

Biochimie thanatologique : ses apports au diagnostic de décès par hypothermie

Thanatobiochemistry: its contribution to the diagnosis of hypothermia fatalities

Guillaume Rousseau^{1,2}
Clotilde Rougé-Maillart³
Hugo Alarcán⁴
Guillaume Drevin⁵
Alexia Gaconnet²
Pascal Reynier¹
Pauline Saint-Martin⁶
Camille Rérolle⁶

¹ Département de biochimie et génétique, Centre hospitalier universitaire d'Angers, Angers, France

² Service de médecine légale et pénitentiaire, Centre hospitalier universitaire d'Angers, Angers, France

³ GEROM-LHEA, IRIS-IBS Institut de biologie en santé, Centre hospitalier universitaire d'Angers, Angers, France

⁴ Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Centre hospitalier régional universitaire de Tours, Hôpital Trousseau, Chambray-lès-Tours, France

⁵ Laboratoire de toxicologie, Centre hospitalier universitaire d'Angers, Angers, France

⁶ Service de médecine légale, Centre hospitalier régional universitaire de Tours, Hôpital Trousseau, Chambray-lès-Tours, France

Article reçu le 23 novembre 2018,
accepté le 17 septembre 2019

L'observation

Le corps d'un homme de 82 ans a été découvert nu à son domicile en février. Au moment de la découverte, toutes

Correspondance G. Rousseau
<guillaume.rousseau@chu-angers.fr>

Résumé. L'hypothermie est une pathologie potentiellement létale dont le diagnostic *in vivo* est relativement simple, reposant sur le constat d'une température corporelle inférieure à 35 °C. Son diagnostic *post mortem* est quant à lui beaucoup plus complexe du fait d'une décroissance thermique survenant systématiquement après le décès, laquelle rend le plus souvent ininterprétable la température corporelle comme argument diagnostique d'une hypothermie. De plus, aucun des éléments autopsiques macroscopiques ou microscopiques décrits comme suspects d'hypothermie n'est pathognomonique d'un décès par hypothermie. Actuellement, ce diagnostic se pose à la lumière d'un faisceau d'arguments concordants incluant ces éléments autopsiques et histologiques mais également, des biomarqueurs. L'objet de cet article est donc d'illustrer par un cas pratique la complexité diagnostique d'un décès par hypothermie au travers des éléments évocateurs actuellement décrits, en accentuant la réflexion sur quelques biomarqueurs confirmés ou à l'étude.

Mots clés : , médecine légale, biochimie thanatologique, hypothermie, *post mortem*

Abstract. Hypothermia is a potentially lethal pathology whose *in vivo* diagnosis is relatively easy, based on the observation of a body temperature below 35°C. However, its *post mortem* diagnosis is much more complex because of a thermal decrease occurring systematically after the death, which renders most often uninterpretable the body temperature as a diagnostic argument for hypothermia. Moreover, none of the macroscopic or microscopic autopsy elements described as suspicious of hypothermia are pathognomonic of a hypothermic death. Currently, this diagnosis arises in the light of an association of concordant arguments including these autopsic and histological elements but also some biomarkers. The aim of this article is to illustrate by a practical case the diagnostic complexity of a death by hypothermia through the evocative elements currently described, by emphasizing the reflection on some biomarkers confirmed or under study.

Key words: forensic sciences, thanatobiochemistry, hypothermia, *post mortem*

les fenêtres du domicile étaient ouvertes malgré des températures nocturnes négatives à cette période de l'année. Il s'agissait d'un homme incurie et sous tutelle vivant seul dans un logement sans eau, ni électricité et mal isolé. Il a été découvert par un proche allongé nu sur le ventre dans la pièce principale du domicile presque vide en dehors d'un pot souillé de selle et d'urine. Le sol était également souillé. D'après l'enquête de voisinage, il aurait eu

l'habitude de vivre nu quelle que soit la période de l'année et il se serait progressivement marginalisé. Il aurait été vu vivant pour la dernière fois par son fils la veille au soir. Le délai *post mortem*, estimé sur la base des constatations de Police Scientifique, était donc inférieur à 24h. Aucun médecin légiste ne s'était déplacé sur le lieu de découverte et le corps a rapidement été transféré à l'institut médico-légal du Centre hospitalier régional universitaire de Tours pour la réalisation d'une autopsie médico-légale à la demande du Procureur de la République au motif de la découverte d'un corps nu dans un domicile ouvert. Les antécédents médico-chirurgicaux, qui nous ont été transmis, faisaient état d'un diabète de type inconnu et de suivi difficile compte tenu du peu d'adhésion aux soins. Il n'y avait aucun antécédent d'exogénose ou d'autre prise de toxique.

Un examen scannographique du corps entier a été réalisé préalablement à l'autopsie. Il a mis en évidence des hernies, inguinale et crurales, contenant des éléments anatomiques digestifs. Aucun corps étranger intracorporel suspect et aucune lésion évocatrice de traumatisme *ante mortem* n'ont été mis en évidence.

L'autopsie a été effectuée environ 36h après la découverte du corps, et dans l'intervalle le corps a été conservé dans une chambre froide à + 4 °C. À l'examen externe des téguments, diverses lésions contuses (abrasions et ecchymoses) récentes et semi-récentes ont été observées sur le thorax, les membres supérieurs et inférieurs. Aucune de ces lésions n'évoquait d'une manière certaine l'intervention d'une tierce personne dans la survenue du décès ou bien l'utilisation d'un objet contondant particulier. Nous avons réalisé des crevés sur les membres supérieurs, le thorax et le cuir chevelu. Il s'agissait de vastes incisions permettant de rechercher des lésions traumatiques des tissus sous cutanés et musculaires qui auraient pu passer inaperçues à l'examen externe. Aucune infiltration hémorragique n'a été visualisée. Après réalisation d'une incision mentopubienne, tous les organes ont été examinés *in situ* puis éviscérés pour être analysés sur table d'examen macroscopique. Les hernies inguinales et crurales ont été retrouvées, ainsi qu'une hernie ombilicale. Il n'y avait aucun argument pour un étranglement de celles-ci. L'examen des organes éviscérés a mis en évidence différents éléments. À l'examen de l'estomac, nous avons constaté la présence de taches noirâtres de la muqueuse. Il s'agissait de taches de Wischnewski qui correspondent à des lésions focales nécrotiques de la muqueuse gastrique et qui sont responsables d'un aspect typique de muqueuse dite en « peau de léopard » (*figure 1*). Nous avons également mis en évidence un état antérieur vasculaire (dilatation globale du réseau coronaire et athérome tritronculaire avec diminution focale du calibre sur les trois premiers segments de chaque coronaire ainsi qu'un pseudo-anévrysme rétro-valvulaire aortique) et un état antérieur neurologique (atrophie cortico-sous-corticale

marquée). Par ailleurs, au cours de l'autopsie, nous n'avons pas constaté d'autre anomalie. Ainsi, à l'issue de l'autopsie, l'hypothèse principale concernant la mort compte tenu des éléments d'enquête et des constatations médico-légales était un décès secondaire à une hypothermie et le mode de décès paraissait accidentel.

Au cours de l'autopsie, les prélèvements standards médico-légaux ont été effectués (toxicologique, anatomopathologique et génétique). Les prélèvements anatomopathologiques n'ont malheureusement pas été analysés en l'absence d'accord obtenu auprès des autorités judiciaires. Néanmoins, ces dernières ont autorisé la réalisation de prélèvements supplémentaires biochimiques et leurs analyses, en l'occurrence du sang fémoral (deux tubes secs, deux tubes EDTA et deux tubes fluorure de sodium), de l'urine (un tube avec acidification et un tube sec) et de l'humeur vitrée (deux tubes fluorure de sodium). Les résultats de cette expertise sont présentés dans le *tableau 1*. Cette expertise avait mis en évidence une augmentation des catécholamines urinaires, de l'hydroxybutyrate intra vitréen et sérique, du cortisol sérique et urinaire, des acides gras sériques et l'absence d'augmentation du glucose intra vitréen. Par ailleurs l'expertise toxicologique n'avait pas révélé d'argument en faveur d'une intoxication létale et notamment l'absence de consommation récente d'alcool. Ainsi, les expertises biochimiques confrontées aux constatations autopsiques ont permis d'appuyer l'hypothèse principale concernant la cause de la mort et le mode de décès, à savoir une hypothermie accidentelle. L'état antérieur cardiaque n'a pas été retenu comme facteur ayant précipité directement le décès en raison d'une faible diminution du calibre des coronaires et de son caractère focal sans remaniement macroscopique de l'endocarde, du myocarde ou de



Figure 1. Photo de la muqueuse gastrique : visualisation de nombreux spots hémorragiques (autrement appelés taches de Wischnewski, flèches noires) lui donnant un aspect dit de « peau de léopard ».

Tableau 1. Résultats des expertises biochimiques et toxicologiques réalisées.

Paramètres	Sérum périphérique	Urine	Humeur vitrée
Adrénaline*		229,4 nmol/mmol de créatinine	
Noradrénaline*		271,0 nmol/mmol de créatinine	
Dopamine*		243 nmol/mmol de créatinine	
Cortisol**	995 nmol/L	8 083 nmol/L	
Hydroxybutyrate***	1,69 mmol/L		1,56 mmol/L
Glucose***			3 mmol/L
Acides gras libres***	354 µmol/L		
Arginine****	101 µmol/L		
Ornithine****	446 µmol/L		
Ratio Arginine/Ornithine	0,226		
Tryptophane****	76 µmol/L		
HbA1c*****	45 mmol/mol d'hémoglobine (6,3 %)		
Éthanol*****	ND		

* Dosage par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection électrochimique (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer) ; ** Immunodosage par compétition avec détection par chimiluminescence (Advia Centaur XPT2, Siemens) ; *** Dosage par spectrophotométrie (ABX Pentra 400, Horiba) ; **** Dosage par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (API 3000, AB Sciex) ; ***** Dosage par chromatographie liquide à haute performance (TOSOH G8, TOSOH) ; ***** Dosage par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flammes (6850 Network GC System, Agilent Technologies) ; ND : non détectable.

l'épicarde. De plus, le diabète n'a pas non plus été retenu pour avoir précipité le décès en l'absence d'argument pour une complication léthale telle que l'acidocétose et le coma hyperosmolaire (bien que ce dernier diagnostic soit encore complexe à porter de façon *post mortem*). En effet, le glucose intra vitréen n'était pas élevé et les corps cétoniques, notamment l'hydroxybutyrate, n'ont pas été observés augmentés à un seuil retenu comme léthal (cf infra).

Le point de vue du clinicien

L'hypothermie est une pathologie potentiellement létale dont le diagnostic *in vivo* est relativement simple, reposant sur le constat d'une température corporelle inférieure à 35 °C [1]. À l'inverse, son diagnostic *post mortem* relève d'une grande complexité du fait de la décroissance thermique *post mortem* qui vient modifier la constatation d'une éventuelle hypothermie *peri mortem* [2]. En effet, une décroissance thermique survient immédiatement après le décès. C'est un des signes positifs de mort qui sert au diagnostic du caractère constant et irréversible de la mort [3]. C'est d'ailleurs l'un des outils diagnostiques utilisés dans l'estimation du délai *post mortem* si celui-ci est inférieur à 48-72 heures [3]. Ainsi, cette décroissance thermique *post mortem* inévitable rend quasi systématiquement ininterprétable la température corporelle dans le cadre d'une suspicion d'hypothermie. Plusieurs facteurs de risque de survenue d'une hypothermie sont décrits dans la littérature [1]. Les décès par hypothermie ne sont pas rares et représentaient 13 419 décès aux États-Unis entre 2003 et 2013

et, entre janvier 2006 et décembre 2011, 62 décès en Australie-Méridionale et 296 décès en Suède [4, 5]. Ces chiffres doivent être pris avec prudence du fait de la complexité diagnostique précédemment évoquée. Cette complexité peut être responsable d'une certaine sous-estimation de l'incidence des décès par hypothermie. Les implications pour le médecin légiste dans sa pratique quotidienne sont importantes car il a été décrit à plusieurs reprises des cas d'homicide par hypothermie dans la littérature [6, 7]. Du fait des conséquences judiciaires, le diagnostic d'hypothermie en contexte médico-légal doit être porté de façon certaine. De plus il doit y avoir un lien direct et certain entre un fait générateur (responsable de l'hypothermie) et un dommage, ici le décès. Tout ceci impose la recherche de critères diagnostiques adaptés aux particularités du diagnostic *post mortem*. C'est un faisceau d'arguments concordants qui permet ce diagnostic à partir de différents éléments : les constatations sur le lieu de découverte du cadavre lors de la levée de corps (examen du corps sur le lieu de découverte) ; les constatations lors de l'autopsie et les expertises cytologiques et biologiques.

Lors de la levée de corps, les constatations se regroupent en deux catégories : les observations dans l'environnement, et les observations sur le cadavre. Concernant l'environnement, le premier signe devant permettre d'évoquer un décès par hypothermie est une faible température extérieure. Toutefois, une faible température extérieure ne constitue pas la condition *sine qua non* d'un diagnostic d'hypothermie. D'autres conditions environnementales sont décrites dans la littérature comme par exemple, le contact du corps avec un carrelage froid

accentuant la conduction thermique du corps vers le sol et donc les conditions hypothermiantes [8]. Le syndrome d'*hide-and-die* décrit dans la littérature correspond au fait qu'un individu cherche à se couvrir d'éléments afin de tenter de s'isoler thermiquement [1]. Par exemple, un individu décédé d'une hypothermie en forêt pourra être trouvé couvert de feuilles/branchages/terre avec de la terre sous les ongles témoignant d'une tentative d'enfouissement pour s'isoler thermiquement. L'examen de l'environnement permet également de rechercher la présence d'ordonnances sur lesquels on pourra mettre en évidence la présence de médicament favorisant l'hypothermie ou de traitement de pathologie pouvant favoriser une hypothermie. C'est notamment le cas des pathologies thyroïdiennes qui favorisent des perturbations de la régulation thermique [1]. Ce type de pathologie favorise la survenue d'hypothermie notamment en milieu tempéré (jusqu'à 22-24 °C). Concernant l'examen du cadavre d'autres éléments importants doivent être relevés notamment l'odeur œnologique du cadavre pouvant être en faveur d'une intoxication éthylique aiguë qui est responsable d'une perturbation de la thermorégulation [2]. Un phénomène important est décrit dans la littérature : le déshabillage paradoxal [9]. Il se caractérise par la découverte d'un corps partiellement à intégralement déshabillé avec présence de vêtements à proximité. Ce comportement serait la conséquence d'une brusque vasodilatation généralisée et ainsi d'une fausse impression de réchauffement par épuisement de la vasomotricité constrictive initiale et surviendrait peu de temps avant le décès [9]. Les lividités sont des modifications cutanées *post mortem* issues d'un phénomène de transsudation, se traduisant par le passage d'érythrocytes à travers les vaisseaux sanguins vers les parties déclives du corps [3]. Celles-ci sont habituellement rouges lie-de-vin, mais sont parfois décrites rouges vives lors d'une exposition au froid [1]. Le processus pathologique responsable de ces modifications de couleur des lividités n'est à ce jour pas précisément expliqué.

Lors de l'examen externe au début de l'autopsie, il peut être décrit un érythème de gel qui désigne un aspect brunâtre à rougeâtre de la « face extensive des grosses articulations », e.g., l'épaule, le coude, la hanche, le genou. Cet aspect a également été rapporté sur les oreilles, les arcades zygomatiques, le nez et les organes génitaux externes masculins. Son incidence est estimée à 72 % [10]. Il serait en lien avec une hémolyse au froid prédominant dans les vaisseaux superficiels sous-cutanés, situés en regard des os faisant saillies. Ces derniers, par phénomène de conduction, sont les premiers exposés au froid et voient ainsi leur température diminuer plus rapidement. Un des écueils pouvant influencer l'observation de ces lésions est le passage en chambre froide dans l'attente de l'autopsie qui peut artificiellement faire apparaître de telles lésions. Ainsi, il est recommandé

de décrire la présence de ces érythèmes de gel avant tout séjour en chambre réfrigérée et donc au temps de la levée de corps afin de faciliter l'interprétation de ces lésions.

Lors de l'examen interne pendant l'autopsie, les signes les plus décrits sont des spots hémorragiques de la muqueuse gastrique, arrondis ou ovalaires, rares ou nombreux et centimétriques ou punctiformes, également connus sous le nom de tâches de Wischnewski, du nom du médecin les ayant décrits pour la première fois en 1895. Leur origine physiopathologique ainsi que leur nature intrinsèque sont toujours à ce jour matière à discussion. Cependant, certains éléments semblent faire consensus : ces lésions semblent résulter d'un saignement de la muqueuse digestive en réponse à un état de stress majeur. L'incidence de ces lésions est variable de 40 à 100 % selon les auteurs [2, 11-13]. Il faut être prudent dans leur interprétation car leur spécificité n'est pas absolue, ces lésions ayant été décrites lors d'intoxication alcoolique, de consommation de drogues ou de réanimation avec défibrillation [13].

D'une manière plus anecdotique, l'*inner knee sign* est un signe articulaire autopsique [14]. Il s'agit d'une hémorragie et/ou d'une hyperémie de la membrane synoviale associée à une coloration rougeâtre du liquide synovial au sein du genou, en lien avec une présence d'hémoglobine. Il est également rapporté en regard d'autres articulations, e.g., l'épaule, le coude et la hanche. Son incidence est estimée à 75 % lors d'hypothermie fatale [14]. On retrouve également dans la littérature des infiltrations hémorragiques des muscles squelettiques du tronc (muscles ilio-psoas, paravertébraux, diaphragme, cervicaux, pectoraux et intercostaux) qui seraient liées à des lésions vasculaires hypoxiques responsables d'une fuite sanguine [15]. En plus des lésions macroscopiques sus-décrites, des lésions microscopiques ont été mises en évidence lors du diagnostic d'hypothermie. Cependant, ces lésions sont peu nombreuses et ne sont pas forcément spécifiques. Par exemple, la vacuolisation du pôle basal des cellules rénales serait en rapport avec une stimulation de la cétogenèse (cf infra). Les acides gras, libérés en excès par stimulation de la lipolyse, s'accumulent en intra cellulaire sous forme de vacuole [16]. Cette vacuolisation n'est donc pas spécifique d'une hypothermie et se rencontre dans toute stimulation anormalement élevée de la cétogenèse : acidocétose diabétique, alcoolique, de jeûne ou septique et certains troubles métaboliques. Par ailleurs, cette vacuolisation a été rapportée pour d'autres types cellulaires tels que les cellules hépatiques, pancréatiques, cardiaques, surrénaliennes et antéhypophysaires [2]. Une dégénérescence focale myocardique, marquée par un aspect torsadé des cellules musculaires, a été rapporté en 1976 mais, à notre connaissance, n'a pas fait l'objet de nouvelle publication [17]. L'interprétation microscopique anatomopathologique d'une atteinte de l'architecture pancréatique (infiltrat inflammatoire ou hémorragique) décrite

dans la littérature doit être faite avec prudence. En effet deux éléments rentrent en compte dans l'analyse et peuvent en altérer l'interprétation : une atteinte pancréatique *ante mortem* et les phénomènes putréfactifs [1].

Ainsi de nombreux arguments pour le diagnostic positif de décès par hypothermie sont décrits. Certains sont cliniques et constatés sur la scène de découverte du cadavre ; d'autres sont macroscopiques et visualisés au cours de l'autopsie. Il existe également des éléments microscopiques d'intérêt visualisés lors de l'étude anatomopathologique. Cependant, aucun de ces éléments n'est pathognomonique et tous ces éléments (environnementaux, macroscopique et microscopique) concourent à un faisceau d'arguments qui bien que précis n'est qu'indirect [18]. Les résultats de biochimie thanatologique jouent donc un rôle important en permettant de renforcer ce faisceau d'arguments qui est la base du raisonnement médico-légal de la causalité d'un décès. Dans le cas présenté dans cette synthèse, les arguments du faisceau étaient nombreux mais insuffisants pour poser le diagnostic à l'issue de l'autopsie. La biochimie thanatologique a joué un rôle déterminant dans le diagnostic de la cause de décès.

Le point de vue du biologiste

La nécessité d'une exploration biologique devant chaque suspicion de décès par hypothermie s'impose devant la faible spécificité des éléments macroscopiques et microscopiques connus. Cette expertise permet de mettre en évidence des dérégulations ou des dysfonctionnements de voies métaboliques impliquées dans les mécanismes de défense en réponse à une hypothermie [19].

Au cours de l'hypothermie, l'hypothalamus, où est situé le centre de la thermorégulation, génère une série de réactions afin de produire de la chaleur tout en empêchant sa dispersion. On observe une stimulation du système nerveux autonome sympathique à l'origine d'une libération des catécholamines : noradrénaline, adrénaline et dopamine. D'autre part, il y a une augmentation de cortisol dont l'origine fait débat entre une stimulation centrale par production d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et une diminution de sa métabolisation et de sa clairance hépatique [20]. L'origine centrale est débattue car la concentration d'ACTH est diminuée dans le liquide cérébro-spinal [21]. Cette hormone du stress mobilise les acides gras à partir du tissu adipeux et va donc stimuler la lipolyse, ce qui entraîne une augmentation de la concentration des acides gras libres dans le sang, ainsi que la cétogenèse. Dès lors, l'exploration des catécholamines, du cortisol, des acides gras et des corps cétoniques va pouvoir être utilisée pour le diagnostic *post mortem* d'hypothermie.

Trois matrices différentes seront utilisées : le plasma, l'urine et l'humeur vitrée.

Le plasma est une matrice relativement simple à prélever qui permet le dosage de nombreux paramètres. Cependant, il peut être mis en défaut notamment pour l'exploration des biomarqueurs à demi-vie sanguine très courte. D'autres circonstances peuvent mettre à défaut l'usage de cette matrice, à savoir, le choc hémorragique et un état de putréfaction avancé. Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'obtenir des milieux alternatifs. L'urine est également un milieu simple à prélever et est très utilisée par les experts toxicologues à la recherche de consommation de drogues ou d'alcool. Ce milieu peut être préférable au plasma par exemple en cas de biomarqueur à demi-vie sanguine courte et éliminée dans les urines, puisqu'il y sera concentré et reflètera les variations dans les heures précédant le décès. L'humeur vitrée est une matrice facile à collecter et est couramment utilisée comme milieu de dosage dans le domaine médico-légal, par exemple pour explorer la consommation en éthanol d'un individu [22]. Sa faible teneur en enzymes, notamment les estérases, et son relatif isolement anatomique permettent une meilleure stabilité de ses composés pendant la période *post mortem*.

Les trois principales catécholamines sont l'adrénaline (Ad), la noradrénaline (Nad) et la dopamine (DA). Elles sont synthétisées par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale et les neurones postganglionnaires du système nerveux sympathique en cas de stress. Elles jouent à la fois le rôle de neurotransmetteurs et celui d'hormones régulatrices. Dans le cadre d'un stress médié par le froid, elles ont pour action d'augmenter la production de chaleur et de potentialiser la prévention des pertes thermiques. Il est actuellement établi qu'un stress médié par le froid est responsable d'une augmentation des catécholamines urinaires (Cu) [1]. Ce constat d'augmentation des catécholamines est quant à lui plus litigieux au niveau sanguin, notamment en raison de leur profil évolutif (augmenté ou diminué) probablement du fait d'une courte demi-vie. Les catécholamines sont quasiment absentes en intra vitréen [2, 23]. Historiquement l'interprétation des Cu se faisait via l'analyse du ratio Ad/Nad [17]. Dorénavant, l'intérêt de ce ratio est remis en question car retrouvé moins sensible et/ou spécifique qu'une étude isolée des concentrations en Ad et Nad urinaires [24]. Par ailleurs, plus récemment, l'intérêt d'une exploration des dérivés O-méthoxylés des catécholamines dans les urines a été discuté car leur excrétion est beaucoup moins fluctuante que celle des catécholamines [24]. Ces dérivés O-méthoxylés, obtenus par l'action de la catéchol-O-méthyl transférase sur les catécholamines, sont au nombre de trois : la méthanéphrine (ou métadrénaline) issue de l'Ad, la norméthanéphrine (ou normétadrénaline) issue de la Nad et la 3-méthoxytyramine issue de la DA. Il n'est pas l'objet de cet article d'exposer exhaustivement l'intérêt et les limites de l'analyse des catécholamines

urinaires et de leurs dérivés O-méthoxylés. Pour cela, nous vous invitons à la lecture d'articles de revue publiés sur le sujet [25-28]. Brièvement, une acidification des urines avec de l'acide chlorhydrique est recommandée afin de prévenir la dégradation des catécholamines par auto-oxydation en quinones, celle-ci étant accélérée en condition alcaline. À l'inverse, cette auto-oxydation serait ralentie par la « protection » apportée par le groupe méthyl des dérivés O-méthoxylés des catécholamines. Ainsi, pour une stabilité extrêmement variable des Cu prélevées en milieu sec/neutre (de 1 à 7 jours, en fonction du pH des urines), leurs dérivés O-méthoxylés sont quant à eux stables jusqu'à 7 jours, à température ambiante, quel que soit le pH des urines [25, 27, 28]. Il apparaît donc que le dosage de ces derniers serait moins contraignant et constituerait une bonne alternative lorsque le prélèvement urinaire n'a pu être réalisé en milieu acide, ce qui est fréquent en salle d'autopsie. Plus généralement, l'âge, le sexe et l'injection d'adrénaline lors d'une réanimation n'auraient pas d'influence sur la concentration de ces biomarqueurs ou tout du moins, l'injection d'adrénaline n'élèverait pas leurs concentrations au-delà des seuils habituellement décrits lors d'hypothermie [24]. Quant à la stabilité *post mortem*, celle-ci est estimée de 2 à 10 jours pour l'Ad et la Nad urinaires [24, 29]. Une étude multicentrique de 2014 a porté sur l'analyse des performances diagnostiques des Cu et leurs dérivés O-méthoxylés parmi 83 décès par hypothermie et 144 décès contrôle dont les délais *post mortem* s'étendaient de 4 à 48 heures (à compter de la découverte du corps pour le groupe hypothermie) [24]. Les sensibilités et spécificités ont été évaluées à, respectivement, 72 % et 87 % pour un seuil d'Ad urinaire à 40 nmol/mmol de créatinine ; 48 % et 100 % pour un seuil de Nad urinaire à 493 nmol/mol de créatinine [24]. Le cortisol est une hormone stéroïde (corticostéroïde) synthétisée dans la zone fasciculée de la glande surrénale à partir du cholestérol et libérée sous la dépendance de l'ACTH hypophysaire [30]. Son augmentation, lors d'une exposition au froid, permet de stimuler la production thermique et énergétique, notamment par stimulation de la glycolyse et de la lipolyse [31]. Bien qu'il y ait des divergences relatives à son évolution en cas d'exposition au froid [32, 33], le cortisol est le plus souvent significativement augmenté lors d'hypothermie fatale [31, 34]. Nous précisons immédiatement toutes les réserves à avoir lors de l'interprétation du cortisol en *post mortem*, car selon toute logique, toute situation de stress devrait être marquée par une augmentation de celui-ci. Bien que ce raisonnement suive une logique implacable, Baňka *et al.* ont présenté des résultats divergents [31]. Ils ont étudié l'évolution du cortisol sanguin lors d'hypothermie en comparaison d'un groupe de patients décédés par AVC hémorragique, ces deux situations étant rattachées à une période d'agonie prolongée. Ils ont ainsi démontré une absence d'augmentation

significative du cortisol lors d'une période d'agonie prolongée, ici l'AVC hémorragique [31]. Néanmoins, interpréter un taux de cortisol en *post mortem* est complexe et doit tenir compte des circonstances de la mort, et des découvertes macroscopiques et microscopiques autopsiques. Certains auteurs (y compris nous-mêmes) s'accordent pour recommander son dosage dans le sang et les urines lors d'une suspicion d'hypothermie, non comme biomarqueur spécifique, mais afin d'étayer le déclenchement d'une réponse systémique face à un état de stress *peri mortem*, qui sera dans ce cas liée à une exposition au froid [19, 31, 34]. *In vivo*, le cortisol sanguin doit être exploré à des instants précis de la journée, en relation à une sécrétion cyclique suivant un rythme nyctéméral. Ainsi, sa valeur sera maximale à 8 heures afin de déclencher l'état d'éveil et minimale à minuit afin de maintenir le sommeil [35]. Bien évidemment, en *post mortem*, il n'est pas possible de satisfaire ces conditions. Baňka *et al.* ont proposé, via une analyse par chromatographie liquide haute performance, le seuil de 830 nmol/L de cortisol sanguin pour étayer le diagnostic d'hypothermie létale [31]. De même, *in vivo*, le cortisol urinaire doit être exploré sur un recueil urinaire de 24 heures. Une fois encore, les conditions *post mortem* ne peuvent satisfaire ces modalités. Pour exemple, Palmiere *et al.* ont constaté des valeurs de cortisol urinaire systématiquement supérieures à 250 nmol/L lors d'hypothermie et inférieures à 240 nmol/L pour leur groupe témoin, lequel comprenait des circonstances avec et sans agonie prolongée [34]. Les corps cétoniques sont au nombre de trois : l'acétylacétate, l'acétone et l'hydroxybutyrate. En cas de stress médié par le froid, l'augmentation des catécholamines et du cortisol stimule la lipolyse et donc la libération des acides gras qui seront déviés du cycle de Krebs vers la céto-genèse afin de produire les dits corps cétoniques. L'acétylacétate et l'hydroxybutyrate sont transportés du foie (site de production) vers les tissus périphériques afin de fournir de « l'énergie ». En thanatologie, il est recommandé d'analyser préférentiellement l'hydroxybutyrate du fait, en *post mortem*, d'une décroissance rapide de l'acétylacétate, d'une augmentation de l'acétone et d'une meilleure connaissance des seuils diagnostiques normaux, pathologiques et létaux de l'hydroxybutyrate (respectivement < 0,5 ; 0,5 à 2,5 et > 2,5 mmol/L) [36]. En tête des matrices d'intérêt pour leur exploration se trouve le sang périphérique. Par ailleurs, lorsque la période d'agonie est prolongée, le temps nécessaire à la diffusion de l'hydroxybutyrate à travers la barrière hémato-rétinienne est atteint et ainsi les deux matrices se retrouvent à équivalence de concentrations. Dans ces conditions, les seuils diagnostiques sanguins décrits sont donc par extrapolation applicables au niveau vitréen. Il est donc intéressant d'analyser conjointement l'hydroxybutyrate dans le sang périphérique et l'humeur vitrée afin d'obtenir une

estimation de la période d'agonie. Comme explicité, si les matrices sont à équivalence de concentration, l'on peut suspecter que la période d'agonie a été de plusieurs heures (sans toutefois plus de précisions) [19, 34, 37]. Néanmoins, l'estimation de cette période d'agonie sur la répartition entre les différentes matrices d'hydroxybutyrate ne doit pas figurer dans un compte-rendu d'expertise. Cette estimation est appliquée par peu de biochimistes-thanatologues et, à ce titre, bénéficie d'un recul insuffisant pour satisfaire les conditions nécessairement rigoureuses d'une expertise scientifique.

L'analyse des corps cétoniques peut être faussée par deux facteurs, la consommation d'alcool et l'acidocétose, notamment diabétique. Ainsi, la mesure des corps cétoniques doit systématiquement être effectuée conjointement avec celle de l'éthanol, ce dernier ayant la propriété d'inhiber la céto-genèse. Dès lors, le dosage des corps cétoniques peut être moins contributif en cas d'hypothermie avec alcoolisation aiguë. Associé à cela, la consommation éthylique est connue pour être par elle-même pourvoyeuse d'hypothermie par divers procédés : accélération des pertes thermiques par vasodilatation généralisée, effet sédatif, inhibition des capacités de frissonnement et dysfonction hypothalamique (centre de la thermorégulation) [37, 39]. Il est ainsi fréquemment observé une intoxication alcoolique lors d'une hypothermie fatale ou non. Aux États-Unis entre 2003 et 2013, 13 419 décès par hypothermie ont été recensés avec pour 10 % d'entre eux une intoxication alcoolique associée [5].

De même, la décompensation acidocéto-sique d'un diabète peut se compliquer d'une hypothermie. L'origine de cette complication est mal connue mais serait le reflet d'une indisponibilité du glucose pourtant nécessaire à la production de chaleur [40]. Gale et Tattersall ont étudié ce lien et ainsi estimé que 12 % des hypothermies seraient liées à une acidocétose diabétique [41]. Dans ce cadre, un case report a récemment été publié pour lequel les deux pathologies ont été identifiées de façon *post mortem* [16]. À l'image de l'hypothermie, le diagnostic *post mortem* d'une acidocétose diabétique est complexe à porter, aucun élément macroscopique n'étant décrit. La précaution du médecin légiste et une analyse biochimique permettent seules d'en faire le diagnostic [38]. Il nous apparaît indispensable, dans ce cadre, d'effectuer systématiquement une exploration combinée de ces pathologies (cf. notre précédent article de synthèse sur ce sujet [38]).

Comme exposé plus haut, la lipolyse est accrue lors d'une exposition au froid en lien avec une sécrétion de cortisol et des catécholamines. Ainsi, les acides gras libres, et plus spécialement les acides stéariques, palmitiques et oléiques, sont augmentés lors d'un décès par hypothermie [42]. Il est évident que cette augmentation présente une très mauvaise spécificité et nécessite d'être interprétée à la lumière des

facteurs interférents suivants : jeûne, diabète mal contrôlé, hyperthyroïdie et phéochromocytome. Néanmoins, cette augmentation semble particulièrement marquée lors d'une hypothermie avec, selon Baňka *et al.*, des concentrations d'acides palmitique, stéarique et oléique, supérieures à 0,2 mmol/L [42] ; et selon Palmiere *et al.*, des concentrations d'acides gras libres de 1,6 à 1,9 mmol/L versus 1,1 à 1,7 mmol/L hors cadre hypothermique, lesquels diffèrent amplement des valeurs *in vivo* : 0,1 à 0,6 mmol/L [34]. On notera donc au passage que parmi les processus taphonomiques survient une lipolyse, que l'on doit rattacher à la lyse cellulaire généralisée.

Notre équipe de recherche a récemment publié une étude du métabolome sérique et urinaire des décès par hypothermie [43]. Une signature métabolomique sérique a été obtenue révélant diverses adaptations métaboliques visant à stimuler la production thermique, préserver la vasomotricité médiée par l'endothélium et prolonger la fluidité membranaire. Parallèlement, de potentiels nouveaux biomarqueurs sériques, dont les performances diagnostiques restent à étudier, ont été découverts tels que le ratio arginine sur ornithine et la concentration en tryptophane. À ce jour, les origines physiopathologiques de ces biomarqueurs sont encore incertaines. Nous avons cependant émis les hypothèses suivantes : l'augmentation du ratio arginine sur ornithine ($> 0,102$), reflétant l'activité de l'arginase, pourrait être le témoin d'une production thermique accrue et celui d'une préservation de la vasomotricité vasculaire ; et la diminution du tryptophane ($< 108 \mu\text{mol/L}$) pourrait, quant à elle, refléter une stimulation de la production thermique médiée par la mitochondrie.

Au total, considérant ces différentes données nous avons obtenu les résultats suivants :

- l'Ad urinaire était supérieure au seuil présenté, à l'inverse de la Nad urinaire, témoignant bien d'un manque de sensibilité de ce dernier biomarqueur. Les cortisol sanguin et urinaire étaient élevés, supérieurs aux seuils présentés. Ces augmentations du cortisol et de l'Ad nous ont permis de confirmer l'état de stress généralisé *peri mortem*. Une réserve reste à émettre sur le cortisol urinaire, la technique analytique utilisée ne correspondant pas aux recommandations, au risque d'un manque de spécificité [30] ;

- l'augmentation des acides gras libres nous a permis de conclure à une stimulation de la lipolyse. Le délai *post mortem* n'étant pas prolongé (absence de phénomène putréfactif), nous avons interprété cette augmentation à la lumière d'un diagnostic d'hypothermie d'ores et déjà porté, limite faite d'un sujet diabétique de corpulence élevé et donc possiblement sujet d'une dyslipidémie ;

- l'hydroxybutyrate sanguin et intra vitréen étaient augmentés à un seuil pathologique reflétant une stimulation de la céto-genèse *peri mortem*. De plus, les concentrations d'hydroxybutyrate étaient à quasi-équivalence entre le sang

et l'humeur vitrée. Nous pouvons donc suggérer que le patient a subi une stimulation prolongée de la cétogenèse, ici rapportée à une hypothermie ;

– l'acidocétose diabétique a pu être éliminée chez ce patient en l'absence d'hyperglycémie (dans un contexte de délai *post mortem* court) et d'augmentation dite létale de l'hydroxybutyrate (inférieure à 2,5 mmol/L).

L'ensemble de ces paramètres, associé aux données autopsiques, nous a permis de porter le diagnostic de décès par hypothermie. Par ailleurs, les potentiels biomarqueurs sériques que nous avons présentés dans notre précédente étude métabolomique (ratio arginine sur ornithine et tryptophane) ont, pour ce patient, confirmé leur intérêt dans la démarche diagnostique autour d'un décès par hypothermie.

Conclusion

Actuellement aucun élément n'a été rapporté pour être pathognomonique d'un décès par hypothermie. Ce diagnostic se construit sur un faisceau concordant d'arguments environnementaux, macroscopiques, microscopiques et biologiques, et théoriquement en l'absence d'argument pour une autre origine létale. Dès lors, ce diagnostic devient extrêmement complexe lorsque plusieurs mécanismes létaux sont associés, e.g., un alpiniste subissant une chute à l'origine d'un polytraumatisme en condition extrême (hypothermie et/ou syndrome hémorragique ?). Perich *et al.* ont récemment publié deux cas mettant en exergue ce point [44]. Un groupe de militaires s'est retrouvé bloqué lors d'une ascension d'un col enneigé en condition extrême (2 000 mètres d'altitude, force du vent estimée à 80 km/h). À l'arrivée des secours, deux militaires ont été trouvés décédés pour lesquels l'autopsie a mis en évidence des éléments suggérant une hypothermie sans pour autant affirmer son origine létale. À la suite de cet événement, une plainte pénale a été posée par les familles des défunts envers les instances militaires, pour laquelle un débat a eu lieu sur l'origine exacte du décès. La question posée était : Ces décès sont-ils en lien avec une hypothermie et/ou un mal des montagnes ? Cette situation alerte sur la nécessaire approche pluridisciplinaire (médecin légiste, anatomopathologiste, toxicologue et biochimiste) à déclencher afin d'élucider au mieux le processus létaux.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Palmiere C, Teresiński G, Hejna P. Postmortem diagnosis of hypothermia. *Int J Legal Med* 2014 ; 128 : 607-14.
2. Rousseau G, Dupont V, Reynier P, Jousset N, Rougé-Maillart C. Exploration d'un décès par hypothermie généralisée. *Rev Med Leg* 2018 ; 9 : 123-33.
3. Beauthier J-P, Mangin P, Hédouin V. *Traité de médecine légale*. Vol. 2. Bruxelles : DeBoeck, 2011 : 25.
4. Bright FM, Winskog C, Walker M, Byard RW. A comparison of hypothermic deaths in South Australia and Sweden. *J Forensic Sci* 2014 ; 59 : 983-5.
5. Meiman J, Anderson H, Tomasallo C, Centers for Disease Control, Prevention (CDC). Hypothermia-related deaths—Wisconsin, 2014, and United States, 2003-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015 ; 64 : 141-3.
6. Madea B, Rittner C. Tötung durch Erfrieren. *Arch Kriminol* 2012 ; 230 : 177-89.
7. Rolf CM, Gallagher KE. Hypothermic death in the Arctic State. *Acad Forensic Pathol* 2018 ; 8 : 64-82.
8. Bright F, Gilbert JD, Winskog C, Byard RW. Additional risk factors for lethal hypothermia. *J Forensic Leg Med* 2013 ; 20 : 595-7.
9. Wedin B, Vanggaard L, Hirvonen J. « Paradoxical undressing » in fatal hypothermia. *J Forensic Sci* 1979 ; 24 : 543-53.
10. Turk EE. Hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2010 ; 6 : 106-15.
11. Tsokos M, Rothschild MA, Madea B, Rie M, Sperhake JP. Histological and immunohistochemical study of Wischnewsky spots in fatal hypothermia. *Am J Forensic Med Pathol* 2006 ; 27 : 70-4.
12. Preuss J, Thierauf A, Dettmeyer R, Madea B. Wischnewsky's spots in an ectopic stomach. *Forensic Sci Int* 2007 ; 169 : 220-2.
13. Bright F, Winskog C, Byard RW. Wischnewski spots and hypothermia: sensitive, specific, or serendipitous? *Forensic Sci Med Pathol* 2013 ; 9 : 88-90.
14. Hejna P, Zátoková L, Tsokos M. The diagnostic value of synovial membrane hemorrhage and bloody discoloration of synovial fluid (« inner knee sign ») in autopsy cases of fatal hypothermia. *Int J Legal Med* 2012 ; 126 : 415-9.
15. Zátoková L, Hejna P, Palmiere C, Teresiński G, Janík M. Hypothermia provokes hemorrhaging in various core muscle groups: how many of them could we have missed? *Int J Legal Med* 2017 ; 13 : 1423-8.
16. Tse R, Garland J, Kesha K, Triggs Y, Yap Z, Stables S. Basal subnuclear vacuolization, Armani-Ebstein lesions, Wischnewsky lesions, and elevated vitreous glucose and β -hydroxybutyrate: is it hypothermia, diabetic ketoacidosis, or both? *Am J Forensic Med Pathol* 2018 ; 39 : 279-81.
17. Hirvonen J. Necropsy findings in fatal hypothermia cases. *Forensic Sci* 1976 ; 8 : 155-64.
18. Byard RW, Bright FM. Lethal hypothermia - a sometimes elusive diagnosis. *Forensic Sci Med Pathol* 2018 ; 14 : 421-3.
19. Rousseau G, Reynier P, Jousset N, Rougé-Maillart C, Palmiere C. Updated review of postmortem biochemical exploration of hypothermia with a presentation of standard strategy of sampling and analyses. *Clin Chem Lab Med* 2018 ; 56 : 1819-27.
20. Woolf PD, Hollander CS, Mitsuma T, Lee LA, Schalch DS. Accidental hypothermia: endocrine function during recovery. *J Clin Endocrinol Metab* 1972 ; 34 : 460-6.

21. Ishikawa T, Quan L, Li D-R, Zhao D, Michiue T, Hamel M, *et al.* Postmortem biochemistry and immunohistochemistry of adrenocorticotropic hormone with special regard to fatal hypothermia. *Forensic Sci Int* 2008 ; 179 : 147-51.
22. Brunet B, Mura P. L'humeur vitrée en toxicologie médico-légale : revue de la littérature et applications. *Ann Toxicol Anal* 2012 ; 24 : 9-15.
23. Hervet T, Teresiński G, Hejna P, Descloux E, Grouzmann E, Palmiere C. Catecholamines and their O-methylated metabolites in vitreous humor in hypothermia cases. *Forensic Sci Med Pathol* 2016 ; 12 : 163-9.
24. Palmiere C, Teresiński G, Hejna P, Mangin P, Grouzmann E. Diagnostic performance of urinary metanephrines for the postmortem diagnosis of hypothermia. *Forensic Sci Med Pathol* 2014 ; 10 : 518-25.
25. Peaston RT, Ball S. Biochemical detection of pheochromocytoma: why are we continuing to ignore the evidence? *Ann Clin Biochem* 2008 ; 45 : 6-10.
26. Roberts NB, Higgins G, Sargazi M. A study on the stability of urinary free catecholamines and free methyl-derivatives at different pH, temperature and time of storage. *Clin Chem Lab Med* 2010 ; 48 : 81-7.
27. Peitzsch M, Pelzel D, Glöckner S, Prejbsiz A, Fassnacht M, Beuschlein F, *et al.* Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2013 ; 418 : 50-8.
28. Peitzsch M, Pelzel D, Lattke P, Siegert G, Eisenhofer G. Preservation of urine free catecholamines and their free O-methylated metabolites with citric acid as an alternative to hydrochloric acid for LC-MS/MS-based analyses. *Clin Chem Lab Med* 2016 ; 54 : 37-43.
29. Ishikawa T, Inamori-Kawamoto O, Quan L, Michiue T, Chen J-H, Wang Q, *et al.* Postmortem urinary catecholamine levels with regard to the cause of death. *Leg Med Tokyo Jpn* 2014 ; 16 : 344-9.
30. Turpeinen U, Hämäläinen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013 ; 27 : 795-801.
31. Bańka K, Teresiński G, Buszewicz G, Mądro R. Glucocorticosteroids as markers of death from hypothermia. *Forensic Sci Int* 2013 ; 229 : 60-5.
32. Leppäluoto J, Korhonen I, Huttunen P, Hassi J. Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, GH and prolactin in men after a 2-h stay in a cold room. *Acta Physiol Scand* 1988 ; 132 : 543-8.
33. Wittert GA, Or HK, Livesey JH, Richards AM, Donald RA, Espiner EA. Vasopressin, corticotrophin-releasing factor, and pituitary adrenal responses to acute cold stress in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 ; 75 : 750-5.
34. Palmiere C, Bardy D, Letovanec I, Mangin P, Augsburger M, Ventura F, *et al.* Biochemical markers of fatal hypothermia. *Forensic Sci Int* 2013 ; 226 : 54-61.
35. Lousiet E. Perturbation du rythme circadien du cortisol. *Corresp En Métabolismes Horm Diabètes Nutr* 2009 ; 13 : 115-9.
36. Palmiere C. The (non)sense of routinely analyzing beta-hydroxybutyrate in forensic toxicology casework. *Forensic Sci Int* 2017 ; 279 : 18-9.
37. Teresiński G, Buszewicz G, Mądro R. The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia. *Forensic Sci Int* 2002 ; 127 : 88-96.
38. Rousseau G, Bergerat N, Drevin G, Reynier P, Jousset N. Biochimie thanatologique : intérêt de l'étude post mortem de l'humeur vitrée pour le diagnostic de décès par acidocétose diabétique. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018 ; 76 : 245-50.
39. Jones AW. Fatality from drinking denatured alcohol and hypothermia. *J Anal Toxicol* 2011 ; 35 : 316-8.
40. Nambu T, Mori K, Shinoto Y, Izumi R, Matsuo K, Kanai Y, *et al.* Diabetic ketoacidosis accompanied by hypothermia: a case report. *Diabetes Res Clin Pract* 2012 ; 96 : 326-30.
41. Gale EA, Tattersall RB. Hypothermia: a complication of diabetic ketoacidosis. *Br Med J* 1978 ; 2 : 1387-9.
42. Bańka K, Teresiński G, Buszewicz G. Free fatty acids as markers of death from hypothermia. *Forensic Sci Int* 2014 ; 234 : 79-85.
43. Rousseau G, Chao De La Barca JM, Rougé-Maillart C, Teresiński G, Jousset N, Dieu X, *et al.* A serum metabolomics signature of hypothermia fatalities involving arginase activity, tryptophan content and phosphatidylcholine saturation. *Int J Legal Med* 2018 ; 133 : 889-98.
44. Perich P, Tuchtan L, Bartoli C, Léonetti G, Piercecchi-Marti M-D. Death from hypothermia during a training course under « extreme conditions »: related to two cases. *J Forensic Sci* 2016 ; 61 : 562-5.