



UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2019

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Expression intra-pulmonaire des Aquaporines 1, 4 et 5 : Quelle
utilité dans le diagnostic différentiel des asphyxies mécaniques et
non mécaniques ?**

Présentée et soutenue publiquement le 15 Janvier 2019 à 14 heures
Au Pôle Recherche
Par Clémence FICHET

JURY

Présidente :

Madame le Professeur Marie-Christine COPIN

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Valery HEDOUIN

Madame le Professeur Mercé JOURDAIN

Madame le Professeur Delphine ALLORGE

Directrice de Thèse :

Madame le Docteur Sarah HUMEZ

Avertissement

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Liste des abréviations

AQP : Aquaporine

IHC : Immunohistochimie

ANM : Asphyxie non mécanique

AM : Asphyxie mécanique

A mixte : Asphyxie mixte

CP : Cytoplasmique

MB : Membranaire

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

HiF1- α : Hypoxia-inducible Factor 1- α

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

SPA: Surfactant protein A

Table des matières

RESUME	1
INTRODUCTION	2
1. L'ASPHYXIE.....	2
1.1. Généralités.....	2
1.2. Asphyxie mécanique.....	3
1.3. Asphyxie non mécanique.....	5
2. HISTOLOGIE PULMONAIRE	6
3. OUTILS DIAGNOSTICS DE L'ASPHYXIE.....	7
3.1. Signes cliniques.....	7
3.2. Lésions microscopiques.....	8
3.3. Outils immunohistochimiques et moléculaires.....	10
4. LES AQUAPORINES.....	11
4.1. Généralités.....	11
4.2. Aquaporines et poumons.....	14
MATERIEL ET METHODES	17
1. POPULATION D'ETUDE	17
2. MATERIEL.....	18
3. ETUDE MORPHOLOGIQUE.....	18
4. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	19
4.1. Mise au point de la technique.....	19
4.2. Interprétation.....	23
5. ANALYSES STATISTIQUES	24
RESULTATS	26
1. CARACTERISTIQUES DES SUJETS.....	26

2. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES.....	30
3. EXPRESSION PULMONAIRE DES AQUAPORINES.....	32
3.1. <i>Aquaporine 1</i>	32
3.1.1. <i>Pneumocytes</i>	32
3.1.2. <i>Cellules endothéliales</i>	34
3.2. <i>Aquaporine 4</i>	35
3.2.1. <i>Pneumocytes</i>	35
3.2.2. <i>Cellules bronchiques</i>	37
3.2.3. <i>Cellules endothéliales</i>	38
3.3. <i>Aquaporine 5</i>	40
3.3.1 <i>Pneumocytes</i>	40
3.3.2 <i>Cellules bronchiques</i>	42
4. CONCORDANCE INTER OBSERVATEURS.....	43
5. DELAI DECES-AUTOPSIE.....	44
DISCUSSION.	45
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	56
RÉFÉRENCES	57

RESUME

Introduction : L'asphyxie est une cause fréquente de décès regroupant de multiples étiologies. L'analyse anatomopathologique est peu spécifique et donc peu informative quant à l'étiologie de l'asphyxie. L'objectif de notre étude est de déterminer s'il existe une expression immunohistochimique pulmonaire différente des Aquaporines (AQP) 1, 4 et 5 entre des sujets décédés d'une asphyxie mécanique (AM) et des sujets décédés d'une asphyxie non mécanique (ANM) dans le but d'établir un nouvel outil diagnostique étiologique de l'asphyxie aiguë pour le pathologiste.

Méthode : L'analyse a porté sur une série rétrospective multicentrique de 36 sujets décédés d'une asphyxie aiguë en contexte Médico-Légal. Nous avons utilisé quatre prélèvements pulmonaires par sujet sur lesquels nous avons réalisé les études immunohistochimiques (IHC) AQP1, AQP4 et AQP5. Chaque IHC a été interprétée suivant 3 critères : la localisation, l'intensité et la quantification du marquage. Chacun de ces critères a été étudié sur les pneumocytes, les cellules endothéliales et les cellules bronchiques. Une double lecture des lames d'IHC a été réalisée.

Résultats : Notre étude n'a pas mis en évidence de différence s'agissant du marquage par les anticorps anti AQP1 et 4 entre les groupes AM et ANM. Concernant l'anticorps anti AQP5, l'intensité du marquage des pneumocytes est proportionnellement plus faible dans le groupe AM, en particulier pour les cas de noyade, que dans le groupe ANM (75% et 46% respectivement). Deux cas du groupe AM et deux cas du groupe ANM présentent un marquage endothélial par l'anticorps anti AQP4.

Conclusion : L'expression intrapulmonaire des AQP1 et 4 ne semble pas être discriminante entre les AM et les ANM. L'expression de l'AQP5 par les pneumocytes est proportionnellement plus faible dans certaines situations d'AM et en particulier la noyade en eau douce.

Mots clés : Aquaporines, asphyxie, poumons, immunohistochimie

INTRODUCTION

1. L'asphyxie

1.1. *Généralités*

L'asphyxie est définie comme une privation en oxygène au niveau des tissus. Par conséquent, tout processus interférant sur le transfert de l'oxygène au niveau tissulaire est une cause d'asphyxie. Toute une série de perturbations peut intervenir: absence ou réduction de l'oxygène dans l'atmosphère, obstruction des voies respiratoires externe ou interne, limitation des mouvements respiratoires thoraciques, pathologies pulmonaires empêchant ou réduisant les échanges gazeux, réduction de la fonction cardiaque, anémie sévère, incapacité des cellules des tissus périphériques à utiliser l'oxygène (par exemple, l'intoxication au cyanure inhibant le système enzymatique de la cytochrome oxydase) (1).

Il est difficile d'obtenir de larges données épidémiologiques, la plupart des études portent sur des séries de cas courtes et très localisées géographiquement. Une étude portant sur une période de 21 ans (janvier 1984 à octobre 2004) dans le département de médecine légale de l'Université Trakya, à Edirne, en Turquie observe que le décès par asphyxie représente 15,7% de toutes les autopsies médico-légales ; 20,8% des cas ont entre 30 et 39 ans et l'âge moyen est de 41,9 ans. Les hommes représentent 79,8% de tous les cas. Le mécanisme le plus fréquent de décès par asphyxie est la pendaison (41,8%), suivie de la noyade (30,5%) et de l'intoxication au monoxyde de carbone (8,2%) (2).

Les asphyxies peuvent être mécaniques (AM) ou non mécaniques (ANM). Une importante variabilité de définition s'observe dans la littérature (3).

1.2. Asphyxie mécanique

L'AM, est, pour certains auteurs, caractérisée par une restriction des mouvements respiratoires par pression externe sur la poitrine ou l'abdomen. Elle peut aussi correspondre à un blocage de la ventilation pulmonaire par des causes extrinsèques (4) : elle comprend ainsi, de façon variable selon les auteurs, plusieurs mécanismes, tels que la pendaison, la strangulation, la suffocation, l'étouffement, la noyade vraie, l'asphyxie positionnelle, la compression thoracique.

La suffocation est un terme général qualifiant le manque d'oxygène dans l'environnement ambiant ou une obstruction des voies aériennes (1). L'étouffement appelé « smothering » en anglais, dont la traduction littérale n'existe pas en langue française, est plus spécifique et indique un blocage externe du passage de l'air dans les voies aériennes supérieures. Un autre type d'étouffement appelé « choking » en anglais, dont la traduction littérale n'existe pas non plus en langue française, fait référence à un blocage interne des voies respiratoires supérieures par un corps étranger ; il est également utilisé pour l'étranglement manuel. Certains auteurs situent la limite de l'obstruction au niveau de l'épiglotte pour différencier « smothering » (obstruction au-dessus de l'épiglotte) et « choking » (obstruction en dessous de l'épiglotte) (3). La strangulation est un terme indiquant l'utilisation des mains ou d'une ligature pour appliquer une pression externe sur le cou. Elle intègre pour certains auteurs la pendaison.

L'étranglement est un terme encore plus spécifique se référant généralement à une strangulation cervicale manuelle.

L'asphyxie positionnelle est définie comme l'impossibilité d'échanges gazeux pulmonaires normaux associée à une dysfonction circulatoire secondaires à la position du corps et après l'exclusion d'autres causes de décès (5).

La noyade vraie, quant à elle, est définie comme un processus entraînant une insuffisance respiratoire aiguë par submersion dans un milieu liquide (6). Elle exclut la noyade secondaire ou hydrocution précédée d'un trouble neurologique ou cardiovasculaire. Cela implique l'existence d'une interface air-liquide à l'entrée des voies aériennes empêchant la respiration. La noyade est classée dans les AM car l'eau constitue un obstacle, d'origine exogène, à l'échange gazeux de la membrane alvéolo-capillaire. Les conséquences physiopathologiques de la noyade sont multiples. L'hypoxie est générée par un laryngospasme (inconstant) et/ou une inhalation de liquide. Il s'ensuit une altération du surfactant, un collapsus alvéolaire et un œdème alvéolaire avec installation d'un shunt intra-pulmonaire, une altération des rapports ventilation/perfusion ainsi que de la compliance pulmonaire et une augmentation du travail respiratoire. D'autre part, les conséquences pulmonaires, volémiques et hydroélectrolytiques sont différentes en fonction de la composition de l'eau : l'eau douce, hypotonique, entraîne un œdème pulmonaire lésionnel (altération du surfactant et du revêtement alvéolaire) et une hypervolémie plasmatique. L'eau de mer, hypertonique, entraîne une inondation alvéolaire et une hypovolémie. Des troubles du rythme cardiaque ou de la conduction peuvent émailler l'évolution d'une noyade vraie (7,8).

1.3. Asphyxie non mécanique

L'asphyxie non mécanique intéresse, selon les auteurs, des causes variées de type toxique, cardio-vasculaire, neurologique ou encore infectieuse. Les causes toxiques regroupent les intoxications médicamenteuses, les abus de substances illicites, d'alcool et l'inhalation de gaz toxiques comme le monoxyde de Carbone.

L'intoxication alcoolique aiguë entraîne l'inhibition des centres respiratoires avec hypoxie globale progressive et affecte les centres circulatoires en générant une insuffisance cardiaque progressive. Son effet sur le système nerveux central est particulièrement néfaste en raison de sa forte lipophilie (9).

Les intoxications médicamenteuses responsables d'une asphyxie ont des mécanismes différents selon le principe actif, par exemple, le propranolol à dose létale entraîne une insuffisance cardiocirculatoire aiguë (10), un surdosage en benzodiazépine ou méthadone génère une dépression du système nerveux central pouvant aller jusqu'à une dépression respiratoire et la survenue du décès. Cet effet dépresseur respiratoire peut être potentialisé par une poly intoxication impliquant d'autres dépresseurs du système nerveux central notamment l'alcool, agissant de façon synergique (11). La polyintoxication représente ainsi, dans la population des sujets toxicomanes, la première cause de décès d'origine toxique (12,13).

Un choc hémorragique ou cardiogénique aigu entraîne, comme tout type de choc (septique, anaphylactique), une asphyxie par manque d'acheminement d'oxygène aux tissus, secondaire à une spoliation sanguine brutale et importante ou à une dysfonction circulatoire par exemple.

Une atteinte des centres respiratoires (par exemple un traumatisme crânien ou un accident vasculaire cérébral) se traduit par un ralentissement ou une inhibition des mouvements respiratoires, responsables d'une asphyxie.

2. Histologie pulmonaire

L'épithélium alvéolaire constitue la principale surface d'échanges gazeux. Il est composé des pneumocytes de type I, occupant la majorité de la surface épithéliale alvéolaire, responsables des échanges gazeux et des pneumocytes de type II, qui transportent le sodium de manière active, produisent le surfactant et ont des capacités de présentation antigénique et de sécrétion de cytokines.

Les cellules ciliées bronchiques jouent un rôle fondamental dans l'épuration pulmonaire en assurant la clairance muco-ciliaire.

La barrière alvéolo-capillaire est formée par les pneumocytes de type 1, la membrane basale et la cellule endothéliale. Cette barrière est perméable à l'oxygène, qui est amené dans la lumière alvéolaire lors de l'inspiration et qui passe ensuite au travers de la barrière jusque dans la circulation sanguine.

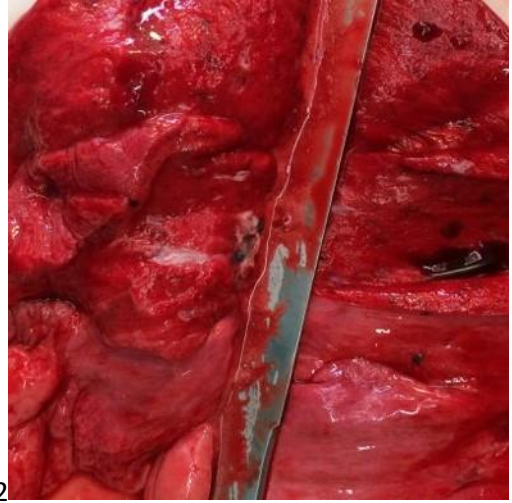
3. Outils diagnostics de l'asphyxie

3.1. Signes cliniques

Les signes cliniques classiques autopsiques d'asphyxie sont peu spécifiques et peu sensibles : à l'examen externe du corps, il est observé une cyanose du visage, des lèvres, des oreilles et des extrémités, parfois un piqueté hémorragique sur la face, le cou, la nuque et les épaules. Les lividités cadavériques sont précoces, intenses, sombres et peuvent prendre un caractère pétéchial.

A l'examen interne, les voies aériennes supérieures présentent de la spume aérée et sanglante, leur muqueuse est rouge et congestive. Les poumons sont sombres, violacés, volumineux, très congestifs (image 1) et œdémateux (image 2). Ils sont remplis de sang fluide, noir ou spumeux et parsemés de foyers hémorragiques diffus. A leur surface se trouvent parfois des plages d'emphysème aigu sous pleural ainsi que des taches arrondies, dites de Tardieu, sous pleurales, toujours à bords nets, de couleur rouge vif ou brunâtre, groupées souvent près du hile et aux bases. Le foie est volumineux et congestif. Les cavités droites du cœur sont dilatées et contiennent du sang noir fluide tandis que le cœur gauche est vide. Les reins sont congestifs. La rate est contractée et exsangue. Le cerveau est œdémateux et congestif (1).

Ces signes ne sont pas pathognomoniques d'une asphyxie aiguë. Le diagnostic d'asphyxie repose donc sur un faisceau d'arguments, les données cliniques et macroscopiques sont ainsi à intégrer à l'ensemble des données commémoratives, autopsiques et anatomopathologiques (14).



Images 1 et 2 : Asphyxie par pendaison : poumon congestif et œdémateux

3.2. Lésions microscopiques

D'un point de vue anatomopathologique, l'asphyxie se caractérise par l'association d'une congestion vasculaire, d'un œdème alvéolaire (image 3) et dans certains cas d'une hémorragie alvéolaire (15,16) (image 5). Certains signes microscopiques sont décrits comme étant en faveur d'une asphyxie mécanique tels qu'une hétérogénéité ventilatoire pulmonaire (image 7) associant des plages d'emphysème alvéolaire aigu (image 4) à des plages d'alvéoles condensées, un emphysème sous pleural (image 6) et un emphysème interstitiel (17).

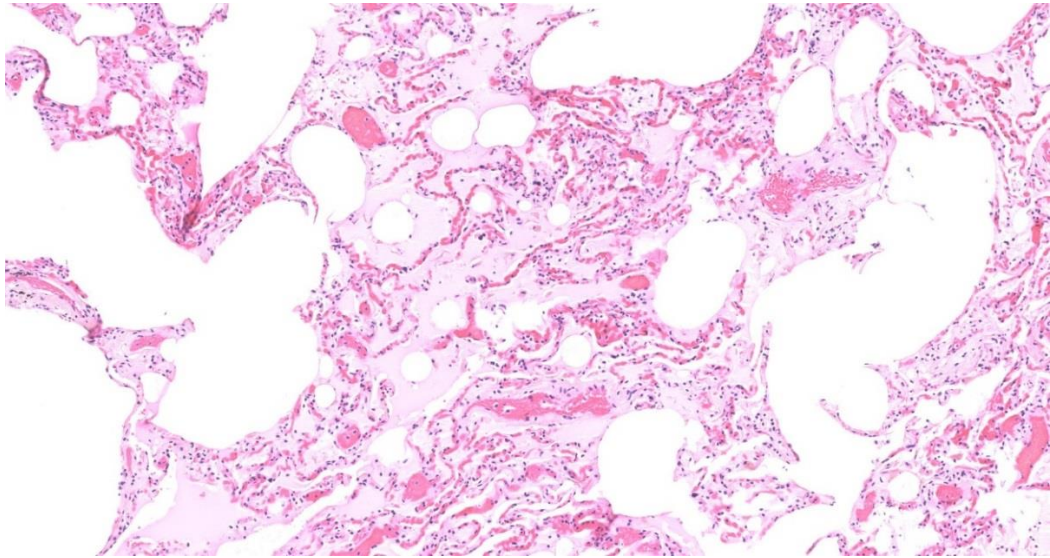


Image 3 : Œdème alvéolaire, congestion vasculaire et emphysème alvéolaire aigu

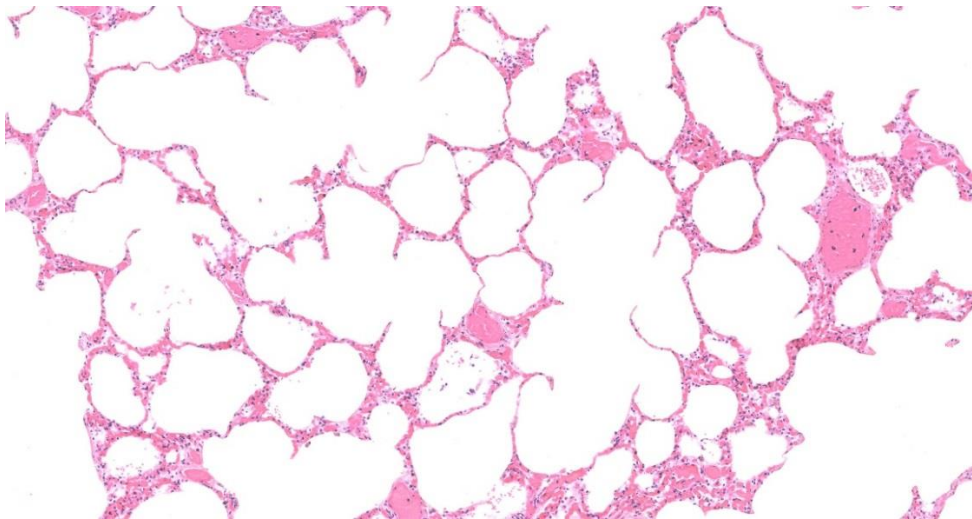
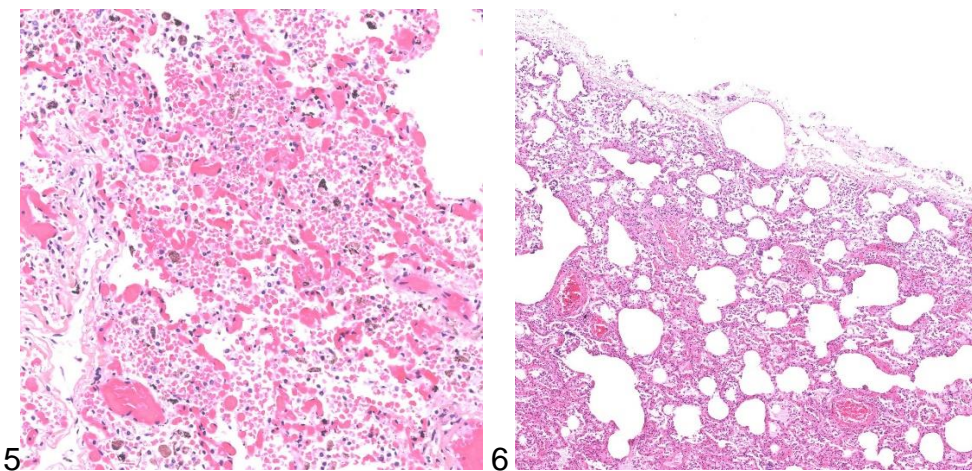


Image 4 : Emphysème alvéolaire aigu



images 5 et 6 : Hémorragie alvéolaire (5) et emphysème sous pleural (6)

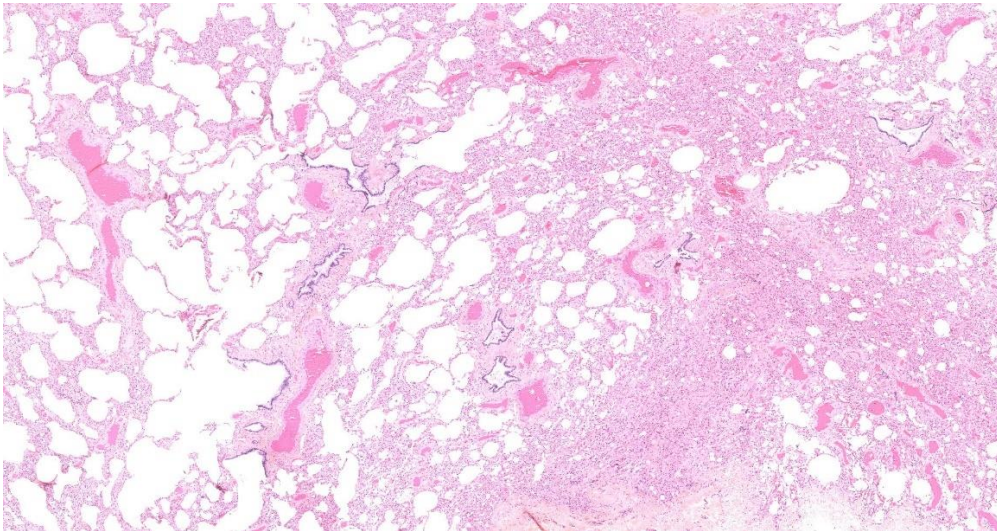


Image 7 : Hétérogénéité de ventilation du parenchyme pulmonaire

Cependant aucun de ces signes cliniques ou anatomopathologiques n'est spécifique d'un décès par asphyxie et, a fortiori, ne permet de différencier avec certitude une asphyxie mécanique d'une asphyxie non mécanique (18).

3.3. Outils immunohistochimiques et moléculaires

De nombreuses études ont tenté d'établir de nouveaux outils diagnostics d'asphyxie, notamment immunohistochimiques.

La présence de SPA sous la forme de dépôts intra-alvéolaires semble être liée à un stimulus hypoxique intense. Lorsque ces dépôts sont massivement présents, ils sont en faveur d'une hypoxie sévère (19). Ils ont été observés dans la plupart des décès par asphyxie mécanique, notamment dans le cas de noyade en eau douce et dans un cas d'intoxication à la méthamphétamine, alors qu'ils étaient très faibles dans les cas d'intoxication à l'alcool, aux hypnotiques ou au monoxyde de carbone (20,21).

L'expression du SPA peut ainsi selon les auteurs avoir un intérêt diagnostique permettant de différencier la noyade d'autres causes de décès par asphyxie (22,23).

Selon Cecchi R. et al., l'HIF1- α est exprimé dans les vaisseaux pulmonaires de la grande majorité des sujets décédés d'une asphyxie mécanique ou par intoxication au monoxyde de carbone. Dans cette étude, le nombre et l'intensité des vaisseaux marqués augmentent avec la durée de l'hypoxie (19).

L'étude de Tsokos M. et al. a montré que le VEGF est abondamment exprimé dans le tissu pulmonaire sain au niveau de l'épithélium bronchique et alvéolaire et sur les cellules glandulaires des bronches et des bronchioles. En revanche, en cas de décès par septicémie avec des lésions pulmonaires aboutissant à un syndrome de détresse respiratoire aiguë, aucune immunoposativité par l'anticorps anti-VEGF n'est observée sur les différents types cellulaires habituellement marqués (24).

Strunk et al. ont démontré que l'asphyxie prolongée est associée à une augmentation significative des macrophages et des cellules géantes intra-alvéolaires (25).

4. Les Aquaporines

4.1. Généralités

Les aquaporines (AQP) ont été découvertes par Peter Agre en 1992 qui a reçu le Prix Nobel de chimie pour ses travaux en 2003. Les AQP sont de petites protéines transmembranaires intégrales qui facilitent le transport de l'eau à travers la membrane

cellulaire en réponse à des gradients osmotiques ou à des différences de pression hydrostatique (26). Elles sont impliquées dans des processus divers tels que la concentration urinaire, la formation du liquide céphalo-rachidien, l'homéostasie de l'eau et de la pression osmotique du tissu nerveux, la sécrétion glandulaire, l'hydratation de la peau, la fertilité masculine, l'ouïe, la vision.

L'eau traverse la bicouche lipidique membranaire de façon passive par deux voies : 1) diffusion simple : lentement à travers la bicouche entre les molécules lipidiques, ce processus est fortement dépendant de la température, 2) diffusion facilitée rapidement par les aquaporines, de façon beaucoup moins sensible à la température.

Les aquaporines permettent donc un mouvement rapide et bidirectionnel de l'eau au travers de la membrane cytoplasmique, perméabilité sélective qui est importante pour de nombreux processus physiologiques vitaux (Figure 1) (27).

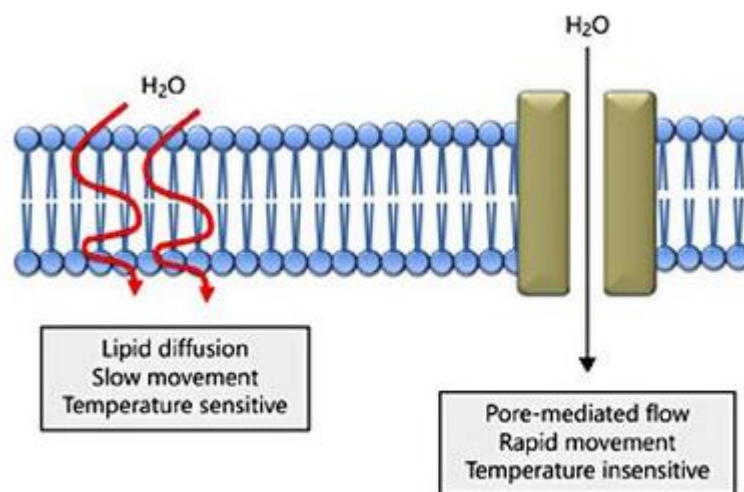


Figure 1 : Voies de transfert passif de l'eau à travers la membrane cellulaire (27)

Toutes les Aquaporines ont les mêmes caractéristiques structurelles globales, un poids moléculaire d'environ 30 kD sous forme non glycosylée et plusieurs états de glycosylation différents. Elles ont toutes 6 domaines transmembranaires ; les

terminaisons C et N sont toutes deux dans le cytoplasme. Les AQP forment un tétramère fonctionnel dans la bicouche lipidique membranaire. Ces 6 domaines transmembranaires sont reliés par des boucles d'acides aminés dont deux sont particulièrement importantes, constituées de 3 acides aminés : NPA (N pour asparagine, P pour proline et A pour alanine). Les deux motifs NPA interagissent l'un avec l'autre dans la région centrale du pore formant un canal étroit de 0,3 nm de diamètre (Figure 2). Le canal interne des aquaporines se compose de trois parties distinctes : une constriction cylindrique au centre et deux entrées coniques. La constriction centrale est si étroite que les molécules d'eau ne peuvent y circuler qu'en « file indienne », une à une, ce qui permet notamment d'assurer la sélectivité à l'eau des aquaporines (28).

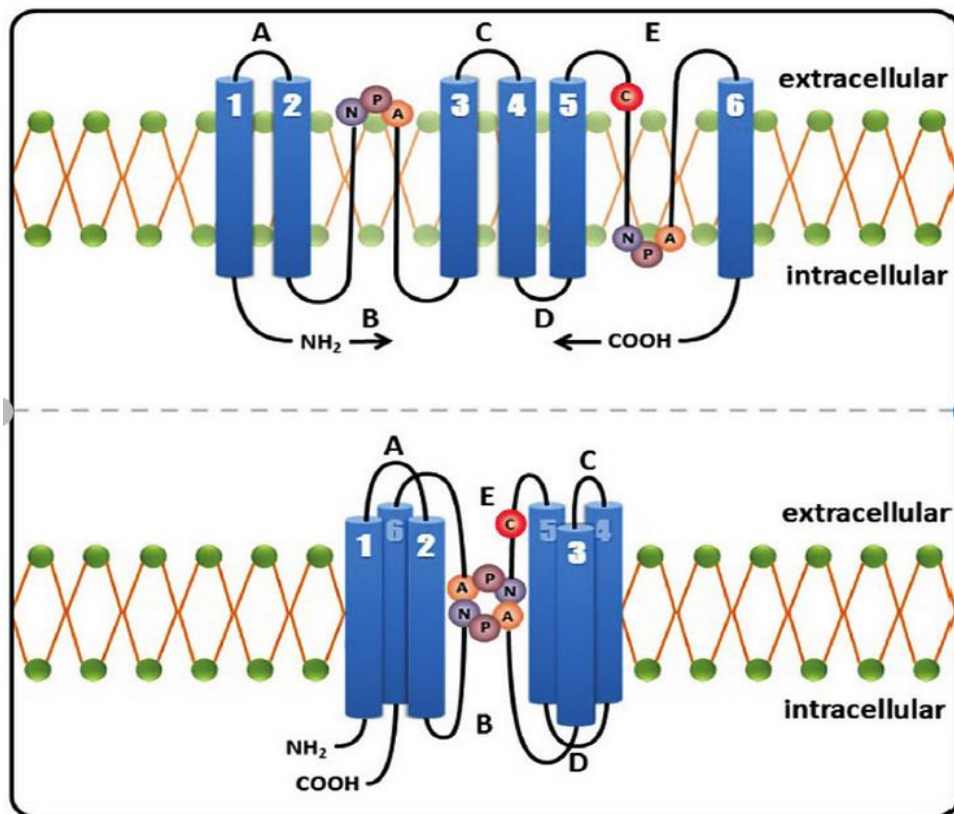


Figure 2 : Structure des Aquaporines (29)

Treize aquaporines sont décrites chez les mammifères, réparties dans la plupart des tissus. Elles interviennent dans de nombreuses barrières épithéliales et endothéliales au sein de divers organes pour y jouer un rôle majeur. Dans le cerveau, l'AQP4 et l'AQP1 sont impliquées dans des fonctions aussi diverses que la régulation du volume extracellulaire, la production, la circulation et la résorption du liquide céphalo-rachidien (30,31). Dans le rein, plusieurs aquaporines sont exprimées dont l'AQP2 qui est régulée par la vasopressine. Leur dysfonctionnement (déficit ou dérégulation de l'expression) peut être à l'origine de maladies héréditaires ou acquises affectant la capacité de concentration de l'urine, comme par exemple, le diabète insipide néphrogénique (32).

4.2. *Aquaporines et poumons*

Quatre d'entre elles sont exprimées dans les voies respiratoires supérieures et les poumons : AQP1, 3, 4 et 5 (33). Elles jouent un rôle dans l'humidification des voies respiratoires, l'absorption du liquide pleural ou d'un liquide alvéolaire en excès ou encore dans la sécrétion des glandes sous-muqueuses.

Le mouvement de l'eau entre l'espace aérien et le compartiment capillaire à travers l'épithélium alvéolaire permet le maintien d'un surfactant isotonique (34). De façon physiologique, l'AQP1 est exprimée dans la membrane des cellules endothéliales, mais aussi dans celle des pneumocytes de type I et des cellules mésothéliales de la plèvre. L'AQP3 est exprimée au niveau baso-latéral de la membrane des cellules épithéliales bronchiques des voies respiratoires proximales et du nasopharynx, mais également au niveau des pneumocytes de type II. L'AQP4 est exprimée dans la

membrane basolatérale des cellules épithéliales bronchiques, trachéales et nasopharyngées, ainsi que dans les pneumocytes de type I. L'AQP5 est exprimée dans la membrane apicale des pneumocytes de type I et dans la membrane apicale des acini des glandes sous-muqueuses des voies aériennes supérieures et des cellules bronchiques (26).

Wang Q. et al. et Hayashi T. et al. suggèrent une expression différentielle des Aquaporines au niveau pulmonaire dans certains types d'asphyxies, notamment une suppression de l'expression du gène de l'AQP5 chez les sujets décédés d'une AM par rapport aux sujets décédés d'une ANM (35), ils observent également une suppression de l'expression pulmonaire du gène de l'AQP5 sur des poumons de sujets décédés d'une asphyxie aiguë par noyade en eau douce contrairement aux noyades en eau salée ou à d'autres causes d'ANM et d'AM (36).

De plus, les Aquaporines ont également été étudiées dans d'autres organes dans le cadre de l'asphyxie par noyade tels que le cerveau où les astrocytes présentent un marquage significativement plus élevé de l'AQP4 dans les cas de décès par noyade en eau douce, par rapport aux noyades en eau salée (37). Une autre étude a montré que l'expression de l'AQP2 intrarénale au niveau de la membrane plasmique apicale des canaux collecteurs est significativement augmentée chez les sujets décédés par noyade en eau salée contrairement aux sujets décédés par noyade en eau douce (38).

L'étude expérimentale de Vassiliou AG et al (39) met en évidence à partir de modèles murins de lésions pulmonaires induites artificiellement par intubation et ventilation pulmonaire artificielle, induites par instillation de Lipopolysaccharides (LPS) ou encore induites par instillation d' Acide chlorhydrique, que l'expression des AQP est modulée au gré de ces différentes situations d'asphyxie. L'auteur avance ainsi l'hypothèse d'une expression des AQP dans le poumon asphyxique aigu dépendante de la localisation et du type de dommage pulmonaire.

L'asphyxie est une situation extrêmement fréquente en anatomopathologie médico-légale, situation pour laquelle le pathologiste ne dispose pas d'outil diagnostique à visée étiologique fiable et précis. Pourtant, déterminer la cause d'une asphyxie et en particulier être capable de distinguer une asphyxie mécanique d'une asphyxie non mécanique est, d'un point de vue médico-judiciaire, parfois crucial pour déterminer l'intervention d'un tiers dans la survenue du décès.

L'objectif de notre étude est de déterminer s'il existe une expression immunohistochimique pulmonaire différente des AQP1, 4 et 5 entre des sujets décédés d'une AM et des sujets décédés d'une ANM dans le but de mettre en évidence un éventuel outil diagnostique étiologique de l'asphyxie.

MATERIEL ET METHODES

1. Population d'étude

L'étude a porté sur l'ensemble des expertises anatomopathologiques des prélèvements issus des instituts de Médecine Légale de Saint Denis de La Réunion, de Paris et de Lille pour lesquelles une asphyxie aigue a été mise en évidence entre novembre 2014 et novembre 2017.

Nous avons collecté les rapports d'autopsies et les bilans toxicologiques.

Le critère d'inclusion était une asphyxie aigue responsable du décès, ce diagnostic était retenu à l'issue de l'analyse anatomopathologique.

Les critères d'exclusion étaient un âge inférieur à 15 ans et 3 mois, l'existence d'une prise en charge réanimatoire, l'existence d'une pathologie pulmonaire chronique, un délai décès-autopsie supérieur à 4 jours, une autolyse tissulaire avec putréfaction à l'examen anatomopathologique, l'absence de données commémoratives et l'absence du bilan toxicologique.

A partir des données anatomopathologiques, médico-légales et toxicologiques, nous avons classé les sujets inclus en trois groupes : AM, ANM et A mixte. Secondairement nous avons exclu les sujets du groupe A mixte, ce sous-groupe étant par définition hétérogène et comportant peu de sujets.

Les données collectées ont fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés de France (CNIL).

2. Matériel

A partir des prélèvements adressés pour l'analyse, nous avons exploité quatre prélèvements par sujet : deux fragments du poumon droit (un fragment du lobe supérieur et un fragment du lobe inférieur) et deux fragments du poumon gauche (un fragment du lobe supérieur et un fragment du lobe inférieur).

3. Etude morphologique

Nous avons réalisé une étude morphologique des lames colorées par l'hématéine éosine safran réalisées à partir des prélèvements pulmonaires. Les critères qui ont été étudiés sont la présence ou non d'un œdème alvéolaire, d'une congestion vasculaire, d'une hémorragie alvéolaire, d'une ventilation hétérogène du parenchyme, d'un emphysème alvéolaire aigu, d'un emphysème sous pleural et interstitiel et d'une hémorragie interstitielle.

L'œdème alvéolaire, l'hémorragie alvéolaire, l'emphysème alvéolaire aigu, l'emphysème sous pleural et interstitiel et l'hémorragie interstitielle ont fait l'objet d'une analyse semi-quantitative de leur intensité : faible, modérée, forte ou absence.

Une lecture (pathologiste 1) a été prise en considération pour l'étude descriptive.

4. Etude Immunohistochimique

4.1. Mise au point de la technique

La technique a été mise au point à partir des prélèvements pulmonaires issus d'un sujet n'ayant pas présenté d'asphyxie, fixés par le formol et inclus en paraffine. Ces blocs ont été coupés à 5µm d'épaisseur.

L'étude immunohistochimique a été réalisée en automate Benchmark Ultra – Ventana ® Roche. Ces automates permettent l'automatisation des différentes étapes du processus d'immunomarquage :

- 1) Déparaffinage : retrait de la paraffine et réhydratation des lames
- 2) Démasquage : restauration des sites antigéniques suite à la formation des ponts Méthylène due à l'utilisation du formol comme fixateur
- 3) Application et incubation de l'anticorps primaire
- 4) Révélation : Mise en évidence des sites d'accrochage de l'anticorps primaire grâce à un chromogène. Les kits de révélation sont spécifiquement dirigés contre les anticorps de souris et de lapin : Ultra View Ventana ® Roche (Référence : 760-500)
- 5) Contre-coloration : Mise en évidence de la structure et de l'architecture tissulaires.

Les paramètres de ces différentes étapes sont à déterminer après une phase de mise au point indispensable à la validation de chacun des marqueurs avant leur utilisation sur les échantillons d'intérêt à tester.

La mise au point des protocoles immunohistochimiques pour les différents marqueurs a été faite en testant l'ensemble des méthodes de démasquage disponibles sur les automates. Les deux grands principes du démasquage antigénique étant :

1) Démasquage par la chaleur

Pour cette méthode de démasquage, il a été testé deux tampons possédant des pH différents : -Tampon CC1 de type TRIS/Borate/EDTA (pH 8.4), ce tampon a été retenu à l'issue de la mise au point.

-Tampon CC2 de type Citrate (pH 6)

2) Démasquage enzymatique

Le démasquage enzymatique a été testé avec l'enzyme Protéase 1 (équivalent Pronase) de la société Ventana Roche ® .

Les mises au point ont débuté en testant la dilution des anticorps primaires la plus faible de la gamme indiquée par les fiches techniques. La dilution était ensuite graduellement augmentée jusqu'à l'obtention d'un immunomarquage optimal. Le temps d'incubation de 32 min à la température de 37°C a été appliqué pour l'ensemble des anticorps sur l'ensemble des lames. Ces paramètres sont ceux couramment utilisés en routine sur ce type d'automate.

Après cette phase de mise au point les protocoles suivants ont été retenus (Tableau 1) :

Anticorps	Fabricant / Distributeur	Référence	Dilution	Hôte	Clone	Etapes IHC supplémentaires
AQP1	Santa Cruz	sc-25287	1/50	Mouse	B-11	Ultra Wash
AQP4	Sigma-Aldrich	HPA014784	1/2000	Rabbit	Polyclonal	Ultra Wash
AQP5	Abcam	ab32320	1/100	Rabbit	EPR3747	Option1 20 min + Ultra Wash

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps

Il est à noter qu'un réactif supplémentaire a été nécessaire pour l'Aquaporine 5. En effet, au cours de la mise au point, cet anticorps a présenté un bruit de fond important qui a pu être réduit par l'ajout de diluant d'anticorps de la société Roche Ventana ® contenant notamment des Immunoglobulines stabilisantes. Cette « Option 1 » a été utilisée comme solution de saturation pour les sites de fixation aspécifique de l'anticorps primaire.

La fonction « Ultra Wash » est une étape supplémentaire au sein des automates qui permet d'appliquer des rinçages supplémentaires sur les lames a posteriori des étapes de révélation. Cela permet d'obtenir des lames plus nettes et la diminution du bruit de fond.

Sur chaque lame, un témoin positif était présent. Pour chaque série d'immunohistochimie, une lame comportant un témoin négatif et une lame sans anticorps primaire ont été réalisées, afin de s'assurer de l'absence de tout faux marquage et/ou fixation(s) non spécifique(s).

Pour l'AQP1, le témoin positif utilisé est le tissu rénal qui présente un marquage cytoplasmique et membranaire des cellules épithéliales du tube contourné proximal (Image 8). Le témoin négatif utilisé est le tissu testiculaire (40).

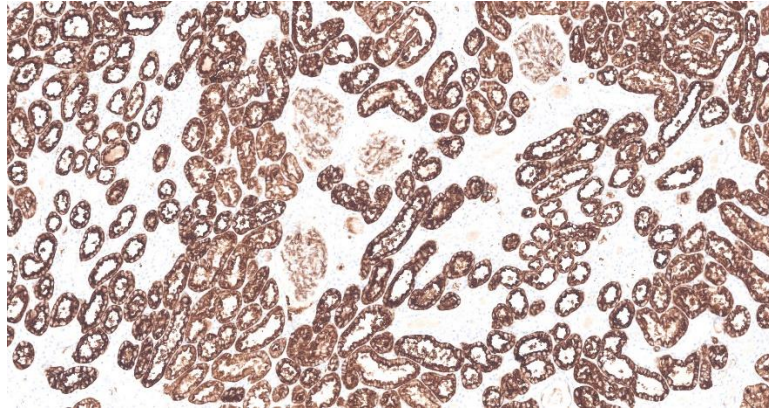


Image 8 : Témoin positif de l'AQP1

Pour l'AQP4, le témoin positif est du tissu cérébral qui présente un marquage cytoplasmique et membranaire des cellules gliales (Image 9). Le témoin négatif est le tissu pancréatique (41).



Image 9 : Témoin positif de l'AQP4

Pour l'AQP5, le témoin positif est du tissu colique qui présente un marquage cytoplasmique et membranaire des glandes coliques (Image 10). Le témoin négatif est du tissu hépatique (42).

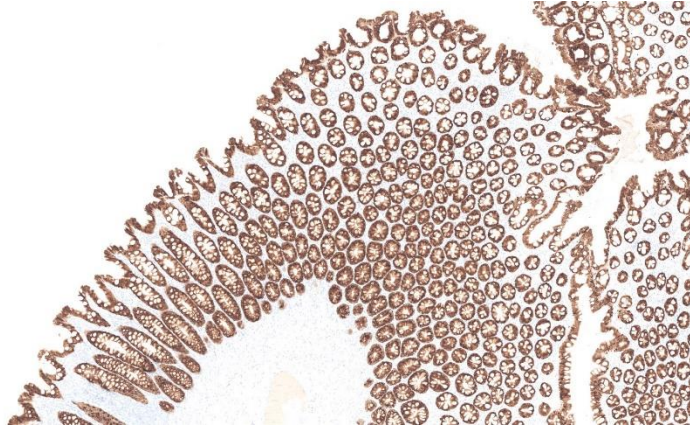


Image 10 : Témoin positif de l'AQP5

Dans certains cas, des pigments formoliques gênant l'interprétation, la technique d'IHC a été réalisée après un traitement par eau oxygénée des lames blanches.

Cette dépigmentation a été effectuée avant le passage en automate. Les lames paraffinées ont été lavées à l'H₂O₂ 30% pendant 30 min puis rincées deux fois 10 min dans le tampon de lavage des automates Benchmark Ultra ® (Reaction buffer).

Pour chaque prélèvement, nous avons réalisé trois lames d'IHC : AQP1, AQP4 et AQP5.

4.2. Interprétation

Nous avons interprété le marquage suivant 3 critères : sa localisation, son intensité et sa quantification.

Une analyse semi-quantitative de la quantification des cellules marquées par l'anticorps a été effectuée de la façon suivante : absence de marquage, quantité faible (1 à 33%), modérée (34 à 66%), importante (67 à 100%).

La localisation du marquage a été classée en CP, MB ou mixte (CP et MB).

L'intensité du marquage a été classée de façon semi-quantitative de la façon suivante : absence de marquage, marquage faible (non identifiable à l'objectif x2,5 ou x5, bien visible à l'objectif x40), modéré (faiblement identifiable à l'objectif x2,5 et x5, bien visible à l'objectif x10 ou x20), fort (nettement identifiable dès l'objectif x2,5 et x5).

Pour chaque critère, une moyenne de la lecture des 4 lames a été déterminée.

Une double lecture des lames d'IHC a été réalisée (pathologiste 1 et pathologiste 2).

Pour l'étude statistique comparant l'expression des différentes AQP, seule la lecture de l'anatomopathologiste sénior (pathologiste 1) a été prise en considération.

5. Analyses statistiques

Les données qualitatives sont présentées en effectifs et en pourcentages. Les données quantitatives sont exprimées par la médiane et l'intervalle interquartile. La normalité des paramètres numériques a été vérifiée graphiquement et par le test du Shapiro-Wilk.

Les deux types d'asphyxie (AM et ANM) sont comparés par les tests du Chi-deux ou du Fisher exact sur les paramètres qualitatifs et par le test U de Mann-Whitney sur les paramètres quantitatifs.

Enfin, nous avons étudié la concordance des résultats inter-observateurs par l'analyse du coefficient de Kappa avec son intervalle de confiance à 95%. La concordance est nulle pour un taux inférieur à 0, légère pour un taux situé entre 0 à 0.2, juste pour un taux situé entre 0.21 et 0.4, modérée entre 0.41 et 0.60, importante entre 0.61 et 0.80 et presque parfaite pour un taux supérieur à 0.8 (43).

Le seuil de significativité retenu est fixé à 5%. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel SAS ®, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) par l'Unité de Biostatistiques du CHU de Lille.

RESULTATS

1. Caractéristiques des sujets

Parmi les 611 dossiers consultés, 575 sujets ont été exclus (Figure 3).

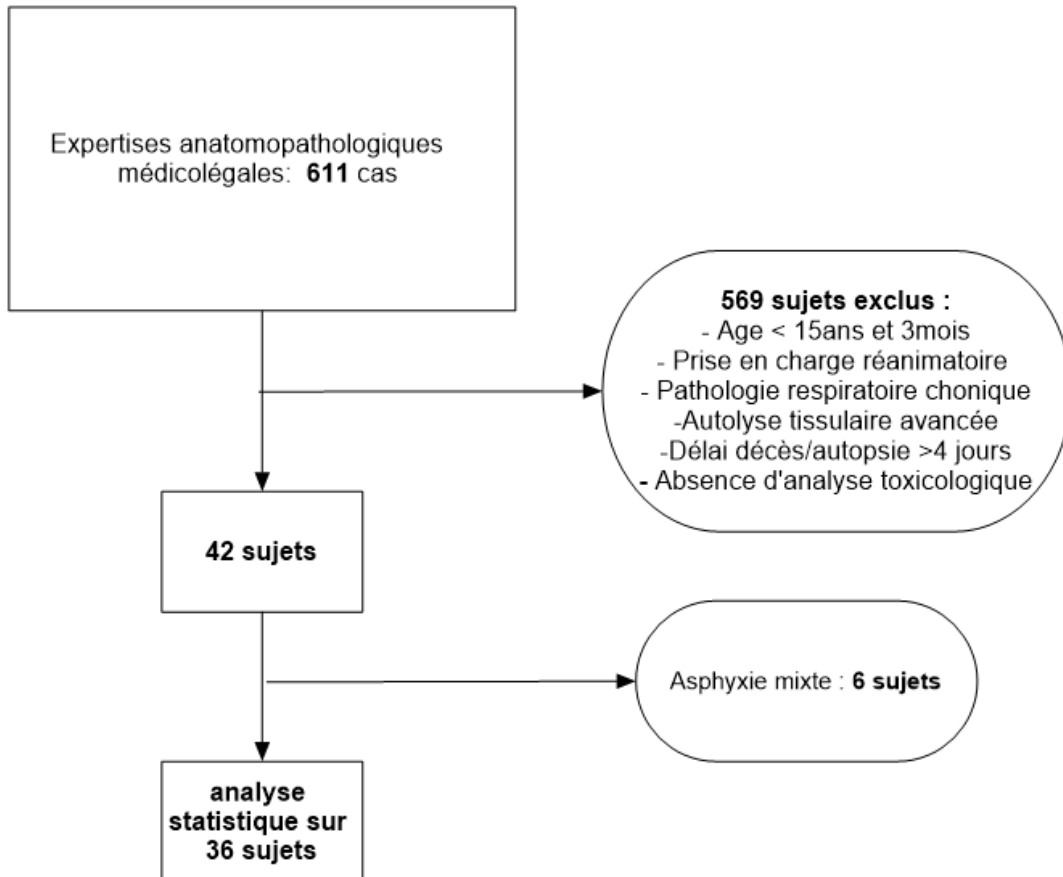


Figure 3 : Flowchart

12 sujets sont décédés d'une AM et 24 sujets sont décédés d'une ANM. Les autopsies des sujets inclus ont été réalisées à l'institut de Médecine Légale de Lille. Les décès secondaires à une A mixte (6 sujets) ont été exclus.

La population d'étude se compose ainsi de 12 femmes (33%) et 24 hommes (67%). L'âge du décès s'étend de 16 à 89 ans, avec une médiane de 40.5 ans. Le délai décès-autopsie présente une médiane de 3 jours. Le descriptif par groupe est résumé dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) :

	AM	ANM	Total
Femmes n (%)	6 (50)	6 (50)	12
Hommes n (%)	6 (25)	18 (75)	24
Age: médiane [intervalle interquartile] (années)	40.5 [31-60]	40.5 [31,5-54]	40.5 [31-57]
Délai décès/autopsie : médiane [intervalle interquartile] (jours)	2 [2-3]	3.5 [2-4]	3 [2-4]

Tableau 2 : Caractéristiques des sujets par groupe

Dans le groupe AM, 7 sujets sont décédés d'une noyade, 4 sujets sont décédés d'une pendaison et 1 sujet est décédé d'une asphyxie positionnelle.

Dans le groupe ANM, 11 sujets sont décédés d'une cause toxique, 4 sujets sont décédés de défaillance cardio-vasculaire pure, 2 sujets sont décédés de causes pulmonaires, 1 sujet est décédé de défaillance neurologique, 3 sujets sont décédés de causes mixtes associant une intoxication médicamenteuse et/ou toxique à une cause naturelle, 2 sujets sont décédés d'une ANM sans étiologie retrouvée, et 1 sujet est décédé d'une insuffisance rénale aigue (Figure 4).

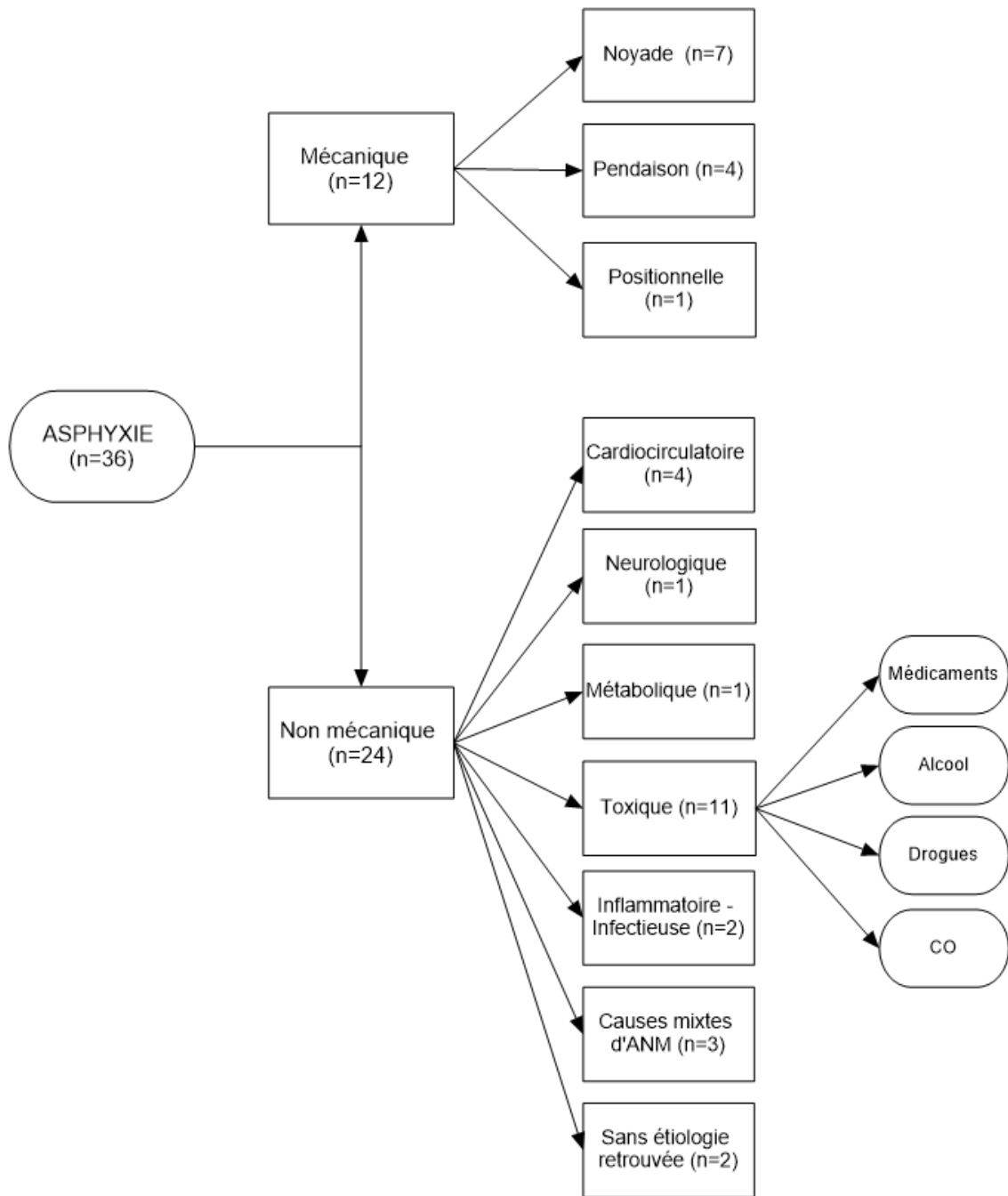


Figure 4 : Répartition des causes d'asphyxie dans notre étude

Les causes toxiques d'asphyxie observées sont : médicament(s) (n=2), alcool (n=4), drogue(s) (n=3), monoxyde de carbone (n=1) et mixtes médicament(s)/alcool (n=2) ou médicament(s)/ drogue(s) (n=2) (Figure 5).

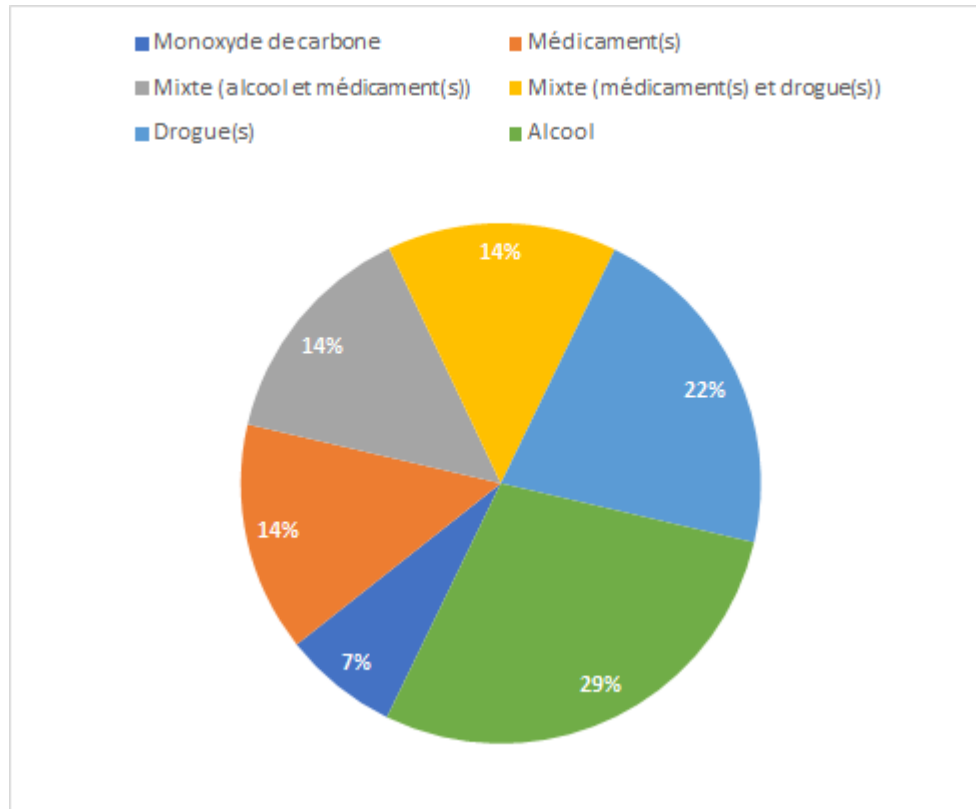


Figure 5 : Répartition des causes toxiques d'asphyxie

Dans 9 cas d'ANM, nous avons observé à l'examen microscopique des lésions focales et minimes pouvant faire discuter une participation mécanique dans la survenue de l'asphyxie. En regard des commémoratifs, des données autopsiques et des données toxicologiques, nous avons considéré ces lésions comme insuffisantes pour affirmer une participation mécanique dans la survenue de l'asphyxie et témoignant plutôt d'un phénomène agonique possiblement positionnel et n'ayant pas participé à la survenue de l'asphyxie aiguë.

2. Caractéristiques morphologiques

Tous les sujets présentent un œdème alvéolaire et une congestion vasculaire. Le groupe ANM se compose majoritairement de cas avec œdème alvéolaire modéré ou intense (n=41,7% et n=45,8% respectivement) contrairement au groupe AM où les sujets se répartissent essentiellement entre œdème alvéolaire léger et modéré (n= 33,3% et n=50% respectivement). L'hémorragie alvéolaire est répartie de façon relativement comparable entre les groupes AM et ANM.

La ventilation hétérogène du parenchyme pulmonaire est absente ou légère dans les deux groupes.

Dans le groupe AM, l'emphysème alvéolaire intense est plus fréquent que dans le groupe ANM (66,6% et 41,6% respectivement). L'emphysème alvéolaire aigu est absent chez des sujets du groupe ANM dans 16,7% des cas.

L'emphysème sous pleural et interstitiel modéré est plus représenté dans le groupe AM que dans le groupe ANM (n=41,7% et n=16,7% respectivement). De plus le groupe ANM présente un nombre de cas (n=45,8%) sans emphysème sous pleural et interstitiel plus important que le groupe AM (n=33,3%).

L'hémorragie interstitielle est répartie de façon relativement comparable entre les deux groupes : dans la majorité des cas, elle est absente (Tableau 3).

		AM n (%)	ANM n (%)
Œdème alvéolaire	absence	0	0
	léger	4 (33,3)	3 (12,5)
	modéré	6 (50)	10 (41,7)
	intense	2 (16,7)	11 (45,8)
Congestion Vasculaire	absence	0	0
	présence	12 (100)	24 (100)
Hémorragie alvéolaire	absence	2 (16,7)	3 (12,5)
	légère	5 (41,7)	12 (50)
	modérée	3 (25)	4 (16,7)
	intense	2 (16,6)	5 (20,8)
Ventilation hétérogène du parenchyme pulmonaire	absence	12 (100)	23 (95,8)
	légère	0	1 (4,2)
	modérée	0	0
	intense	0	0
Emphysème sous pleural et interstitiel	absence	4 (33,3)	11 (45,8)
	léger	3 (25)	9 (37,5)
	modéré	5 (41,7)	4 (16,7)
	intense	0	0
Emphysème alvéolaire aigu	absence	0	4 (16,7)
	léger	2 (16,7)	7 (29,2)
	modéré	2 (16,7)	3 (12,5)
	intense	8 (66,6)	10 (41,6)
Hémorragie interstitielle	absence	11 (91,7)	21 (87,5)
	légère	1 (8,3)	2 (8,3)
	modérée	0	1 (4,2)
	intense	0	0

Tableau 3 : Caractéristiques morphologiques

3. Expression pulmonaire des Aquaporines

3.1. Aquaporine 1

Concernant l'AQP1, nous observons un marquage des cellules endothéliales et des pneumocytes. Il n'y a pas de marquage des cellules bronchiques.

3.1.1. Pneumocytes

Le groupe AM présente plus fréquemment un marquage des pneumocytes d'intensité faible ou modérée (75%) par rapport au groupe ANM où l'intensité est le plus souvent modérée à forte (96%) (Images 11 et 12).

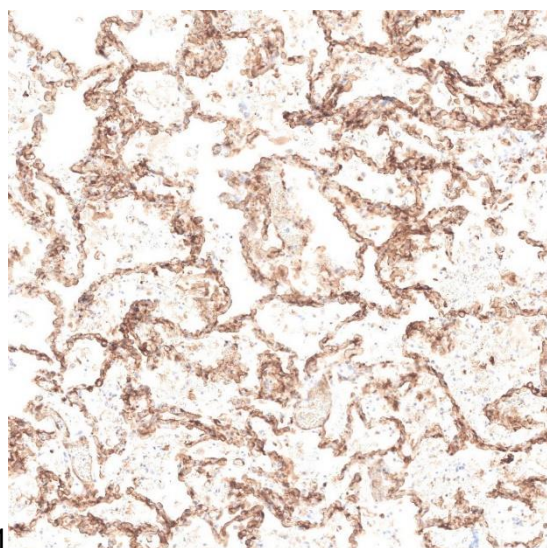
La quantification du marquage des pneumocytes semble de répartition comparable entre les groupes AM et ANM : elle est majoritairement importante (83% dans chaque groupe).

Le marquage est le plus souvent MB dans les deux groupes (89% dans chaque groupe) (Tableau 4).

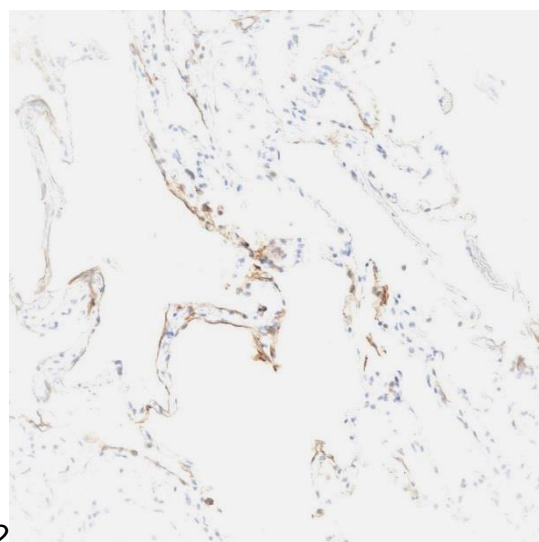
Compte tenu de la taille des sous effectifs, l'étude statistique n'a pu être réalisée qu'à partir de l'intensité du marquage des pneumocytes et ne révèle pas de différence significative entre les groupes ($p=0,0969$).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	0	0	0
	CP	0	0	0
	MB	9 (75)	23 (95)	32 (89)
	CP+MB	3 (25)	1 (5)	4 (11)
Intensité du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	1 (8)	1 (4)	2 (6)
	Modérée	8 (67)	10 (42)	18 (50)
	Forte	3 (25)	13 (54)	16 (44)
Quantification du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	0	0	0
	Modérée	2 (17)	4 (17)	6 (17)
	Importante	10 (83)	20 (83)	30 (83)

Tableau 4 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti-AQP1



11



12

Images 11 et 12 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti-AQP1, 11 :

ANM, 12 : AM

3.1.2. Cellules endothéliales

La proportion de cellules endothéliales immunomarquées (67%) est légèrement plus importante dans le groupe ANM par rapport au groupe AM (50%).

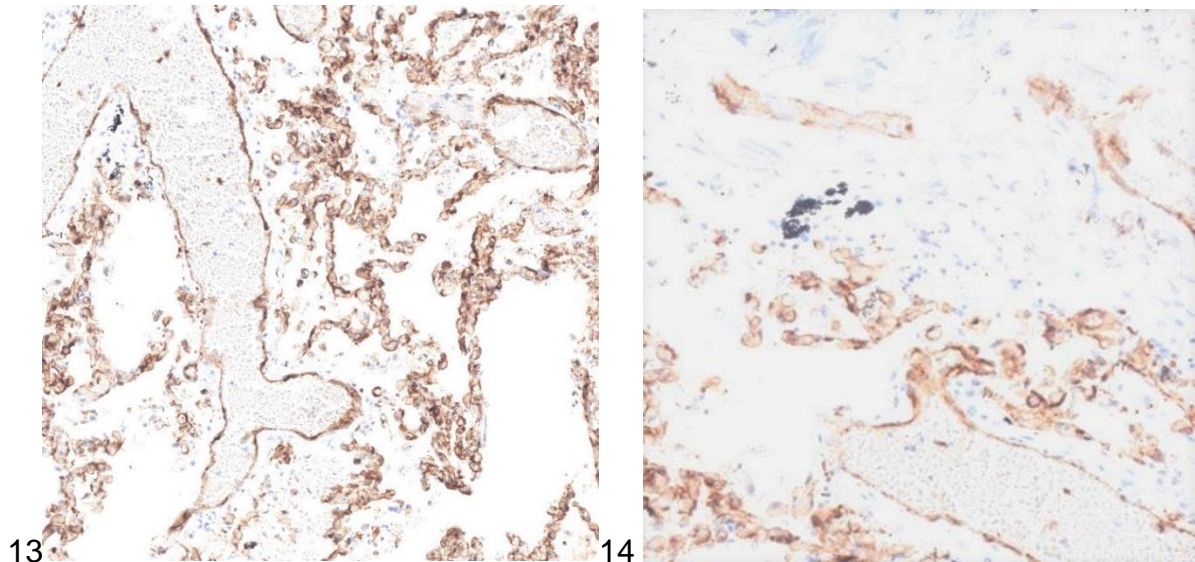
L'intensité du marquage des cellules endothéliales par l'anticorps anti AQP1 est majoritairement faible et modérée tant dans le groupe AM (100%) que dans le groupe ANM (87,5%) (Images 13 et 14).

Le marquage est soit CP (44%), soit MB (44%), avec quelques situations d'immunomarquage CP et MB (12%), dans des proportions identiques entre les groupes ANM et AM (Tableau 5).

L'étude statistique n'a pu être réalisée que sur la quantification du marquage des cellules endothéliales par l'AQP1 et ne révèle pas de différence significative entre les groupes ($p=0.4715$).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	0	0	0
	CP	5 (42)	11 (46)	16 (44)
	MB	5 (42)	11 (46)	16 (44)
	CP+MB	2 (16)	2 (8)	4 (12)
Intensité du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	3 (25)	6 (25)	9 (25)
	Modérée	9 (75)	15 (62,5)	24 (67)
	Forte	0	3 (12,5)	3 (8)
Quantification du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	2 (17)	3 (13)	5 (14)
	Modérée	4 (33)	5 (21)	9 (25)
	Importante	6 (50)	16 (66)	22 (61)

Tableau 5 : Immunomarquage des cellules endothéliales par l'Anticorps anti AQP1



Images 13 et 14 : Immunomarquage des cellules endothéliales par l'Anticorps anti-AQP1, 13 : ANM, 14 : AM

3.2. Aquaporine 4

Concernant l'AQP4, on note un marquage des cellules bronchiques et des pneumocytes. Dans quatre cas, un faible marquage des cellules endothéliales est observé (2 cas d'ANM et 2 cas d'AM).

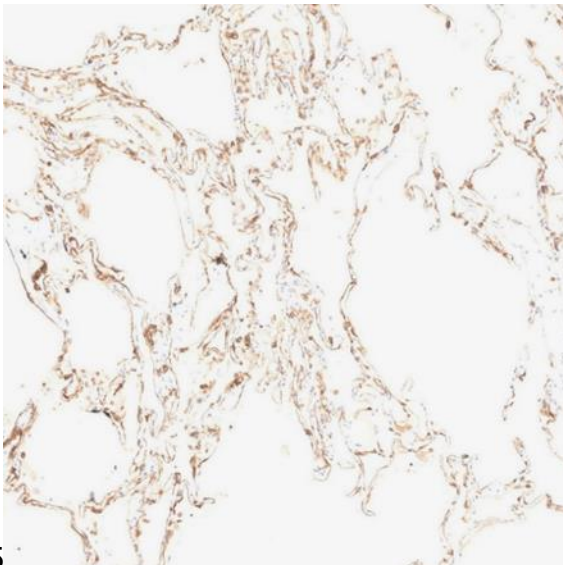
3.2.1 Pneumocytes

L'intensité et la quantification du marquage sont relativement semblables entre les groupes AM et ANM (Images 15 et 16). On constate cependant dans le groupe ANM une proportion plus importante de pneumocytes intensément marqués par l'anticorps (67%) par rapport au groupe AM (50%). Le marquage est principalement MB dans les deux groupes avec cependant 5 cas d'ANM présentant un marquage CP et MB (Tableau 6). L'étude statistique a pu être réalisée sur la quantification et l'intensité du

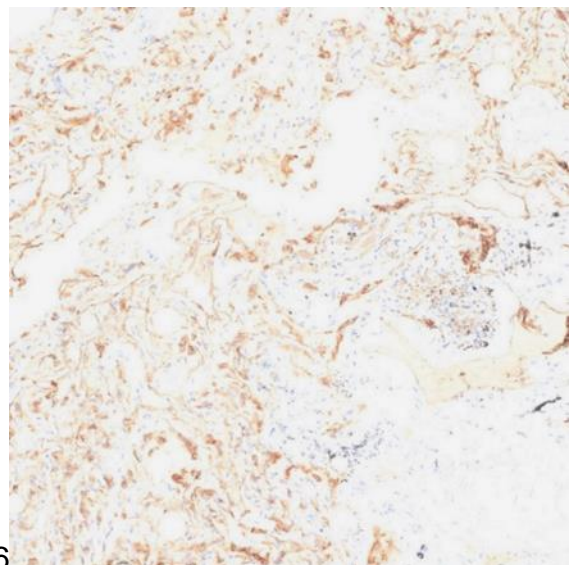
marquage des pneumocytes par l'AQP4 et ne révèle pas de différence significative entre les groupes ($p=0.8134$ et $p=0.4715$ respectivement).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	0	0	0
	CP	0	0	0
	MB	12 (100)	19 (79)	31 (86)
	CP+MB	0	5 (21)	5 (14)
Intensité du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	1 (8)	1 (4)	2 (6)
	Modérée	5 (42)	7 (29)	12 (33)
	Forte	6 (50)	16 (67)	22 (61)
Quantification du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	3 (25)	3 (13)	6 (17)
	Modérée	3 (25)	8 (33)	11 (31)
	Importante	6 (50)	13 (54)	19 (52)

Tableau 6 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti AQP4



15



16

Images 15 et 16 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti-AQP4, 15 :

ANM, 16 : AM

3.2.2. Cellules bronchiques

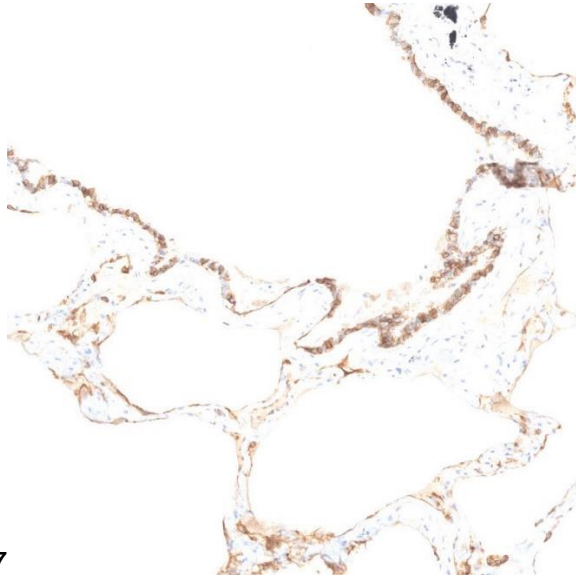
Dans le groupe AM, on constate une proportion plus importante de cellules bronchiques marquées (75%), par rapport au groupe ANM (57%).

L'étude statistique a pu être réalisée sur l'intensité et la quantification du marquage des cellules bronchiques par l'anticorps anti-AQP4 et ne révèle pas de différence significative ($p=0.1211$ et $p=0.4630$ respectivement). Cependant, il est à noter que dans le groupe AM, l'intensité est majoritairement forte (92%) (Images 17 et 18).

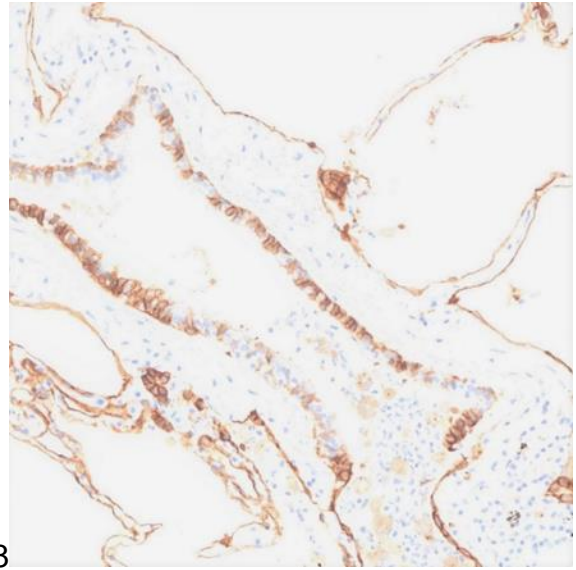
Le marquage est majoritairement MB dans les deux groupes (88,5%), quelques cas présentant un marquage MB et CP (11,5%) (Tableau 7).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	0	0	0
	CP	0	0	0
	MB	11 (92)	20 (87)	31 (88,5)
	CP+MB	1 (8)	3 (13)	4 (11,5)
Intensité du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	1 (8)	0	1 (3)
	Modérée	0	8 (35)	8 (23)
	Forte	11 (92)	15 (65)	26 (74)
Quantification du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	1 (8)	3 (13)	4 (11)
	Modérée	2 (17)	7 (30)	9 (26)
	Importante	9 (75)	13 (57)	22 (63)

Tableau 7 : Immunomarquage des cellules bronchiques par l'Anticorps anti AQP4



17



18

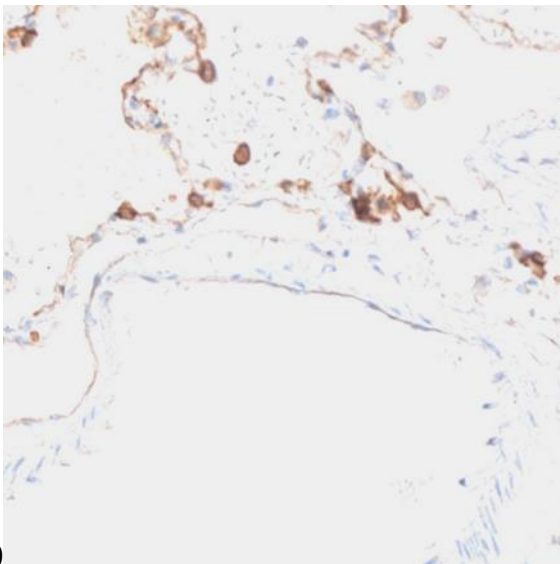
Images 17 et 18 : Immunomarquage des cellules bronchiques par l'Anticorps anti-AQP4, 17 : ANM, 18 : AM

3.2.3. Cellules endothéliales

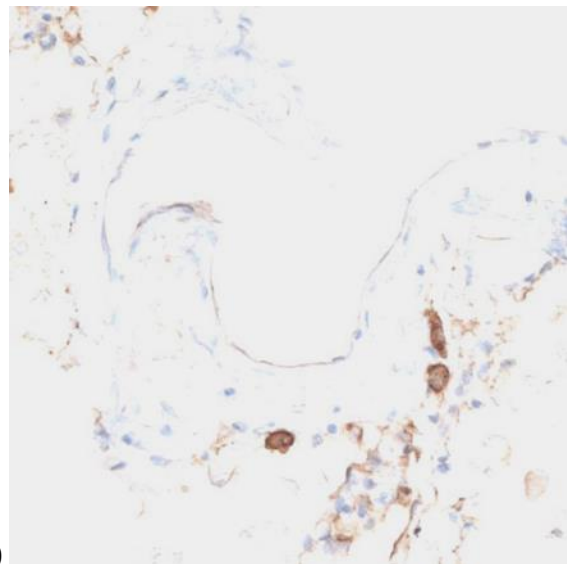
Les quatre cas présentant un marquage des cellules endothéliales par l'anticorps anti AQP4 sont répartis équitablement entre le groupe AM (deux asphyxies par noyade) et ANM (une asphyxie secondaire à un choc hémorragique et une asphyxie secondaire à une intoxication éthylique). Ils présentent tous un marquage MB, une intensité de marquage et une proportion de cellules marquées faibles ou modérées (Tableau 8) (Images 19 et 20).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	10 (83)	22 (92)	32 (89)
	CP	0	0	0
	MB	2 (17)	2 (8)	4 (11)
	CP+MB	0	0	0
Intensité du marquage n (%)	0	10 (83)	22 (92)	32 (89)
	Faible	2 (17)	2 (8)	4 (11)
	Modérée	0	0	0
	Forte	0	0	0
Quantification du marquage n (%)	0	10 (83)	22 (92)	32 (89)
	Faible	1 (8,5)	2 (8)	3 (8)
	Modérée	1 (8,5)	0	1 (3)
	Importante	0	0	0

Tableau 8 : Immunomarquage des cellules endothéliales par l'Anticorps anti AQP4



19



20

Images 19 et 20 : Immunomarquage des endothéliales par l' Anticorps anti-AQP4, 19

: ANM, 20 : AM

3.3. Aquaporine 5

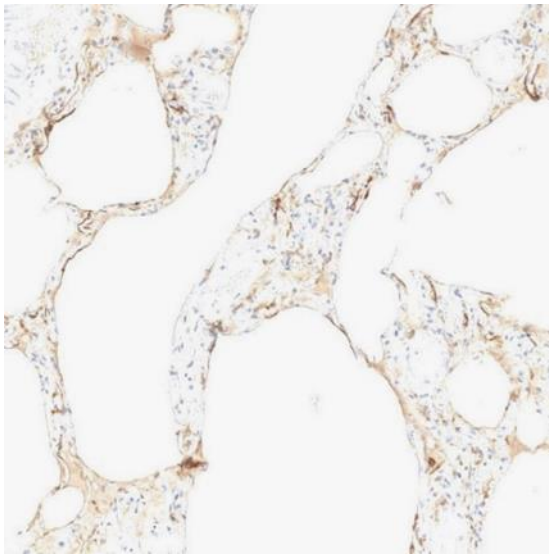
Concernant l'AQP5, nous observons un marquage des cellules bronchiques et des pneumocytes. Ce marquage est dans une majorité des cas apical. Il n'y a pas de marquage des cellules endothéliales.

3.3.1. Pneumocytes

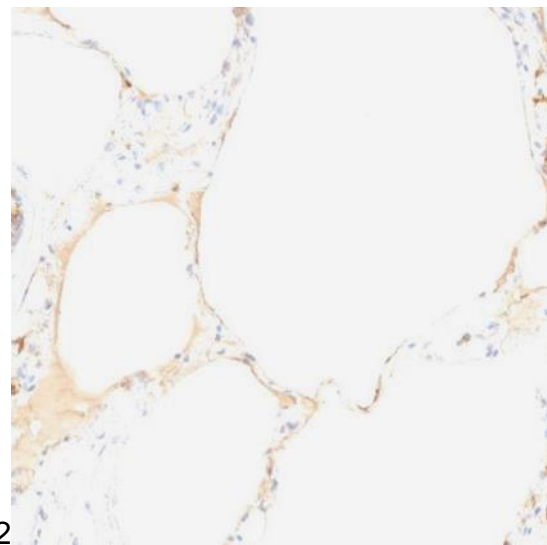
La majorité des cas d'ANM (79%) et des cas d'AM (83%) présente un marquage des pneumocytes de localisation MB. Deux cas d'AM (asphyxies secondaires à une noyade) et 1 cas d'ANM (asphyxie secondaire à une défaillance cardiaque) ne présentent aucun marquage par l'anticorps anti AQP5 sur les pneumocytes. L'intensité du marquage des pneumocytes est faible dans une majorité de cas du groupe AM, contrairement au groupe ANM où le marquage est plus fréquemment modéré ou intense (Images 21 et 22) (Tableau 9).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	2 (17)	1 (4)	3 (8)
	CP	0	0	0
	MB	10 (83)	19 (79)	29 (81)
	CP+MB	0	4 (17)	4 (11)
Intensité du marquage n (%)	0	2 (17)	1 (4)	3 (8)
	Faible	7 (58)	10 (42)	17 (47,5)
	Modérée	3 (25)	10 (42)	13 (36,5)
	Forte	0	3 (12)	3 (8)
Quantification du marquage n (%)	0	2 (17)	1 (4)	3 (8)
	Faible	8 (66)	17 (71)	25 (69)
	Modérée	2 (17)	4 (17)	6 (17)
	Importante	0	2 (8)	2 (6)

Tableau 9 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti AQP5



21



22

Images 21 et 22 : Immunomarquage des pneumocytes par l'Anticorps anti-AQP5, 21 :

ANM, 22 : AM

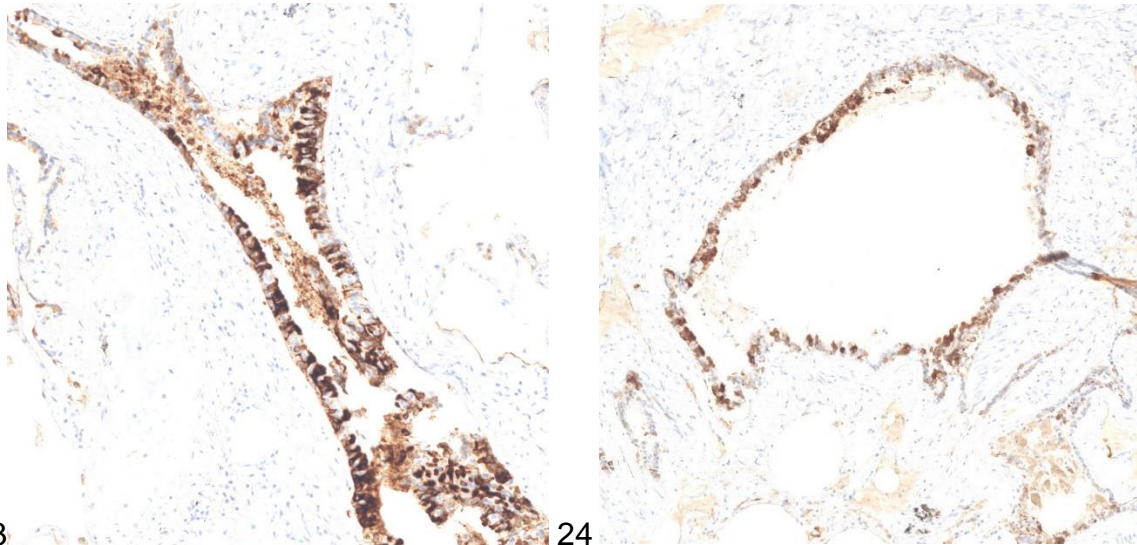
3.3.2 Cellules bronchiques

Les résultats entre les deux groupes semblent comparables (Tableau 10).

La majorité des cas d'AM et d'ANM présente un marquage CP et MB (92% et 67% respectivement). De même, la majorité des cas d'AM et d'ANM présente une intensité (92% et 92% respectivement) et une quantification (100% et 87,5% respectivement) du marquage importantes (Images 23 et 24).

		AM	ANM	Total
Localisation du marquage n (%)	0	0	0	0
	CP	0	5 (21)	5 (14)
	MB	1 (8)	3 (12)	4 (11)
	CP+MB	11 (92)	16 (67)	27 (75)
Intensité du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	0	0	0
	Modérée	1 (8)	2 (8)	3 (8)
	Forte	11 (92)	22 (92)	33 (92)
Quantification du marquage n (%)	0	0	0	0
	Faible	0	1 (4)	1 (3)
	Modérée	0	2 (8,5)	2 (5)
	Importante	12 (100)	21 (87,5)	33 (92)

Tableau 10 : Immunomarquage des cellules bronchiques par l'Anticorps anti AQP5



Images 23 et 24 : Immunomarquage des cellules bronchiques par l'Anticorps anti-AQP5, 23 : ANM, 24 : AM

4. Concordance inter observateurs

Nous avons ensuite comparé l'interprétation de l'analyse immunohistochimique faite par le pathologiste 1 à celle du pathologiste 2, afin d'évaluer la concordance inter observateurs (Tableau 11).

La concordance inter-observateurs la plus faible concerne la localisation du marquage des différents anticorps anti-AQP. L'intensité et la quantification du marquage présentent un accord faible à modérée entre les deux lecteurs.

Kappa [IC à 95%]		Localisation	Intensité	Quantification
AQP1	Pneumocytes	-0.1053 [-0,17-(-0,03)]	0.5714 [0,32-0,81]	0.4000 [0,08-0,71]
	Cellules endothéliales	-0.1519 [-0,36-0,05]	0.2899 [-0,07-0,65]	0.4809 [0,22-0,73]
AQP4	Pneumocytes	0.0784 [-0,20-0,35]	0.4714 [0,20-0,73]	0.4000 [0,15-0,64]
	Cellules bronchiques	0.0207 [-0,08-0,12]	0.4026 [0,11-0,68]	0.2506 [0,01-0,49]
AQP5	Pneumocytes	0.1028 [-0,14-0,42]	0.4436 [-0,01-0,89]	0 [0-0]
	Cellules bronchiques	-0.0874 [0,08-0,55]	0.0345 [-0,25-0,21]	0.1142 [-0,10-0,33]

Tableau 11 : Concordance inter observateurs

5. Délai décès-autopsie

Le test U de Mann-Whitney met en évidence l'absence de différence significative entre le groupe AM et le groupe ANM concernant le délai décès/autopsie ($p=0,1268$).

DISCUSSION

Les données de la littérature suggèrent que les AQP ont un rôle essentiel dans plusieurs mécanismes physiopathologiques, notamment dans l'asphyxie. Notre étude n'a pas mis en évidence de différence significative s'agissant de l'immunomarquage par les anticorps anti AQP1, 4 et 5 au niveau pulmonaire. Cependant, nous observons un marquage proportionnellement plus intense des pneumocytes par l'Anticorps anti AQP5 dans le groupe ANM comparativement au groupe AM.

Dans notre description morphologique, nous avons constaté que les signes classiques d'AM, tels que l'emphysème sous pleural et interstitiel ou l'emphysème alvéolaire aigu, sont également présents dans une certaine proportion dans le groupe ANM. Ceci peut s'expliquer par la difficulté d'établir une cause de décès dans des situations où le déterminisme mortel est plurifactoriel. Il est ainsi parfois difficile voir impossible de catégoriser un décès comme étant une AM ou une ANM lorsque sont confrontées les données d'enquête, autopsiques, anatomopathologiques et toxicologiques. Ainsi des lésions microscopiques témoins d'une part mécanique dans la survenue de l'asphyxie aiguë peuvent représenter un phénomène agonique lors d'une intoxication par exemple, dont il est difficile de déterminer la part de responsabilité dans la survenue du décès. Les signes histopathologiques classiques d'asphyxie ne sont donc pas suffisamment spécifiques pour différencier une AM d'une ANM, d'où l'importance de déterminer d'autres outils diagnostics différentiels.

Notre postulat initial était que les patterns d'expression pulmonaire des AQP pouvaient être différents entre des situations d'AM ou d'ANM. En effet, des études ont mis en évidence une modification de l'expression des AQP pulmonaires dans diverses situations pathologiques, d'une part, dans un contexte de pathologies pulmonaires chroniques, pour exemple, l'AQP1 dans la fibrose pulmonaire idiopathique (44) ou à proximité des adénocarcinomes pulmonaires et mésothéliomes (45), d'autre part, lors de lésions pulmonaires induites artificiellement par intubation et ventilation pulmonaire artificielle (39,46,47).

A partir de modèles murins, Vassiliou AG. et al. ont étudié l'expression pulmonaire des AQP1, 4, 5 et 9 à l'échelle transcriptomique et immunohistochimique après avoir induit un SDRA. Le SDRA est une forme très sévère de défaillance pulmonaire aiguë (œdème pulmonaire lésionnel), consécutive de l'atteinte de la membrane alvéolo-capillaire (48,49). Cette atteinte est secondaire à une réaction inflammatoire d'origine pulmonaire ou extra-pulmonaire (par exemple : une septicémie ou l'inhalation de substances toxiques). La principale caractéristique physiopathologique du SDRA est une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire pulmonaire qui induit la libération de cytokines et la genèse d'un dommage alvéolaire diffus. Les auteurs ont reproduit différents mécanismes de SDRA, certains altérant préférentiellement les cellules épithéliales alvéolaires (instillation intratrachéale d'Acide Chlorhydrique et ventilation mécanique), d'autres altérant à la fois les cellules endothéliales et alvéolaires (instillation intratrachéale de LPS). Le LPS est responsable d'une apoptose accrue des cellules endothéliales induisant un afflux de macrophages alvéolaires (50). L'expression des AQP a été évaluée par RT-PCR et IHC. L'expression de l'AQP1 reste inchangée dans les trois modèles, l'expression de l'AQP4 diminue dans les modèles ciblant

principalement l'épithélium alvéolaire, tandis que l'expression de l' AQP5 diminue dans le modèle ciblant à la fois l'endothélium et l'épithélium alvéolaire (39). Les lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique, ciblant l'épithélium alvéolaire, peuvent être comparées à des lésions d'AM. Concernant l'AQP4, cette étude est concordante avec la notre où l'intensité de l'immunomarquage par l'anticorps anti AQP4 semble proportionnellement plus modérée sur les pneumocytes du groupe AM par rapport au groupe ANM. Les résultats concernant l'AQP5 sont eux différents des nôtres. Cependant cette comparaison est à envisager avec précaution car ces travaux correspondent à des modèles murins, qu'il s'agit de lésions pulmonaires induites artificiellement, observées sur plusieurs jours, alors que le délai de survenue d'une AM dans notre étude est court. On peut ainsi émettre l'hypothèse que la physiopathologie diffère entre ces situations expérimentales et les situations médico-légales. Cependant, dans plusieurs situations d'ANM (par exemple toxiques ou infectieuses), la durée d'agonie peut être plus longue, parfois de plusieurs heures et rejoindre ainsi les conditions expérimentales sus-citées.

A notre connaissance seule l'étude de Wang Q. et al. a auparavant cherché à mettre en évidence une expression différentielle des AQP pulmonaires entre des sujets décédés d'une AM et d'une ANM. Cette étude a comparé l'expression intrapulmonaire de l'AQP1 et l'AQP5 par IHC mais aussi par biologie moléculaire (PCR), entre des sujets décédés d'une AM (comportant des cas d'étouffements de type « smothering », « choking » et de strangulations) et des sujets décédés d'une ANM (comportant des cas de lésions cérébrales et de mort subite d'origine cardiaque). D'un point de vue moléculaire, cette étude a démontré de façon statistiquement significative la suppression de l'expression de l'AQP5, dans le groupe AM par rapport au groupe ANM. Du

point de vue immunohistochimique, dans le groupe AM, l'anticorps anti AQP5 présentait un faible marquage des pneumocytes de type I tandis que pour les cas d'ANM un immunomarquage intense des pneumocytes était observé. Ceci est en accord avec notre étude où l'on observe une majorité de cas ayant un marquage faible des pneumocytes par l'anticorps anti-AQP5 dans le groupe AM alors que dans le groupe ANM une majorité de cas présente un marquage modéré ou intense. Cependant, dans le groupe AM de cette étude, l'AQP5 marquait plus fréquemment des agrégats et des fragments granulaires au sein des espaces alvéolaires, correspondant à un produit de dégradation pneumocytaire, comparativement au groupe ANM.

Le marquage des cellules endothéliales par l'AQP1 était sensiblement le même dans les cas d'AM et d'ANM (35). Dans notre étude, s'agissant de l'expression de l'AQP1, le groupe ANM présentait une proportion plus élevée de cellules endothéliales marquée par rapport au groupe AM. Cette différence pour l'AQP1 peut s'expliquer par le fait que les auteurs ont exclu les pathologies pulmonaires préexistantes, mais ne mentionnent pas l'exclusion de cas ayant bénéficié des manœuvres réanimatoires. De plus, dans cette étude, il n'y a pas de sujet décédé par asphyxie secondaire à une noyade, situation qui représente plus de la moitié des sujets composant notre groupe AM (58%). Enfin, contrairement aux auteurs de cette étude, nous avons réalisé une quantification globale du marquage des pneumocytes, comprenant le marquage des pneumocytes solidaires de la paroi alvéolaire et celui des pneumocytes détachés dans la lumière alvéolaire.

Les AQP exprimées aux niveaux pulmonaire, rénal et cérébral ont été étudiées dans les noyades en eau douce et en eau salée. Au niveau pulmonaire, une de ces études a mis en évidence de façon significative une suppression de l'expression de l'AQP5

par RT-PCR sur des poumons de sujets décédés d'une asphyxie aigue par noyade en eau douce contrairement aux sujets décédés d'une asphyxie secondaire à une noyade en eau salée ou à d'autres causes d'asphyxies (chocs hémorragiques, intoxications aiguës au monoxyde de carbone, strangulation, lacération du tronc cérébral, intoxication aiguë au chloroforme, et hémorragie méningée). Ceci est en accord avec notre étude qui présente, pour l'ensemble des cas de noyades, toutes en eau douce, un marquage et une quantification faibles, voire absents, des pneumocytes par l'anticorps anti-AQP5 alors que ce marquage est modéré ou intense dans le groupe ANM. Les auteurs interprètent ce résultat comme une inhibition, par l'eau hypotonique, de l'expression de l'AQP5 dans les cellules épithéliales alvéolaires de type I afin de prévenir l'hémodilution (36). A contrario, l'eau de mer, hypertonique, stimule l'expression de l'AQP5, expression régulée par l' HIF-1 α . Ainsi, Beiyun Zhou et al. ont démontré que l'expression de l'AQP5 en situation d'induction hypertonique est régulée en partie par la transcription de l' HIF-1 α (51). Il s'agit d'un facteur de transcription qui intervient dans les réponses adaptatives aux changements d'oxygénation des tissus. L'HIF1- α est par ailleurs exprimé dans les vaisseaux pulmonaires de la grande majorité des sujets décédés par asphyxie mécanique (19).

Au niveau rénal, Jun-Ling An et al. ont montré que l'expression immunohistochimique de l'AQP2 intrarénale au niveau de la membrane plasmique apicale des canaux collecteurs était significativement augmentée chez les sujets décédés par noyade en eau salée contrairement aux sujets décédés par noyade en eau douce ou décédés d'une asphyxie non mécanique. De plus, l'expression de l'AQP-2 était significativement plus basse dans le groupe décédé par noyade en eau douce que dans le groupe témoin. L'expression de l'AQP1 et 4 n'était en revanche pas modifiée significativement (38).

La noyade en eau douce entraîne un transfert d'eau hypotonique de la lumière alvéolaire vers la lumière vasculaire, entraînant une hypervolémie, une hémodilution, une hémolyse et une diminution des électrolytes sériques. De la même façon que l'AQP5 au niveau pulmonaire, une diminution de l'expression rénale de l'AQP2 au niveau de la membrane plasmique immédiatement après ce stress hypotonique peut constituer un mécanisme de protection limitant l'entrée d'eau dans la cellule, réduisant ainsi le gonflement cellulaire et l'hémodilution.

Au niveau cérébral, ce même auteur a également constaté au cours d'une autre étude, que les astrocytes présentaient un marquage immunohistochimique significativement plus élevé de l'AQP4 dans les cas de décès par noyade en eau douce, par rapport aux noyades en eau salée et au groupe contrôle (décès par asphyxie non mécanique). De plus, l'AQP4 était significativement moins exprimée chez les sujets décédés par noyade en eau salée que le groupe contrôle. Les auteurs avancent l'hypothèse d'un mécanisme protecteur pour prévenir la rétraction des astrocytes en limitant la sortie de l'eau intracellulaire lors d'un stress hypertonique ou inversement s'il s'agit d'un stress hypotonique (37).

Ces différentes études suggèrent donc que l'expression des AQP, notamment les AQP2, 4 et 5 au niveau pulmonaire mais aussi rénal et cérébral, peut être régulée de façon immédiate et différentielle entre deux situations particulières d'asphyxie aiguë que sont la noyade en eau douce et en eau salée.

Ainsi, la différence d'osmolarité au niveau de la barrière alvéolo-capillaire influencerait l'expression des AQP pulmonaires.

La segmentation de notre population d'étude en AM et ANM ne serait donc pas la plus pertinente pour l'étude des AQP et la mise en évidence d'une éventuelle expression différentielle.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de différence significative d'expression des AQP pulmonaires entre les AM et ANM dans notre étude, serait le rôle mineur des AQP dans les mécanismes physiologiques pulmonaires concernés (26,52,53). Des modèles murins knock-out pour les AQP1 et 4 mais aussi pour l'AQP5 ont permis d'étudier cette hypothèse. Les résultats obtenus semblent démontrer le rôle très limité des AQP dans la physiologie du transport des fluides des voies aériennes dans des conditions physiologiques normales mais aussi en réponse à des lésions pulmonaires induites telles qu'une ventilation rapide avec de l'air sec (54,55). L'étude de Verkman AS et al. suggère que les mouvements des fluides, physiologiques ou soumis à un stress, sont nettement supérieurs dans le rein ou les glandes salivaires, où les aquaporines sont absolument nécessaires à leur fonctionnement normal. Les taux de transport de fluide sensiblement plus faibles dans les voies respiratoires, la plèvre et les poumons que dans les épithéliums rénal et sécrétoire peuvent expliquer le manque apparent de signification fonctionnelle des AQP sur ces sites (26).

A noter par ailleurs que l'observation dans notre étude d'un marquage endothélial par l'AQP4 n'a jamais été rapportée dans la littérature.

Notre travail présente plusieurs limites parmi lesquelles : de petits effectifs, une concordance inter-observateurs faible ou modérée, un délai décès-autopsie s'étendant jusqu'à 4 jours et la méthode de constitution de nos groupes AM et ANM.

La concordance inter-observateurs est légère à modérée, s'agissant de l'intensité et de la quantification de l'immunomarquage et nulle à faible pour la topographie de l'immunomarquage. L'hétérogénéité du marquage au sein des prélèvements - pouvant être expliquée par leur nature post mortem et l'autolyse débutante inhérente à celle-ci - a pu être responsable de ce manque de concordance inter-observateurs. La concordance particulièrement faible s'agissant de la topographie du marquage relève du caractère subjectif du critère lui-même.

L'autolyse tissulaire présente de façon proportionnelle avec le délai décès-autopsie a pu limiter la qualité de l'IHC. Bien que l'immunomarquage était net et sans bruit de fond, une certaine hétérogénéité de quelques cas était parfois observée au sein d'un prélèvement. En effet, un délai décès-autopsie trop important peut rendre l'analyse des tissus difficile, bien que cela dépende également d'autres facteurs comme les conditions de conservation du corps. La décomposition humaine est un processus biologique et chimique complexe qui implique l'interaction d'un large éventail d'enzymes, de bactéries, de champignons et de protozoaires, qui fonctionnent chacun dans un environnement optimal. Après le décès, la privation en oxygène entraîne une autolyse puis une putréfaction. La température et l'humidité seraient les variables influant le plus sur le processus de décomposition. D'autres variables telles que les insectes, les vêtements, le pH du sol, les traumatismes pré mortem, la taille du corps, le sexe, l'âge, la taille, l'exposition au soleil et les précipitations ont également un impact significatif sur la progression de la décomposition humaine (56–58). Lesnikova I. et al. ont observé que sur des échantillons tissulaires de sujets décédés avec un intervalle post mortem de 1 à 3 jours, l'étude immunohistochimique était bien conservée avec divers anticorps (CKAE1, S100, vimentin et CD45), alors que les échantillons tissulaires de

sujets décédés avec un intervalle post mortem plus long présentaient une diminution de l'intensité de l'immunomarquage (59). De plus, des conditions de fixation non optimales des tissus, en particulier par une quantité de formol insuffisante ou encore une surfixation (délai de conservation dans le formol trop long) peuvent nuire à la qualité de l'IHC (60–62). Toutefois dans notre étude, nous avons observé que les immunomarquages étaient majoritairement nets sans artefact de type bruit de fond et seule une hétérogénéité de l'immunomarquage était parfois observée.

De plus, nous avons statistiquement prouvé que le délai décès-autopsie était comparable entre les groupes AM et ANM, ce qui a permis leur comparaison.

Nous avançons l'hypothèse que l'absence de patterns différentiels d'expression pulmonaire des AQP1, 4 et 5 dans notre étude résulte notamment de l'hétérogénéité des mécanismes physiopathologiques au sein même des sous-groupes.

En effet, déterminer la cause du décès et en particulier établir s'il s'agit d'une AM ou d'une ANM s'est révélé difficile dans un certain nombre de cas. Pour exemple, les asphyxies avec participation toxique, où l'effet des toxiques (drogues, alcool, médicaments) est assujéti à une tolérance propre à chaque individu. Le seuil mortel peut varier d'un individu à l'autre, suivant le toxique en cause (63). Par exemple, le seuil de tolérance des opioïdes métabolisés par le Cytochrome P450 (enzyme exprimée dans le foie) peut être diminué par une maladie hépatique. Des interactions graves peuvent également se produire entre différents toxiques et substances psychoactives, comme par exemple le fentanyl associé à la cocaïne, l'héroïne et l'alcool. Sur le plan pharmacodynamique, le fentanyl et l'alcool exercent une action dépressive synergique sur le système cardio-circulatoire, tandis que la cocaïne génère une stimulation du système cardio-circulatoire à l'origine d'une vasoconstriction des artères et d'une arythmie

cardiaque hyperkinétique. En outre, la consommation d'alcool et de fentanyl peut potentialiser les effets secondaires produits sur le système nerveux tels que la somnolence, les vertiges, les étourdissements, les difficultés de concentration et l'altération de la pensée et du jugement. Dans les cas graves, une hypotension artérielle, une détresse respiratoire, un évanouissement, un coma ou même le décès peuvent survenir (64).

La dichotomie AM et ANM est parfois difficile à appliquer comme le met en évidence la difficulté à établir une classification consensuelle des asphyxies. La noyade et la pendaison en sont de bons exemples. Concernant la noyade, plusieurs mécanismes physiopathologiques sont à envisager. D'une part, il y a la noyade vraie, soit par submersion inaugurale soit par syncope inaugurale d'origine traumatique (nageur heurté), médicale (épilepsie, malaise hypoglycémique, syncope d'origine cardiaque) ou thermo différentielle, avec pénétration de liquide dans les voies aériennes. D'autre part il y a la mort subite en milieu hydrique dont l'étiologie peut être cardiovasculaire, réflexe ou thermo différentielle. Le dosage du strontium et la recherche de diatomées permettent d'aider à différencier ces deux mécanismes (65). Dans notre étude, les sujets décédés d'une asphyxie secondaire à une noyade présentaient un dosage sanguin du strontium en faveur ou compatible avec une noyade vraie. Pour un seul sujet, le dosage sanguin du strontium n'a pas été réalisé, toutefois aucune autre cause de décès ne pouvait être avancée et l'étiologie d'une noyade vraie était ainsi retenue.

La pendaison peut également faire intervenir plusieurs mécanismes physiopathologiques pouvant associer une obstruction mécanique des voies aériennes supérieures, résultant de la poussée de la base de la langue contre le toit du pharynx, de l'écrasement du larynx ou de la trachée, à un étirement du sinus carotidien avec arrêt

cardiaque réflexe, à une compression des carotides et des veines jugulaires (plus rarement des artères vertébrales) responsables d'une hypoxie cérébrale. La moelle épinière cervicale peut également, dans certains cas, être lésée (1,66,67).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'implication judiciaire d'un diagnostic d'asphyxie mécanique ou non mécanique nécessite de disposer d'un outil diagnostique étiologique fiable et précis pour le pathologiste.

Dans notre étude, nous ne mettons pas en évidence d'expression pulmonaire des AQP significativement différente entre AM et ANM. Une analyse transcriptomique et immunohistochimique réalisée sur de plus grands effectifs pourrait permettre de pallier à l'hétérogénéité des sous-groupes. L'étude de l'expression des AQP dans d'autres organes (le rein par exemple) où leur implication dans l'équilibre osmotique est plus importante pourrait également être informative quant à leur régulation au cours des différentes situations d'asphyxie.

REFERENCES

1. Saukko P, Knight B. Knight's Forensic Pathology. CRC Press; 2015. 665 p.
2. Azmak D. Asphyxial deaths: a retrospective study and review of the literature. *Am J Forensic Med Pathol.* juin 2006;27(2):134-44.
3. Sauvageau A, Boghossian E. Classification of asphyxia: the need for standardization. *J Forensic Sci.* sept 2010;55(5):1259-67.
4. Oehmichen M, Auer RN, König HG. *Forensic Neuropathology and Associated Neurology.* Springer Science & Business Media; 2006. 661 p.
5. Chmieliauskas S, Mundinas E, Fomin D, Andriuskeviciute G, Laima S, Jurolaic E, et al. Sudden deaths from positional asphyxia: A case report. *Medicine (Baltimore).* juin 2018;97(24):e11041.
6. Bierens JJLM, Lunetta P, Tipton M, Warner DS. *Physiology Of Drowning: A Review.* *Physiology (Bethesda).* mars 2016;31(2):147-66.
7. Ouanes-Besbes L, Dachraoui F, Ouanes I, Abroug F. Noyades : aspects physiopathologiques et thérapeutiques. *Réanimation.* déc 2009;18(8):702-7.
8. Papa L, Hoelle R, Idris A. Systematic review of definitions for drowning incidents. *Resuscitation.* juin 2005;65(3):255-64.
9. Fracasso T, Pfeiffer H, Köhler H, Wieseler S, Hansen SD, Jentgens L, et al. Immunohistochemical expression of fibronectin and C5b-9 in the myocardium in cases of fatal ethanol intoxication. *Int J Legal Med.* juill 2011;125(4):537-42.
10. Fucci N, Offidani C. An unusual death by propranolol ingestion. *Am J Forensic Med Pathol.* mars 2000;21(1):56-8.
11. VIDAL : Base de données médicamenteuse pour les prescripteurs libéraux [Internet]. VIDAL. [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
12. Simonsen KW, Edvardsen HME, Thelander G, Ojanperä I, Thordardottir S, Andersen LV, et al. Fatal poisoning in drug addicts in the Nordic countries in 2012. *Forensic Sci Int.* mars 2015;248:172-80.
13. Nielsen MKK, Johansen SS, Linnet K. Evaluation of poly-drug use in methadone-related fatalities using segmental hair analysis. *Forensic Sci Int.* mars 2015;248:134-9.
14. Beauthier J-P. *Traité de médecine légale.* 2e édition. De Boeck Supérieur; 2011. 1054 p.

15. Durigon M. Pathologie médico-légale. Paris: Elsevier Masson; 1997. 170 p.
16. Dettmeyer RB. Forensic Histopathology: Fundamentals and Perspectives. Springer Science & Business Media; 2011. 469 p.
17. Grellner W, Madea B. Pulmonary micromorphology in fatal strangulations. *Forensic Sci Int.* 4 juill 1994;67(2):109-25.
18. Pollanen MS. Subtle fatal manual neck compression. *Med Sci Law.* avr 2001;41(2):135-40.
19. Cecchi R, Sestili C, Prosperini G, Cecchetto G, Vicini E, Viel G, et al. Markers of mechanical asphyxia: immunohistochemical study on autoptic lung tissues. *Int J Legal Med.* janv 2014;128(1):117-25.
20. Zhu BL, Ishida K, Quan L, Fujita MQ, Maeda H. Immunohistochemistry of pulmonary surfactant apoprotein A in forensic autopsy: reassessment in relation to the causes of death. *Forensic Sci Int.* 11 sept 2000;113(1-3):193-7.
21. Maeda H, Fujita MQ, Zhu B-L, Ishida K, Quan L, Oritani S, et al. Pulmonary surfactant-associated protein A as a marker of respiratory distress in forensic pathology: assessment of the immunohistochemical and biochemical findings. *Leg Med (Tokyo).* mars 2003;5 Suppl 1:S318-321.
22. Pérez-Cárceles MD, Sibón A, Vizcaya MA, Osuna E, Gómez-Zapata M, Luna A, et al. Histological findings and immunohistochemical surfactant protein A (SP-A) expression in asphyxia: its application in the diagnosis of drowning. *Histol Histopathol.* 2008;23(9):1061-8.
23. Stemberga V, Stifter S, Cuculić D, Coklo M, Bosnar A. Immunohistochemical surfactant protein-A expression: fatal drowning vs. postmortem immersion. *Med Hypotheses.* avr 2009;72(4):413-5.
24. Tsokos M. Immunohistochemical detection of sepsis-induced lung injury in human autopsy material. *Leg Med (Tokyo).* juin 2003;5(2):73-86.
25. Strunk T, Hamacher D, Schulz R, Brinkmann B. Reaction patterns of pulmonary macrophages in protracted asphyxiation. *Int J Legal Med.* nov 2010;124(6):559-68.
26. Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol.* 15 déc 2007;159(3):324-30.
27. Brown D. The Discovery of Water Channels (Aquaporins). *Ann Nutr Metab.* 2017;70 Suppl 1:37-42.
28. Gravelle S, Joly L, Detcheverry F, Ybert C, Cottin-Bizonne C, Bocquet L. Perméabilité optimale des aquaporines - Une histoire de forme ? *Med Sci (Paris).* 1 févr 2015;31(2):174-9.
29. Geadkaew A. Human Parasitic Aquaporins: New anti-parasitic drug targets. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand.* 1 août 2014;42(2).

30. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev.* oct 2013;93(4):1543-62.
31. Guérin CF, Regli L, Badaut J. [Roles of aquaporins in the brain]. *Med Sci (Paris).* sept 2005;21(8-9):747-52.
32. Li Y, Wang W, Jiang T, Yang B. Aquaporins in Urinary System. *Adv Exp Med Biol.* 2017;969:131-48.
33. Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mars 2001;24(3):224-34.
34. Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, et al. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta.* mai 2014;1840(5):1492-506.
35. Wang Q, Ishikawa T, Michiue T, Zhu B-L, Guan D-W, Maeda H. Intrapulmonary aquaporin-5 expression as a possible biomarker for discriminating smothering and choking from sudden cardiac death: a pilot study. *Forensic Sci Int.* 10 juill 2012;220(1-3):154-7.
36. Hayashi T, Ishida Y, Mizunuma S, Kimura A, Kondo T. Differential diagnosis between freshwater drowning and saltwater drowning based on intrapulmonary aquaporin-5 expression. *Int J Legal Med.* janv 2009;123(1):7-13.
37. An J-L, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Immunohistochemical examination of intracerebral aquaporin-4 expression and its application for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. *Int J Legal Med.* janv 2011;125(1):59-65.
38. An J-L, Ishida Y, Kimura A, Kondo T. Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. *Int J Legal Med.* mars 2010;124(2):99-104.
39. Vassiliou AG, Manitsopoulos N, Kardara M, Maniatis NA, Orfanos SE, Kotanidou A. Differential Expression of Aquaporins in Experimental Models of Acute Lung Injury. *In Vivo.* oct 2017;31(5):885-94.
40. AQP1 - Antibodies - The Human Protein Atlas [Internet]. [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000240583-AQP1/antibody>
41. AQP4 - Antibodies - The Human Protein Atlas [Internet]. [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171885-AQP4/antibody>
42. AQP5 - Antibodies - The Human Protein Atlas [Internet]. [cité 3 oct 2018]. Disponible sur: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000161798-AQP5/antibody>
43. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* mars 1977;33(1):159-74.
44. Galán-Cobo A, Arellano-Orden E, Sánchez Silva R, López-Campos JL, Gutiérrez Rivera C, Gómez Izquierdo L, et al. The Expression of AQP1 IS Modified in Lung of Patients

With Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Addressing a Possible New Target. *Front Mol Biosci.* 2018;5:43.

45. López-Campos JL, Sánchez Silva R, Gómez Izquierdo L, Márquez E, Ortega Ruiz F, Cejudo P, et al. Overexpression of Aquaporin-1 in lung adenocarcinomas and pleural mesotheliomas. *Histol Histopathol.* 2011;26(4):451-9.
46. Fabregat G, García-de-la-Asunción J, Sarriá B, Cortijo J, De Andrés J, Mata M, et al. Increased expression of AQP 1 and AQP 5 in rat lungs ventilated with low tidal volume is time dependent. *PLoS ONE.* 2014;9(12):e114247.
47. Lin F, Pan L-H, Ruan L, Qian W, Liang R, Ge W-Y, et al. Differential expression of HIF-1 α , AQP-1, and VEGF under acute hypoxic conditions in the non-ventilated lung of a one-lung ventilation rat model. *Life Sci.* 1 mars 2015;124:50-5.
48. Rawal G, Yadav S, Kumar R. Acute Respiratory Distress Syndrome: An Update and Review. *J Transl Int Med.* juin 2018;6(2):74-7.
49. Nanchal RS, Truwit JD. Recent advances in understanding and treating acute respiratory distress syndrome. *F1000Res.* 2018;7.
50. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* sept 2008;295(3):L379-399.
51. Zhou B, Ann DK, Li X, Kim K-J, Lin H, Minoo P, et al. Hypertonic induction of aquaporin-5: novel role of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am J Physiol, Cell Physiol.* avr 2007;292(4):C1280-1290.
52. Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration. *J Gen Physiol.* juin 2001;117(6):573-82.
53. Borok Z, Verkman AS. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: role of aquaporin water channels in fluid transport in lung and airways. *J Appl Physiol.* déc 2002;93(6):2199-206.
54. Bai C, Fukuda N, Song Y, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice. *J Clin Invest.* févr 1999;103(4):555-61.
55. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest.* janv 2000;105(1):93-100.
56. Cockle DL, Bell LS. Human decomposition and the reliability of a « Universal » model for post mortem interval estimations. *Forensic Sci Int.* août 2015;253:136.e1-9.
57. Ceciliason A-S, Andersson MG, Lindström A, Sandler H. Quantifying human decomposition in an indoor setting and implications for postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int.* févr 2018;283:180-9.
58. Suckling JK, Spradley MK, Godde K. A Longitudinal Study on Human Outdoor Decomposition in Central Texas. *J Forensic Sci.* janv 2016;61(1):19-25.

59. Lesnikova I, Schreckenbach MN, Kristensen MP, Papanikolaou LL, Hamilton-Dutoit S. Usability of Immunohistochemistry in Forensic Samples With Varying Decomposition. *Am J Forensic Med Pathol.* sept 2018;39(3):185-91.
60. Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* juin 2002;10(2):183-6.
61. Libard S, Cerjan D, Alafuzoff I. Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol.* 24 oct 2018;
62. Hitchman E, Hodgkinson C, Roberts D, Ashton G, Yunus Z, Byers R, et al. Effect of prolonged formalin fixation on immunohistochemical staining for the proliferation marker Ki67. *Histopathology.* déc 2011;59(6):1261-3.
63. Kintz P, éditeur. *Toxicologie et pharmacologie médico-légales.* Amsterdam, France: Elsevier; 1998. 719 p.
64. Pérez-Mañá C, Papaseit E, Fonseca F, Farré A, Torrens M, Farré M. Drug Interactions With New Synthetic Opioids. *Front Pharmacol.* 2018;9:1145.
65. Deveaux M, Pépin G. Les métaux marqueurs de la noyade. *Annales de Toxicologie Analytique.* 2007;19(1):59-64.
66. Sharma BR, Singh VP, Harish D. Neck structure injuries in Hanging--comparing retrospective and prospective studies. *Med Sci Law.* oct 2005;45(4):321-30.
67. Ma J, Jing H, Zeng Y, Tao L, Yang Y, Ma K, et al. Retrospective analysis of 319 hanging and strangulation cases between 2001 and 2014 in Shanghai. *J Forensic Leg Med.* août 2016;42:19-24.

AUTEUR : Nom : FICHET

Prénom : Clémence

Date de Soutenance : 15 janvier 2019

Titre de la Thèse : Expression intra-pulmonaire des Aquaporines 1, 4 et 5 : Quelle utilité dans le diagnostic différentiel des asphyxies mécaniques et non mécaniques ?

Thèse - Médecine - Lille 2019

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologique

Mots-clès : Aquaporines, asphyxie, poumons, immunohistochimie

Résumé :

L'asphyxie est une cause fréquente de décès regroupant de multiples étiologies. L'analyse anatomopathologique est peu spécifique et donc peu informative quant à l'étiologie de l'asphyxie. L'objectif de notre étude est de déterminer s'il existe une expression immunohistochimique pulmonaire différente des Aquaporines (AQP) 1, 4 et 5 entre des sujets décédés d'une asphyxie mécanique (AM) et des sujets décédés d'une asphyxie non mécanique (ANM) dans le but d'établir un nouvel outil diagnostic étiologique de l'asphyxie aiguë pour le pathologiste.

L'analyse a porté sur une série rétrospective multicentrique de 36 sujets décédés d'une asphyxie aiguë en contexte Médico-Légal. Nous avons utilisé quatre prélèvements pulmonaires par sujet sur lesquels nous avons réalisé les études immunohistochimiques (IHC) AQP1, AQP4 et AQP5. Chaque immunohistochimie a été interprétée suivant 3 critères : la localisation, l'intensité et la quantification du marquage. Chacun de ces critères a été étudié sur les pneumocytes, les cellules endothéliales et les cellules bronchiques. Une double lecture des lames d'IHC a été réalisée.

Notre étude n'a pas mis en évidence de différence s'agissant du marquage par les anticorps anti AQP1 et 4 entre les groupes AM et ANM. Concernant l'anticorps anti AQP5, l'intensité du marquage des pneumocytes est proportionnellement plus faible dans le groupe AM, en particulier pour les cas de noyade, que dans le groupe ANM (75% et 46% respectivement). Deux cas du groupe AM et deux cas du groupe ANM présentent un marquage endothélial par l'anticorps anti AQP4.

L'expression intrapulmonaire des AQP1 et 4 ne semble pas être discriminante entre les AM et les ANM. L'expression de l'AQP5 par les pneumocytes est proportionnellement plus faible dans certaines situations d'AM et en particulier la noyade en eau douce.

Composition du Jury :

Présidente : Madame le Professeur Marie-Christine COPIN

Assesseurs : Monsieur le Professeur Valery HEDOUIN

Madame le Professeur Mercé JOURDAIN

Madame le Professeur Delphine ALLORGE

Directrice de Thèse : Madame le Docteur Sarah HUMEZ