,75	[0,47;1,25]	[6,4 ; 230]	[6 ; 327]	0,96
Diazépam	11	0,09	[0,01;0,22]	[3 ; 70,2]	[7,2 ; 1620]	0,87
Nordiazépam	12	0,09	[0,015;0,16]	[7,4 ; 66]	[124 ; 1590]	0,22
Midazolam	12	0,15	[0,001;0,43]	[2,4 ; 50,4]	[11,8 ; 7270]	0,95
Clobazam	2	0,39	0,51 et 0,28	29 et 165	103 et 326	//
Norclobazam	2	0,33	0,20 et 0,47	6,8 et 712	34,4 et 1510	//
Témazépam	7	0,15	[0,08 ; 0,16]	[1 ; 7,6]	[2,4 ; 91,1]	0,99

¹ [C]Hv/[C]sgpm : Concentration dans l'humeur vitrée/ Concentration dans le sang périphérique postmortem

Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique postmortem

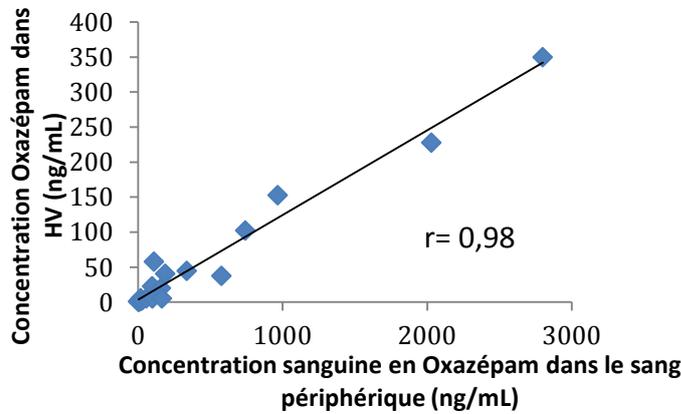


Figure 14 : Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Oxazépam

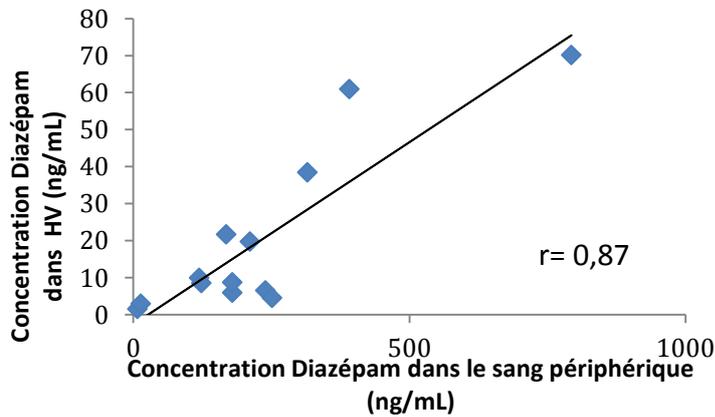


Figure 15 : Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Diazépam

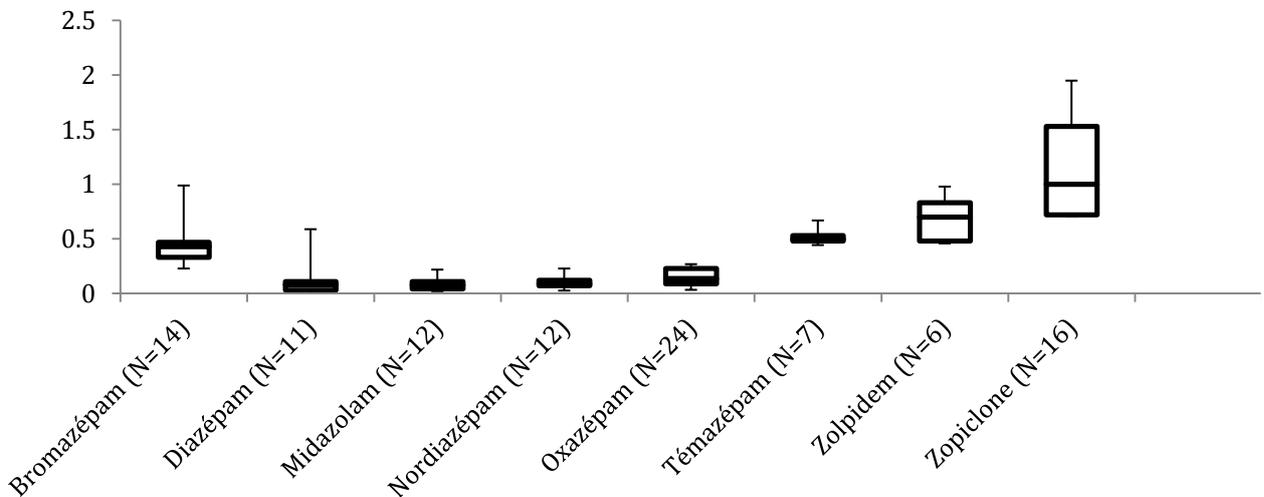


Figure 16 : Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les benzodiazépines

VI-1-2. Bétabloquants

20 prélèvements de sang et d'humeur vitrée ont été quantifiés.

Résultats quantitatifs des bétabloquants

Tableau 12 : Résultats quantitatifs des bétabloquants

[C]Hv/[C]sgpm	N	Moyenne des ratios [C]Hv/[C]sgpm	Intervalle des ratios calculés	Intervalle [C]Hv (ng/mL)	Intervalle [C]sgpm (ng/mL)	r
Aténolol	3	0,34	[0,2 ; 0,6]	[89,9 ; 1310]	[409 ; 2180]	0,99
Bisoprolol	8	1	[0,39 ; 1,7]	[33,7 ; 70,4]	[33,2 ; 80,6]	0,05
Métoprolol	4	0,91	[0,3 ; 1,22]	[45,3 ; 548]	[70 ; 587]	0,97
Propranolol	3	0,68	[0,44 ; 1,02]	[5 ; 348]	[10 ; 343]	0,99
Sotalol	2	1,35	0,66 et 2,05	233 et 242	118 et 350	//

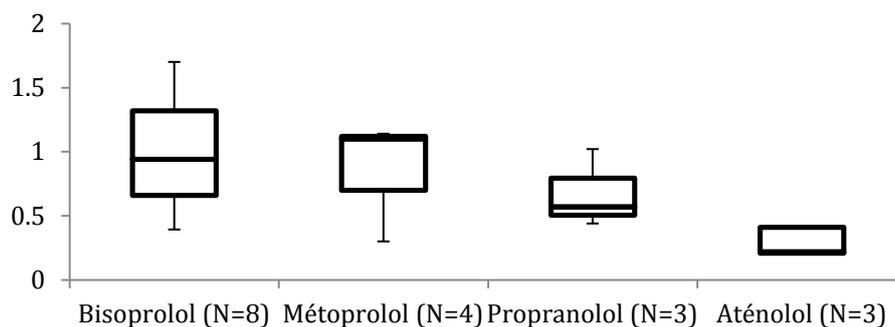


Figure 17 : Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les bétabloquants.

VI-1-3. Antidépresseurs et antipsychotiques

53 prélèvements de sang et d'humeur vitrée ont été quantifiés.

Résultats quantitatifs des antidépresseurs et antipsychotiques

Tableau 13 : Résultats quantitatifs des antidépresseurs et antipsychotiques

[C]Hv/[C]sgpm	N	Moyenne des ratios [C]Hv/[C]sgpm	Intervalle des ratios calculés	Intervalle [C]Hv (ng/mL)	Intervalle [C]sgpm (ng/mL)	r
Alimémazine	3	0,38	[0,06 ; 0,38]	[4,7 ; 52,5]	[50,4 ; 138]	0,56
Amisulpride	1	0,32	0,32	802	2490	//
Amitriptyline	2	0,23	[0,23 ; 0,24]	[56,5 ; 910]	[248 ; 3710]	//
Nortriptyline	1	0,29	0,29	558	1870	//
Citalopram	7	0,37	[0,26 ; 0,74]	[26 ; 276]	[23,9 ; 775]	0,95
Clomipramine	2	0,02	[0,005 ; 0,03]	[4 ; 4,5]	[122 ; 700]	//
Clozapine	1	0,12	0,12	152	1280	//
Cyamémazine	6	0,15	[0,01 ; 0,55]	[2 ; 49,4]	[44,9 ; 1160]	0
Doxylamine	1	3,38	3,38	690	204	//
Fluoxétine	2	0,04	0,025 et 0,06	47,5 et 47,7	839 et 1920	//
Halopéridol	1	0,37	0,37	1,8	4,9	//
Hydroxyzine	3	0,02	[0,01 ; 0,03]	[1,5 ; 6]	[58,4 ; 71,7]	0
Cétirizine	1	0,87	0,87	211,5	241	//
Loxapine	3	0,06	[0,01 ; 0,02]	[2 ; 3,76]	[13,7 ; 174]	0,57
Mirtazapine	6	0,29	[0,04 ; 0,47]	[6 ; 169]	[42,9 ; 360]	0,93
OLanzapine	2	2,49	[1,68 ; 3,3]	[320 ; 529]	[97 ; 315]	//
Paroxétine	2	0,02	0,002 et 0,04	[3,6 ; 73,5]	[1320 ; 1690]	//
Pipampérone	1	0,68	0,68	120	176	//
Prégabaline	1	0,08	0,08	0,7	9	
Quétiapine	5	0,25	[0,04 ; 0,5]	[1 ; 187]	[25,6 ; 1670]	0,81
Rispéridone	1	0,6	0,6	75	125	//
9 OH Rispéridone	2	0,93	[0,5 ; 1,36]	[4,37 ; 114]	[8,7 ; 83,8]	//
Venlafaxine	7	0,57	[0,21 ; 1,08]	[25 ; 2285]	[37 ; 5210]	0,99
Desmethyl venlafaxine	5	0,66	[0,37 ; 0,97]	[123 ; 720]	[127 ; 1180]	0,89

Relation entre les concentrations des antidépresseurs et antipsychotiques dans l'humeur vitrée et le sang périphérique postmortem

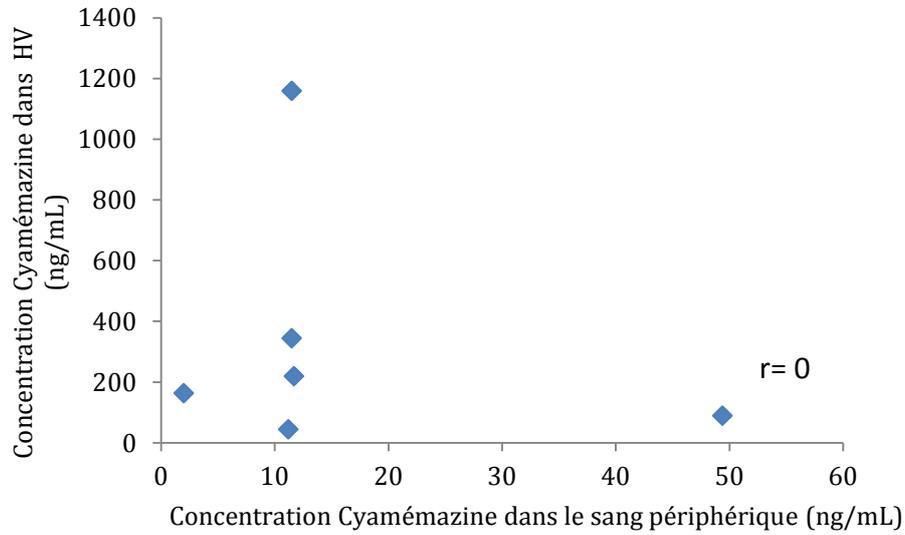


Figure 18 : Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en Cyamémazine

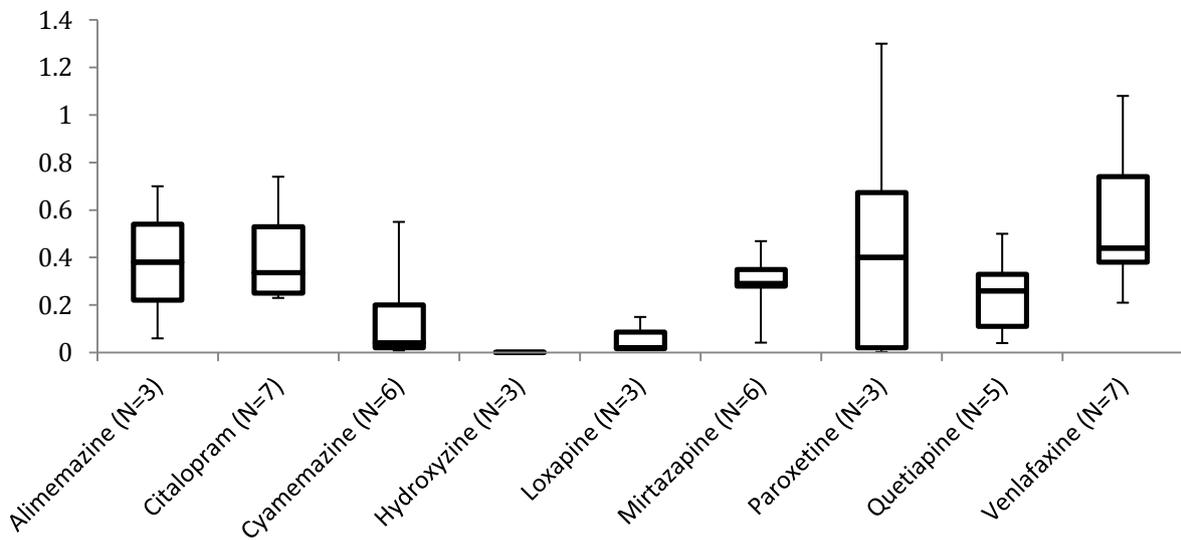


Figure 19 : Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les antidépresseurs et antipsychotiques.

VI-1-4. Opiacés, cocaïne et amphétamines

Les quantifications en opiacés, cocaïne et amphétamines ont été réalisées sur 59 échantillons de sang périphérique postmortem et d'humeur vitrée.

Résultats quantitatifs des opiacés, cocaïniques, amphétamines

Tableau 14 : Résultats quantitatifs des opiacés, cocaïniques, amphétamines

[C]Hv/[C]sgpm	N	Moyenne des ratios [C]Hv/[C]sgpm	Intervalle des ratios calculés	Intervalle [C]Hv (ng/mL)	Intervalle [C]sgpm (ng/mL)	r
Morphine	16	1,32	[0,08 ; 3,94]	[16 ; 158]	[9,2 ; 1900]	0,55
Oxymorphone	1	0,6	//	5,4	9	//
Kétamine	3	0,50	[0,06 ; 0,92]	[1 ; 780]	[167 ; 912]	0,89
Codéine	6	2,33	[1,13 ; 4,08]	[6,6 ; 156]	[4,3 ; 100]	0,96
Oxycodone	2	1,26	[0,92 ; 1,61]	118 et 3135	128 et 1940	//
6 MAM	4	Non applicable	Non applicable	[39,6 ; 67,5]	284	//
Tramadol	9	0,85	[0,38 ; 2,35]	[61 ; 1810]	[118 ; 2550]	0,98
Buprénorphine	4	0,7	[0,12 ; 2,13]	[1,2 ; 14,3]	[6,7 ; 10]	0
Norbuprénorphine	4	1,22	[0,18 ; 2,53]	[5 ; 39]	[5,8 ; 27,3]	0
Méthadone	11	0,28	[0,06 ; 0,85]	[18,5 ; 459]	[103 ; 915]	0,73
EDDP	7	0,22	[0,03 ; 0,56]	[6,1 ; 59,6]	[15 ; 171]	0,93
Cocaïne	7	0,31	[0,07 ; 0,54]	[11 ; 3830]	[25,6 ; 17500]	0,97
Benzoylécgonine	8	0,53	[0,07 ; 1,12]	[47,5 ; 4025]	[42,4 ; 11600]	0,92
Ecgonine méthylester	7	0,56	[0,05 ; 1,5]	[98,5 ; 366,5]	[155 ; 11600]	0
Amphétamine	1	1,92	//	32,2	16,8	//
MDMA	4	1,43	[0,48 ; 2,58]	[299 ; 2870]	[143 ; 5880]	0,99
MDA	4	1,54	[0,53 ; 2,38]	[32 ; 69,5]	[14,7 ; 130]	0,99

Relation entre les concentrations des opiacés dans l'humeur vitrée et le sang périphérique postmortem

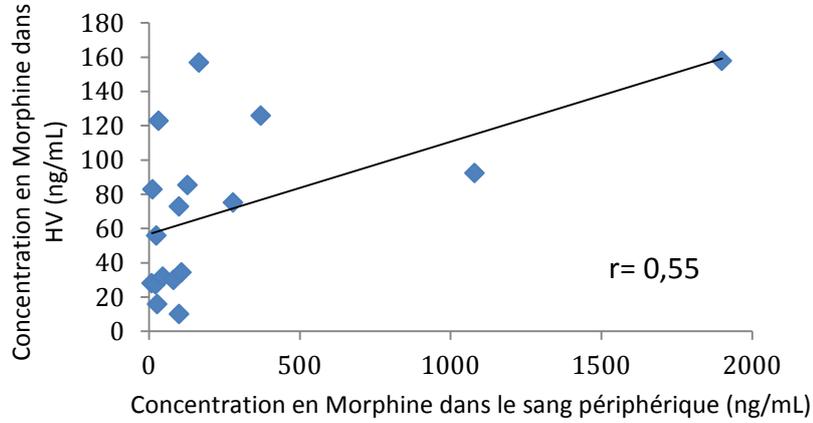


Figure 20 : Relation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique en

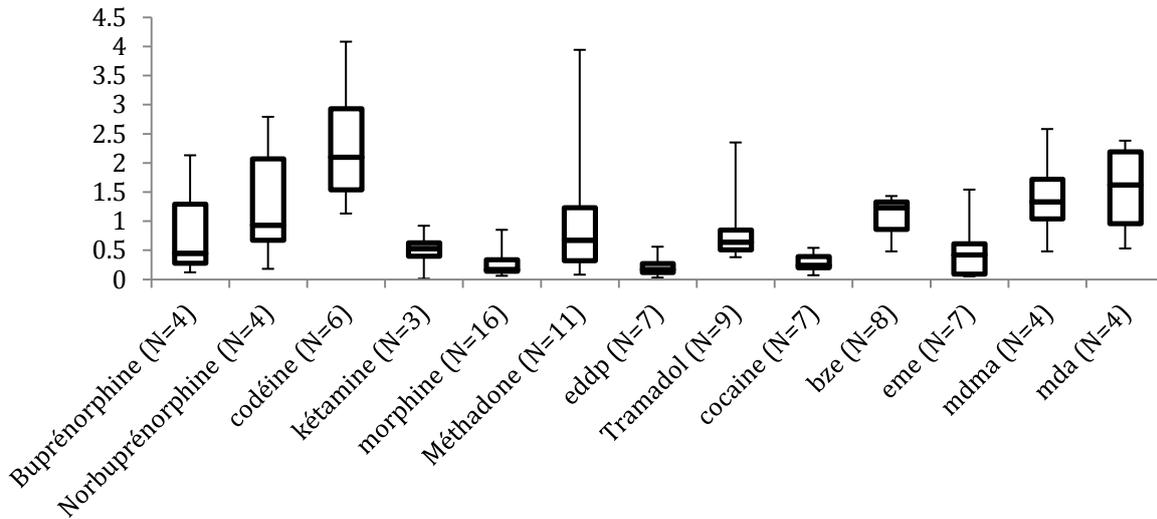


Figure 21 : Dispersion des valeurs des ratios (concentration dans l'humeur vitrée/ concentration dans le sang périphérique postmortem) pour les opiacés, antalgiques, cocaïnes et amphétamines.

VI-1-5. Éthanol et éthylglucuronide

Résultats quantitatifs de l'éthylglucuronide

Les quantifications en éthanol et éthylglucuronide ont été réalisées sur 30 échantillons de sang périphérique postmortem et 30 échantillons d'humeur vitrée.

Tableau 15 : Résultats quantitatifs de l'éthylglucuronide

ETG sang (ng/mL)	ETG hv (ng/mL)	ratio ETG sang/hv	OH sang (g/L)	OH hv (g/L)	Ratio OH sang/HV
0	103	//	//	//	//
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	70,2	//	//	//	//
0	0	0	0,1	0	0
0	0	0	0,2	0	0
0	0	0	0,2	0,1	2
114	72,2	1,58	0	0	0
124	51,6	2,40	2,24	3,1	0,72
187	176	1,06	0,67	0,40	1,67
251	116	2,16	0,13	0,17	0,76
263	306	0,86	0,8	0,83	0,97
510	351	1,45	1,84	1,88	0,98
732	824	0,89	0,1	0,22	0,45
801	99	8,09	1	1,3	0,8
1280	571	2,24	0,23	0,1	2,3
1380	151	9,14	1,24	1,47	0,84
1520	609	2,49	0,45	0,79	0,57
1880	816	2,30	0,84	1,39	0,6
1980	771	2,57	0,5	1,2	0,42
2310	399	5,79	2,12	2,69	0,79
2517	269	9,36	1,2	1,1	1,1
3519	1683	2,09	1,4	1,3	1,02
3840	456	8,42	1,52	1,8	0,84
5990	3050	1,96	1,85	1,5	1,23
6340	2600	2,43	2,19	2,97	0,74
7219	1002	7,2	1,6	1,7	0,7
7640	6330	1,21	2,47	3,15	0,78
11000	6400	1,72	2,65	3,04	0,87
2046,6	909,2	2,6	0,9	1,1	0,7

Relation entre les concentrations d'éthylglucuronide dans l'humeur vitrée et le sang périphérique postmortem

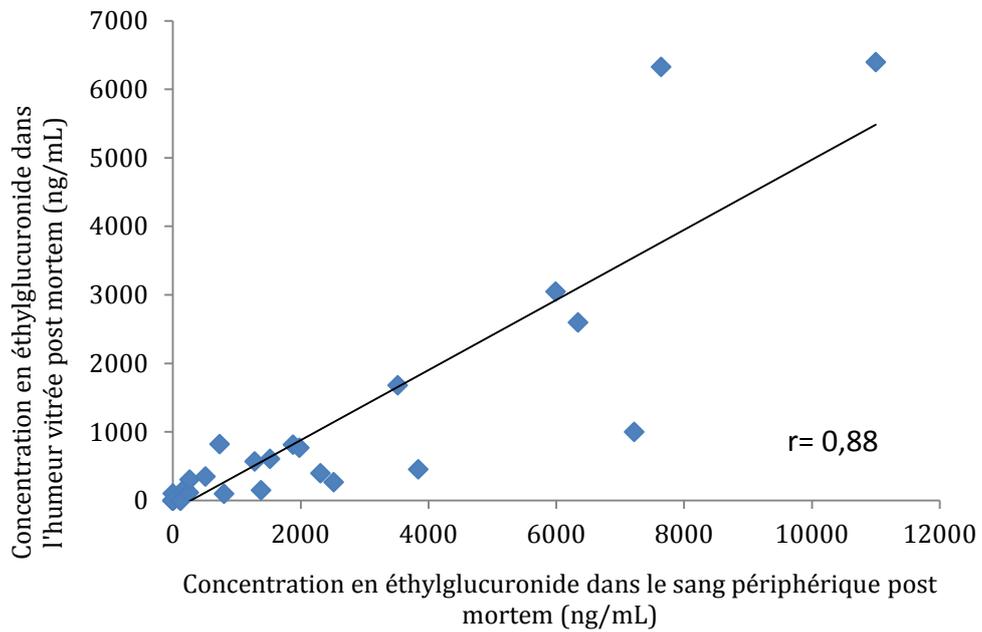


Figure 22 : Relation concentrations en éthylglucuronide dans le sang périphérique et l'humeur vitrée postmortem

VI-2. Résultats quantitatifs des marqueurs biochimiques

Les quantifications des marqueurs biochimiques ont été réalisées sur 26 échantillons de plasma postmortem et 26 échantillons d'humeur vitrée.

VI-2-1. Myoglobine

Résultats quantitatifs de la myoglobine

Tableau 16 : Résultats quantitatifs de la myoglobine

Concentration en Myoglobine dans l'humeur vitrée ($\mu\text{mol/L}$)	Concentration plasmatique en troponine ($\mu\text{g/L}$)	Délais entre le décès et les prélèvements (jour)	Sexe	Age (ans)	Cause du décès
GROUPE 1 (N=11)					
< 15	< 0,014	1	M	57	Asphyxie mécanique
16	< 0,014	1	F	80	Septicémie
16	< 0,014	1	F	24	Méningite aigüe
20	< 0,014	2	M	54	Arme blanche
35	< 0,014	2	M	83	Ballistique crânien
47	< 0,014	1	M	71	Ballistique crânien
57	< 0,014	2	M	42	Rupture gastrique
69	< 0,014	2	M	52	Ballistique crânien
71	< 0,014	1	M	43	Hémorragie intra-cérébrale
180	< 0,014	2	F	70	immolation
252	< 0,014	1	M	34	Pneumopathie inhalation
70,4	<0,014	1,45		55,45	
GROUPE 2 (N=14)					
1730	61	1	M	59	Cardiaque
16	62	1	M	24	Cardiaque
30	> 100	2	F	66	Cardiaque
32	> 100	1	M	31	Cardiaque
37	> 100	1	F	47	Cardiaque
42	> 100	2	F	53	Cardiaque
45	> 100	1	M	51	Cardiaque
90	> 100	1	M	55	Cardiaque
162	> 100	1	F	92	Cardiaque
226	> 100	2	M	40	Cardiaque
416	> 100	1	M	47	Cardiaque
514	> 100	2	M	24	Cardiaque
811	> 100	< 1	M	30	Cardiaque
2800	> 100	1	M	31	Cardiaque
496,5	93,4	1,28		59,1	

Relation entre les concentrations en myoglobine dans l'humeur vitrée et la troponine dans le plasma postmortem

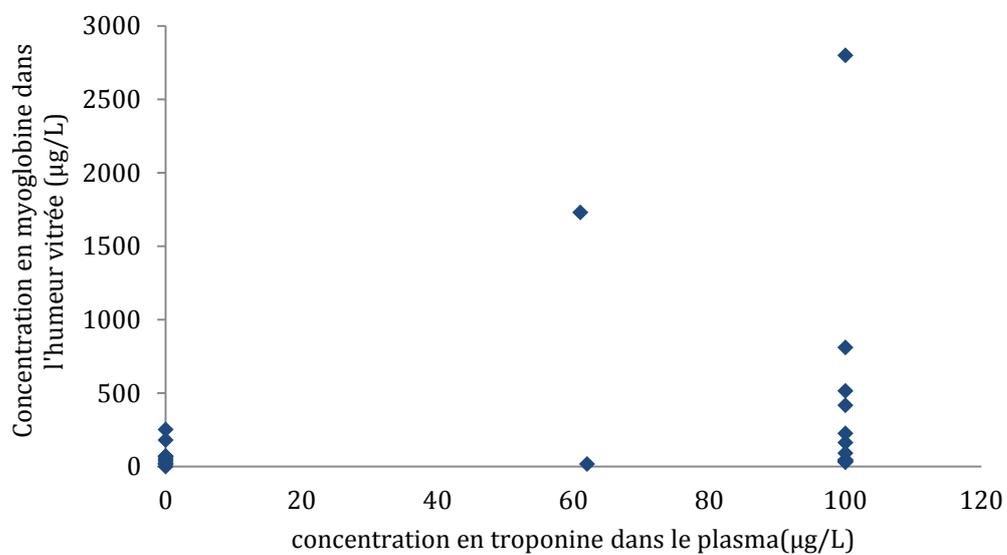


Figure 23 : Relation entre la Myoglobine dans l'humeur vitrée et la troponine plasmatique

VI-2-2. CK

Résultats quantitatifs des CK

Tableau 17 : Résultats quantitatifs des CK

Concentration en CK dans l'humeur vitrée (UI/L)	Concentration plasmatique en troponine (µg/L)	Délais entre le décès et les prélèvements (jour)	Sexe	Age (ans)	Cause du décès
GROUPE 1 (N=11)					
< 7	< 0,014	1	F	80	Septicémie
35	< 0,014	2	M	83	Ballistique crânien
58	< 0,014	2	M	54	Arme blanche
70	< 0,014	1	F	24	Méningite aiguë
118	< 0,014	1	M	71	Ballistique crânien
120	< 0,014	2	M	42	Rupture gastrique
161	< 0,014	1	M	43	Hémorragie intra cérébrale
239	< 0,014	2	F	70	immolation
280	< 0,014	1	M	34	Pneumopathie inhalation
300	< 0,014	1	M	57	Asphyxie mécanique
340	< 0,014	2	M	52	Ballistique crânien
156,4	<0,014	1,45		55,45	
GROUPE 2 (N=15)					
368	61	1	M	59	Cardiaque
64	62	1	M	24	Cardiaque
86	> 100	< 1	M	30	Cardiaque
120	> 100	1	M	31	Cardiaque
122	> 100	1	M	56	Cardiaque
160	> 100	1	F	47	Cardiaque
164	> 100	2	F	66	Cardiaque
200	> 100	2	F	53	Cardiaque
251	> 100	1	F	92	Cardiaque
854	> 100	1	M	51	Cardiaque
1000	> 100	1	M	31	Cardiaque
1324	> 100	2	M	24	Cardiaque
1894	> 100	1	M	55	Cardiaque
3948	> 100	2	M	40	Cardiaque
12000	> 100	< 1	M	64	Cardiaque
1415,4	93,4	1,3		48,2	

Relation entre les CK dans l'humeur vitrée et la troponine plasmatique

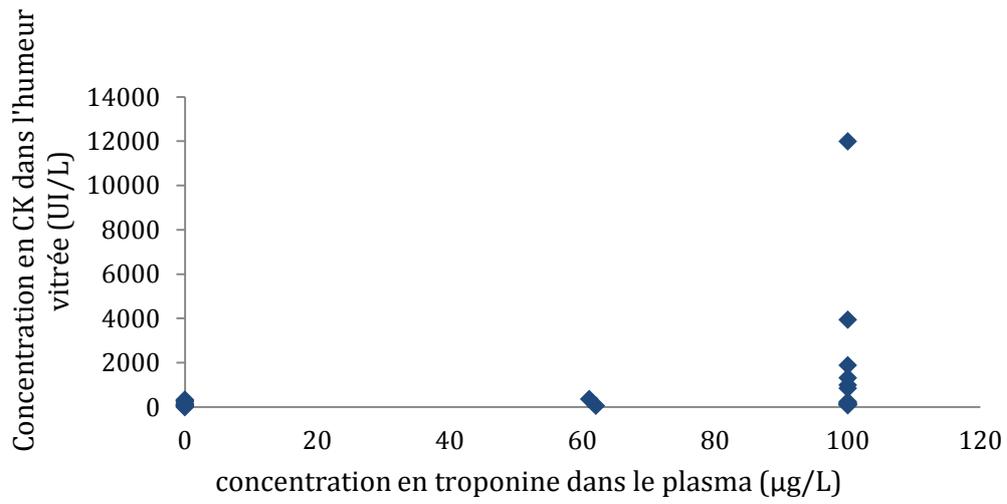


Figure 24 : Relation entre les CK dans l'humeur vitrée et la troponine plasmatique

VI-2-3. NT pro BNP

Résultats quantitatifs des NT pro BNP

Tableau 18 : Résultats quantitatifs des NT pro BNP

Concentration en NT pro BNP dans l'humeur vitrée (pg/mL)	Concentration en troponine plasmatique (µg/L)	Délais entre le décès et les prélèvements (jour)	Sexe	Age (ans)	Cause du décès
GROUPE 1 (N=11)					
25	< 0,014	2	M	54	Arme blanche
34	< 0,014	1	F	80	Septicémie
60	< 0,014	1	F	24	Méningite aiguë
67	< 0,014	1	M	34	Pneumopathie inhalation
90	< 0,014	2	M	83	Ballistique crânien
71	< 0,014	1	M	43	Hémorragie intracérébrale
82	< 0,014	2	F	70	immolation
99	< 0,014	1	M	57	Asphyxie mécanique
103	< 0,014	2	M	42	Rupture gastrique
105	< 0,014	1	M	71	Ballistique crânien
159	< 0,014	2	M	52	Ballistique crânien
81,4	< 0,014	1,45		55,45	
GROUPE 2 (N=14)					
89	61	1	M	59	Cardiaque
193	62	1	M	24	Cardiaque
84	> 100	1	M	51	Cardiaque
89	> 100	1	M	31	Cardiaque
90	> 100	1	M	55	Cardiaque
100	> 100	2	F	66	Cardiaque
101	> 100	1	M	47	Cardiaque
140	> 100	2	F	53	Cardiaque
146	> 100	< 1	M	30	Cardiaque
180	> 100	2	M	40	Cardiaque
200	> 100	< 1	M	64	Cardiaque
240	> 100	1	M	31	Cardiaque
284	> 100	1	F	47	Cardiaque
294	> 100	2	M	24	Cardiaque
159,3	93,4	1,29		44,43	

Relation entre les concentrations de NT pro BNP dans l'humeur vitrée et de troponine dans le plasma

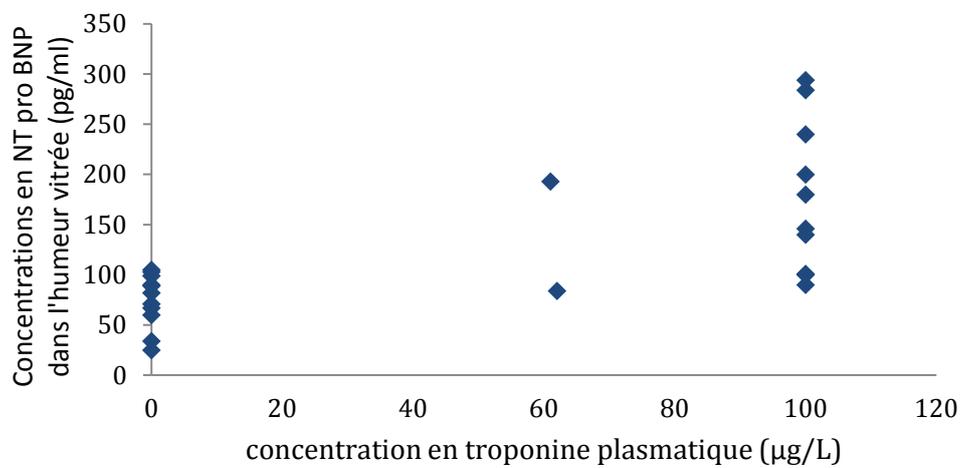


Figure 25 : Relation entre les concentrations de NT pro BNP dans l'humeur vitrée et de troponine plasmatique

VI-2-4. Copeptine

Résultats quantitatifs de la copeptine

Tableau 19 : Résultats quantitatifs de la copeptine

Concentration en copeptine dans l'humeur vitrée (µmol/L)	Concentration en troponine plasmatique (µg/L)	Délais entre autopsie et prélèvements (jour)	Sexe	Age (ans)	Cause du décès
GROUPE 1 (N=10)					
3,4	< 0,014	1	M	57	Asphyxie mécanique
4	< 0,014	1	F	24	Méningite aigüe
4,1	< 0,014	1	M	43	Hémorragie intra cérébrale
4,2	< 0,014	1	F	80	Septicémie
4,4	< 0,014	2	F	70	immolation
4,8	< 0,014	2	M	42	Rupture gastrique
5	< 0,014	1	M	34	Pneumopathie inhalation
5,4	< 0,014	2	M	54	Arme blanche
5,5	< 0,014	2	M	83	Ballistique crânien
5,9	< 0,014	2	M	52	Ballistique crânien
4,7	< 0,014	1,5		53,9	
GROUPE 2 (N=16)					
7	61	1	M	59	cardiaque
6	62	1	M	24	cardiaque
9	71	1	M	37	cardiaque
5,5	> 100	2	F	53	cardiaque
6	> 100	2	M	40	cardiaque
6	> 100	1	M	31	cardiaque
6	> 100	1	F	47	Cardiaque
7,1	> 100	< 1	M	30	Cardiaque
7,6	> 100	1	M	55	Cardiaque
8,8	> 100	2	M	24	Cardiaque
8,9	> 100	1	M	31	Cardiaque
9,9	> 100	2	F	27	cardiaque
11,4	> 100	1	M	47	Cardiaque
14,8	> 100	2	F	66	Cardiaque
15,8	> 100	1	F	92	Cardiaque
20	> 100	< 1	M	64	cardiaque
9,4	93,4	1,31		45,44	

VII. Discussion

VII-1. Discussion : résultats qualitatifs et quantitatifs toxicologiques dans le sang et dans l'humeur vitrée

VII-1-1. Benzodiazépines

Discussion des résultats qualitatifs des benzodiazépines

Concernant les benzodiazépines, 93 % des molécules mères et 72 % des métabolites retrouvés dans le sang périphérique sont aussi retrouvés dans l'humeur vitrée correspondante lors des screenings réalisés.

Dans 7 % des cas, les molécules mères ne sont pas retrouvées dans l'humeur vitrée alors qu'elles le sont dans le sang périphérique. La plupart de ces cas s'expliquent par une faible concentration retrouvée dans le sang périphérique après quantification (< 12 ng/mL). Cependant, dans deux cas, du midazolam est retrouvé dans l'humeur vitrée mais non quantifié (concentration dans l'humeur vitrée < LOQ) malgré une concentration élevée dans le sang périphérique (244 et 592 ng/mL). Une administration de midazolam a pu être réalisée par les services de soin, peu de temps avant le décès (administration perimortem). Aucune interaction médicamenteuse avec les transporteurs impliqués dans le passage de la BHR n'a été mise en évidence concernant ces deux cas.

Concernant les données bibliographiques, les analyses qualitatives montrent que dans de nombreux cas, les molécules mères et les métabolites retrouvés dans le sang ne sont pas forcément retrouvés dans l'humeur vitrée. En effet dans l'étude de Robertson et coll., les molécules mères n'étaient détectées que dans 10% des cas dans l'humeur vitrée contre plus de 30 % des cas dans le sang [44]. L'étude qualitative avec détection par temps de vol réalisée par Pelander et coll. retrouvait que 40 % des molécules mères présentes dans l'urine étaient également présentes dans l'humeur vitrée et que 33% des métabolites présents dans l'urine étaient également présents dans l'humeur vitrée [26]. Certaines molécules comme l'oxazépam et le témazépam sont plus difficilement retrouvées dans l'humeur vitrée, il en est de même dans l'étude de Pelander et coll. mais les matrices étudiées dans l'étude de Pelander et coll. étaient l'urine et l'humeur vitrée et non le sang périphérique et l'humeur vitrée. De plus, les échantillons étaient analysés après extraction SPE. Les différences de préparation d'échantillons (simple déprotéinisation ou extraction SPE) ainsi que les différences de matrice (urine ou sang périphérique) peuvent expliquer les différences entre les résultats qualitatifs réalisés dans notre étude et celle de Pelander et coll. [26].

Discussion des résultats quantitatifs des benzodiazépines

Concernant les résultats quantitatifs, il existe une variabilité importante des résultats quantitatifs dans le sang et dans l'humeur vitrée selon la molécule retrouvée. D'une manière générale les ratios [molécule dans l'humeur vitrée]/ [molécule dans le sang périphérique] sont $< 0,5$ pour 11 des benzodiazépines quantifiées. Les concentrations en benzodiazépines dans l'humeur vitrée sont systématiquement inférieures aux concentrations dans le sang périphérique, résultats concordants avec les données issues de la littérature [45].

Pour l'ensemble des molécules, les coefficients de corrélation sont élevés, montrant l'existence d'une corrélation entre les concentrations vitréennes et sanguines postmortem. Selon Robertson et coll., les concentrations en molécules mères sont environ 3 fois plus importantes dans le sang périphérique que dans l'humeur vitrée [44]. Selon Bévalot et coll., cette différence pourrait s'expliquer par la forte liaison protéique des benzodiazépines ainsi que leurs propriétés neutres ou légèrement acides [13]. Holmgren et coll. ont montré une corrélation significative entre le passage des molécules dans l'humeur vitrée et la liaison protéique [46]. Les résultats de l'étude réalisée sont en accord avec les données issues de la littérature. Les benzodiazépines ayant une liaison protéique $> 90\%$ sont effectivement moins retrouvées dans l'humeur vitrée. Seul le zolpidem, probablement de par son LogP, son volume de distribution et sa bonne absorption semble bien diffuser à travers la BHR.

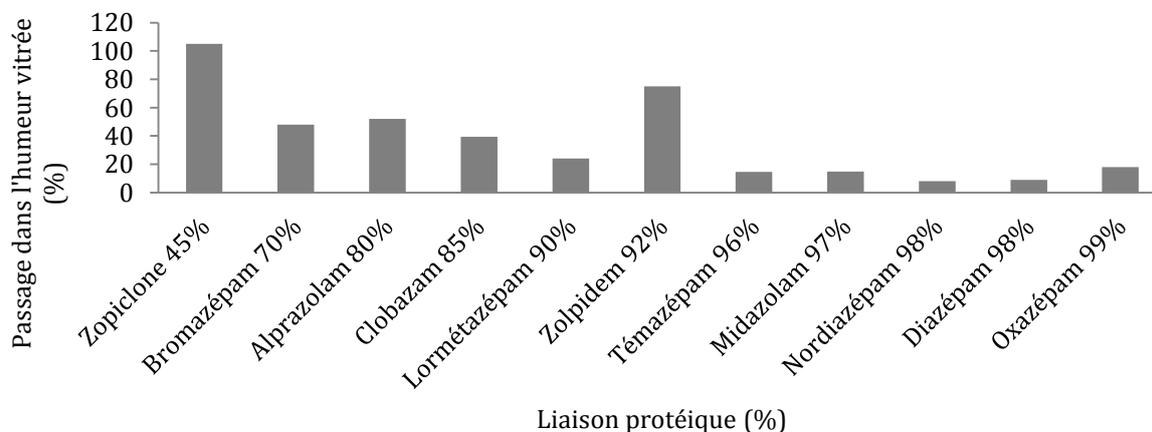


Figure 27 : Relation entre la liaison protéique et le passage dans l'humeur vitrée

La liposolubilité des molécules est également un paramètre à prendre en compte comme en atteste l'étude de Pitkänen et coll., les bêtabloquants les plus lipophiles pénètrent plus vite qu'ils ne ressortent [14]. Dans notre étude, les molécules amphiphiles ou légèrement liposolubles sont retrouvées plus facilement dans l'humeur vitrée. Les molécules liposolubles passent rapidement la BHR après liaison aux lipoprotéines qui la constituent [12], cependant l'humeur vitrée étant constituée à $> 90\%$ d'eau, les molécules plus lipophiles comme le midazolam, sont probablement moins retenues dans ce milieu. Cela explique pourquoi les molécules avec des $\log P > 2,12$ sont moins présentes dans l'humeur vitrée.

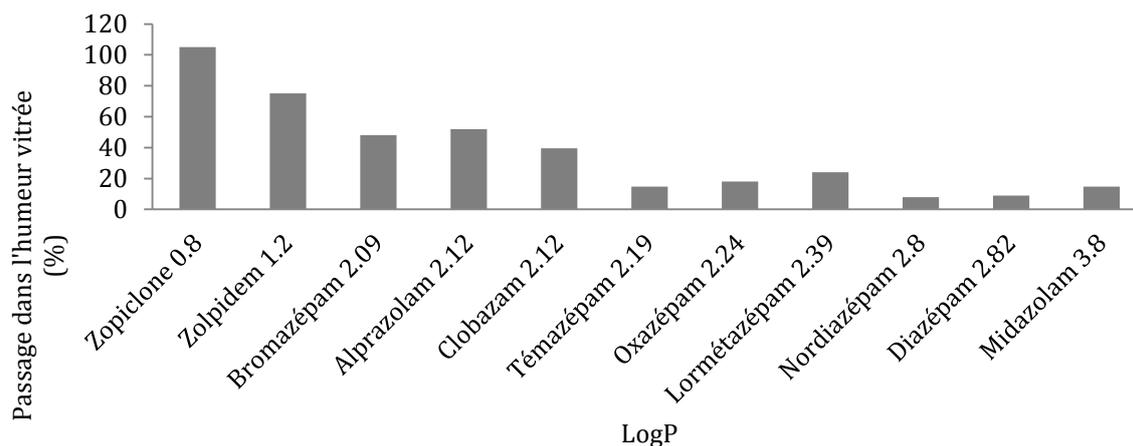


Figure 28 : Relation entre le passage dans l'humeur vitrée et le LogP

La taille de la molécule influence également son passage à travers la BHR. Ainsi des molécules de haut poids moléculaire dépendent d'un transport actif. La demi-vie des molécules de haut poids moléculaire est allongée en comparaison avec les molécules de petit poids moléculaire [16]. Concernant les benzodiazépines, les poids moléculaires des différentes molécules sont relativement similaires et les variations des poids moléculaires entre les différentes molécules ne semblent pas influencer de façon exclusive leur passage ou leur demi-vie dans l'humeur vitrée.

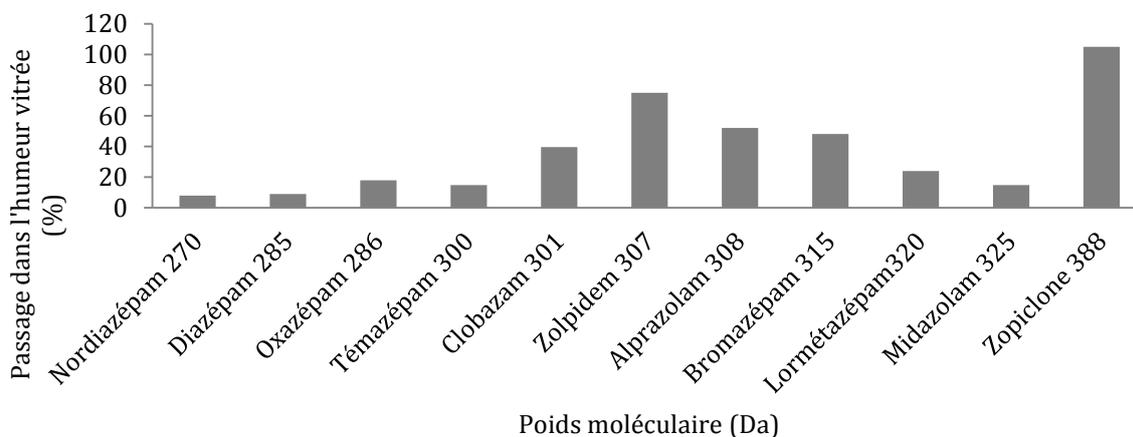


Figure 29 : Relation entre le passage dans l'humeur vitrée et le poids moléculaire

La diversité des données pharmacocinétiques (voies et mode d'administration, galénique, génétique) ainsi que les variations postmortem (étiologie du décès, délais écoulés entre le décès et le prélèvement) font que l'interprétation des résultats des concentrations vitréennes doit être faite avec vigilance.

VII-1-2. Opiacés, amphétamines, cocaïniques et analgésiques

Discussion des résultats qualitatifs des opiacés, amphétamines, cocaïniques, analgésiques

Concernant les opiacés, amphétamines, cocaïniques et analgésiques, 91 % des molécules mères et 95 % des métabolites retrouvés dans le sang périphérique sont aussi retrouvés dans l'humeur vitrée correspondante. Dans 9 % des cas les molécules mères retrouvées dans le sang périphérique ne sont pas retrouvées dans l'humeur vitrée. Dans ces cas, la concentration retrouvée dans le sang périphérique est faible (inférieure à 6 ng/mL). Pour un cas, la concentration en buprénorphine dans le sang est de 30,7 ng/mL et la molécule n'a pas été retrouvée lors du screening dans l'humeur vitrée. Les prélèvements ont été réalisés tardivement (5 jours après la découverte du corps). La rapidité du décès (pendaison) après la prise de la molécule mais également le délai entre la prise de la molécule et les prélèvements peuvent expliquer l'absence de buprénorphine dans le screening de l'humeur vitrée. De plus le poids moléculaire (457 Da), le logP (4,98) et la forte liaison protéique (96%) peuvent expliquer pourquoi la molécule est moins retrouvée dans l'humeur vitrée du fait d'un passage de la BHR plus limitée. Un autre cas retrouvait de la 5APB dans le sang périphérique, alors que la molécule n'était pas retrouvée dans l'humeur vitrée. La rapidité du décès (malaise et décès suite à une consommation de stupéfiant en soirée) peut expliquer l'absence de cette molécule lors du screening réalisé dans l'humeur vitrée.

La recherche de la 6 MAM dans l'humeur vitrée représente un intérêt majeur, en effet la 6 MAM a été retrouvée dans 7 screenings réalisés sur l'humeur vitrée et seulement dans 3 screenings réalisés sur le sang périphérique. De nombreuses études ont montré que la 6 MAM était plus souvent détectée dans l'humeur vitrée que dans l'urine ou le sang, témoignant ainsi d'un usage d'héroïne [47-49]. La lipophilie de la molécule permet une bonne diffusion à travers les membranes, le passage de la BHR est facilité et l'absence de dégradation dans l'humeur vitrée permet une cinétique d'élimination retardée.

Concernant l'étude qualitative menée par Pelander et coll., 82 % des molécules mères retrouvées dans l'urine lors des screenings avec détection par temps de vol sont aussi retrouvées dans l'humeur vitrée. Seulement 55 % des métabolites présents dans l'urine sont retrouvés dans l'humeur vitrée. 17 échantillons d'urine et d'humeur vitrée ont été analysés et seuls le tramadol et ses métabolites ainsi que la kétamine, la morphine, la méthadone, l'EDDP, la codéine et ses métabolites ont été retrouvés. Les échantillons analysés ne contenaient ni amphétamines, ni cocaïne, ni buprénorphine.

Discussion des résultats quantitatifs des amphétamines, cocaïniques

Concernant les résultats quantitatifs, la MDMA et les amphétamines ont des ratios [concentration humeur vitrée] / [concentration sanguine périphérique] moyens respectivement à 1,43 et 1,92. Dans la littérature la valeur de ce ratio varie est compris entre 0,65 et 6,7 pour la MDMA et entre 0,36 et 1,48 pour les amphétamines [13]. Concernant la MDMA, les concentrations vitréennes sont plus importantes que les concentrations sanguines. Il s'agit dans la plupart des cas d'intoxications massives associant la MDMA à d'autres produits (méthadone, buprénorphine). Le délai moyen entre la découverte des corps et les prélèvements était de 2,5 jours. À l'autopsie un syndrome asphyxique et des œdèmes aigus pulmonaires étaient retrouvés, données cliniques en faveur d'une origine toxique par overdose. Concernant la MDMA, De Letter et coll. ont mis en évidence une meilleure stabilité des concentrations en MDMA dans l'humeur vitrée que dans le sang cardiaque. Cependant, la concentration en MDMA serait liée au délai postmortem et aurait tendance à augmenter lorsque ce délai augmente, en partie à cause d'une déshydratation du globe oculaire et également suite à des phénomènes de redistribution postmortem encore peu explorés [18]. Dans notre étude, 1 seul cas de consommation d'amphétamines a permis de réaliser des quantifications dans l'humeur vitrée et le sang périphérique. La concentration dans l'humeur vitrée est à 32,2 ng/mL pour une concentration sanguine à 16,8 ng/mL. Cependant l'humeur vitrée a possiblement été contaminée par du sang (coloration rosée du prélèvement). Une corrélation entre les concentrations dans l'humeur vitrée et le sang périphérique a été mise en évidence pour la cocaïne et la MDMA. En effet pour l'ensemble de ces molécules, les coefficients de corrélation sont proches de 1. Concernant la cocaïne et ses métabolites les ratios [concentration humeur vitrée] / [concentration sanguine périphérique] sont inférieurs à 0,5. Les concentrations vitréennes sont dans la plupart des cas inférieures aux concentrations sanguines. La cocaïne est une molécule qui est rapidement dégradée. Les données issues de la littérature diffèrent selon les études réalisées. Ainsi Antonides et coll. retrouvent que dans 72% des cas les concentrations en cocaïne sont plus importantes dans l'humeur vitrée que dans le sang périphérique et que dans 78% des cas les concentrations en benzoylecgonine étaient plus importantes dans le sang périphérique que dans l'humeur vitrée [49]. L'hypothèse avancée était que le pH de l'humeur vitrée en postmortem étant environ à 7 sur l'ensemble des humeurs vitrées étudiées, la dégradation de la cocaïne est moins importante et plus lente dans l'humeur vitrée que dans le sang périphérique. De plus l'absence d'estérases dans l'humeur vitrée peut aussi expliquer sa dégradation retardée. Ces résultats sont comparables à ceux de Mackey-Bojack et coll. [50]. D'autres études montrent une bonne corrélation, notamment en prenant en compte la cocaïne totale (concentration calculée de la cocaïne et de ses métabolites) entre les concentrations sanguines et les concentrations dans l'humeur vitrée [50] [51]. La liaison protéique, le poids moléculaire ou le logP ne semblent pas expliquer qu'il y ait environ deux fois plus de cocaïne dans le sang périphérique que dans l'humeur vitrée. Dans notre étude, Il s'agit dans la plupart des cas d'intoxications massives avec des concentrations sanguines importantes (> 3000 ng/mL) dans plus de la moitié des cas. Les décès étaient dans la

majorité des cas dus à une intoxication aiguë. Des décès rapides peuvent expliquer cette différence de concentration entre le sang périphérique et l'humeur vitrée. De plus, dans un tiers des cas, il était retrouvé des concentrations élevées de méthadone (> 500 ng/mL) dans l'humeur vitrée. La cocaïne et la méthadone sont substrats de la PgP (transport à travers la BHR). Un phénomène de saturation de la PgP par la méthadone pourrait expliquer la différence entre les concentrations vitréennes et sanguines postmortem.

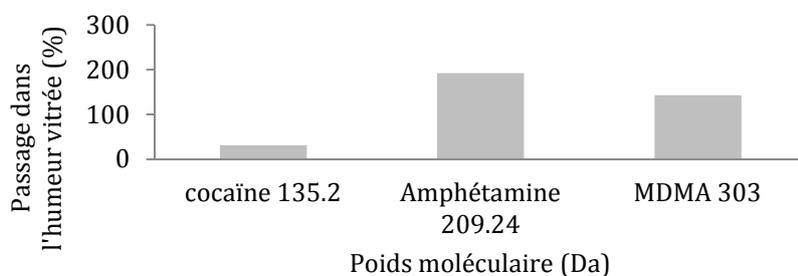


Figure 30 : Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les amphétamines, cocaïne et MDMA

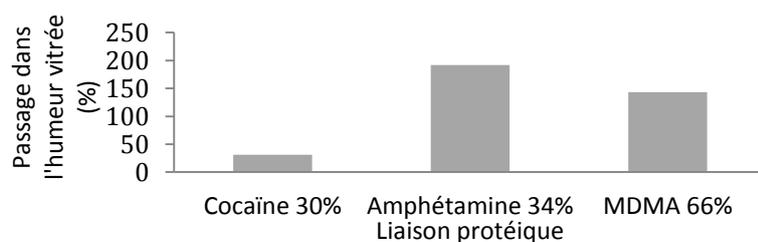


Figure 31 : Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les amphétamines, cocaïne et MDMA

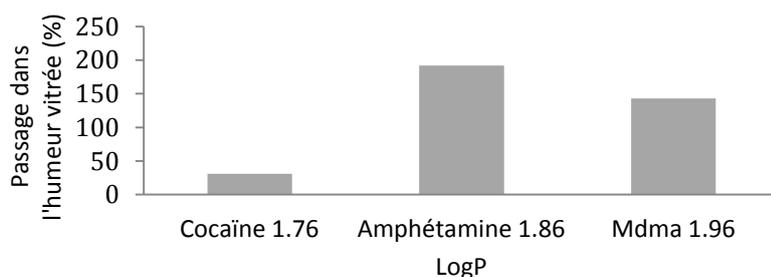


Figure 32 : Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les amphétamines, cocaïne et MDMA

La dégradation rapide de la cocaïne dans le sang, la rapidité du décès ou encore l'existence de phénomènes de saturation au niveau des transporteurs peuvent expliquer les résultats obtenus. Il est difficile de tirer une règle générale de ces résultats, du fait du faible nombre d'échantillons analysés.

Discussion des résultats quantitatifs des opiacés et analgésiques

Concernant les résultats des ratios [concentration humeur vitrée] / [concentration sanguine périphérique], la moyenne est respectivement de 1,32 pour la morphine, 2,33 pour la codéine, 0,9 pour la buprénorphine, 0,85 pour le tramadol, 0,5 pour la kétamine.

Dans la littérature les ratios varient pour la morphine [13] [48] [52]. Antonides et coll. ont montré que dans 72% des cas analysés, la morphine était plus présente dans le sang périphérique que dans l'humeur vitrée [49]. Rees et coll. ont admis que les valeurs des ratios variaient selon le temps écoulé entre le décès et les prélèvements. En effet plus ce délai est réduit, plus la concentration en morphine dans l'humeur vitrée est élevée, dépassant souvent la concentration dans le sang. Plus le délai est long, plus la concentration dans l'humeur vitrée a tendance à diminuer [53]. Dans la majeure partie des cas de l'étude menée, le délai entre la découverte du corps et la réalisation des prélèvements était inférieur à 2 jours. De plus, seule la morphine libre est quantifiée. Les formes glucuroconjuguées présentes dans le sang périphérique n'ont pas été quantifiées pouvant sous-estimer les concentrations sanguines en morphine totale. Lors des screenings réalisés il n'a pas été retrouvé de formes glucuroconjuguées dans l'humeur vitrée. Cette sous-estimation peut expliquer la différence entre les concentrations vitréennes et sanguines périphériques postmortem.

L'étude menée ne met pas en évidence de corrélation évidente entre les concentrations vitréennes et sanguines postmortem ($r = 0,55$). La diversification des modes de prises mais également de l'origine de la morphine (codéine ou morphine) peuvent expliquer les variations observées au sein des concentrations vitréennes et sanguines.

Concernant la méthadone et l'EDDP, les concentrations sont plus importantes dans le sang que dans l'humeur vitrée. Les données issues de la littérature sont comparables avec ces résultats [54] [55]. Sa liaison protéique élevée, son $\log P$ à 3,9 peuvent expliquer la présence plus importante de la méthadone dans le sang périphérique que dans l'humeur vitrée.

Concernant la codéine, les concentrations dans l'humeur vitrée sont plus importantes que dans le sang. Sa faible liaison protéique explique probablement le passage important de la molécule à travers la BHR. Rees et coll. ont montré que la codéine passait plus facilement la BHR que la morphine, probablement à cause de sa plus grande lipophilie [53]. Ses propriétés physico-chimiques permettent d'expliquer sa présence importante dans l'humeur vitrée.

Concernant la 6MAM, les concentrations sont plus élevées dans l'humeur vitrée que dans le sang périphérique [56] [57]. Ces données sont concordantes avec les résultats retrouvés dans l'étude menée. En effet seuls 3 échantillons de sang périphérique retrouvent de la 6 MAM, alors que 7 échantillons d'humeur vitrée retrouvent la molécule. De plus les concentrations lorsqu'elles sont supérieures à la LOQ, sont plus importantes dans l'humeur vitrée que dans le sang périphérique. L'absence d'estérase dans l'humeur vitrée et son $\log P$ plus élevé que la morphine (1,9 pour la 6 MAM) expliquent que la 6MAM soit plus souvent retrouvée dans l'humeur vitrée.

Concernant le tramadol, les concentrations dans l'humeur vitrée sont généralement plus importantes ou proches des concentrations retrouvées dans le sang périphérique [58]. Ces

données concordent avec celles de notre étude. Les concentrations dans l’humeur vitrée sont proches de celles présentes dans le sang périphérique.

Concernant la kétamine, peu d’études ont quantifié la kétamine dans l’humeur vitrée et le sang périphérique postmortem. Les rares données montrent une concentration plus importante dans le sang que dans l’humeur vitrée, ce qui concorde avec nos résultats [45]. L’humeur vitrée étant constituée à > 90 % d’eau, le logP à 3,9 de la kétamine fait que la molécule est probablement moins retenue dans l’humeur vitrée.

Enfin, concernant la buprénorphine et son métabolite, les concentrations entre l’humeur vitrée et le sang périphérique sont proches avec un ratio moyen à 0,9 et 1,22 respectivement. Les résultats sont très dispersés avec des ratios [buprénorphine humeur vitrée]/ [buprénorphine sang périphérique] très variés, probablement à cause du faible nombre d’échantillons et des causes de décès (décès après hémorragie extériorisée, ballistique...).

Concernant les opiacés, la liaison protéique et le LogP semblent être des facteurs influençant le passage et la demi-vie de la molécule dans l’humeur vitrée.

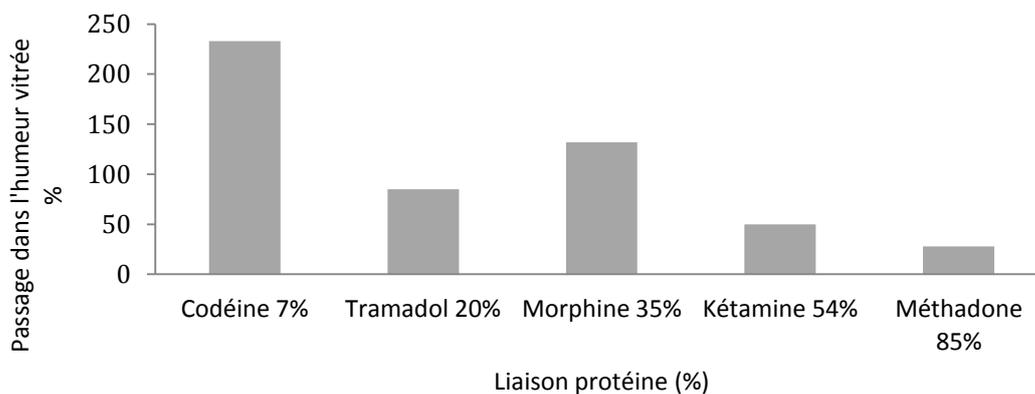


Figure 33 : Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les opiacés

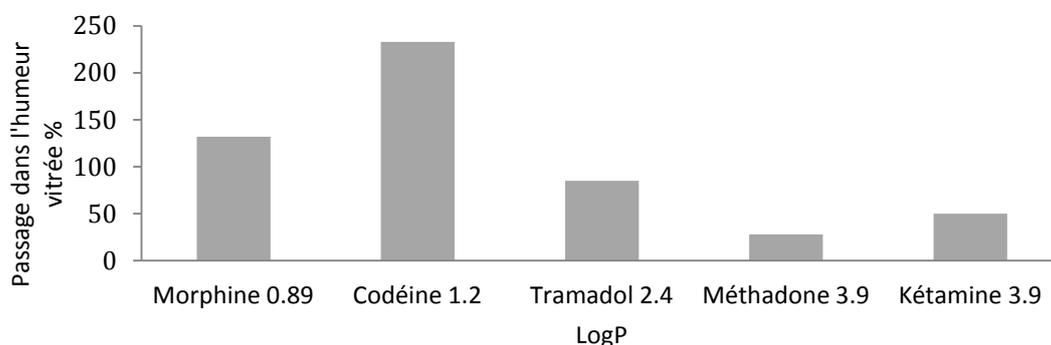


Figure 34 : Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les opiacés

La variabilité des modalités et schémas de prise, les variations morphotypiques, les différences de délais entre la prise du traitement et la réalisation des prélèvements mais également la cause du décès sont des paramètres pouvant expliquer les variations des résultats des quantifications de la buprénorphine, codéine, méthadone.

VII-1-3. Bétabloquants

Discussion des analyses qualitatives des bétabloquants

22 échantillons de sang périphérique et 21 échantillons d'humeur vitrée retrouvent des bétabloquants lors des screenings réalisés. Pour l'ensemble des échantillons, 95 % des molécules mères présentes dans le sang périphérique sont retrouvées dans l'humeur vitrée.

Dans un seul cas, le screening retrouve de l'aténolol dans le sang et non dans l'humeur vitrée correspondante. Cependant après quantification, la concentration en aténolol dans le sang périphérique était inférieure à la LOQ (20 ng/mL). Dans l'étude de Pelander et coll., 19 échantillons d'urine et 19 échantillons d'humeur vitrée trouvaient un bétabloquant (aténolol, métoprolol ou propranolol) et 100% des molécules mères ont été retrouvées dans les deux milieux analysés [26].

Discussion des analyses quantitatives des bétabloquants

Les résultats des ratios [bétabloquants humeur vitrée]/ [bétabloquants sang périphérique] varient entre 0,34 et 1,35 selon le bétabloquant. Les ratios sont supérieurs à 1 pour le bisoprolol et le sotalol. Il existe peu de données issues de la littérature concernant la quantification des bétabloquants dans l'humeur vitrée dans une population autopsique. Cependant plusieurs études ont été réalisées sur l'animal et retrouvent des concentrations inférieures dans le sang comparativement à l'humeur vitrée [59] [60].

Concernant l'aténolol, le propranolol, le métoprolol, les coefficients de corrélation sont proches de 1 ce qui n'est pas le cas pour le bisoprolol. Les concentrations dans le sang et l'humeur vitrée concernant le bisoprolol sont proches et peu dispersées se trouvant dans l'intervalle thérapeutique décrit dans la littérature (valeurs comprises entre 33 et 80 ng/mL).

Pitkanen et coll. ont mis en évidence que la taille et la lipophilie des bétabloquants influent sur le passage de la BHR et la demi-vie des molécules dans l'humeur vitrée [14]. Cependant cette notion est controversée dans une étude de Pélissier-Alicot et coll., réalisée sur le lapin [59]. Une relation entre le passage des molécules dans l'humeur vitrée et le LogP ainsi que la liaison protéique peut être suggérée au vu des résultats obtenus.

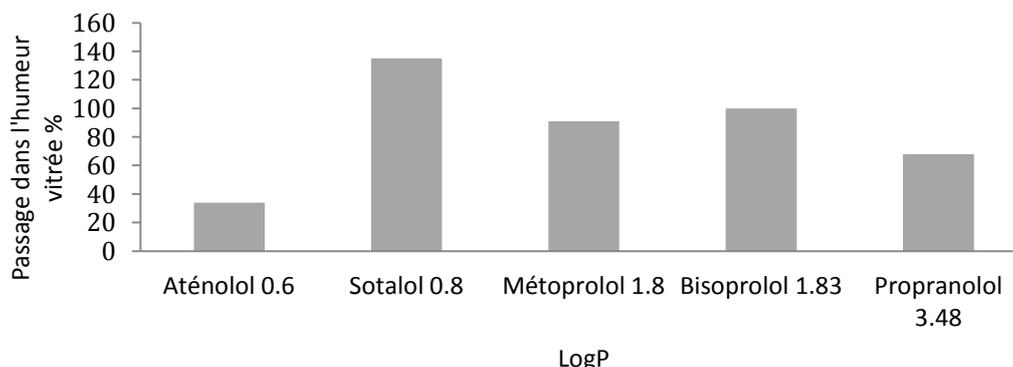


Figure 35 : Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les bétabloquants

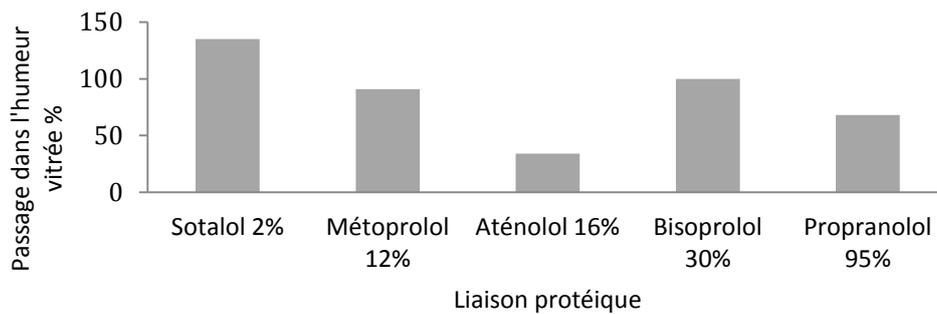


Figure 36 : Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les bêtabloquants

L'Aténolol, malgré sa faible liaison protéique est moins retrouvé dans l'humeur vitrée que d'autres molécules. Il s'agit du bêtabloquant le moins lipophile de ceux quantifiés. De plus, les modalités de prise, les délais entre le décès et les prélèvements ainsi que le type de décès peuvent expliquer ce résultat.

Cependant, dans l'étude réalisée, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre le poids moléculaire et le passage des molécules dans l'humeur vitrée. Le faible nombre d'échantillons, les poids moléculaires peu différents entre les molécules quantifiées peuvent expliquer ce résultat.

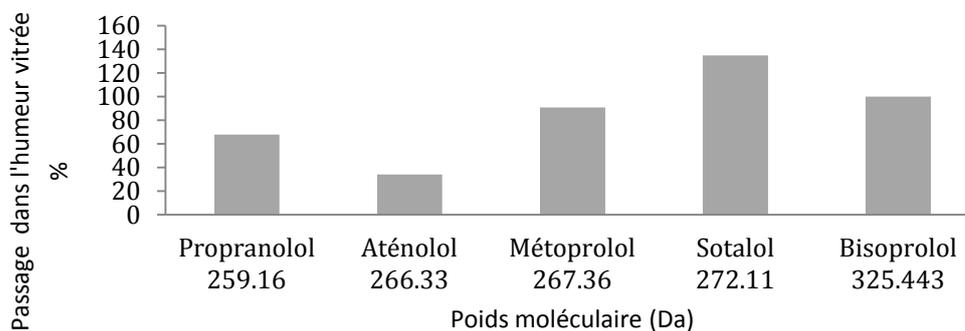


Figure 37 : Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les bêtabloquants

Les bêtabloquants semblent traverser relativement facilement la BHR et sont bien retrouvés lors des screenings réalisés dans l'humeur vitrée. En effet dans l'ensemble, les ratios [bêtabloquants humeur vitrée]/ [bêtabloquants sang périphérique] varient entre 0,34 et 1,35 mais sont en moyenne supérieurs à 0,7. Leurs caractéristiques physicochimiques permettent, en règle générale une bonne diffusion dans l'humeur vitrée et une bonne corrélation entre les concentrations sanguines périphériques et vitréennes.

VII-1-4. Antidépresseurs et antipsychotiques

Discussion des analyses qualitatives des antidépresseurs et antipsychotiques

63 échantillons de sang périphérique et d'humeur vitrée analysés retrouvent des antidépresseurs ou des antipsychotiques lors des screenings. 89 % des molécules mères et 67 % des métabolites sont retrouvés à la fois dans le sang et dans l'humeur vitrée. Dans l'étude de Pelander et coll. 87 % des molécules mères sont retrouvées dans l'humeur vitrée et 53% des métabolites sont retrouvés dans l'humeur vitrée. Les molécules mères sont plus facilement retrouvées dans l'humeur vitrée que les métabolites.

Discussion des analyses quantitatives des antidépresseurs et antipsychotiques

Les résultats des ratios [molécule humeur vitrée]/ [molécule sang périphérique] varient entre 0,02 et 3,38 pour l'ensemble des antidépresseurs et antipsychotiques. D'une manière générale les ratios sont < 1 , hormis pour la doxylamine et l'olanzapine. Cependant le faible nombre d'échantillons contenant ces molécules (N=3) et le délai entre le décès et les prélèvements (moyenne de 3 jours) permettent difficilement d'interpréter ces résultats. Concernant le citalopram, la mirtazapine, la venlafaxine les coefficients de corrélation sont proches de 1.

Bévalot et coll., suite à une étude sur une population autopsique (N=22) ont décrit l'absence de corrélation entre les concentrations vitréennes et sanguines pour certaines molécules telles que le citalopram et la cyamémazine et des ratios [molécule humeur vitrée]/ [molécule sang périphérique] de 0,7 en moyenne concernant le citalopram et 0,38 concernant la cyamémazine, valeurs supérieures à celles retrouvées dans notre étude [13]. La cyamémazine, de part sa liaison protéique et son LogP passe probablement peu la BHR. Dans l'étude menée, le délai entre le décès et la réalisation des prélèvements était en moyenne < 2 jours.

Dans l'étude de Bévalot et coll. menée sur des lapins, il est mis en évidence une augmentation de ces ratios en fonction du délai entre le décès et la réalisation des prélèvements [13].

Les variations de délais, les différences de modalités et schémas de prises (galéniques variables, posologies...) peuvent expliquer les différences entre les résultats de notre étude et celle de Bévalot et coll.

Une étude a été menée sur la diffusion des molécules dans l'humeur vitrée et leurs propriétés physico-chimiques.

Il ne semble pas exister de corrélation entre le passage des molécules dans l'humeur vitrée et le poids moléculaire ou entre le passage des molécules dans l'humeur vitrée et le LogP.

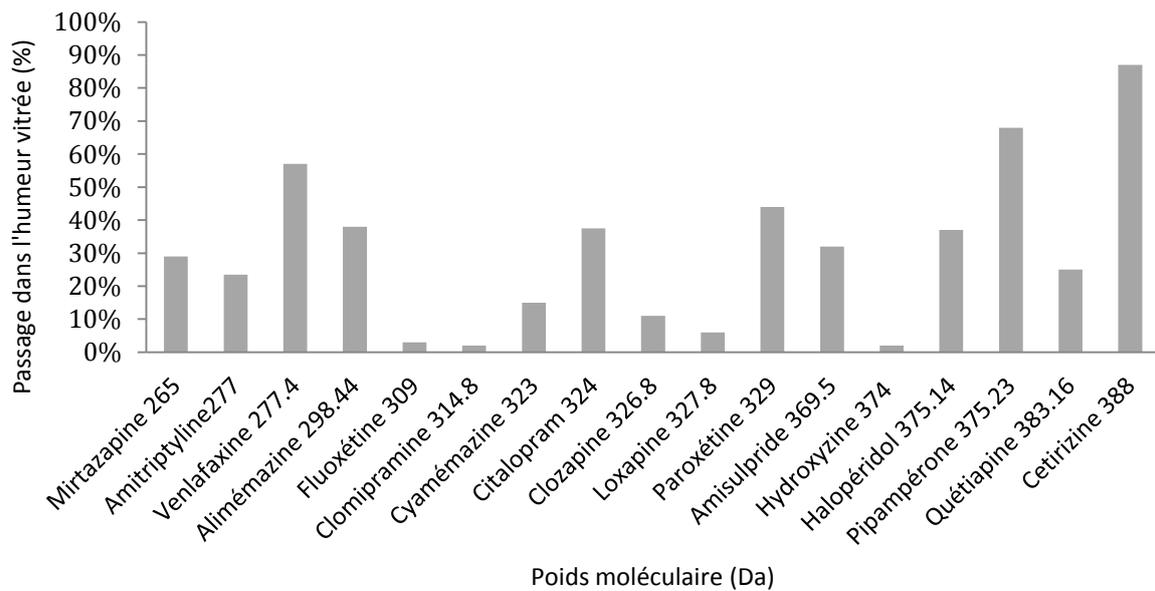


Figure 38 : Passage dans l'humeur vitrée selon le poids moléculaire pour les antidépresseurs et antipsychotiques

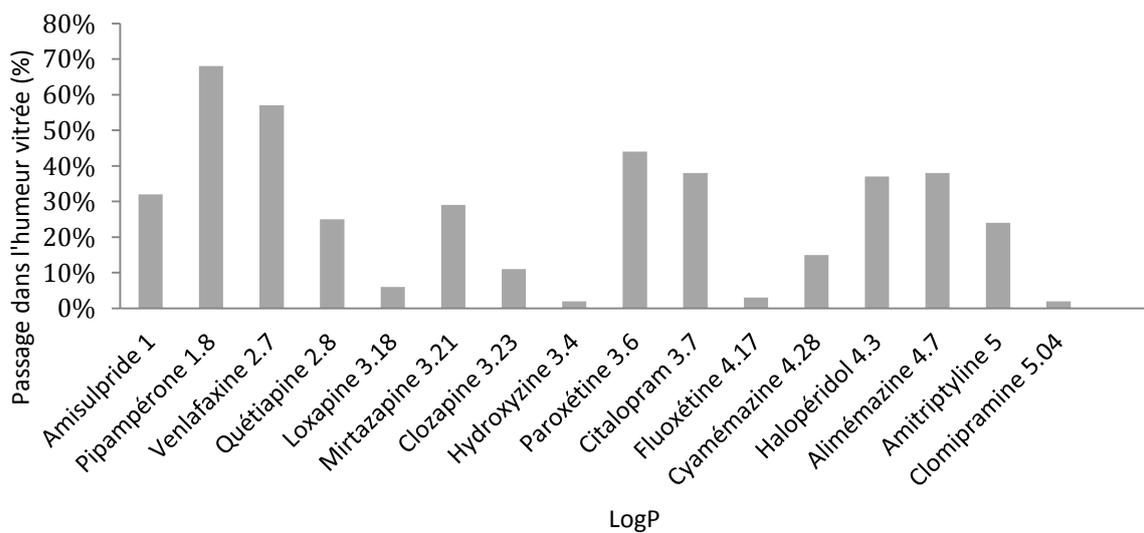


Figure 39 : Passage dans l'humeur vitrée selon le LogP pour les antidépresseurs et antipsychotiques

Le passage des molécules semble lié à la liaison protéique.

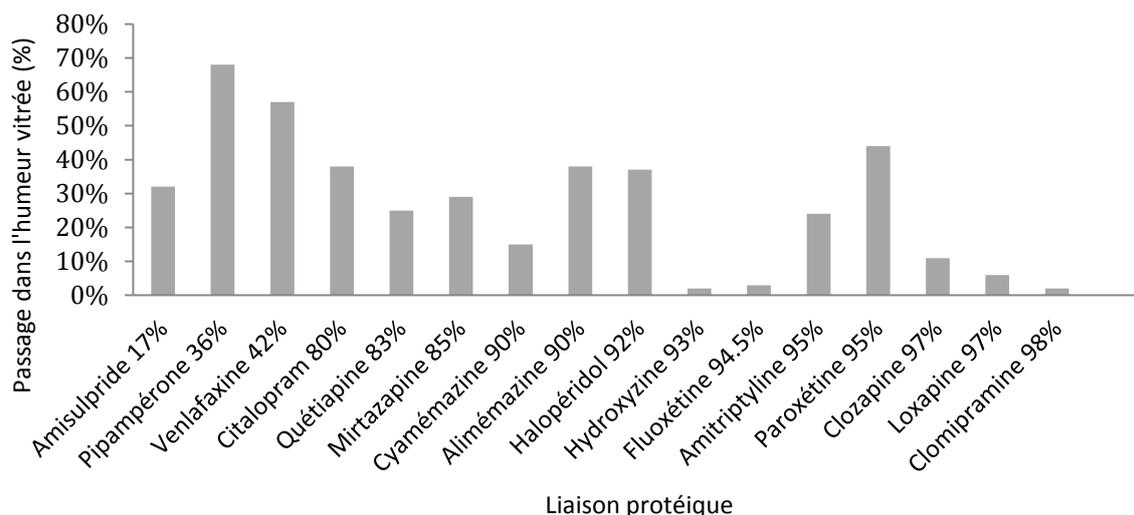


Figure 40 : Passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique pour les antidépresseurs et antipsychotiques

De façon générale, les différences physico-chimiques entre les molécules, les différences de posologie, de modalité de prise et les différences de délai entre le décès et les prélèvements ainsi que le faible nombre d'échantillons analysés pour certaines molécules telles que l'alimémazine ou la clomipramine font que les concentrations vitréennes sont difficilement interprétables et les ratios [molécule humeur vitrée]/ [molécule sang périphérique] extrêmement variables d'une molécule à une autre. D'une façon générale il existe peu de corrélation entre les concentrations vitréennes et sanguines périphériques postmortem.

VII-1-5. Autres xénobiotiques

De très nombreuses molécules sont retrouvées à la fois dans l'humeur vitrée et dans le sang périphérique lors des screenings réalisés. Notamment le paracétamol, la metformine ou l'amoxicilline sont retrouvés à la fois dans le sang et dans l'humeur vitrée. La quinine et ses dérivés ont été retrouvés dans plusieurs cas à la fois dans l'humeur vitrée et dans le sang périphérique. Il s'agit d'une petite molécule qui passe probablement bien la BHR de par ses caractéristiques chimiques et qui est facilement détectée lors des screenings réalisés. La présence de cette molécule dans le sang et l'humeur vitrée malgré l'absence de contexte d'infection à *Plasmodium* n'a pas été expliquée immédiatement. La molécule et ses dérivés provenaient de la consommation d'eau tonique [61]. Quelques molécules sont au contraire peu retrouvées dans l'humeur vitrée. C'est le cas pour l'amiodarone, les statines, le rivaroxaban, le pantoprazole, le kétoprofène. Les molécules non retrouvées dans l'humeur vitrée lors des screenings sont représentées sur le tableau ci-dessous avec certaines de leurs caractéristiques chimiques et sont comparées avec les caractéristiques chimiques de la morphine, molécule retrouvée dans 91 % des cas dans l'humeur vitrée et dans le sang périphérique.

Tableau 21 : Passage des xénobiotiques dans l'humeur vitrée selon les caractéristiques physico-chimiques

Molécule	Poids moléculaire	Liaison protéique	LogP	charge
Morphine	285	35%	0,89	1
Kétoprofène	254,09	99,5%	3,2	-1
Benserazide	257,26	Non liée	-3	0
Oybutinine	357	93%	4,4	1
Pantoprazole	383,37	98%	2,1	0
Tadalafil	389,14	94%	2,33	0
Amlodipine	408,14	97,50%	3	1
Spironolactone	416,57	98%	3,6	0
Nimodipine	418,44	95%	3,41	0
Losartan	422,9	99,70%	5,01	0
Rivaroxaban	435,06	95%	1,9	0
Sildenafil	474,57	96%	2,3	0
Loperamide	477	97%	5,5	1
Ceftriaxone	554,05	95%	-2	-1
Atorvastatine	558,64	98%	5,7	-1
Amiodarone	645,31	97%	7,6	1

Les propriétés physico-chimiques des molécules influencent leur passage à travers la BHR, ainsi que leur demi-vie dans l'humeur vitrée. Ainsi une forte liaison protéique, un logP négatif, une charge totale nulle peuvent être des facteurs limitant le passage des molécules à travers la BHR ou la demi-vie dans l'humeur vitrée.

Ces facteurs peuvent expliquer en partie pourquoi celles-ci, bien que présentes dans le sang ne sont pas retrouvées lors des screenings dans l'humeur vitrée malgré une grande sensibilité de la méthode utilisée.

Concernant les quantifications, la prégabaline et l'amisulpride ont été quantifiés à la fois dans le sang périphérique et l'humeur vitrée avec des ratios [molécule humeur vitrée]/[molécule sang périphérique] respectivement à 0,32 et 0,08. Le faible nombre d'échantillons contenant ces molécules ne permet pas d'interpréter ces résultats.

VII-1-6. Étude du passage des xénobiotiques étudiés selon leurs propriétés physico-chimiques

De nombreux paramètres influencent la diffusion des molécules à travers la BHR, et peuvent expliquer pourquoi certaines molécules ne sont pas ou peu retrouvées dans l'humeur vitrée.

Une faible concentration de la molécule dans le sang périphérique entraîne la plupart du temps une distribution limitée et un passage faible voire absent de la molécule à travers la BHR. Certaines propriétés physico-chimiques influencent également le passage et la demi-vie des xénobiotiques dans l'humeur vitrée.

Une forte liaison protéique ou un poids moléculaire élevé représentent une limitation au passage vers l'humeur vitrée pour certaines molécules. Holmgren et coll. ont déjà montré une corrélation significative entre le passage des molécules dans l'humeur vitrée et la liaison protéique [46]. Il apparaît ici que les molécules non retrouvées dans l'humeur vitrée sont de poids moléculaire > 300 kDa, avec une liaison protéique élevée > 94%.

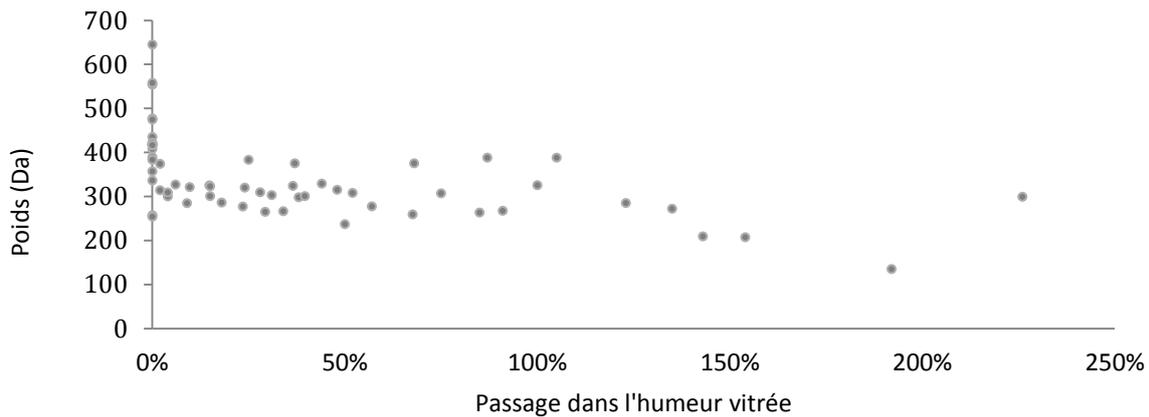


Figure 41 : Passage dans l'humeur vitrée en fonction du poids moléculaire

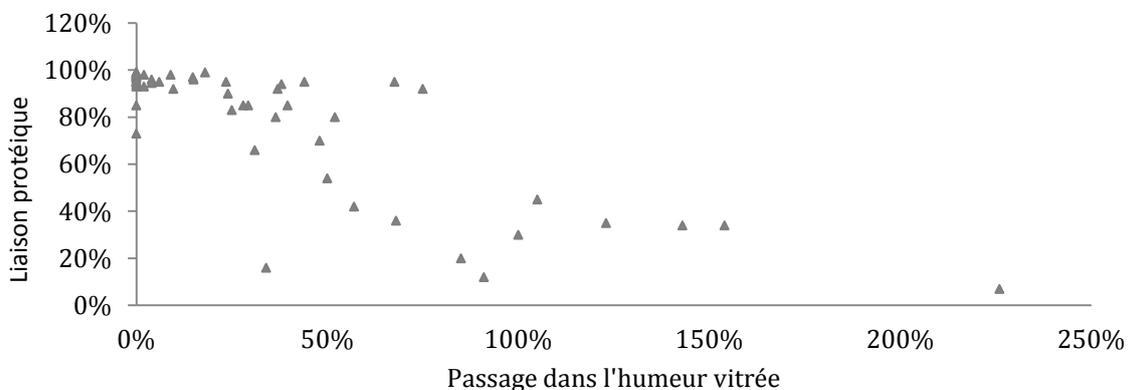


Figure 42 : passage dans l'humeur vitrée selon la liaison protéique

Les molécules liposolubles passent rapidement la BHR après liaison aux lipoprotéines qui la constituent [12], cependant l'humeur vitrée étant constituée à > 90 % d'eau, les molécules très lipophiles sont probablement moins retenues dans ce milieu. Cela explique pourquoi les molécules avec des logP > 3 sont moins présentes dans l'humeur vitrée. Les molécules hydrophiles dépendent d'un transport actif saturable [7]. Les molécules avec un logP négatif (benserazide, ceftriaxone) ne sont pas retrouvées dans l'humeur vitrée probablement par difficulté de diffusion à travers la bicouche lipidique constituant la membrane cytoplasmique.

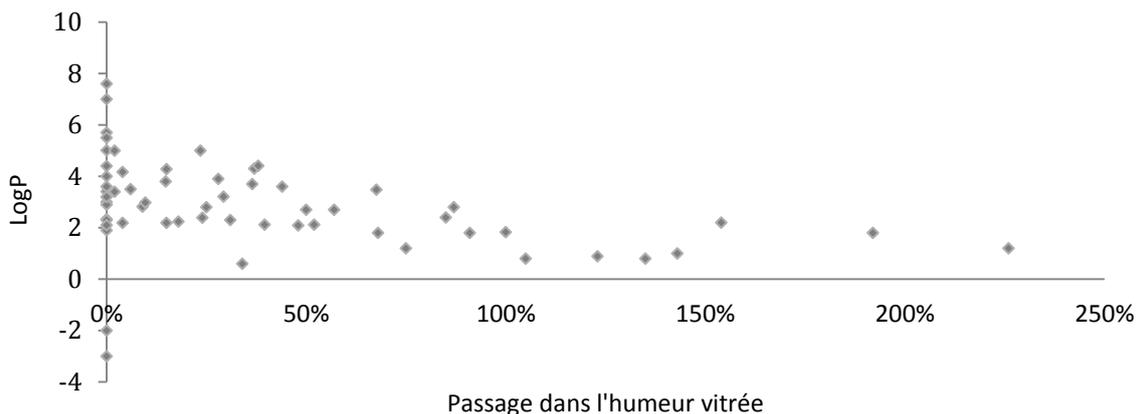


Figure 43 : Passage dans l'humeur vitrée en fonction du LogP

Les molécules ne passant pas dans l'humeur vitrée ont pour la majeure partie d'entre elles des charges nulles ou négatives. L'humeur vitrée est constituée essentiellement d'eau, mais également de GAG chargés négativement [7]. Les molécules chargées positivement seront plus retenues dans le milieu, comparativement aux molécules de charge nulles ou négatives. L'étude de Käs Dorf et coll. a mis en évidence qu'une digestion des GAG permettait de diminuer le phénomène de « trapping » existant pour les molécules ayant une charge globale positive [7].

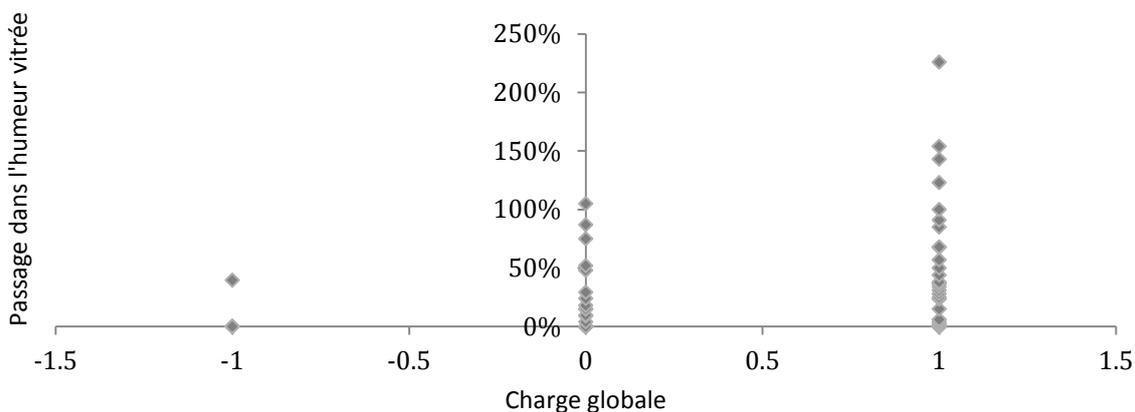


Figure 44 : Passage dans l'humeur vitrée en fonction de la charge globale

Une charge négative, un logP élevé ou négatif, un poids moléculaire important ou une forte liaison protéique sont des facteurs influençant négativement le passage des molécules à travers la BHR.

VII-1-7. Éthanol et éthylglucuronide dans le sang et dans l'humeur vitrée

La quantification de l'éthanol est depuis longtemps réalisée dans l'humeur vitrée. L'éthylglucuronide est issu du métabolisme non oxydatif de l'éthanol au niveau des hépatocytes. 30 échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique postmortem ont été quantifiés. La moyenne des concentrations en éthylglucuronide dans le sang périphérique postmortem était de 2046,6 ng/mL. Dans l'humeur vitrée, la moyenne des concentrations retrouvées était de 909,2 ng/mL. Dans la majeure partie des cas, les concentrations en éthylglucuronide dans l'humeur vitrée étaient plus faibles que les concentrations retrouvées dans le sang périphérique postmortem. Ces résultats concordent avec ceux issus d'autres études [62][63][64]. L'éthylglucuronide est un produit du métabolisme de l'éthanol et seul 0,1 % de l'éthanol ingéré se retrouve sous forme d'éthylglucuronide. L'humeur vitrée étant un milieu anatomiquement clos et isolé, il apparaît probable qu'un faible pourcentage de l'éthylglucuronide présent dans le sang périphérique parvient dans l'humeur vitrée. Deux cas retrouvaient de l'éthylglucuronide dans l'humeur vitrée alors que le prélèvement sanguin était négatif pour l'éthanol et l'éthylglucuronide et que le prélèvement d'humeur vitrée était négatif pour l'éthanol. L'éthylglucuronide est éliminé probablement moins rapidement dans l'humeur vitrée, du fait de la préservation de ce milieu des contaminations bactériennes. Selon l'étude de Baranowski et coll., l'éthylglucuronide pourrait être dégradé par certains micro-organismes notamment certaines entérobactéries comme *E. Coli* [65], bactéries qui prolifèrent à l'état de putréfaction [29]. 1 cas ne retrouvait pas d'éthanol dans le sang périphérique et dans l'humeur vitrée mais retrouvait de l'éthylglucuronide dans le sang périphérique et l'humeur vitrée. L'élimination plus lente de l'éthylglucuronide en fait un marqueur d'intérêt en toxicologie médico légale comme en attestent les études réalisées dans le sang périphérique postmortem [66] [67] [68]. Son accumulation en cas de consommation répétée d'alcool permet d'obtenir une fenêtre de détection large, jusqu'à 36h après l'élimination complète de l'éthanol [36]. Il s'agit d'un métabolite relativement stable et dont l'élimination est plus lente que l'éthanol. Trois cas retrouvaient une éthanolémie inférieure à 0,3 g/L avec une éthanolémie négative dans l'humeur vitrée et l'absence d'éthylglucuronide dans le sang et l'humeur vitrée. Ces résultats sont en faveur d'une production d'éthanol par la flore microbienne présente dans le sang périphérique en postmortem. Trois cas retrouvaient une éthanolémie et une quantification d'éthylglucuronide négatives dans le sang périphérique postmortem et l'humeur vitrée attestant de l'absence de consommation d'éthanol dans les heures précédant le décès mais également de l'absence de production d'éthanol par la flore microbienne. La relation entre les concentrations en éthylglucuronide dans le sang et dans l'humeur vitrée est relativement linéaire avec un $r = 0,88$. L'humeur vitrée apparaît comme un milieu d'intérêt dans la quantification de l'éthylglucuronide. En effet, prélevé sur un tube contenant du fluorure de sodium, le milieu est stable et permet de rechercher une consommation d'alcool avant le décès lorsque l'éthanolémie est négative et lorsque le contexte est évocateur (alcoolisme chronique, notion d'alcoolisation avant le décès). L'étude de l'éthylglucuronide dans l'humeur vitrée permet également, en cas d'éthanolémie faible dans le sang périphérique, de faire la différence entre une consommation d'alcool antérieure au décès et une production d'éthanol due à une prolifération microbienne postmortem.

VII-2. Discussion : résultats qualitatifs et quantitatifs des marqueurs biochimiques dans le sang et dans l'humeur vitrée

VII-2-1. Myoglobine

La myoglobine est une métalloprotéine présente dans le tissu musculaire. Bien que présente au niveau du muscle cardiaque, la myoglobine est également présente dans de nombreux autres tissus musculaires notamment dans les muscles squelettiques.

Concernant le groupe 1, la moyenne d'âge était de 55,45 ans.

Les quantifications de myoglobine dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 70,4 µg/L.

Les valeurs variaient entre < 15 Et 252 µg/L.

Concernant le groupe 2, la moyenne d'âge était de 59,1 ans.

Les taux de myoglobine dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 496,5 µg/L.

Les valeurs variaient entre 16 Et 2800 µg/L. Dans l'ensemble, les valeurs de myoglobine étaient plus élevées dans le groupe 2 que dans le groupe 1. Cependant, plusieurs cas diagnostiqués décès par ischémie cardiaque avaient un dosage de myoglobine du même ordre de grandeur que certains cas du groupe 1. La myoglobine est peu spécifique du muscle cardiaque et l'élévation du taux de myoglobine dans l'humeur vitrée peut être le reflet d'une simple lyse des cellules musculaires squelettiques. Dans l'étude menée, bien que certains décès ne soient pas dus à un infarctus du myocarde, la myoglobine quantifiée est dans certains cas plus élevée que dans les décès diagnostiqués d'origine cardiaque. Ces résultats peuvent être dus à un délai important entre le décès et la réalisation des prélèvements autopsique ou dus à la cause du décès. Dans certains cas du groupe 2, les taux de myoglobine sont peu élevés. En cas d'infarctus du myocarde, le taux de myoglobine atteint sa valeur maximale près de 9 h après l'ischémie cardiaque. Les taux peu élevés de myoglobine dans le groupe 2 peuvent être le reflet d'une ischémie cardiaque récente et d'un décès rapide, ne permettant pas l'augmentation du taux de myoglobine dans l'humeur vitrée. Le taux de myoglobine dans l'humeur vitrée semble peu spécifique d'un décès par ischémie cardiaque. La valeur de la myoglobine ne doit pas être interprétée de façon isolée mais doit être associée avec les valeurs d'autres marqueurs d'ischémie cardiaque [69].

VII-2-2. CK

Les CK sont présents au niveau musculaire et cardiaque.

Concernant le groupe 1, la moyenne d'âge était de 55,45 ans. Les résultats du dosage des CK dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 156,4 UI/L. Les valeurs variaient entre < 7 Et 340 UI/L. Concernant le groupe 2, la moyenne d'âge était de 48,2 ans. Les résultats du dosage des CK dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 1415,4 UI/L. Les valeurs variaient entre 64 Et 12000 UI/L. Dans l'ensemble, les valeurs des CK étaient plus élevées dans le groupe 2 que dans le groupe 1. Dans 7 cas issus du groupe 2, les valeurs des CK étaient supérieures à 200 UI/L avec des valeurs allant jusqu'à 1324 UI/L. Ces valeurs reflètent bien une souffrance myocardique, mais doivent être interprétées avec précaution et en fonction du délai écoulé entre le décès et la réalisation des prélèvements et sont concordants avec les données issues d'autres études [69]. Dans le groupe 2, 4 cas présentent des taux < 200 UI/L (sexe masculin) dans l'humeur vitrée. Il est possible que l'absence de passage des CK dans l'humeur vitrée soit due à la rapidité du décès. Dans le groupe 1, 3 cas présentaient des taux de CK > 200 UI/L (sexe masculin), un délai important entre le décès et la réalisation des prélèvements peut expliquer ces résultats. De plus, Qi Wang et coll. décrivent des valeurs de CK plus élevées lorsque les décès sont d'origine cardiaque, mais ces valeurs peuvent également être élevées en cas d'hypothermie ou d'autres causes de décès [41]. Les CK sont peu spécifiques du muscle cardiaque et peuvent être élevés dans de nombreuses situations avec une lyse des cellules musculaires, le dosage des CK-MB est plus spécifique du tissu cardiaque [70].

VII-2-3. NT pro BNP

Le peptide natriurétique B est excrété par les myocytes ventriculaires lorsque la tension exercée sur les cellules augmente. Le NT pro BNP est produit de façon équimolaire. Ces marqueurs sont des marqueurs utilisés en antemortem pour le diagnostic et le suivi de l'insuffisance cardiaque systolique.

Concernant le groupe 1, la moyenne d'âge était de 55,45 ans. Les résultats du dosage des NT pro BNP dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 81,4 ng/mL. Les valeurs variaient entre 25 Et 159 ng/mL.

Concernant le groupe 2, la moyenne d'âge était de 44,43 ans. Les quantifications des NT pro BNP dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 159,3 ng/mL. Les valeurs variaient entre 84 Et 294 ng/mL. Dans l'ensemble, les valeurs des NT pro BNP étaient plus élevées dans le groupe 2 que dans le groupe 1. Dans l'étude de Rafael Bañón González et coll, les NT pro BNP mesurés dans l'humeur vitrée sont plus élevés dans les décès après infarctus du myocarde ce qui concorde avec les résultats obtenus [70]. D'après les études réalisées sur l'humeur vitrée et le sang périphérique postmortem, les NT pro BNP semblent être un marqueur intéressant dans les décès après un infarctus du myocarde [42] [71-73].

Cependant les valeurs de NT pro BNP peuvent être augmentés en fonction de l'âge, de pathologies cardiaques chroniques mais également varier selon les traitements pris (IEC,

ARA...)). Nous n'avons aucune information sur les traitements antérieurs ou les antécédents. L'âge des cas inclus était en moyenne de 44,43 ans, soit des sujets jeunes.

VII-2-4. Copeptine

À notre connaissance il s'agit de la première étude réalisée concernant le dosage de la copeptine dans l'humeur vitrée en postmortem.

La copeptine est avant tout un marqueur de stress libéré par l'hypophyse. Elle est utilisée couplée à la valeur de la troponine pour infirmer un infarctus du myocarde lorsqu'un tableau clinique est évocateur.

Concernant le groupe 1, la moyenne d'âge était de 53,9 ans.

Les résultats du dosage de copeptine dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 4,7 $\mu\text{mol/L}$. Les valeurs variaient entre 3,4 Et 5,9 $\mu\text{mol/L}$.

Concernant le groupe 2, la moyenne d'âge était de 45,44 ans.

Les résultats du dosage de copeptine dans l'humeur vitrée étaient en moyenne de 9,4 $\mu\text{mol/L}$. Les valeurs variaient entre 5,5 Et 20 $\mu\text{mol/L}$.

Dans l'ensemble, les valeurs de copeptine dans l'humeur vitrée étaient plus élevées dans le groupe 2 que dans le groupe 1.

Malgré le faible nombre de cas inclus, le dosage de la copeptine, couplée à celui d'autres marqueurs d'ischémie cardiaque, pourrait s'avérer intéressant dans le diagnostic d'infarctus du myocarde en postmortem. Il s'agit toutefois d'un marqueur non spécifique du muscle cardiaque et sa valeur pourrait être augmentée dans certains cas (agonie longue, délai élevé entre le décès et la réalisation des prélèvements autopsiques...). Il n'y a, à notre connaissance, aucune étude sur l'intérêt de ce marqueur en postmortem. Une étude avec un plus grand nombre de cas inclus pourrait être intéressante.

VII-2-5. Troponine T hs

L'ensemble des prélèvements d'humeur vitrée réalisés retrouvaient une troponine T hs < 0,014 $\mu\text{g/L}$. La troponine est une molécule de 37 kDa et de par sa masse moléculaire, il est probable qu'elle ne puisse franchir la BHR. Effectivement, aucun des prélèvements d'humeur vitrée réalisés dans le groupe 2 n'a pu retrouver de la troponine T hs. Ces données sont concordantes avec l'étude menée par Rafael Bañón González et coll., qui est à notre connaissance la seule étude réalisée sur ce sujet [70].

VIII. Conclusion

De nombreux paramètres influencent la diffusion des molécules à travers la BHR, et peuvent expliquer les variations entre les concentrations sanguines postmortem et les concentrations dans l'humeur vitrée.

L'étude menée est à notre connaissance la première étude évaluant l'intérêt des screenings par méthode ULC-HRMS avec détecteur par temps de vol, dans l'humeur vitrée comparativement au sang périphérique sur une population autopsique. Sur l'ensemble des échantillons analysés, en moyenne 92% des molécules mères présentes dans le sang périphérique sont retrouvées dans l'humeur vitrée. Les rares cas où la molécule est retrouvée dans le sang périphérique mais non dans l'humeur vitrée sont des cas pour lesquels les concentrations sanguines sont inférieures à la LOQ, ou des cas avec des molécules ayant des propriétés physico-chimiques particulières ne permettant pas le passage de la BHR. La réalisation de screenings larges sur l'humeur vitrée est une alternative intéressante dans les cas où le sang périphérique n'est pas prélevable.

Concernant l'étude quantitative, bien que les concentrations vitréennes donnent un aperçu de la concentration sanguine d'un xénobiotique, il apparaît difficile d'établir une corrélation entre les concentrations présentes dans ces deux milieux. Néanmoins, de nombreuses molécules présentent des corrélations moyennes voire élevées entre les concentrations sanguines périphériques et vitréennes. Il existe trop de paramètres physiologiques et physicochimiques différents entrant en jeu pour pouvoir déterminer grâce à la formule brute d'une molécule sa diffusion dans l'humeur vitrée.

La quantification de l'éthylglucuronide dans l'humeur vitrée représente un intérêt lors de la recherche d'alcoolisation antemortem. La stabilité du milieu et notamment l'absence de prolifération microbienne entraînent une dégradation de l'éthylglucuronide plus lente dans l'humeur vitrée que dans le sang périphérique, permettant même lorsque l'éthanolémie est négative, de diagnostiquer une consommation d'alcool avant le décès.

Concernant les marqueurs d'ischémie cardiaque dans l'humeur vitrée, l'étude réalisée est en faveur du dosage des NT pro BNP et des CK lors de cas évocateurs d'ischémie myocardique. Cette étude est à notre connaissance, la première étude concernant le dosage de la copeptine dans l'humeur vitrée dans une population autopsique. L'augmentation d'un tel marqueur dans l'humeur vitrée en postmortem est dans l'état actuel des connaissances difficilement interprétable. Couplé à d'autres marqueurs d'ischémie cardiaque, ce marqueur semble avoir un intérêt. Une étude incluant un plus grand nombre de cas et comparant les valeurs de la copeptine vitréenne avec les valeurs plasmatiques pourrait être intéressante.

L'humeur vitrée reste un milieu peu étudié, cependant, son rôle dans la recherche des causes de la mort tant au niveau biochimique que toxicologique n'est pas à négliger.

IX. Références

- [1] Sebag J. Anatomie et physiologie du vitré et de l'interface vitréorétinienne. In: Encyclopedie Chirurgicale et Medicale. Ophtalmologie. Paris: Elsevier Masson; 2008; p21.
- [2] Harper D.R. A comparative study of the microbiological contamination of postmortem blood and vitreous humour samples taken for ethanol determination. *Forensic Sci Int* 1989; 43(1): 37-44.
- [3] Formation Nantaise et Recherche en Ophtalmologie. Anatomie de l'Œil : vitré et milieux transparents; 2006 [Document consulté sur le site: http://www.fnro.net/ophtalmologie/Anatomie/AnatOE_Vitre/AnatOE_Vitre.html le 12 septembre 2018].
- [4] Bishop P.N. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog retinal eye res* 2000; 19(3): 323-344.
- [5] Digital world medical school. Eye anatomy; 2017 [Document consulté sur le site : <https://www.digital-world-medicalschool.net/01.%20Medical%20School/1.%201st/08.%20Regional%20Gross%20Anatomy/01.%20Head/04b.%20Orbit/02.%20Eye.html> le 12 septembre 2018].
- [6] Mouillon M, Bru MM. Anatomie de l'angle iridocornéen. *Encycl Méd Chir* 2000; 21-003.
- [7] Käs Dorf BT, Arends F, Lieleg O. Diffusion regulation in the vitreous humor. *Biophys J* 2015;109(10): 2171-2181.
- [8] Gall Y. Acide hyaluronique: structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. In : *Annales de dermatologie et de venerologie*. Paris: Elsevier Masson; 2010. p. 30-39.
- [9] Gobeaux F. Phases denses de collagène de type 1: transition isotrope/cholesterique, fibrillogenèse et minéralisation. 2007. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- [10] Peyman GA., Khoobehi B, Tawakol MAGDY et coll. Intravitreal injection of liposome-encapsulated ganciclovir in a rabbit model. *Retina-J Ret Vit Dis* 1987; 7: 227-229.
- [11] Kuppermann BD, Quiceno JI, Aguilar MF et coll. Intravitreal ganciclovir concentration after intravenous administration in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis: implications for therapy. *J Infect Dis* 1993; 168(6): 1506-1509.
- [12] Patte M, Sillaire I, Pauchard E et coll. Barrières hémato-oculaires. *Physiologie*. In: *Ophtalmologie*. Paris: Elsevier; 2006.
- [13] Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C et coll. Analyse des xénobiotiques dans l'humeur vitrée en toxicologie médico-légale: revue de la littérature. *Rev Med Leg* 2016;7(4):153-179.
- [14] Pitkänen L, Ranta VP, Moilanen H et coll. Permeability of Retinal Pigment Epithelium: Effects of Permeant Molecular Weight and Lipophilicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:641-646.
- [15] Xu J, Heys J, Barocas V et coll. Permeability and diffusion in vitreous humor: implications for drug delivery. *Pharm res* 2000; 17: 664-669.
- [16] Maurice D. Practical issues in intravitreal drug delivery. *J Ocul Pharmacol th* 2001;17(4): 393-401.
- [17] Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv drug deliver rev* 2006; 58(11): 1131-1135.
- [18] De Letter EA, Clauwaert KM, Belpaire FM et coll. Post-mortem redistribution of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA," ecstasy") in the rabbit. *Int j med leg* 2002; 116(4): 216-224.
- [19] Coe J. Vitreous potassium as a measure of the postmortem interval: an historical review and critical evaluation. *Forensic sci int* 1989; 42(3): 201-213.
- [20] Camba A, Lendoiro E, Cordeiro C et coll. High variation in hypoxanthine determination after analytical treatment of vitreous humor samples. *Forensic sci med* 2014; 10(4):627-633.
- [21] Munoz JI, Costas E, Rodríguez-Calvo MS et coll. A high-performance liquid chromatography method for hypoxanthine determination in vitreous humour: application to estimation of post mortem interval. *Human exp toxicol* 2006; 25(5):279-281.

- [22] Barús JIM, Suárez-Peñaranda JM, Otero XL et coll. Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging. *Forensic sci int* 2002; 125(1):67-74.
- [23] Palmiere C, Mangin P. Urea nitrogen, creatinine, and uric acid levels in postmortem serum, vitreous humor, and pericardial fluid. *Int j med leg* 2015; 129(2):301-305.
- [24] Palmiere C, Bardy D, Letovanec I et coll. Biochemical markers of fatal hypothermia. *Forensic sci int* 2013; 226(13):54-61.
- [25] Pecllet C, Picotte P, Jobin F. The use of vitreous humor levels of glucose, lactic acid and blood levels of acetone to establish antemortem hyperglycemia in diabetics. *Forensic sci int* 1994;65(1): 1-6.
- [26] Pelander A, Ristimaa J, Ojanperä I. Vitreous Humor as an Alternative Matrix for Comprehensive Drug Screening in Postmortem Toxicology by Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol* 2010; 34(6):312-318.
- [27] Coquerel A, Lemaire-Hurtel AS. Devenir d'un xénobiotique dans l'organisme. In: *Traité De Toxicologie Médico-judiciaire*. Paris: Elsevier; 2012.p.3-49.
- [28] Faculté de médecine CHUPS Jussieu. Pharmacologie. Pharmacocinétique; 2006. [Document consulté sur le site: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/Pharmaco.pdf> le 13 septembre 2018.]
- [29] Pélissier-Alicot AL. La redistribution post mortem: état des lieux en 2016. *Toxicol Ana Clin* 2016; 28(2): 103-114.
- [30] Brunet B, Pélissier-Alicot AL. Redistribution post mortem. In: *Traité de toxicologie médico-judiciaire*. Paris: Elsevier; p.51-62.
- [31] Cours de Médecine légale. Polycopié de médecine légale. Thanatologie; 2010. [Document consulté sur le site: <https://medecinelegale.wordpress.com/cours-polycopies-de-medecine-legale-2/> le 13 septembre 2018].
- [32] Høiseth G, Karinen R, Christophersen A et coll. Practical use of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in postmortem cases as markers of antemortem alcohol ingestion. *Int J Legal Med* 2010; 124(2):143-148.
- [33] Pounder DJ. The nightmare of postmortem drug changes. *Leg Med* 1993; 163-191.
- [34] Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Sci Int* 2007. 165(1): 10-29.
- [35] Morel I, Anger JP. Alcool éthylique et éthylisme. In: *Traité de toxicologie médico judiciaire*. Paris: Elsevier ; 2012.p.279-297.
- [36] Gicquel T, Lepage S, Morel I. Ethylglucuronide et éthylsulfate, marqueurs biologiques de la consommation d'alcool. *Rev Francoph Lab* 2016; 479:69-74.
- [37] Jackowski C, Schwendener N, Grabherr S et coll. Post-Mortem Cardiac 3-T Magnetic Resonance Imaging: Visualization of Sudden Cardiac Death? *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(7):617-629.
- [38] Ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN et coll. Cardiac Troponins I and T Are Biological Markers of Left Ventricular Dysfunction in Septic Shock. *Clin Chem* 2000; 46(5): 650-657.
- [39] Nickel CH, Bingisser R, Morgenthaler NG. The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department. *BMC Med* 2012; 10:7.
- [40] Christ-Crain M, Fenske W. Copeptin in the diagnosis of vasopressin-dependent disorders of fluid homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(3):168.
- [41] Wang Q, Michiue T, Ishikawa T. Combined analyses of creatine kinase MB, cardiac troponin I and myoglobin in pericardial and cerebrospinal fluids to investigate myocardial and skeletal muscle injury in medicolegal autopsy cases. *Leg Med* 2011; 13(5):226-232.
- [42] Sabatasso S, Vaucher P, Augsburg M et coll. Sensitivity and specificity of NT-proBNP to detect heart failure at post mortem examination. *Int J Legal Med* 2011; 125(6):849-856.
- [43] Cina SJ, Thompson WC, Fischer JR et coll. A study of various morphologic variables and troponin I in pericardial fluid as possible discriminators of sudden cardiac death. *Am. J. Foren Med Path* 1999; 20(4): 333-337.

- [44] Robertson MD, Drummer OH. Postmortem Distribution and Redistribution of Nitrobenzodiazepines in Man . J Forensic Sci 1998; 43(1):9-13.
- [45] Bévalot F. Intérêts et limites de la bile et de l'humeur vitrée comme matrices alternatives en toxicologie médico-légale. Thèse Université Claude Bernard - Lyon I; 2014.
- [46] Holmgren P, Druid H, Holmgren A et coll. Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. Journal of Forensic Sci 2004; 49(4):1-6.
- [47] Pearson J, Saady J. Utility of vitreous humor in investigations of heroin-related deaths. J Anal Toxicol 2003; 27(3): 199.
- [48] Scott K, Oliver J. Vitreous Humor as an Alternative Sample to Blood for the Supercritical Fluid Extraction of Morphine and 6-Monoacetylmorphine .Med Sci Law 1999; 39(1):77-81.
- [49] Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. Vitreous Fluid Quantification of Opiates, Cocaine, and Benzoylcegonine: Comparison of Calibration Curves in Both Blood and Vitreous Matrices with Corresponding Concentrations in Blood. J Anal Toxicol 2007; 31(8): 469-476.
- [50] Mackey-Bojack S, Kloss J, Apple F. Cocaine, Cocaine Metabolite, and Ethanol Concentrations in Postmortem Blood and Vitreous Humor. J Anal Toxicol 2000; 24(1): 59-65.
- [51] Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. Relationships Between Concentrations of Cocaine and Its Hydrolysates in Peripheral Blood, Heart Blood, Vitreous Humor and Urine. J Forensic Sci 2006; 51(2):421-425.
- [52] Sturner WQ, Garriott JC. Comparative toxicology in vitreous humor and blood. Forensic Sci 1975; 6(1): 31-39.
- [53] Rees KA, Pounder DJ, Osselton MD. Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humor in heroin/morphine-related deaths. Forensic Sci Int 2013; 226(1):152-159.
- [54] Ziminski KR, Wemyss CT, Bidanset JH et coll. Comparative study of postmortem barbiturates, methadone, and morphine in vitreous humor, blood, and tissue. J Forensic Sci 1984; 29(3):903-909.
- [55] Couper F, Choppra K, Pierre-Louis MLY. Fatal methadone intoxication in an infant. Forensic sci int 2005; 153(1):71-73.
- [56] Brunet B, Mura P. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale : revue de la littérature et applications. Ann Toxicol Anal 2012; 24(1): 9-15.
- [57] Wyman J, Bultman S. Postmortem Distribution of Heroin Metabolites in Femoral Blood, Liver, Cerebrospinal Fluid, and Vitreous Humor. J Anal Toxicol 2004; 28(4):260-263.
- [58] Lewis RJ, Ritter RM, Johnson RD et coll. Postmortem Concentrations of Tramadol and O-Desmethyltramadol in 11 Aviation Accident Fatalities. Aerospace AM 2010; 10:12.
- [59] Pélissier-Alicot AL, Gaulier JM, Dupuis C, et coll. Post-mortem redistribution of three beta-blockers in the rabbit. Int J Legal Med 2006; 120(4):226-232.
- [60] Padrini L, Isacchi B, Bilia AR et coll. Pharmacokinetics and local safety profile of propranolol eye drops in rabbits. Pediatr res 2014; 76(4):378.
- [61] Sauvageon Y, Mura P, Dupuis N et coll. Eau tonique ou traitement par quinine, what did you expect? Tox Anal Clin 2018; 30(3):189-194.
- [62] Keten A, Tumer AR, Balseven-Odabasi A. Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography–mass spectrometry . Forensic Sci Int 2009; 193(1): 101-105.
- [63] Thierauf A, Kempf J, Perdekamp MG et coll. Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death. Forensic sci int 2011; 210(1):63-68.
- [64] Rainio J, Kultti J, Kangastupa P et coll. Immunoassay for ethyl glucuronide in vitreous humor: a new tool for postmortem diagnostics of alcohol use. Forensic sci int 2013; 226(1): 261-265.
- [65] Baranowski S, Serr A, Thierauf A et coll. In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. Int J Legal Med 2008, 122(5):389-393.
- [66] Høiseth G, Karinen R, Christophersen AS et coll. A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. Forensic Sci Int 2007; 165(1):41-45.
- [67] Høiseth G, Bernard JP, Karinen R et coll. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. Forensic Sci Int 2007; 172(2-3):119-124.

- [68] Politi L, Morini L, Mari F et coll. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med* 2008; 122(6):507-509.
- [69] Osuna E, Perez MC, Jakobsson SW et coll. Biochemical and morphological markers in the post mortem diagnosis of ischemic heart distress. *Acta Med Leg Soc* 1990; 40:275-283.
- [70] Bañón González R, Escayola EN, Noguera Velasco JA et coll. Utilidad de la determinación de troponina T, CK-MB, NT-proBNP y mioglobina en humor vítreo en autopsias forenses. *Rev Esp Med Leg* 2008; 34(1):18-24.
- [71] Chen JH, Inamori-Kawamoto O, Michiue Tet coll. Cardiac biomarkers in blood, and pericardial and cerebrospinal fluids of forensic autopsy cases: A reassessment with special regard to postmortem interval. *Leg Med Tokyo Jpn* 2015; 17(5):343-350.
- [72] Palmiere C, Mangin P. Postmortem chemistry update part II. *Int J Legal Med* 2012; 126(2):199-215.
- [73] Michaud K, Augsburg M, Donzé N et coll. Evaluation of postmortem measurement of NT-proBNP as a marker for cardiac function. *Int J Legal Med* 2008; 122(5):415-420.

Résumé

L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de l'humeur vitrée comme matrice alternative lors de la recherche des causes de la mort.

La première partie de l'étude présente les caractéristiques anatomiques et physiologiques de l'humeur vitrée et du sang périphérique, ainsi que les mécanismes de diffusion ante et post mortem et les données de pharmacocinétique. Les principaux marqueurs biochimiques et toxicologiques étudiés sont également présentés.

La seconde partie décrit l'étude expérimentale mise en place sur une population autopsique. Des screenings par méthode ULC-HRMS avec détection par temps de vol ont été réalisés sur 252 échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique post mortem. Des quantifications ont été réalisées selon les molécules retrouvées lors des screenings. Les résultats qualitatifs et quantitatifs du sang périphérique et de l'humeur vitrée ont été comparés. Une étude quantitative sur l'éthylglucuronide a également été menée sur 30 échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique. Les résultats des quantifications des principaux marqueurs d'ischémie cardiaque sont également présentés. 27 échantillons autopsiques d'humeur vitrée ont permis de quantifier les CK, les NT pro BNP, la myoglobine et la copeptine. L'humeur vitrée est une bonne matrice alternative pour la recherche qualitative de xénobiotiques. Il s'agit d'un milieu stable, peu sujet aux remaniements post mortem et aux contaminations bactériennes. Ainsi, la réalisation de screenings par méthode ULC HRMS permet de mettre en évidence la plupart des molécules présentes dans le sang périphérique. Certaines molécules comme la 6 MAM ou l'éthylglucuronide ont des cinétiques d'élimination retardée dans l'humeur vitrée du fait notamment de l'absence d'estérases dans ce milieu. Il apparaît cependant difficile d'établir une corrélation entre les concentrations sanguines et vitréennes notamment pour certaines classes de molécules comme les antidépresseurs. De nombreux paramètres tels que le poids moléculaire, la charge, la liposolubilité, la liaison protéique et les modalités de prise des xénobiotiques influencent les concentrations vitréennes et sanguines. Concernant les marqueurs d'ischémie cardiaque, l'étude de l'ensemble de marqueurs, associées aux données de l'autopsie permettent d'orienter vers un décès dû à une ischémie cardiaque.

Mots clés : éthylglucuronide, humeur vitrée, ischémie cardiaque, quantification, sang périphérique, screening ULC-HRMS.



UNIVERSITE DE POITIERS



Faculté de Médecine et de
Pharmacie

SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !



Résumé

L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de l'humeur vitrée comme matrice alternative lors de la recherche des causes de la mort.

La première partie de l'étude présente les caractéristiques anatomiques et physiologiques de l'humeur vitrée et du sang périphérique, ainsi que les mécanismes de diffusion ante et post mortem et les données de pharmacocinétique. Les principaux marqueurs biochimiques et toxicologiques étudiés sont également présentés.

La seconde partie décrit l'étude expérimentale mise en place sur une population autopsique. Des screenings par méthode ULC-HRMS avec détection par temps de vol ont été réalisés sur 252 échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique post mortem. Des quantifications ont été réalisées selon les molécules retrouvées lors des screenings. Les résultats qualitatifs et quantitatifs du sang périphérique et de l'humeur vitrée ont été comparés. Une étude quantitative sur l'éthylglucuronide a également été menée sur 30 échantillons d'humeur vitrée et de sang périphérique. Les résultats des quantifications des principaux marqueurs d'ischémie cardiaque sont également présentés. 27 échantillons autopsiques d'humeur vitrée ont permis de quantifier les CK, les NT pro BNP, la myoglobine et la copeptine. L'humeur vitrée est une bonne matrice alternative pour la recherche qualitative de xénobiotiques. Il s'agit d'un milieu stable, peu sujet aux remaniements post mortem et aux contaminations bactériennes. Ainsi, la réalisation de screenings par méthode ULC HRMS permet de mettre en évidence la plupart des molécules présentes dans le sang périphérique. Certaines molécules comme la 6 MAM ou l'éthylglucuronide ont des cinétiques d'élimination retardée dans l'humeur vitrée du fait notamment de l'absence d'estérases dans ce milieu. Il apparaît cependant difficile d'établir une corrélation entre les concentrations sanguines et vitréennes notamment pour certaines classes de molécules comme les antidépresseurs. De nombreux paramètres tels que le poids moléculaire, la charge, la liposolubilité, la liaison protéique et les modalités de prise des xénobiotiques influencent les concentrations vitréennes et sanguines. Concernant les marqueurs d'ischémie cardiaque, l'étude de l'ensemble de marqueurs, associées aux données de l'autopsie permettent d'orienter vers un décès dû à une ischémie cardiaque.

Mots clés : éthylglucuronide, humeur vitrée, ischémie cardiaque, quantification, sang périphérique, screening ULC-HRMS.