



N° d'ordre NNT : 2021LYSE1058

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE (E.D.I.S.S.)

Spécialité de doctorat :
Chimie analytique – Toxicologie médico-légale

Soutenue publiquement le 31 mars 2021

Par Charline BOTTINELLI

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION DE L'INSULINE HUMAINE ET DE SES ANALOGUES DANS DES PRELEVEMENTS SANGUINS ET TISSULAIRES DANS UN CADRE MEDICO-LEGAL

INTERETS ET LIMITES POUR L'INTERPRETATION DES DONNEES POST-MORTEM

Directeurs de Thèse : Pr. Jérôme GUITTON
 Pr. Laurent FANTON

Jury : Pr. Anne-Laure PÉLISSIER-ALICOT (Présidente du jury)
Dr. Marc AUGSBURGER (Rapporteur)
Dr. Jean-Michel GAULIER (Rapporteur)
Dr. Sybil CHARRIERE (Examinateuse)
Dr. Maggy HOLOGNE (Examinateuse)
Pr. Isabelle MOREL (Examinateuse)
Pr. Laurent FANTON (Directeur de thèse)
Pr. Jérôme GUITTON (Directeur de thèse)

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution de l'insuline humaine et de ses analogues dans des prélèvements sanguins et tissulaires dans un cadre médico-légal.

Intérêts et limites pour l'interprétation des données post-mortem.

Le but de ce travail était de développer et de valider des techniques analytiques basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse de l'insuline humaine et de ses analogues dans des milieux biologiques.

Une partie bibliographique décrit les matrices biologiques d'intérêt et rassemble les connaissances actuelles sur l'analyse des insulines dans les milieux biologiques.

Une partie expérimentale présente le développement de méthodes basées sur l'immunopurification et la spectrométrie de masse, à travers 2 articles analytiques. L'un rapporte la première validation d'une méthode d'analyse quantitative des insulines dans le sérum post-mortem par LC-MS/HRMS. Le second article présente la mise au point d'une analyse qualitative dans les tissus, validée en termes de limite de détection et de spécificité. L'application à des cas réels a permis d'illustrer les performances des 2 méthodes. D'après les données obtenues, un protocole pré-analytique a été établi avec des recommandations sur les matrices d'intérêt et les modalités de prélèvement en cas de suspicion d'intoxication aux insulines. Enfin, une aide à l'interprétation des résultats a été proposée sous la forme d'un logigramme à travers l'étude de la littérature et les différents cas rapportés et analysés.

La mise en œuvre et l'interprétation des résultats des analyses des insulines dans un cadre médico-légal et en particulier en post-mortem sont complexes. Les travaux réalisés proposent des méthodes analytiques validées et fiables. Celles-ci devraient contribuer à acquérir de nouvelles données pour améliorer les connaissances de la toxicologie médico-légale des insulines.

DISCIPLINE

Chimie analytique – Toxicologie médico-légale

MOTS-CLES

Toxicologie médicolégale – Insuline – Chromatographie liquide – Spectrométrie de masse - Tissus

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R OU DU LABORATOIRE

Ciblage Thérapeutique en Oncologie - EMR 3738

Laboratoire de pharmacologie-toxicologie, Hôpital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon,
PIERRE BENITE

Analysis of human insulin and its analogs by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry in blood and tissue samples in a forensic context

Interests and limitations in postmortem data interpretation

The aim of this study was to develop and to validate analytical techniques based on liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry for analysis of human insulin and its analogs in biological samples.

A literature section describes the biologic matrices of interest and gathers current knowledge on insulins analysis in biological media.

An experimental section presents the development of methods based on immunopurification and mass spectrometry, through 2 analytical papers. The first one reports the first validation of a quantitative method for insulins analysis in postmortem serum by LC-MS/HRMS. The second reports the development of a qualitative analysis of tissue samples, validated in terms of limit of detection and specificity. The application to authentic cases illustrated the performances of the both methods. Based on the data obtained, a pre-analytical process has been established with recommendations on matrices of interest and sampling methods in case of suspected insulin poisoning. Finally, a tool to help in interpreting results was proposed in the form of a logic diagram through the study of the literature and the various cases reported and analyzed.

Performing and interpreting results of insulins analyses in a forensic context and particularly in postmortem are complex. The present work proposes validated and reliable analytic methods. These should contribute to the acquisition of new data to improve knowledge on the forensic toxicology of insulins.

KEYWORDS

Forensic Toxicology – Insulin – Liquid chromatography – Mass spectrometry – Tissues

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Anne-Laure Pélissier-Alicot, le Dr Marc Augsburger, et le Dr Jean-Michel Gaulier pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Vos travaux dans le domaine médico-légal sont reconnus au niveau international. Je vous remercie de me faire l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie le Dr Sybil Charrière, le Dr Maggy Hologne et le Pr Isabelle Morel d'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinatrices. Je vous remercie de l'intérêt porté à ce sujet. Vos points de vue de domaines variés apportent une dimension différente et complémentaire à la problématique abordée dans cette thèse.

Je remercie le Pr Laurent Fanton pour avoir accepté de co-diriger ces travaux de recherche qui prolongent une collaboration fructueuse débutée il y a de nombreuses années avec le laboratoire LAT LUMTOX.

Je remercie grandement le Pr Jérôme Guitton pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail de thèse. Merci pour votre disponibilité sans faille et votre humanité. Ce fut un réel plaisir d'apprendre à vos côtés.

J'adresse tous mes remerciements au Dr Fabien Bévalot pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir fait confiance pour mener à terme ce projet ambitieux. Vous m'avez initiée à la Recherche et encouragée dans cette voie.

Je remercie le Dr Nathalie Cartiser pour ces précieux conseils et son immense aide à la rédaction des articles.

Je remercie le Dr Tiia Kuuranne et le Dr Raul Nicoli de m'avoir chaleureusement accueillie dans leur laboratoire de l'antidopage suisse et d'avoir partagé avec moi leurs connaissances sur l'analyse des protéines.

Je tiens à remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire LAT LUMTOX pour leur soutien logistique, informatique et moral. Merci de m'avoir épaulé durant ces années et d'avoir développé un radar aux « protocoles insuline ».

Je tiens à remercier le personnel du service Pharmacologie Toxicologie de l'Hôpital Lyon Sud pour leur aide technique au cours de mes expérimentations.

Je remercie également l'équipe de l'Institut Médico-Légal de Lyon pour leur collaboration à ces travaux.

Je tiens à remercier mes amis pour leur soutien et leur bienveillance : Julie, Leticia (ma coach officielle en communication anglaise), Boubou, Bourdon, Bachi-bouzouk.

Merci à mes parents et grands-parents de m'avoir transmis cette détermination, cette soif d'apprendre et ce goût de l'accomplissement de soi. Merci de croire en moi en toutes circonstances. « Chi va piano, va sano e lontano ! »

A mon cher et tendre de longue date, Merci de m'encourager à donner le meilleur de moi-même et de me rassurer. Merci pour ta patience et ton enthousiasme à toute épreuve.

A Pierre Luc qui m'a aidé à avoir les idées plus claires tout au long de ce travail, j'aurais tant aimé te faire lire cette thèse. Par ces mots, tu y participes un peu.

Pour finir, j'adresse une pensée particulière à toutes les personnes qui illustrent ce travail de recherche.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	12
I. LE CYCLE DE VIE DE L'INSULINE	16
II. LES ANALOGUES : quand un acide aminé peut en cacher un autre	20
1) Analogues à action rapide	20
2) Analogues à action lente	21
III. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	26
IV. MESUSAGES : accidents ou malveillance ?	29
V. REVUE DE LA LITTERATURE	31
VI. PRESENTATION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE	58
VII. LES CHALLENGES DU DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE	58
1) Détermination des matrices d'intérêt	58
2) Adsorption/Agrégation : deux phénomènes à limiter	62
3) Analyse par LC-MS/HRMS	66
4) Immunopurification	69
VIII. ARTICLE ANALYTIQUE 1	70
Développement et validation d'une méthode de quantification de l'insuline humaine et de ses analogues synthétiques dans le plasma et le sérum post-mortem par LC-MS/HRMS	
IX. ARTICLE ANALYTIQUE 2	88
Détection des insulines dans les tissus post-mortem : une technique optimisée basée sur l'immunopurification et la détection par LC-MS/HRMS	
X. DISCUSSION & PERSPECTIVES	100
1) Apports du travail	101
2) Limites analytiques	102
a) Surcharge des matrices d'intérêt	102
b) LC-MS/HRMS	103
c) Limites de l'immunopurification	103
d) Analyse des analogues	106
3) Limites toxicologiques	107
4) Perspectives	108
a) Améliorations analytiques	108
b) Une nouvelle matrice à analyser	110
c) Perspectives de recherche des métabolites et des produits de dégradation	112
CONCLUSION GENERALE	120
BIBLIOGRAPHIE	123
ANNEXES	129

LISTE DES ANNEXES

Les annexes sont composées de résumés de communications orales que nous avons réalisées lors de congrès nationaux.

Annexe 1 : (page 130)

Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique – Lille – Mai 2019

Characterization of suicide involving insulin analog injection: interest of injection site analysis by LC/HRMS

C.Bottinelli, J.Guitton, L.Fanton, F. Bévalot

Annexe 2 : (page 132)

Congrès de la Société Française de Médecine Légale – Dijon – Juillet 2019

Proposition de protocole de mise en évidence des insulines en post-mortem

C.Bottinelli, J.Guitton, F.Bévalot, L.Fanton

Annexe 3 : (page 133)

Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique – Grenoble – 2020

Analyse de l'insuline humaine et de ses analogues par techniques immunochimiques et LC-HRMS sur sang postmortem : à propos d'un cas de décès impliquant l'aspart.

C.Bottinelli, J.Guitton, K.Chikh, C.Roger, N.Cartiser, R.Nicoli, L.Fanton, F. Bévalot

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Synthèse de l'insuline endogène et transport intracellulaire

Figure 2 : Parcours de l'insuline endogène : de la sécrétion à la dégradation

Figure 3 : Mécanisme de dégradation de l'insuline dans un hépatocyte

Figure 4 : Structures primaires des insulines

Figure 5 : Schéma des différents modes de diffusion des insulines du site d'injection sous-cutané vers la circulation sanguine

Figure 6 : Spectre de masse du précurseur de l'insuline humaine 5 fois protoné

Figure 7 : Schéma de fragmentation des peptides

Figure 8 : Spectre de masse de la fragmentation de l'ion précurseur de l'insuline humaine (m/z 1162,3)

Figure 9 : Aperçu des couches de la peau jusqu'au muscle et représentation d'une administration sous-cutanée

Figure 10 : Schéma de transport de l'insuline après sécrétion endogène ou administration sous-cutanée

Figure 11 : Schéma d'adsorption et agrégation de l'insuline en solution

Figure 12 : Evolution des aires du pic de l'insuline humaine en fonction du temps (minutes) d'une solution à 200 ng/mL (Eau/ACN 97 :3 v/v) dans un insert en verre

Figure 13 : Chromatogramme représentant l'ensemble des insulines analysées et leur temps de rétention (détection en mode SIM). Les conditions d'analyses permettant d'obtenir cette rétention sont détaillées dans l'article n°1.

Figure 14 : Spectres d'ions produits (mode PRM) des insulines : a) humaine (précurseur m/z 1162,533) ; b) lispro (précurseur m/z 1162,533) ; c) asparte (précurseur 1165,333) ; d) glulisine (précurseur 1165,333)

Figures 15 : Schéma des étapes de l'immunopurification et des potentielles interférences pouvant impactées le résultat

Figure 16 : Amélioration proposée dans le but de limiter l'impact des molécules à haut poids moléculaire sur l'analyse des insulines à action lente

Figure 17 : Exemple d'utilisation de l'outil Excel pour déterminer la structure peptidique d'un produit de dégradation commun aux insulines humaine et glargin

Figure 18 : Exemple d'utilisation de l'outil Excel pour déterminer la structure peptidique d'un produit de dégradation commun aux insulines humaine et détémir

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evaluation de la stabilité des insulines. Récapitulatif des tests expérimentaux par variation des matériaux et de la composition du solvant de dilution/injection à partir d'injections directes d'insulines

Tableau 2 : Comparaison de méthodes RIA vs LC-MS/HRMS

Tableau 3 : Pourcentages des réactions croisées de l'insuline humaine, ses analogues et les métabolites de l'insuline glargin avec les anticorps utilisés pour l'immunopurification

Tableau 4 : Données de l'étude préliminaire et méthodes d'analyse des insulines publiées dans l'humeur vitrée

Tableau 5 : Etude des produits de dégradation des insulines dans le sérum et des solutions aqueuses de globules rouges

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN: acétonitrile

DMSO: dimethylsulfoxide

EI : étalon interne

HRMS: spectrométrie de masse haute résolution

IDE: insulin degrading enzyme

IRMA : immunoradiometric assay

LC: chromatographie en phase liquide

LDL: limite de détection

LDQ: limite de quantification

MeOH : méthanol

MS: spectrométrie de masse

PDI: protein disulfide isomerase

PMI: postmortem interval (=délai post-mortem)

PRM: parallel reaction monitoring

RIA: radioimmunoessai

SIM: single ion monitoring

SPE: extraction sur phase solide

INTRODUCTION GENERALE

Il y a plus de 2000 ans les civilisations grecques, égyptiennes et romaines rapportaient chez certains de leurs contemporains, les symptômes d'urine au goût sucré (latin : « mellitus » : « au goût de miel ») et de consommation et excrétion rapide et très importante d'eau [1]. C'est fin du XVIIème siècle que la maladie regroupant ces symptômes parmi d'autres est nommée pour la première fois : diabetes mellitus [1]. Aujourd'hui, le diabète est défini comme un désordre métabolique, caractérisé par une hyperglycémie chronique associée à des complications dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides [2]. Ce désordre est induit par une diminution de la sécrétion d'insuline ou une diminution de son action ou bien une combinaison des deux. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune qui se manifeste par la destruction des îlots de Langerhans, situés dans la partie endocrine du pancréas, entraînant la diminution puis l'arrêt de la sécrétion d'insuline. Le diabète de type 2 est une maladie évolutive qui se manifeste par une altération de la sécrétion d'insuline avec ou sans résistance de l'action de celle-ci [3].

Les traitements contre cette pathologie sont étudiés depuis plus d'un siècle. Les premières médications développées étaient à base de préparations pancréatiques issus d'animaux [4]. C'est en 1922 qu'un patient en état de coma hypoglycémique était sauvé pour la première fois suite à l'injection de ce type d'extraits pancréatiques purifiés. Ces extraits à effets hypoglycémiants ont été mis au point par F. Banting, J. Mac Leod et J. Collip et constituaient les premiers traitements impliquant un minimum d'effets secondaires [5]. Très rapidement, ce nouveau remède était commercialisé dans le monde entier puis n'a eu de cesse d'être optimisé dans le but de modifier les délais d'action, et de faciliter son administration.

De nos jours, le nombre de patients diabétiques ne fait qu'augmenter [6]. Grâce au développement d'analogues biosynthétiques de l'insuline humaine, leur qualité et durée de vie ont été largement améliorées. La Fédération internationale du diabète recensait 463 millions de personnes atteintes de diabètes dans le monde en 2019, dont 10 % représentaient le type 1 [6]. L'Organisation Mondiale de la Santé prévoit plus de 700 millions de personnes atteintes d'ici à 2045 [6]. Pour les 90 % de diabétiques de type 2, l'insulinothérapie est de plus en plus proposée lorsque les traitements par antidiabétiques oraux ne suffisent plus [3]. La demande en traitement à base d'insuline humaine ou de ses analogues synthétiques est donc en perpétuelle augmentation. La gestion de l'insulinothérapie est complexe et non dénuée de risques. Bien que limitée aux personnels soignants, aux malades ainsi qu'à leurs proches, le risque d'erreur de dosage et de détournement d'usage augmente avec le nombre de personnes traitées. Ainsi dès 1927, le premier cas de tentative de suicide à l'insuline a été rapporté puis le premier cas de meurtre impliquant l'insuline en 1957 [7]. Depuis, de nombreux cas de décès impliquant l'insuline humaine ou l'un de ses analogues dans des contextes de suicides, et plus rarement d'homicides, ont été rapportés dans

la littérature [8, 9]. Néanmoins, la caractérisation d'une intoxication par insuline est un challenge, puisque le diagnostic post-mortem d'hypoglycémie est peu fiable et l'analyse des insulines et l'interprétation des résultats sont complexes. Certains paramètres à prendre en considération sont souvent inconnus ou difficiles à mettre en évidence tels que le délai entre l'administration et la survenue du décès ou la détection de marques anatomiques et autopsiques telles que les marques d'aiguilles.

Dans la plupart des cas, le dosage de l'insuline en post-mortem est effectué par des techniques d'immunoanalyse qui ne permettent pas de distinguer l'insuline humaine de ses analogues ou de ses métabolites et produits de dégradation [10]. Ces méthodes présentent des réactions croisées différentes en fonction des kits utilisés, ce qui implique des positivités différentes pour les analogues, les insulines animales ou encore la pro-insuline et ses métabolites. Aujourd'hui, les techniques basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permettent de différencier les multiples analogues de l'insuline humaine [10]. Cependant, ces analyses sont essentiellement réalisées dans le domaine du vivant, principalement dans le domaine du contrôle antidopage. Certaines de ces méthodes ont été appliquées au domaine médico-légal post-mortem, mais aucune n'a été validée sur les matrices autopsiques (sang hémolysé, organes...) [11, 12].

En d'autres termes, compte tenu de la complexité de l'estimation de l'état glycémique, des difficultés analytiques et des phénomènes de dégradation de l'insuline, le nombre de cas de décès liés à l'insuline est sans doute sous-estimé.

Le travail de thèse présenté ici avait pour but de mettre au point des protocoles analytiques permettant de mettre en évidence l'implication de l'insuline humaine ou de ses analogues dans des cas de décès. Les travaux réalisés ont permis l'élaboration d'un protocole débutant en salle d'autopsie, avec des recommandations sur les matrices d'intérêt à prélever ainsi que les modalités de prélèvement en cas de suspicion d'intoxication aux insulines. Des méthodes de préparation des différents échantillons associées à une méthode d'analyse spécifique et sélective ont été développées et validées afin d'identifier formellement, et de quantifier pour le sang, l'ensemble des insulines. Enfin, une aide à l'interprétation des résultats a été proposée à travers l'étude de la littérature et les différents cas rapportés et analysés au sein du laboratoire.

Une première partie bibliographique s'articule autour d'une revue de la littérature ayant pour principal objet l'analyse des insulines en post-mortem dans un cadre médico-légal. Certains axes volontairement peu développés dans la revue ont été redétaillés dans le présent manuscrit, notamment le développement et le mécanisme d'action des analogues de l'insuline humaine ainsi que l'analyse par

spectrométrie de masse. La seconde partie présente les travaux expérimentaux réalisés à travers deux articles ; l'un dédié à l'analyse du plasma et du sérum post-mortem, l'autre à l'analyse de différents tissus. Enfin, des recommandations pré-analytiques, l'intérêt des matrices à analyser et l'interprétation des résultats obtenus sont proposés en conclusion de ce document.

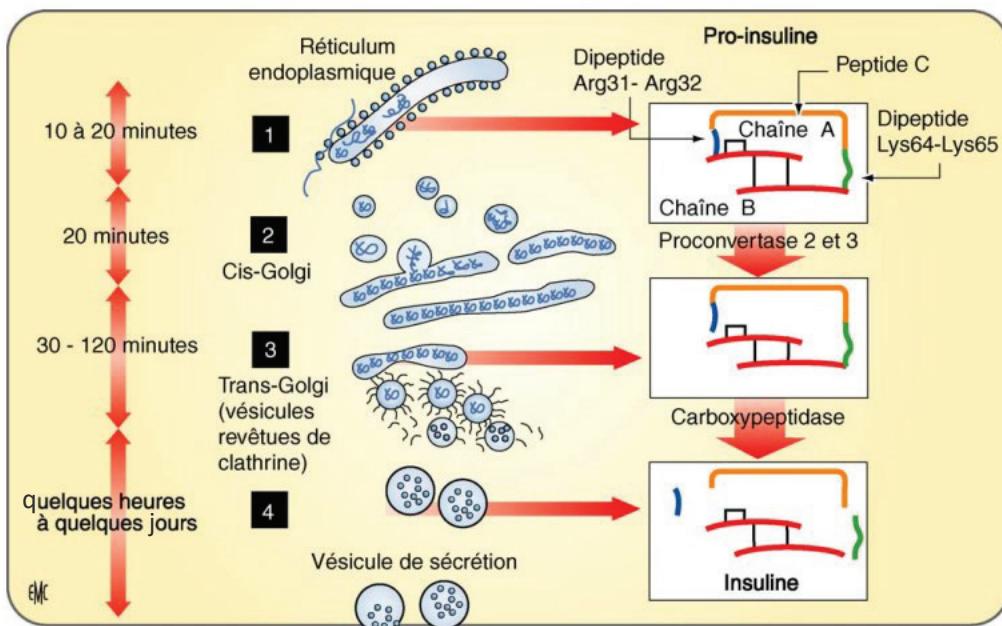
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE CYCLE DE VIE DE L'INSULINE

L'insuline est une hormone endogène essentielle au contrôle de la glycémie. C'est un hétérodimère composé de deux chaînes peptidiques liées par deux ponts disulfures : la chaîne A (21 acides aminés) et la chaîne B (30 acides aminés). Un troisième pont disulfure relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A. L'insuline humaine possède une masse molaire moyenne de 5807 Da. La synthèse endogène de l'insuline humaine débute par l'expression du gène de l'insuline situé sur le bras court du chromosome 11 [13]. Ce gène contrôle la première étape de la production de son précurseur : la pré-pro-insuline, dans le cytoplasme des cellules bêta des îlots de Langerhans, situés dans la partie endocrine du pancréas. Cette préprohormone comporte au niveau de sa partie N-terminale une séquence d'acides aminés majoritairement hydrophobes, ce qui favorise son transport vers le réticulum endoplasmique rugueux. A ce stade, des endopeptidases transforment rapidement la pré-pro-insuline en pro-insuline, constituée des chaînes A et B connectées entre elles par le peptide C. La proinsuline quitte ensuite le réticulum endoplasmique rugueux via une vésicule. Au contact de la membrane du cis-Golgi, la pro-insuline est libérée à l'intérieur du Golgi [13] (Figure 1).

Des enzymes spécifiques, les prohormones convertases PC2 et PC3 ainsi que la carboxypeptidase H, finalisent la maturation de l'hormone en tronquant la pro-insuline afin de produire en quantité équimolaire le peptide C et l'insuline humaine [13, 14]. Lorsque la concentration en insuline augmente, la protéine se dimérisé spontanément puis est dirigée dans de nouvelles vésicules au sein du trans-Golgi. A l'intérieur de ces vésicules, les dimères s'associent 3 par 3 en présence d'atomes de zinc pour former des cristaux d'hexamères [13]. Sous cette forme, l'insuline est stable et inactive. Les vésicules de sécrétion chargées d'insuline sont stockées de quelques heures à quelques jours jusqu'à ce que les cellules bêta soient exposées à un stimulus ordonnant la sécrétion immédiate de la protéine. L'unique stimulus physiologique de cette sécrétion est l'augmentation de la concentration de glucose dans le sang [13]. L'insuline est également sécrétée sans stimulation à une concentration faible dite basale. Il s'agit d'une sécrétion pulsatile à deux rythmes de fluctuation : lente, toutes les 2 à 3 h, et rapide toutes les 15 min [13, 15]. La sécrétion d'insuline est stoppée lorsque la concentration en glucose est inférieure à 2.50 – 3.33 nmol/L (0.45 – 0.60 g/L) [16].

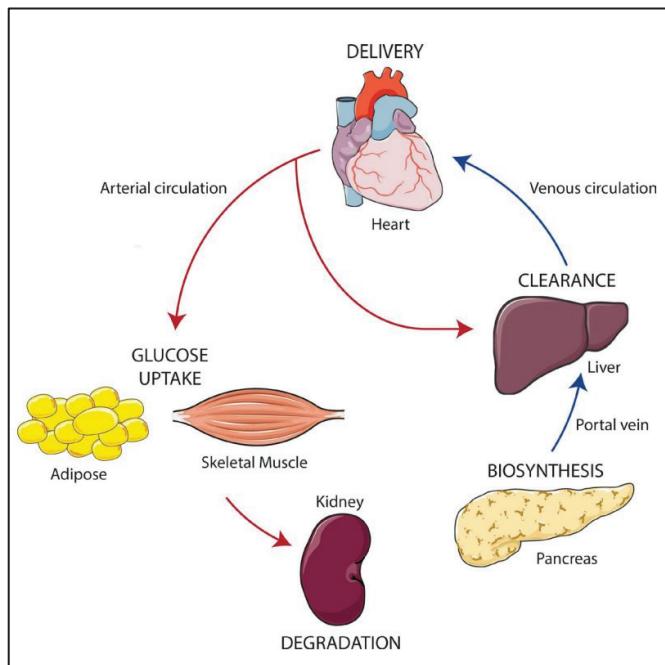
Figure 1 : Synthèse de l'insuline endogène et transport intracellulaire [13]



La libération de l'insuline se déroule par exocytose des vésicules de sécrétion. Ce mécanisme permet le transfert de l'insuline du cytoplasme vers la surface de la cellule bêta. La membrane de la vésicule fusionne avec la membrane plasmique pour libérer l'insuline dans l'espace interstitiel. Environ 1% des vésicules sont accolées à la membrane plasmique et constituent une quantité d'insuline immédiatement mobilisable, responsable de la première phase de sécrétion. La seconde phase correspond à une nouvelle vague d'accolement de vésicules stockées auparavant dans le cytoplasme.

Une fois libérée dans l'espace interstitiel, l'insuline voit sa concentration diminuer par effet de dilution. Sa structure est alors transformée de la forme hexamère à la forme monomère, ce qui lui permet de diffuser à travers les capillaires sanguins et ainsi de rejoindre la veine porte hépatique [17]. L'insuline est transportée via la circulation sanguine vers le foie pour subir un effet de premier passage hépatique où 60 à 80% de la quantité d'insuline sont extraits de la circulation. Les 20 à 40 % non métabolisés par le foie vont diffuser vers les autres cellules cibles (Figure 2). Pour éviter tout risque d'hypoglycémie, l'insuline doit être rapidement métabolisée. Malgré les connaissances actuelles et les nombreuses études réalisées depuis plus d'un siècle concernant cette hormone, son mode et son étendue d'action ne sont pas totalement compris. En effet, l'action de l'insuline se situe principalement au niveau du foie, du tissu adipeux, du cerveau, des muscles mais également au niveau de chaque cellule comportant un récepteur d'insuline : les cellules insulino-sensibles. Ces dernières se retrouvent dans l'ensemble de l'organisme : hépatocytes, cellules rénales, erythrocytes, monocytes, ... Ainsi, toute cellule insulino-sensible est capable de métaboliser la protéine [18].

Figure 2 : Parcours de l'insuline endogène : de la sécrétion à la dégradation [17]

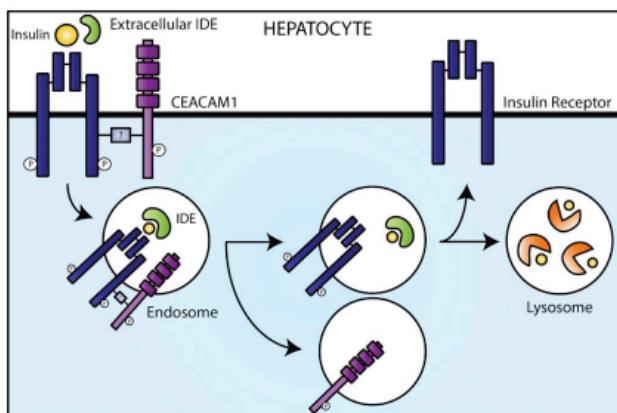


Ce métabolisme est initié par la fixation de l'hormone sur son récepteur spécifique, situé à la surface des cellules insulino-sensibles. Un récepteur est composé de deux sous-unités : α et β . En se fixant sur la sous-unité α , l'insuline implique une modification conformationnelle de la sous-unité β , qui génère une série de signaux biochimiques alertant que le récepteur est occupé, et que la phase de métabolisme peut être amorcée [19]. Seule une faible proportion d'insuline liée au récepteur est relarguée intacte dans la circulation sanguine. Le complexe hormone-récepteur est ensuite internalisé dans un endosome qui constitue le site majeur de la dégradation de l'insuline internalisée (Figure 3). Pour être dégradée l'insuline doit se dissocier de son récepteur. Pour cela, une acidification du milieu intra-endosomique est initiée par action de la pompe à protons, diminuant l'affinité de l'hormone pour son récepteur [19]. Par la suite, l'insuline est métabolisée selon un schéma très complexe. Depuis de nombreuses années, les enzymes impliquées, leur séquence d'action et les produits qui en découlent sont étudiés. A ce jour, un mécanisme impliquant plusieurs enzymes semble mettre d'accord certains auteurs. Cependant, leur ordre d'action n'est pas encore totalement élucidé. L'Insulin Degrading Enzyme (IDE) semble jouer un rôle majeur dans l'ignition du métabolisme. Néanmoins, son action n'est pas indispensable pour l'activer et certains auteurs ont observé qu'elle agit également plus tard, après l'action de la Protein Disulfide Isomerase (PDI) qui clive les ponts disulfures inter et intra chaîne peptidique. En 1998, Duckworth et ses collaborateurs [18] ont proposé le schéma de métabolisme qui suit. L'IDE clive l'insuline lorsqu'elle est liée à son récepteur, soit au niveau de la membrane plasmique, soit après internalisation. Cette enzyme semble identifier la structure tridimensionnelle de l'insuline et la cliver en de nombreux sites en dehors de la partie liée au récepteur. La PDI agit ensuite pour

séparer les chaînes peptidiques. Les séquences d'acides aminés sont alors transférées dans des parties subcellulaires et le métabolisme se poursuit sous l'action de diverses peptidases non spécifiques résultant à des séquences d'acides aminés toujours plus courtes. Dans le cas des cellules rénales, contrairement au foie, les lysosomes jouent un rôle plus important et plus tôt dans le mécanisme de dégradation de l'insuline (Figure 3). En effet, la plupart des fragments d'insuline partiellement dégradées sont directement délivrés aux lysosomes où la dégradation sera complète [18]. Pourtant, les produits de dégradation intracellulaires et endosomaux qui en résultent sont identiques à ceux observés dans le foie [18]. Les mécanismes impliqués dans la clairance rénale de l'insuline sont la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire proximale. La réabsorption tubulaire concernant 99 % de l'insuline se déroule majoritairement par endocytose [18]. De ce fait, une très faible proportion d'insuline intacte est excrétée dans les urines.

Étant donné que l'insuline administrée par injection sous-cutanée échappe au premier passage hépatique, le rein a une importance accrue dans l'élimination de l'insuline chez les patients diabétiques insulino-traités comparés aux sujets non traités. A chaque étape, les produits du métabolisme peuvent être relargués dans la circulation sanguine par exocytose. Les sites de clivages ont été détaillés dans la revue de la littérature (page 35).

Figure 3 : Mécanisme de dégradation de l'insuline dans un hépatocyte [17]



POINTS CLÉS

- ❖ L'insuline humaine est une hormone endogène essentielle au contrôle de la glycémie.
- ❖ Elle est composée de 2 chaînes peptidiques : la chaîne A et la chaîne B.
- ❖ 60 à 80 % de la quantité d'insuline sécrétée sont extraits de la circulation sanguine par effet de premier passage hépatique.
- ❖ Son métabolisme est initié par fixation à son récepteur spécifique.
- ❖ Son métabolisme très complexe, n'est pas encore totalement élucidé à ce jour.

II. LES ANALOGUES : quand un acide aminé peut en cacher un autre

Suite à la découverte de l'insuline, l'utilisation d'insulines animales (porcine et bovine) a permis de prendre en charge des patients souffrant de diabète [4]. Des modifications des formulations animales par complexation avec de la protamine et / ou du zinc ont fourni la possibilité de moduler la durée d'action des insulines administrées. L'insuline Neutral Protamine Hagedorn (NPH) prodiguait ainsi ses effets durant 8 à 12 h [20]. Cependant, certaines formulations nécessitaient une remise en suspension avant l'administration. Ceci impliquait des variations dans les doses injectées et constituait un risque d'hypo- ou hyperglycémies. Fin des années 1970, la biosynthèse de l'insuline humaine a permis de multiplier la production et ainsi de donner accès à ce traitement au monde entier. Nonobstant, des inégalités d'accès aux soins restent d'actualité [21]. Quelques années plus tard, le développement des analogues de l'insuline s'est basé sur le mécanisme et la vitesse de distribution de l'hormone du site d'injection vers la circulation sanguine. Les modifications de la chaîne peptidique de l'insuline humaine se sont principalement localisées sur l'extrémité de la chaîne B, puisqu'entre les acides aminés B26 et B30, elles n'interfèrent pas avec la liaison des insulines au récepteur spécifique (Figure 4). Le but premier étant toujours de mimer l'action de l'insuline endogène en termes de concentrations basales et postprandiales. Les nouvelles formulations d'insulines autorisent aujourd'hui un régime plus flexible et plus sûr, avec moins de risques d'hypoglycémies. Il existe à ce jour différents analogues de l'insuline humaine divisés en deux catégories : les analogues à action rapide et les analogues à action lente.

1) Analogues à action rapide

Trois insulines à action rapide sont actuellement disponibles : l'insuline lispro (laboratoire Lilly), l'insuline asparte (laboratoire Novo Nordisk), et l'insuline glulisine (laboratoire Sanofi-Aventis). Comparée à l'insuline humaine, l'insuline lispro comporte une inversion des acides aminés B28 et B29. La substitution de l'acide aminé B28 par un acide aspartique mène à la synthèse d'insuline asparte. Pour l'insuline glulisine, l'acide aminé B3 est substitué par la lysine et le B29 par un acide glutamique (Figure 4). Ces modifications peptidiques ont pour effet de déstabiliser la tendance naturelle des monomères de l'insuline à se complexer en dimères et hexamères. Ceci implique l'accélération de la dissociation en monomères et donc l'absorption de ces insulines dans la circulation sanguine (Figure 5). Leur pic de concentration est globalement deux fois plus élevé que celui de l'insuline humaine.

Les analogues à action rapide ont pour but de simuler la sécrétion postprandiale. Leur synthèse a été mise au point pour s'affranchir de l'insuline humaine de synthèse. En effet, lorsque cette dernière est administrée en sous-cutané, sa demi-vie est de l'ordre

de 270 min [22], tandis que l'insuline endogène possède une demi-vie de 4 à 6 min [23]. De plus, le délai d'action de l'insuline humaine de synthèse de 30 min [24] nécessite une organisation particulière au moment des repas pour les patients traités. Le développement des analogues à action rapide a facilité la gestion du traitement en diminuant le délai d'action (10-12 min) et la durée d'action (4 h) de ces insulines, réduisant par la même occasion les risques d'hypoglycémies postprandiales [25, 26]. Des formulations composées d'insuline rapide et d'insuline rapide complexée à de la protamine sont disponibles pour diminuer le nombre d'injections par jour nécessaire pour réguler la glycémie. Le désavantage est l'impossibilité d'adapter la dose rapide/intermédiaire individuellement [4].

2) Analogues à action lente :

En ce qui concerne les analogues à action lente, les modifications physico-chimiques ont pour but de mimer la concentration basale en insuline. En augmentant les capacités d'agrégation et de polymérisation des insulines, il est possible de créer un réservoir duquel les insulines sont relarguées au fur et à mesure, pour un profil cinétique plus sûr, en limitant les risques d'hypoglycémies.

Insuline glargin :

Le point isoélectrique de l'insuline humaine est de 5,4. Suite à la substitution de l'acide aminé A21 par une glycine et l'ajout de deux arginines au niveau de l'extrémité C-terminal de la chaîne B (Figure 4), on obtient l'insuline glargin. Son point isoélectrique s'élève à 6,7 [27]. Immédiatement après l'administration sous-cutanée, cet analogue soluble en formulation (pH 4,0) subit deux transformations. D'une part, il précipite dans le tissu sous-cutané dont le pH physiologique est neutre, ce qui entraîne un délai de diffusion de l'insuline dans la circulation sanguine [28]. D'autre part, il est très rapidement métabolisé [27]. Des réactions enzymatiques rapides et intenses mènent à la formation de métabolites M1 (DesB31-32 glargin) et M2 (DesB30-32 glargin). En conséquence, l'insuline glargin est très rarement détectée dans les prélèvements biologiques. L'effet hypoglycémiant de l'insuline glargin est caractérisé par son métabolite M1 représentant le produit actif majoritaire du métabolisme de la protéine. Son délai d'action est de l'ordre de 30 à 60 min et la durée est supérieure à 16 h [20].

Insuline détémir :

Les différences structurelles de l'insuline détémir par rapport à l'insuline humaine résident dans la suppression de l'acide aminé terminal B30 et l'acylation de l'acide aminé B29 par un acide gras de 14 carbones (acide myristique) (Figure 4). Ces

modifications entraînent l'augmentation de la stabilité de l'insuline sous sa forme hexamère et encourage la formation de dihexamères au site d'injection. De plus, la chaîne aliphatique en B29 constituée d'un acide gras favorise la liaison réversible de cette insuline à l'albumine, tant au niveau du tissu sous-cutané que de la matrice sanguine. Cette liaison à l'albumine de 98% retarde également l'action de l'hormone de synthèse [29] (Figure 5). Le traitement par insuline détémir nécessite jusqu'à deux injections par jour pour obtenir et conserver la concentration basale souhaitée [4].

Insuline dégludec :

Les différences structurelles de l'insuline dégludec par rapport à l'insuline humaine résident dans la suppression de l'acide aminé terminal B30 et de l'acylation de l'acide aminé B29 par un acide gras de 16 carbones (Figure 4). En plus de ces modifications, l'ajout de phénol dans la formulation implique la formation de dihexamères stables. Suite à l'administration sous-cutanée de cette insuline, le phénol est éliminé dans le tissu et les dihexamères se complexent en chaînes de multihexamères (Figure 5). Les monomères sont libérés progressivement par les extrémités de ces chaînes. De la même manière que l'insuline détémir, la liaison réversible à l'albumine (99%) a lieu dans tous les milieux biologiques. En règle générale, le traitement par insuline dégludec ne nécessite qu'une seule injection par jour et limite le risque d'hypoglycémie comparé au traitement par insuline glargine et détémir [20]. Moins de variabilité pharmacodynamique et moins de variabilité inter-individus ont été observées comparées aux autres insulines à action lente [30]. L'association dans une même formulation de l'insuline basale dégludec avec l'insuline rapide asparte a reçu l'autorisation de mise sur le marché en 2013 mais n'est pas encore diffusée dans tous les pays [4].

L'administration d'insulines exogènes est indispensable aux diabétiques de type 1. Le mode d'administration le plus répandu est l'injection dans le tissu sous-cutané. En effet, les patients s'administrant seuls leur traitement, cette voie possède l'avantage de limiter les dommages vasculaires et neuronaux [31]. Les voies intramusculaires et intraveineuses sont réservées à l'usage clinique. L'administration se réalise au niveau abdominal, dans les membres (bras, cuisses) ou bien dans le bas du dos. L'absorption abdominale est plus importante [31]. Hormis le site d'injection, l'absorption des insulines depuis le tissu sous-cutané varie selon de nombreux paramètres : la température, le débit sanguin, la dose, le type d'insuline, la présence ou non de lipohypertrophie, ou encore l'activité physique. Les doses d'insulines sont prescrites et recommandées en U/kg, démontrant que le poids est un autre facteur important dans la gestion du diabète et que chaque individu suit une posologie propre à son organisme. Cependant, des variations inter-individuelles peuvent conduire à des

effets différents sur la régulation de la glycémie. Ceci démontre la complexité de la gestion de l'insulinothérapie.

En règle générale, le suivi de l'efficacité d'une insuline se ne mesure pas à sa concentration mais au profil cinétique du glucose. Les données concernant les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des analogues de l'insuline sont donc peu nombreuses et très souvent réalisées uniquement sur des sujets diabétiques de type 1 [4]. De plus, pour les études réalisées, la plupart utilisent l'immunoessai qui comporte des limites quant à la détection des analogues (taux de réactions croisées différents selon les kits, pas d'identification formelle). Pour résoudre cette limite de l'identification, des méthodes de spectrométrie de masse ont été développées.

POINTS CLÉS

- ❖ Les modifications des analogues sont principalement localisées sur l'extrémité de la chaîne B.
- ❖ Les modifications des analogues à action rapide induisent une diminution de la complexation des insulines sous forme de dimères et hexamères, accélérant l'absorption dans la circulation sanguine.
- ❖ Les modifications peptidiques des analogues à action lente ont pour effet d'augmenter les capacités de polymérisation de l'insuline.

Figure 4 : Structures primaires des insulines

A : humaine (5807 Da) ; B : lispro (5807 Da) ; C : glulisine (5823 Da) ; D : asparte (5826 Da) ; E : glarginé (6062 Da) ; F : glarginé métabolite M1 (5751 Da) ; G : détémir (5917 Da) ; H : dégludec (6104 Da). Les chaînes A sont représentées en blanc, les chaînes B en gris clair. Les modifications d'acides aminés des analogues comparées à l'insuline humaine sont marquées par un fond gris foncé. Les lettres correspondent à la nomenclature officielle IUBMB des acides aminés.

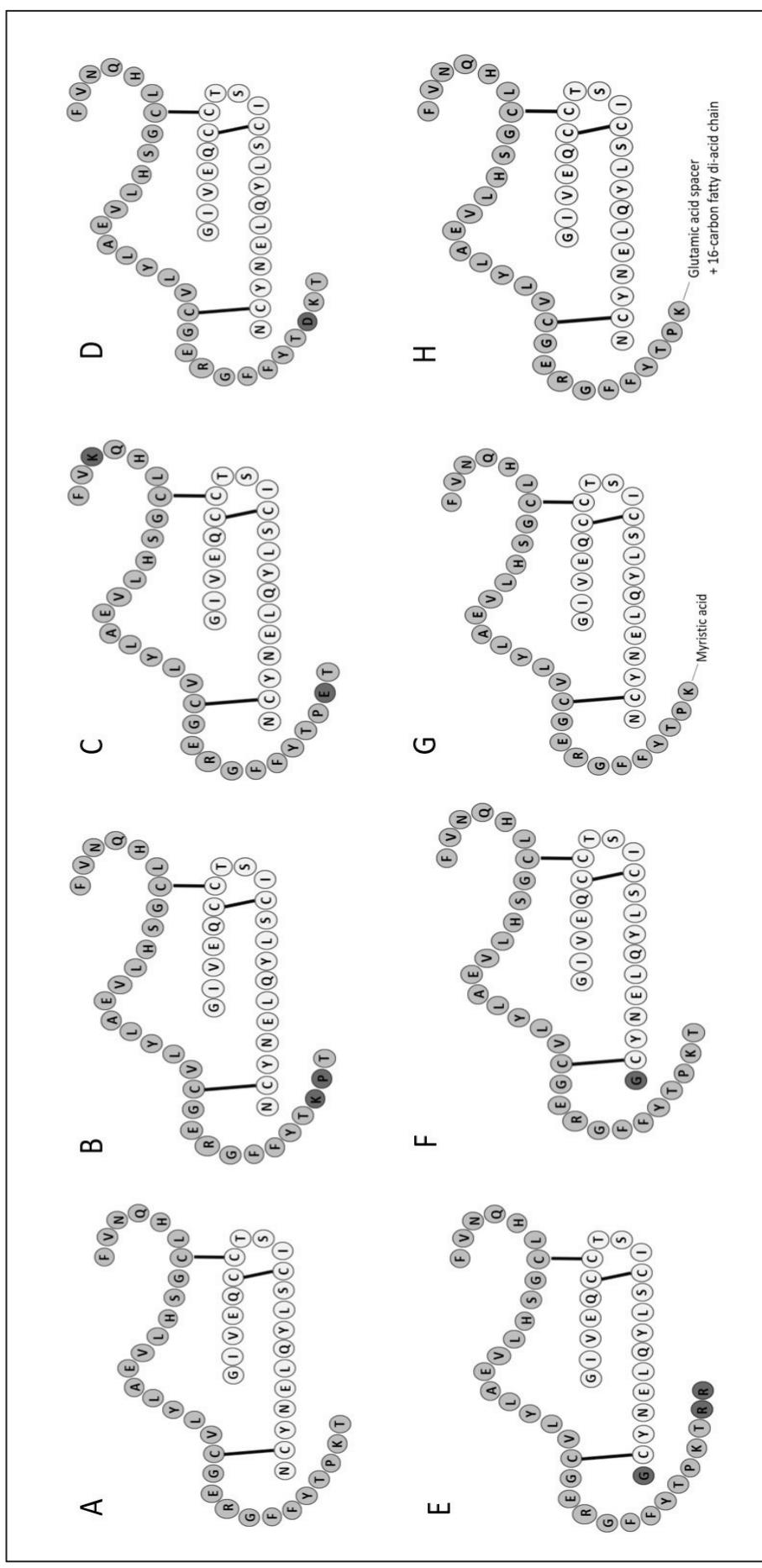
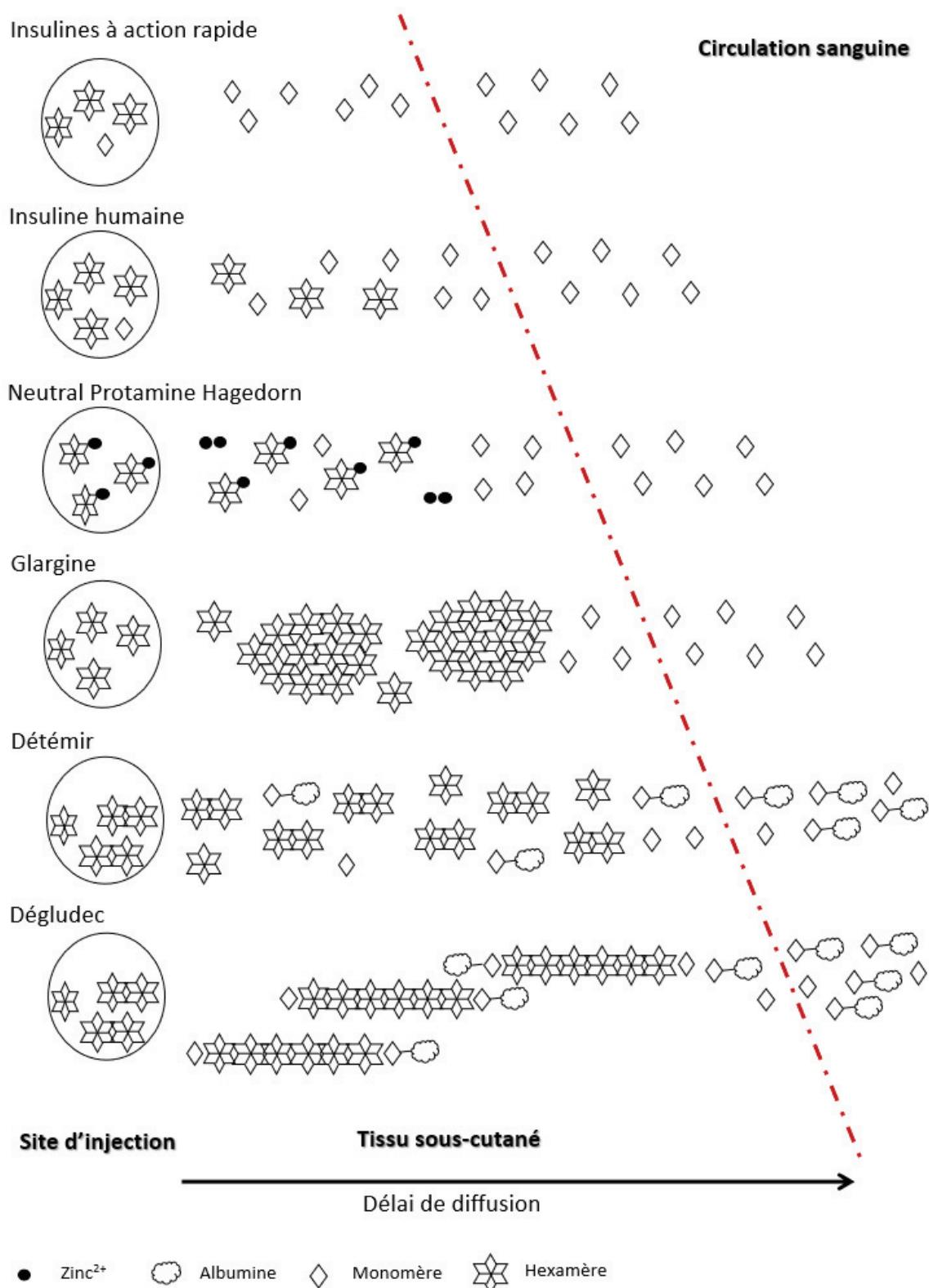


Figure 5 : Schéma des différents modes de diffusion des insulines du site d'injection sous-cutané vers la circulation sanguine (Inspirée de [28])



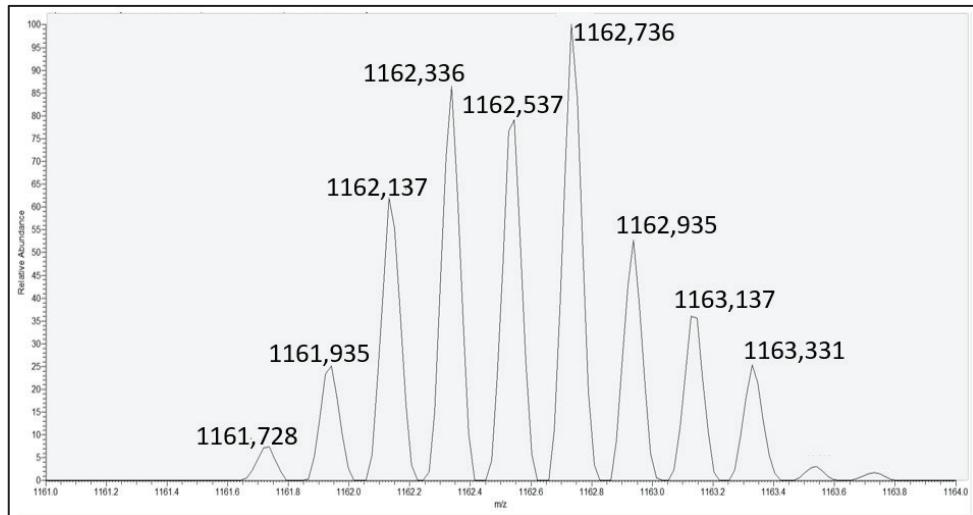
III. LA SPECTROMETRIE DE MASSE

L'analyse des protéines dans des milieux biologiques par immunoessai est largement répandue. En effet, elle est simple à mettre en œuvre, plutôt rapide avec une bonne sensibilité et offre une grande capacité d'applications en fonction des anticorps utilisés. Néanmoins, de nouvelles méthodes d'analyse chromatographiques couplées à différents types de détecteurs ont été développées ces dernières années, dans le but d'identifier formellement les protéines analysées. Ce dernier aspect n'étant pas vérifié pour toutes les protéines avec l'immunoessai. C'est notamment le cas pour l'analyse des insulines. Compte tenu du haut poids moléculaire des protéines et de leur sensibilité aux conditions extrêmes de température et de pression, la chromatographie liquide (LC) est préférée à d'autres technologies comme la chromatographie en phase gazeuse. Récemment, des revues de la littérature spécifiques aux insulines ont présenté les multiples technologies utilisées pour l'analyse de ces hormones : MALDI, LC couplée à des détecteurs de type quadripôle, trappe ionique (Orbitrap) ou temps de vol (TOF)... [10, 32].

Les deux principales technologies décrites pour l'analyse de prélèvements biologiques sont les quadripôles [33-36] et la spectrométrie de masse de haute résolution de type Orbitrap [11, 37, 38]. Le développement de l'analyse des insulines par spectrométrie de masse (MS) a pris de l'ampleur, majoritairement dans le domaine du dopage. Le point crucial de l'analyse par spectrométrie de masse est sa sensibilité puisque les concentrations d'insulines en milieu biologique sont faibles.

Lors de l'analyse des insulines, plusieurs états de charge ont été observés. Ceci s'explique par la masse molaire des insulines supérieure à 1000 Da ainsi que par la présence au sein de leur chaîne peptidique d'histidine facilement protonable. L'état de charge est dépendant de la composition et du débit de la phase mobile au moment de l'élation des composés dans le détecteur [35]. Globalement, quel que soit le type de détection choisi, l'identification des insulines est réalisée à partir d'ions précurseurs 4 à 7 fois protonés représentant des ions pseudo-moléculaires de m/z 800 à 1500. Les détecteurs à haute résolution offrent la possibilité de déterminer précisément la charge de l'ion précurseur à partir de son massif isotopique, comme illustré avec la figure 6, représentant le massif isotopique de l'insuline humaine. La différence de m/z 0,2 entre deux masses successives du massif isotopique indique la présence de 5 charges sur la protéine.

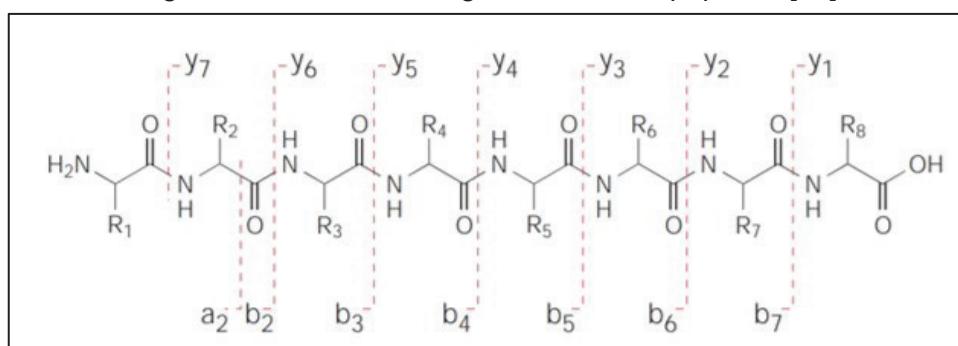
Figure 6 : Spectre de masse du précurseur de l'insuline humaine 5 fois protoné
(Résolution 35 000 FWHM)



Quel que soit le détecteur utilisé, quadripôle ou Orbitrap, il peut être utilisé selon plusieurs modes. Le mode full scan enregistre l'ensemble des ions arrivant au détecteur ; le mode Single Ion Monitoring (SIM) cible uniquement les masses m/z souhaitées (ions pseudo-moléculaires) nommées ions précurseurs ; le mode Parallel Reaction Monitoring (PRM) ou Multiple Reaction Monitoring (MRM) se focalise sur des transitions composées d'un ion précurseur menant suite à une fragmentation à un ion produit.

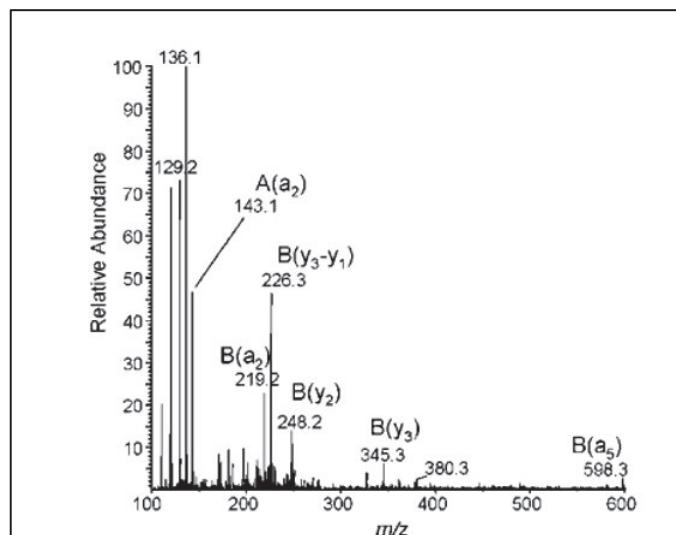
La fragmentation des protéines la plus commune et la plus informative se produit entre deux acides aminés. Dans le cas des insulines, l'intérêt se porte sur les fragmentations ayant lieu au niveau de la partie C-terminale de la chaîne B, puisque c'est en bout de chaîne que se situe la majeure partie des modifications des analogues, par rapport à l'insuline humaine. Les différentes fragmentations donnent lieu à des ions produits dénommés ions b si la partie N-terminale est chargée et ions y si la partie C-terminale est chargée (Figure 7).

Figure 7 : Schéma de fragmentation des peptides [39]



La figure 8 représente le spectre de masse de la fragmentation de l'ion précurseur de l'insuline humaine. Le résultat de la fragmentation est dépendant de la technologie utilisée, de la composition et du débit de la phase mobile, ainsi que des paramètres de détection appliqués (débit de gaz, température, voltage).

Figure 8 : Spectre de masse de la fragmentation de l'ion précurseur de l'insuline humaine (m/z 1162,3) (source ESI – Appareil API4000 Qtrap) [40]



Pour ce travail de thèse, le choix s'est porté sur l'Orbitrap, appareillage disponible au laboratoire et utilisé dans différentes techniques d'analyse des insulines publiées [26, 37, 40, 41].

POINTS CLÉS

- ❖ L'identification des protéines est formelle grâce au développement de techniques LC-MS.
- ❖ La distinction entre les insulines est réalisée à partir des ions pseudo-moléculaires multichargés et des ions produits issus de la fragmentation de l'extrémité de la chaîne B.

IV. MESUSAGES : accidents ou malveillance ?

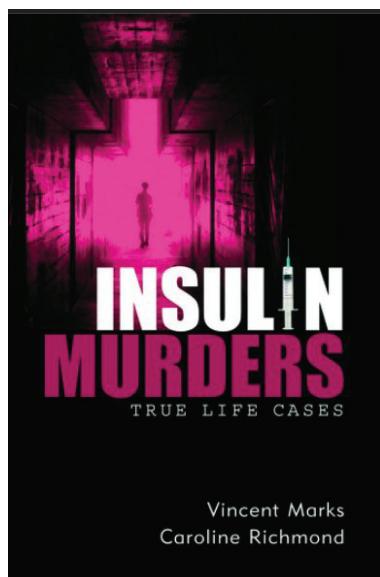
Outre une utilisation dans un cadre strictement médical, les insulines ont été détournées de leur usage dans les années qui ont suivi leur mise sur le marché. Tout d'abord, dans le cadre sportif, le fonctionnement des insulines sur le plan musculaire a été étudié et exploité dans le but d'améliorer les performances des athlètes. En effet, l'augmentation du transport du glucose et des acides aminés dans les fibres musculaires squelettiques [10, 42] ainsi que le stockage intracellulaire du glycogène, entraînent des effets anabolisants potentiels. Ainsi, ces protéines sont aujourd'hui considérées comme des substances dopantes et sont proscrites dans le domaine du sport [43-45]. Néanmoins, cet aspect du mésusage des insulines ne fait pas partie de notre domaine d'application.

La notion de mésusage peut être abordée de deux manières : accidentelle et volontaire. Lorsque le mésusage est accidentel, il s'agit majoritairement d'erreur thérapeutique (erreur de dose administrée). Il peut aussi s'agir de mauvaise utilisation du matériel d'administration. En effet, l'utilisation répétée de la même aiguille ou l'administration sur le même site sous-cutané peut engendrer une lipohypertrophie. Ceci entraîne une modification de diffusion des insulines, une création d'un réservoir d'insulines et potentiellement un relargage brutal impliquant une hypoglycémie sévère. Des erreurs accidentelles de dose administrée par des patients ont été rapportées [46-49]. L'erreur peut aussi provenir du corps médical [7, 50]. En effet, une récente présentation a démontré que dans un contexte de nouvelles formulations plus concentrées que les précédentes : 200 U/mL (Humalog) à 300 U/mL (Toujeo) contre habituellement 100 U/mL ; seuls 18% des soignants interrogés (n=68) procéderaient de la bonne manière pour injecter la dose prescrite à un patient [51]. Néanmoins, le nombre d'accidents reste faible. Selon une étude allemande menée de 1995 à 2003, 160 appels aux centres anti-poisons concernaient une intoxication aux insulines sur plus de 175 000 (<0,1%) [52]. Parmi ces 160 appels, seuls 5 % correspondaient à des erreurs accidentelles. En revanche 91 % représentaient un mésusage volontaire. En effet, étant donné que leur surdosage implique un état hypoglycémique pouvant mener au décès, les insulines sont parfois volontairement utilisées à des fins suicidaires ou criminelles. Les tentatives de suicide [53-59] et les suicides [12, 26, 34, 48, 60-68] constituent la majeure partie des intoxications rapportées. L'effet euphorisant de l'insuline est parfois recherché, comme rapporté dans un cas d'administration d'insuline à des fins récréatives [69].

Le premier cas de meurtre impliquant l'insuline a été révélé en 1957 par l'affaire Kenneth Barlow [70]. Depuis, de nombreux autres cas d'homicides impliquant les insulines ont été révélés même si leur nombre semble sous-estimé [7, 71-77]. Cette particularité de la difficulté de mise en évidence de l'implication de l'insuline a d'ailleurs

fait connaître la protéine au grand public à travers des affaires médiatisées, et romancées par la suite, comme par exemple l'affaire Von Bulow [7]. Dans le livre intitulé *Insulin Murders- True life cases*, Vincent Marks et Caroline Richmond ont rapporté 14 récits d'histoires vraies de meurtres impliquant l'insuline depuis le premier en 1957 [7]. En 2009, V. Marks publiait une revue comptabilisant 66 homicides dont certains sont suspectés, d'autres présumés et d'autres prouvés regroupant les données de 10 pays [8]. Néanmoins, toutes les tentatives de suicides ou d'homicides ne conduisent pas au décès si la prise en charge est rapide, notamment dans les cas de Münchhausen [78] et de Münchhausen par procuration observés sur des enfants [79-82] ou des personnes âgées [83].

Hormis l'insuline glulisine pour laquelle aucune donnée n'a été retrouvée, l'ensemble des insulines a été impliqué dans un contexte de mésusage : humaine, lispro [26], asparte [12, 54, 58, 84], glargin [58, 85], détémir [50], dégludec [49, 84]. Enfin, la gravité et l'issue de l'intoxication dépendent toujours du statut diabétique et de l'état de santé du patient, de la dose et du type d'insuline administrée ainsi que du délai de prise en charge. Dans tous les cas, dans le but d'adapter la meilleure prise en charge en cas d'intoxication ou de mettre en évidence une maltraitance ou un homicide, il est idéalement recommandé de réaliser une identification formelle des insulines, que ce soit au plan clinique ou au plan médico-légal.



V. REVUE DE LA LITTERATURE

L'objectif de la revue de la littérature était de rassembler les connaissances actuelles, sur l'analyse des insulines dans les échantillons biologiques et sur l'interprétation des concentrations, dans un contexte médico-légal. Les données de la littérature étant conséquentes depuis la diffusion de l'immunoanalyse début des années 60, cette revue s'est essentiellement focalisée sur les données post-mortem ou permettant d'argumenter un résultat de concentration post-mortem.

Les notions physiologiques de structure, sécrétion, mécanisme d'action et catabolisme de l'insuline humaine et de ses analogues biosynthétiques ont été abordées, de même que les aspects pré-analytiques tels que l'échantillonnage et la conservation pré-analytique. Les différentes techniques de dosage : immunoanalyse et spectrométrie de masse ont fait l'objet d'une section à part puisque la quantification est amplement impactée par la méthodologie utilisée. En effet, l'immunoanalyse est une technique historique dans l'analyse de l'insuline et a été très largement utilisée, puisqu'elle fournit une bonne sensibilité et une facilité de mise en œuvre. Récemment, cependant, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse offre une sélectivité indispensable dans le contexte médico-légal, permettant de distinguer l'insuline humaine de ses analogues et de ses métabolites ou produits de dégradation. Néanmoins, cette technologie n'a volontairement pas été traitée dans le détail puisque des revues récentes ont déjà développé spécifiquement ce sujet. Toutefois, les travaux rapportés sont principalement focalisés sur l'analyse de l'urine dans le domaine de la lutte antidopage.

A partir de cas de décès causés par une intoxication à l'insuline rapportés dans la littérature, les différentes concentrations dans le sang ante- et post-mortem, chez des patients non-diabétiques et diabétiques traités, ont été listées et discutées, en fonction de la technique d'analyse utilisée. Les multiples aspects médico-légaux d'une intoxication par l'insuline ont été étudiés tels que le mécanisme d'intoxication et les limites de l'analyse en post-mortem. Une des limites majeures reste l'hémolyse qui dégrade très rapidement les insulines après le décès. Certaines matrices dites alternatives peuvent être alors analysées pour rechercher la preuve de l'administration d'insuline avant le décès. Une partie complète se focalise sur l'analyse de ces matrices alternatives reprenant l'ensemble des études animales et humaines réalisées à partir de foie, bile, rein, urine, humeur vitrée (HV), cerveau, liquide cérebrospinal, muscle, tissu adipeux et site d'injection.

Compte tenu des limites de l'analyse post-mortem des insulines, l'interprétation des concentrations est très complexe. Dans le but de proposer un outil d'aide à l'interprétation, un logigramme composé de deux étapes a été construit. La première

étape correspond au cheminement analytique ; la seconde est un guide d'interprétation. Ce logigramme ne se conçoit pas comme une recette miracle à appliquer pour conclure ou non à une intoxication. C'est un outil proposé afin de prendre en considération les points essentiels de l'analyse et d'aider à l'interprétation qui doit être spécifique à chaque cas. Le logigramme souligne dans une première étape analytique, l'importance de connaître le type d'analyse mise en œuvre pour mesurer la concentration en insuline, particulièrement dans le cas d'immunoanalyse pour laquelle la détection des analogues varie en fonction du kit utilisé. Dans un second temps, les nombreux paramètres ante-mortem (dose, pathologies associées, délai administration/injection, etc) et post-mortem (dégradations *in corpore* et dégradation *in vitro* liée à l'hémolyse, etc) impliqués dans l'interprétation des concentrations d'insulines ont été répertoriés sous forme de questions à se poser pour conclure ou non à un surdosage d'insulines. Les valeurs de concentrations rapportées dans la littérature sont très hétérogènes et reflètent l'importance de systématiquement documenter le résultat avec le type d'analyse mis en œuvre, les circonstances du décès, les délais entre l'administration et le décès, le type d'insuline administrée, la dose et le délai entre le décès et les prélèvements. L'ensemble des paramètres, pré-analytiques, analytiques, cliniques et notions d'enquête est évoqué dans ces questionnements afin d'éviter de conclure ou d'exclure faussement un surdosage. Finalement, dans le cadre d'un décès impliquant un surdosage d'insuline, l'obtention de mesures fiables et leur interprétation solide reste un challenge.

REVIEW ARTICLE



Is insulin intoxication still the perfect crime? Analysis and interpretation of postmortem insulin: review and perspectives in forensic toxicology

Charline Bottinelli^a, Nathalie Cartiser^b, Fabien Bévalot^a, Laurent Fanton^{b,c} and Jérôme Guitton^{d,e}

^aLaboratoire LAT LUMTOX, Lyon, France; ^bDépartement de médecine légale, Hôpital Edouard-Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France;

^cFaculté de médecine Lyon Est, Institut de Médecine Légale, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France;

^dLaboratoire de Toxicologie, ISPB-Faculté de Pharmacie, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France; ^eHospices Civils de Lyon, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre Bénite Cedex, France

ABSTRACT

Insulin is an anabolic hormone essential to glucose homeostasis. Insulin therapy, comprising human insulin (HI) or biosynthetic analogs, is critical for the management of type-1 diabetes and many of type-2 diabetes. However, medication error including non-adapted dose and confusion of insulin type, and misuse, such as massive self-administration or with criminal intent, can have lethal consequences. The aim of this paper is to review the state of knowledge of insulin analysis in biological samples and of the interpretation of insulin concentrations in the situation of insulin-related death investigations. Analytic aspects are considered, as quantification can be strongly impacted by methodology. Immunoanalysis, the historical technique, has a prominent role due to its sensitivity and ease of implementation. Recently, liquid chromatography coupled to mass spectrometry has provided indispensable selectivity in forensic contexts, distinguishing HI, analogs, and degradation products. We review the numerous antemortem (dose, associated pathology, injection-to-death interval, etc.) and postmortem parameters (*in corpore* degradation, *in vitro* degradation related to hemolysis, etc.) involved in the interpretation of insulin concentration. The interest and limitations of various alternative matrices providing a valuable complement to blood analysis are discussed. Vitreous humor is one of the most interesting, but the low diffusion of insulin in this matrix entails very low concentrations. Injection site analysis is relevant for identifying which type of insulin was administered. Muscle and renal cortex are matrices of particular interest, although additional studies are required. A table containing most case reports of fatal insulin poisoning published, with analytical data, completes this review. A logic diagram is proposed to highlight analytical issues and the main parameters to be considered for the interpretation of blood concentrations. Finally, it remains a challenge to provide reliable biological data and solid interpretation in the context of death related to insulin overdose. However, the progress of analytical tools is making the “perfect crime” ever more difficult to commit.

Abbreviations: AT: adipose tissue; BBB: blood–brain barrier; CB: cardiac blood; CSF: cerebrospinal fluid; DARTs™: disposable automated research tips; FB: femoral blood; HI: human insulin; HRMS: high-resolution accurate mass spectrometry; IAC: immunoaffinity chromatography; IAS: insulin autoimmune syndrome; IDE: insulin degrading enzyme; IV: intravenous; LC: liquid chromatography; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; M1: 21A-Gly-HI (metabolite of glargin); M2: 21A-Gly-des-30B-Thr-HI (metabolite of glargin); MS: mass spectrometry; MSIA™: mass spec immuno assay; MS/MS: tandem mass spectrometry; NanoLC: nano liquid chromatography; NPH: Neutral Protamine Hagedorn; PDI: protein disulfide isomerase; PEG: polyethylene glycol; PMI: postmortem interval; PMR: postmortem redistribution; RIA: radioimmunoassay; SC: subcutaneous; SPE: solid phase extraction; VH: vitreous humor

ARTICLE HISTORY

Received 29 January 2020

Revised 19 April 2020

Accepted 27 April 2020

KEYWORDS

Insulin; analogs;
immunoanalysis; mass
spectrometry; postmortem

Table of contents

1. Introduction	325	3.3. Mass spectrometric analysis	330
2. Insulins, structures, and mechanisms of action	325	3.4. Limits of detection	331
2.1. Human insulin	325	4. Forensic aspect of insulin intoxication	331
2.2. Therapeutic insulins	326	4.1. Mechanism of insulin intoxication	331
3. Analytic aspects	327	4.2. Blood	332
3.1. Preanalytic considerations	327	4.2.1. Physiological HI concentration in healthy subjects	332
3.1.1. Sampling and storage	327	4.2.2. Pathological increase in HI concentration	332
3.1.2. Anti-insulin antibodies	329		
3.2. Immunoanalysis	329		

4.2.3. Limitations of postmortem blood insulin determination	333
4.2.4. Postmortem blood insulin concentrations	334
4.3. Alternative matrices	335
4.3.1. Liver	335
4.3.2. Bile	335
4.3.3. Kidney	339
4.3.4. Urine	339
4.3.5. Injection site	339
4.3.6. Adipose tissue	340
4.3.7. Muscle	340
4.3.8. Vitreous humor	340
4.3.9. Brain	340
4.3.10. Cerebrospinal fluid	341
5. Discussion/conclusion	341
Acknowledgment	343
Declaration of interest	343
References	343

1. Introduction

Insulin is an anabolic hormone essential to glucose homeostasis. Dysregulation of its secretion or of the cellular response to insulin can lead to diabetes, characterized by chronic hyperglycemia (World-Health-Organization 1999). Management of diabetic patients aims to prevent hyperglycemia and its short- and long-term complications: insulin therapy is required for survival in type 1 and many type 2 diabetes after few years. Beyond therapeutic accidents, insulin therapy can be misused, as in doping to provide energy reserves as glycogen and to inhibit proteolysis and lipolysis in the organism (Thomas and Thevis 2019), or for suicidal or even criminal purposes. The rate of exogenous insulin administration as cause of death is undoubtedly underestimated (Sunderland et al. 2016). Indeed, insulin involvement in death is difficult to detect and even more challenging to prove in a court of law in criminal cases (Marks and Richmond 2008a, 2008b). Despite, Thevis and Thomas had recently written that "the myth of a "non-traceability" of insulin [...] has been disproven" (Thomas and Thevis 2019), insulin intoxication remains difficult to recognize due to the nonspecific symptoms of hypoglycemia onset, the delay of occurrence of death, lack of anatomical findings at autopsy and difficulties in finding needle marks. Is insulin intoxication still the perfect crime?

The aim of this paper is to review the state of knowledge on insulin analysis in biological samples and on the interpretation of insulin concentrations in investigation of deaths related to insulin administration. The issue of insulin analysis in biological samples is largely discussed by considering preanalytical precautions, immunoassays and mass spectrometric methods. Antemortem and postmortem parameters essential to consider in interpreting postmortem insulin concentrations are also reviewed. A table summarizes cases involving misuse of insulin and reporting postmortem concentrations. Specificities of current therapeutic insulins (human and

biosynthetic analogs) are considered. Not only analytical investigation in blood is reviewed, but also in alternative postmortem matrices, to highlight their potential interest or limitations.

The scale of the scientific literature over many decades is a proof of scientists' constant interest for insulin. The present review of the literature was conducted up to November 2019 on PubMed and Google Scholar. The search for case reporting death in relation to insulin used "insulin" as constant keyword. It was associated to other keywords but the large number of publications available was not only in forensic interest. The search was thus restricted to knowledge of forensic interest, adding the keyword "forensic," published after 1958 (when insulin-specific immunoassay replaced determination of insulin level on animal tests). The list of the used keywords was the following with the number of articles identified without and with the restriction: "chromatography" (8436/27), "murder" (65/23), "autopsy" (591/50), "case report" (12003/60), "suicide" (325/35), "vitreous humor" (187/20), "urine" (8324/21), "bile" (1982/3), "brain" (23337/40), "adipose tissue" (31265/22), "muscle" (39392/37), "liver" (48029/59), "kidney" (18883/19), and "postmortem" (840/68). Publications not found in the first literature search but cited in retrieved publications were also considered. Finally, only the articles with a postmortem insulin measurement were used. Thus, 31 cases were reported from 24 studies. Although determination of C-peptide, proinsulin, anti-insulin antibodies, glucose, and other biological parameters, such as lactate or ketone, is often related to insulin analysis (Iwase et al. 2001; Hess et al. 2011a; Musshoff et al. 2011) and is very useful in interpretation, these compounds are not within the scope of this review. All insulin concentrations are reported in the unit used by the authors and converted in $\mu\text{U/mL}$ to facilitate comparison.

2. Insulins, structures, and mechanisms of action

2.1. Human insulin

Human Insulin (HI) is a hormone composed of two peptides cross-linked by disulfide bonds: the A-chain (21 amino acids) and the B-chain (30 amino acids), as illustrated in Figure 1. It is an anabolic hormone involved in the metabolism of the three nutrient families: carbohydrates, lipids, and proteins. However, its main known role is to maintain glucose homeostasis. By increasing cell membrane permeability, HI promotes glucose entry in sensitive cells. In liver and muscle cells, HI stimulates glucose storage as glycogen and inhibits its degradation (Ibrahim 2010).

HI synthesis occurs in the beta-cells of Langerhans islets, located in the endocrine part of the pancreas. The first step is preproinsulin production, followed by conversion into proinsulin by endopeptidase, then maturation in the Golgi apparatus (Magnan and Ktorza 2005), catalyzed by specific prohormone convertases which truncate proinsulin in equimolar quantities of HI and C-peptide (Jarzuel 2008). When vesicles become mature and HI concentration increases, it precipitates with zinc ions to form hexamer crystals (Magnan and Ktorza 2005), which are an inactive and stable form. The

vesicles are stored until the beta-cells are exposed to appropriate stimuli ordering the immediate secretion of HI. When HI is released in the interstitial space, dilution induces a change from hexamer to monomer, which is then able to diffuse in blood capillaries and enter the systemic circulation (Jarzuel 2008).

Without stimulation, HI is secreted at a low rate, known as basal or constitutive secretion. This has been shown to be pulsatile, with 2 rhythms of fluctuation: slow, with a period of 2–3 h, and fast, with a period of 15 min (Widjaja et al. 1999; Magnan and Ktorza 2005). In larger amounts, HI secretion responds to increase in blood glucose level. Blood glucose is the only primary physiologic stimulus for HI secretion (Magnan and Ktorza 2005). At supra-physiologic or therapeutic level, HI secretion can be induced by other compounds, such as mannose, leucine, glyceraldehyde, sulfonylurea, and glinide. Circulating amino acids and non-esterified fatty acids, and some digestive hormones (e.g. glucagon-like peptide 1) and parasympathetic hormones (e.g. acetylcholine) are secondary stimuli, able to enhance HI secretion only when blood glucose level is high enough. This constitutes a physiologic mechanism preventing hypoglycemia (Magnan and Ktorza 2005). Another protective mechanism is insulin receptor downregulation when HI concentration increases (Blackard et al. 1979). Finally, to maintain glucose homeostasis, HI activity is balanced by counter-regulatory hormones such as glucagon, adrenaline, cortisol or growth hormone (Binder and Bendtson 1992). Overall, HI and C-peptide secretion nearly stops when glucose levels fall to 2.5–3.33 mmol/L (0.45–0.60 g/L) (DeWitt et al. 2007).

After distribution to sensitive tissues and action via specific insulin receptors, HI is rapidly eliminated, thus, responding rapidly to changes in blood glucose level. HI secreted by a healthy person has a half-life of approximately 5 min

(Duckworth et al. 1998). All cells presenting insulin specific receptors are able to degrade HI. Although the liver and kidneys are the major sites of insulin clearance (Duckworth et al. 1998), other insulin target tissues, such as muscle tissue, play an important role in HI catabolism. The first step in HI metabolism is the link between HI and its specific receptor, located on the plasma membrane of insulin-sensitive cells. Only a small part of the HI bound to the receptor is released intact into the systemic blood circulation; the rest is metabolized. At high HI level, non-receptor-mediated insulin uptake by pinocytosis was shown to significantly contribute to hepatocyte uptake and catabolism (Duckworth et al. 1998). Cellular metabolism of HI is complex, and many studies have been conducted to identify the enzymes involved, the sequence of their action and the degradation products. There is now generally agreed to be a mechanism involving several peptidases: Insulin Degrading Enzyme (IDE), Protein Disulfide Isomerase (PDI), Cathepsin D, and some other nonspecific peptidases (Brodal 1971; Authier et al. 1994; Seabright and Smith 1996; Duckworth, et al. 1998; Authier et al. 2002; Bellia et al. 2013). However, the sequence of their action is not fully understood. IDE seems to identify the 3D structure of HI and cleaves the HI on a variety of sites outside the part bound to the receptor, mainly on the B chain (Authier et al. 1994). PDI is able to cut the disulfide bridges linking A and B chains, thus releasing either intact or modified A and B chains. Figure 1 represents the IDE and PDI cleavage sites. Nonspecific peptidases further degrade the modified A and B chains into smaller sequences of amino acids.

2.2. Therapeutic insulins

Insulin therapy is prescribed to diabetic patients as replacement for partial or total HI secretion deficiency or insulin resistance. There have been numerous studies and

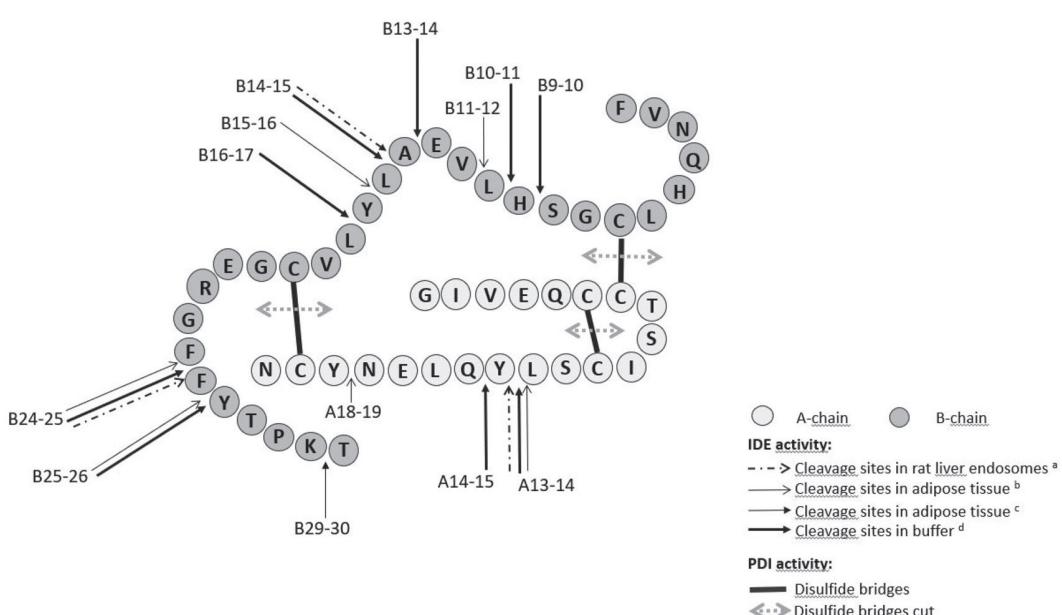


Figure 1. Human insulin structure. The letters are official nomenclature of amino acids. Arrows represent cleavage sites of the insulin degrading enzyme (IDE) identified in various *in vitro* studies and of protein disulfide isomerase (PDI). a (Seabright and Smith 1996); b (Duckworth et al. 1997); c (Thomas et al. 2015); d (Bellia et al. 2013).

developments in administration route, but subcutaneous (SC) injection is still the most common. Injection can be performed by the patient with a syringe or insulin pen, or scheduled through an external insulin pump (Shahani and Shahani 2015). The injection site can be the arm, thigh, buttock, or abdomen, and must be changed regularly as repeated injection may cause local lipohypertrophy that could delay absorption (Batalis and Prahlow 2004) and then insulin could be released in a second time implying hyperinsulinemia. Intravenous (IV) administration is limited to emergency care. Individual insulin requirements are between 0.4 and 1.0 IU/kg/day (American Diabetes Association 2018) but could be potentially superior and adjusted for each patient, entailing regular follow-up with daily glycemic measurement (Idris et al. 2018).

Research on insulin therapy is constant, to improve patient comfort and safety. Regular HI, consisting of unchanged HI synthesized by genetic engineering, has replaced insulin of animal origin. Different formulations and insulin analogs (bioengineered insulin obtained by slight modification of HI peptide sequence) are available to modulate pharmacokinetics. Two types of analog have been designed and are currently prescribed: rapid-acting insulins (Lispro, Glulisine and Aspart) and long-acting insulins (NPH (Neutral Protamine Hagedorn), Glargine, Detemir, and Degludec). Table 1 summarizes the pharmacokinetic parameters of therapeutic insulins and Figure 2 illustrates the main pharmacokinetic profiles of free insulins.

Insulin requires a complex formulation for production and conservation (Home 2012; Jayakrishnapillai et al. 2017). As observed *in vivo*, its stability in solution involves the formation of oligomers: the balance between monomer, dimer and hexamer forms depends on concentration, pH and the metallic ions present in the solution. After subcutaneous injection, dilution of metallic ions, physiological pH and progressive insulin concentration decrease, enable transformation into monomers. This dissociation is necessary for the insulin to pass through membranes to reach bloodstream, and results in a delay between injection and onset of action, called latency. For synthetic HI, onset of action is approximately 30 min (Morello 2011) with peak concentration at 82–97 min (Rave et al. 2006) after injection and an action duration from 6 to 8 h (Batalis and Prahlow 2004). Rapid-acting analogs were designed to more accurately mimic the rapid intense physiologic HI secretion response to food intake. Modifications in the peptide sequence of these analogs destabilize the hexamer conformation, resulting in faster dissociation and thus reduced latency (Home 2012). Pharmacokinetically, Lispro, Glulisine, and Aspart insulins are comparable, with higher and quicker concentration peak and shorter half-life than Regular HI. Formulations of insulin solution stabilized by zinc and protamine, marketed as NPH, provide an intermediate action, with delayed peak concentration followed by prolonged blood presence (Nasrallah and Reynolds 2012). Long-acting analogs display a pharmacokinetic profile with virtually no peak, close to basal secretion, with a constant active blood concentration over a prolonged period. Modifications leading to Glargine decrease solubility

at physiological pH, which delays oligomer dissociation and increases latency.

After subcutaneous injection, Glargine undergoes enzymatic removal of the basic arginine pair at positions B30 and B31, resulting in 21A-Gly-HI (M1) (Bolli et al. 2012; Thomas et al. 2015), then cleavage of 30B-threonine leading to 21A-Gly-des-30B-Thr-HI (M2) (Bolli et al. 2012). Glargine and M2 were inconsistently detectable in plasma after a therapeutic administration and M1 determination was shown to be more relevant to characterize the glucodynamic effects of glargine (Bolli, et al. 2012; Steinstraesser et al. 2014). Detemir insulin is quickly absorbed but is extensively bound to albumin (>98%) (Novo Nordisk 2005; Bodenlenz et al. 2015); progressive release of the free active form ensures its long-acting profile. Degludec combines increased latency, due to multi hexamer formation at the subcutaneous injection site, with binding to albumin (>99%) (Novo Nordisk 2015), resulting in progressive release of the free active form (Nasrallah and Reynolds 2012; Vora et al. 2015).

3. Analytic aspects

Since the late 1950s, immunoassay, and particularly radioimmunoassay (RIA), has replaced biological testing on mice, guinea pigs and isolated rat diaphragms for insulin detection and quantification. Subsequently, improvements in antibody preparation and the development of immunometric techniques enhanced the selectivity of insulin immunoassays (Dong et al. 2018). Lately, insulin use in human and animal doping encouraged the development of techniques based on chromatography and mass spectrometry. Recently, Thomas and Thevis published an interesting and detailed review on the recent advances in the determination of insulins from biological fluids (Thomas and Thevis 2019).

3.1. Preanalytic considerations

3.1.1. Sampling and storage

In bioanalytical practice, insulins are usually quantified in plasma, which is usual for preclinical and clinical trial samples. Several authors have shown that HI is stable in serum: for 24 h at room temperature, 30 days at +4°C or at -20°C and at least 39 weeks at -80°C (Chen et al. 2013; Taylor et al. 2016). Heparinized plasma is not advised, as HI levels were reported to be lower than in serum (Agin et al. 2013). The use of anticoagulants such as EDTA (Darby et al. 2001) or fluoride oxalate (Beastall et al. 1995) was also reported. Stability in plasma, whatever the anticoagulant, was comparable to that in serum (Chen et al. 2013). Stability of HI in whole blood may be compromised by the effect of hemolysis. Indeed, insulin degradation was clearly demonstrated in hemolyzed serum (Brodal 1971; Sapin et al. 1997; Hess et al. 2013) and red blood cell hemolysate (Wunder et al. 2014; Taylor et al. 2016), with breakdown proportional to hemolysis (Brodal 1971). Enzymatic degradation involving disulfide reductase located in erythrocytes was hypothesized by Brodal et al. (Brodal 1971). Release of peptidases such as IDE during hemolysis was described (Sapin et al. 1997). However,

Table 1. Types of insulin and their pharmacokinetics after subcutaneous administration.

	Modification compared to human insulin	Onset	T_{max}	C_{max}^b	Duration of action	Half-life ^d
Regular human insulin	Unchanged	30 min Morello (2011)	82–97 min Rave et al. (2006)	For 0.15 U/kg: 45 μ U/mL Rave et al. (2006)	6–8 h Batalis and Prahlaw (2004)	192–276 min Czock et al. (2003), De la Pena et al. (2011)
Lispro	Switch of B28 and B29	10–30 min Hess et al. (2013)	33.3 ± 2.6 min Von Mach et al. (2002)	For 0.05 U/kg: 20.8 ± 1.1 μ U/ml Von Mach et al. (2002)	3–4 h Hess et al. (2013)	50–55 min Czock et al. (2003), De la Pena et al. (2011)
Glulisine	Substitution of B3 by lysine and B29 by glutamic acid	9 min Arnolds et al. (2010)	55–57 min Rave et al. (2006)	For 0.15 U/kg: 79–82 μ U/ml Rave et al. (2006)	4 h Home (2012)	42 min Becker and Frick (2008)
Aspart	Substitution of B28 by aspartic acid	17 min Arnolds et al. (2010)	33.0 ± 2.6 min Von Mach et al. (2002)	For 0.05 U/kg: 24.6 ± 1.3 μ U/ml Von Mach et al. (2002)	4 h Home (2012)	32–77 min Plum et al. (2000), Petersen et al. (2010)
Neutral Protamine Hagedorn (NPH)	Unchanged stabilized by addition of zinc and protamine in the formulation	1–2 h Nasrallah and Reynolds (2012)	4–8 h Nasrallah and Reynolds (2012)	For 0.4 U/kg: 147 ± 40 pmol/L Heise et al. (2004) (21.6 ± 5.76 μ U/ml)	8–12 h Nasrallah and Reynolds (2012)	7–19 h Lauritzen et al. (1982)
Glargine	Substitution of A21 by glycine and + addition of 2 arginine at C-terminal B chain	30–60 min Nasrallah and Reynolds (2012)	8.1–12.3 h Bolli et al. (2012), Luzio et al. (2013)	For 0.6 U/kg: 136 pmol/L ^a Bolli et al. (2012) (22.6 μ U/ml)	16–32 h Nasrallah and Reynolds (2012), Heise and Mathieu (2017)	12.1–19 h Heise and Mathieu (2017), Heise et al. (2015)
Detemir	Removal of B30, acylation of B29 to a C14 fatty acid	30–60 min Nasrallah and Reynolds (2012)	8.9–14.3 h Luzio et al. (2013)	For 0.4 U/kg: 2865 ± 626 pmol/L Heise et al. (2004) (119 ± 26.1 μ U/ml) ^c	16–24 h Nasrallah and Reynolds (2012)	5–7 h Danne et al. (2003), Begg et al. (2015)
Degludec	Removal of B30, dacylation of B29 to a C16 fatty acid via a glutamic acid spacer	30–90 min Nasrallah and Reynolds (2012)	10–12 h Tambascia and Eliaschewitz (2015)	For 0.4 U/kg: 4000 pmol/L Haahr and Heise (2014) (663 μ U/ml) ^c	>24–42 h Nasrallah and Reynolds (2012), Vora et al. (2015)	17–25.4 h Nasrallah and Tambascia and Eliaschewitz (2015)

^aConcentration of M1.^bConcentrations were obtained by immunoanalysis using various immunoassay kits; thus concentration data are not comparable.^cTotal insulin concentration taking account of insulin bound to albumin, which is different from the active insulin concentration.^dHalf-life is dose-dependent, resulting in varying ranges.

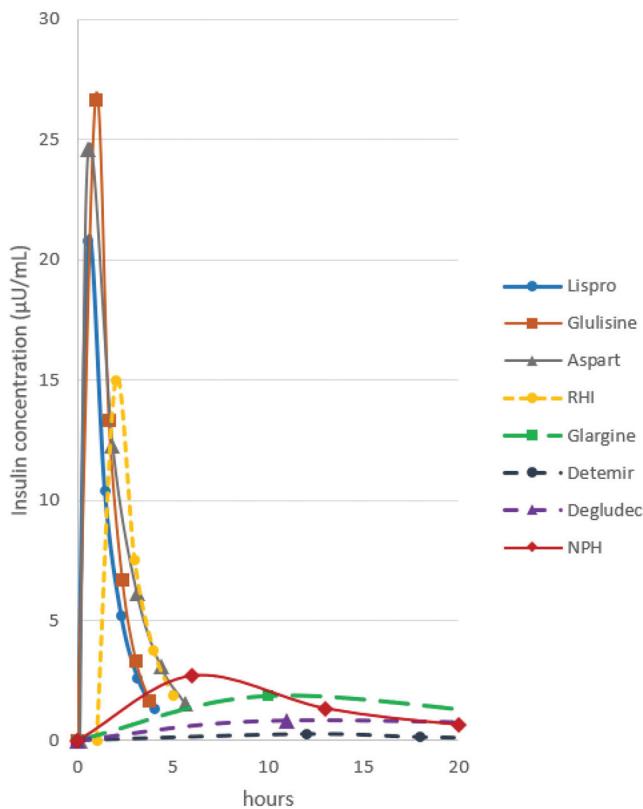


Figure 2. Pharmacokinetic profiles of free Regular Human Insulin (RHI), rapid analogs (Lispro, Glulisine, Aspart), Neutral Protamine Hagedorn (NPH), and long-acting analogs Glargin, Detemir and Degludec), based on the pharmacokinetic data Table 1.

Wunder et al. (2014) demonstrated that IDE inhibitor could not prevent HI degradation in hemolysis samples. It was suggested that the reaction is a non-proteolytic degradation initiated by hemoglobin, but that thiol groups from globin cysteines are at the origin of the degradation. Quick centrifugation after blood sample collection is, therefore, highly recommended (Palmiere et al. 2015). However, in forensic practice, this good practice cannot be systematically applied and, moreover, adequate serum may be difficult to obtain due to postmortem changes. Only two studies focused on stability in other matrices. Legg et al. (2019) demonstrated that loss of HI in vitreous humor (VH) is complete by 1 day at room temperature, and by 14 days at +4 °C, while no degradation was observed at -20 °C, over a 30-day period. Thomas et al. (2007) studied the stability of insulin in urine, and observed no degradation for 8 weeks at +4 °C or -20 °C. Most authors agree that samples, if not immediately analyzed, should be stored frozen, between -20 °C and -80 °C until analysis, whatever the type of matrix (Sturner and Putnam 1972; Dickson et al. 1977; Benzi et al. 1990; Koskinen et al. 1999; Marks and Wark 2013; Palmiere et al. 2015; Sunderland et al. 2016; Taylor et al. 2016). Stability of HI following several freezing-thawing cycles was studied in serum and plasma but conclusions were variable: some studies reported perfect stability (Reimers et al. 1982; Reyna et al. 2001; Chen et al. 2013; Taylor et al. 2016) whereas others found a significant impact on the insulin concentration in the sample (Livesey et al. 1980; Borer-Weir et al. 2012). In the

absence of consistent data, it seems advisable to limit the number of freezing-thawing cycles.

Concerning insulin analogs, the pattern of degradation was studied in hemolyzed blood for Lispro, Glulisine, Aspart, and Glargin (Wunder et al. 2014) and seems to be the same as that of HI. Legg et al. studied analogs (Lispro, Glulisine, Aspart, Glargin, and Detemir) stability in VH and demonstrated that as for HI the loss was complete by 1 day at room temperature and by 14 days at +4 °C, while no degradation was observed at -20 °C, over a 30-day period (Legg et al. 2019). In urine, it was observed that Glargin and Detemir were stable during 8 weeks at +4 °C and -20 °C (Thomas et al. 2007). Thus, the same pre-analytical precautions are advised in case of search for analogs or in case of forensic samples for which the type of administered insulin is unknown (HI or analog).

3.1.2. Anti-insulin antibodies

In diabetes etiology, following insulin injection or in some auto-immune diseases, patients can develop anti-insulin antibodies (Binder and Bendtson 1992). In this case, a part of secreted or injected insulin binds to anti-insulin antibodies and only the free insulin remains biologically active. Thus, measured insulin level will be impacted in patients producing such antibodies, and distinction between total and free insulin may be relevant in clinical practice (Lutz et al. 1997; Batalis and Prahlow 2004). However, in the case of massive insulin overdose, insulin levels are likely to be so high that the difference between total and free insulin may not be significant (Dickson et al. 1977; Winston 2000).

3.2. Immunoanalysis

Immunological methods are the most common for determining HI in clinical practice. A large range of immunoassay kits is available on the market: either competitive (e.g. RIA) or noncompetitive (so-called "sandwich") assays (such as immunoradiometric assay or chemiluminescence assays). Antibody specificity is one of the major limitations of immunoassays and especially for insulin analysis. Mainly designed for HI determination, immunoassays variously discriminate HI from biological compounds close to insulin, such as proinsulin (Chevenne et al. 1999), from animal insulins, which were used in the past in diabetes therapy (Marks and Wark 2013) and biogenetic analogs currently used in therapeutics (Heurtault et al. 2014), and from HI or analogs metabolites or degradation products. According to the kit employed, cross-reaction with these interferences will impact variously the HI quantification. RIA based on polyclonal antibodies is more prone to interferences than immunometric assay based on two monoclonal antibodies. Interference with human proinsulin was the most common, due to the obvious similarity to insulin, but immunoassays able to discriminate insulin and proinsulin are nowadays available (Vezzosi et al. 2003). Chevenne et al. (1999), comparing various immunoassay kits, reported cross-reactivity between <0.1% and 100% with proinsulin and its main metabolites. Cross-reactivity with insulin

growth factor I, C-peptide or glucagon is generally documented in the manufacturer's summary of product characteristics (Palmiere et al. 2015). The variability of cross-reaction with endogenous compounds related to insulin contributes to the great differences observed in the range of values indicated as normal (non-pathologic) by manufacturers, and to the difficulty of comparing insulin concentrations obtained using different methods (Chevenne et al. 1999).

Cross-reactivity between HI and therapeutic analogs depends on the binding site of the antibodies employed in the kit. Specificity for HI is better if recognition is based on antigenic sites located between peptides 27 and 30 of the B chain. In this area, most of the analogs display differences in peptide sequence compared to HI (Heurtault et al. 2014). Conversely, if antigenic sites are located in the middle of the B chain or in the major part of the A chain, cross-reactivity may be elevated due to high or exact similarity between HI and analogs. Heurtault et al. (2014) analyzed 5 synthetic analogs and 2 glargine metabolites with 16 immunoassay kits. Cross-reactivity values ranged from <0.1% to 264% and only four kits had negligible cross-reactivity between HI and analogs. Numerous RIA kits do not discriminate HI from M1. Sunderland et al. (2016) compared two immunoassay kits and liquid chromatography coupled to a mass detector (LC-MS) for the diagnosis of self-administered Aspart insulin overdose. The first kit gave a serum insulin concentration of 5.2 µU/mL, suggesting a therapeutic value (reference range <13.7 µU/mL). The second kit gave a serum insulin concentration of 4741 µU/mL, suggesting overdose (reference range, from 3.0 to 25.1 µU/mL). The first kit was known to have only 2% cross-reactivity with insulin analogs, while the second was known to have moderate to good reactivity with analogs (except Glulisine). Consequently, only the second kit successfully highlighted this Aspart insulin overdose, by indicating an erroneous increased HI value. Only LC-MS identified Aspart insulin, and accurately quantified the serum level at 4000 µU/mL. The discrepancy between results obtained using two different immunoassays was a good illustration of the pitfalls arising from variable cross-reactivity between HI and analogs: the presence of insulin analogs in a sample may falsely increase or decrease HI estimates, leading to potentially dramatic misinterpretation as no identification is provided by immunoanalysis. As shown in this case, analysis of a given sample by two immunoassay kits, one specific to HI and another interfering with analogs, may suggest administration of analogs if results are significantly different.

Another pitfall of immunoassays is the presence, in some sera, of heterophilic antibodies (common to all immunoassays; Boscato and Stuart 1988; Marks and Wark 2013), anti-insulin antibodies (specific to insulin assay) (Kim et al. 2011) and the link to plasma protein (such as albumin for detemir and degludec insulins). Without pretreatment of the serum sample, immunoassays determine the concentration of immunoreactive insulin (or direct insulin) (Sapin 2002; Kim et al. 2011). This concentration corresponds neither to the free nor to the total insulin level but to the sum of free and bound insulin for which the sites targeted by immunoassay antibodies are still free despite the link to proteins or antibodies. The result is thus dependent on the immunoassay kit used and

the nature of the antibodies developed by the patient. Free insulin can be measured by using, for example, precipitation with polyethylene glycol (PEG) (Chevenne et al. 1999; Sapin 2002). To obtain total insulin, preprocessing with acidic solution then PEG precipitation and neutralization is recommended (Kim et al. 2011).

Quantification of insulin by immunoassay can also be compromised by sample quality: too lipemic, icteric, proteomic, or hemolyzed serum. Most manufacturers advise against analysis on hemolysis samples, due to imprecise impact on insulin results (Cook et al. 2010; Garinet et al. 2014). Hemolysis induces degradation of HI, and immunoassays can display variable cross-reactivity to the insulin degradation product. In "sandwich" assay, as recognition of two epitopic sites is required, both sites may not be available after degradation, usually leading to underestimation of concentration (Chevenne et al. 1999). Surprisingly, Skowronek et al. (2018) observed an increase in insulin concentration in hemolyzed serum. In competitive assay, the result may be underestimated, if antibodies do not match the degradation products, or overestimated if the labeled-insulin (I^{125}) is also degraded and its fragment is recognized and falsely quantified (Sapin et al. 1997). The use of immunoassays in postmortem samples is even more restricted. Blood collected at autopsy is frequently hemolyzed, degraded or putrefied. Quantification on alternative matrices used for in postmortem toxicology, such as VH, bile, or tissue homogenates, has not been validated by kit manufacturers (Palmiere et al. 2015), and must be interpreted with caution.

Another risk, essentially concerning noncompetitive assay, is the Hook effect. "Sandwich" assays are designed so that the labeled antibody concentration is largely in excess of that of antigens, in physiologic and pathologic conditions. However, in overdose situations, antigen concentration can exceed that of the labeled antibody, this saturation prevents formation of the sandwich, resulting in an underestimated result. This error can be avoided by comparing results for a given sample when pure and diluted (Sapin 2008).

In conclusion, immunoassay cannot identify the compounds interacting with the antibodies (HI, endogenous compound close to insulin, therapeutic analog, metabolite, or degradation product). Exact quantification may be compromised by sample quality, interference and Hook effect. Thus, forensic applications for immunoassay are limited. Confirmation analysis to provide identification is advised. If this is not available, double analysis with two immunoassay kits with different cross-reaction profiles and systematic dilution of the sample can allow us to avoid the main pitfalls. Knowledge of immunoanalysis limits is critical to ensure a pertinent interpretation of the result.

3.3. Mass spectrometric analysis

For several years, mass spectrometric detection was used for HI and analogs identification and quantification in biological matrices. Unlike many proteins, insulin does not precipitate with organic solvents such as acetonitrile or methanol. Thus, both of these are an inexpensive and easy means to

eliminate some interfering proteins while keeping the insulin in solution. Moreover, this addition of organic solvent breaks down any insulin–anti-insulin–antibody present in the sample, enabling total insulin analysis (Chen et al. 2013). In most analytical procedures, an extraction step is added, such as solid phase extraction (SPE) (Darby et al. 2001; Kuuranne et al. 2008; Thomas et al. 2009; Chambers et al. 2013; Chen et al. 2013; Chambers et al. 2014), immunoaffinity chromatography (IAC) (Thevis et al. 2006; Thomas et al. 2007; Thevis et al. 2008; Legg et al. 2019), magnetic bead extraction (Thomas et al. 2009; Hess et al. 2012, 2013; Thevis et al. 2012; Ojanpera et al. 2013; Taylor et al. 2016) or immunoenrichment using disposable automated research tips (DARTsTM). Mass SpecImmuno Assay (MSIATM), which is based on DARTsTM technology and composed with a specific sorbent for insulins purification, was used in several studies (Oran et al. 2011; Peterman et al. 2014; Nedelkov et al. 2018). Combining immunopurification with mass spectrometric detection constitutes a hybrid bioassay or a hybrid mass spectrometry assay (Blackburn 2013). Several extraction steps can be combined: SPE plus magnetic bead extraction (Thomas et al. 2009), two SPE procedures plus IAC (Thomas et al. 2007), etc. The combination of several protein precipitation and extraction steps enhances sample purification and sensitivity, but significantly increases the cost of the analysis and is time-consuming.

Concerning detection, different technologies have been described: LC with simple mass analyzer (LC-MS) (Darby et al. 2001) or with tandem mass analyzer (LC-MS/MS) (Thevis et al. 2008; Hess et al. 2012, 2013; Chambers, et al. 2014; Sunderland et al. 2016; Legg et al. 2019), and more recently nanoliquid-chromatography (nanoLC) (Thevis et al. 2012; Ojanpera et al. 2013; Thomas et al. 2015) and high-resolution accurate mass spectrometry (HRMS) based on an orbitrap or time-of-flight detector (Thomas et al. 2009; Oran et al. 2011; Ojanpera et al. 2013; Peterman et al. 2014; Wunder et al. 2014; Thomas et al. 2015; Nedelkov et al. 2018). Using mass spectrometry detection, HI and most analogs can be easily identified by their *m/z* ratio, even with simple MS analyzers. As Lispro and HI differ only by the inversion of two amino acids, they display the same accurate mass and can only be distinguished by their ion product mass spectra obtained with tandem spectral analyzers: *m/z* ion 226 that represents the fragment B(y3-y1) for HI and *m/z* ion 217 that represents the fragment B(y2) for Lispro. For more details see publication explaining the principle of abc's (xyz's) of peptide sequencing (Steen and Mann 2004), publication on specific fragmentation of insulins (Thevis et al. 2008) and recent review on advances in the determination of insulins (Thomas and Thevis 2019). Some authors use simultaneous acquisition of full-scan high-resolution and ion fragmentation to identify insulins and their degradation products and metabolites, such as DesB30 HI, DesB24-30 HI, and M1, especially in urine (Thomas et al. 2007; Thevis et al. 2008). With adequate sample preparation, mass spectrometry can be performed regardless of the matrix, such as Hess's method (Hess et al. 2013), which allows detection of Lispro in VH, injection site, muscle, and kidney, even at weak concentrations. This is of great interest in postmortem toxicology, as blood samples are not

always available, analyzable or non-hemolyzed and as a consequence other matrices are collected to investigate the cause of death. In conclusion, mass spectrometry analysis, unlike immunoassay, allows identification of the analyte by distinguishing HI, analogs, metabolites, and degradation products, and accurate quantification in a wide range of biological matrices. It is, thus, an adapted technology for insulin analysis in clinical cases of unexplained hypoglycemic coma and in forensic cases, and a valuable proof in medicolegal investigation of death related to insulin overdose.

3.4. Limits of detection

Improved sensitivity is required to detect traces of insulins in case of degradation or metabolism and in some alternative matrices where concentrations are known to be low, such as VH or urine (Thomas et al. 2009; Ojanpera et al. 2013). Table 2 reports some limits of detection (LOD) encountered in the literature for HI determination depending on the matrix, sample preparation and detection method (immunoassay or mass spectrometry). Immunoassays were traditionally seen as more sensitive than MS based assays, but the advent of highly sensitive new generation mass spectrometers, combined in hybrid techniques with specific immunoaffinity extractions, such as MSIATM, means this difference is considerably reduced. LOD is also dependent on the sample volume available: up to 5 ml was required in some studies, but volumes ranging from 0.1 ml to 1 ml are more common in forensic contexts.

4. Forensic aspect of insulin intoxication

4.1. Mechanism of insulin intoxication

The main mechanism of insulin intoxication is hypoglycemia, leading to neurological findings. Hypoglycemia is generally defined as blood glucose <0.6 g/L (3.33 mmol/L) (Fletcher 1983) but symptoms usually occur around 0.4 g/L (2.22 mmol/L) and coma below 0.1 g/L (0.55 mmol/L) (Baud et al. 2006). Symptoms are divided into two categories. The primary symptoms are linked to parasympathetic hyperactivity, causing sweating, tremor, tachycardia, anxiety, and hunger. Neuroglycopenia induces neurological manifestations such as confusion, dizziness, headache, clouding of vision, loss of fine motor skills and speech impairment, convulsion, and loss of consciousness (Baud et al. 2006; Marks 2010). These symptoms can be associated with behavioral change, such as irritability, irrational anger and aggressiveness (Marks 2010). Finally, encephalopathy develops, with hypertonic coma, characterized by a pupillary dilatation and low reactivity, paleness, and deep breathing. If hypoglycemia persists, death or neurological sequela can ensue (Baud et al. 2006). Delayed initiation of treatment is a significant factor influencing outcome (Mégarbane et al. 2007). Some atypical forms of insulin intoxication have been described: aggravation of a psychiatric condition, pulmonary edema and myocardial infarction (Baud et al. 2006). Factors decreasing glycemia potentiate insulin toxicity: association with alcohol or with drugs with hypoglycemic effects, inadequate or delayed food ingestion, sudden

Table 2. Non-exhaustive list of various insulin LODs encountered in the literature according to matrix, sample preparation and analysis technique.

Analysis	Matrix (μL)	Sample preparation	LOD ^a	Year of publication	References
Chemiluminescence enzyme immunoassay	VH (50)	NP	0.2 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2015	Palmiere et al. (2015)
Radioimmunoassay	VH (No data)	NP	0.5 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2013	Nowicka et al. (2013)
Radioimmunoassay	Plasma (990)	NP	3.46 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2018	Dong et al. (2018)
LC-MS	Plasma (5000)	SPE	23.05 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2001	Darby et al. (2001)
LC-MS/MS	Serum (500)	IAC	1–2 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2016	Van Der Gugten et al. (2016)
LC-MS/MS	Plasma (150)	Protein precipitation – SPE	1.8 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2013	Chen et al. (2013)
LC-MS/MS	VH (1000)	Protein precipitation – magnetic beads	4.5 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2013	Hess et al. (2013)
LC-HRMS	Plasma (500)	Immunoenrichment	2.16 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2014	Peterman et al. (2014)
NanoLC-HRMS	Urine (5000)	SPE – magnetic beads	0.072 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2009	Thomas et al. (2009)
NanoLC-HRMS	VH (100)	Protein precipitation – magnetic beads	1.44 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2013	Ojanpera et al. (2013)
MALDI-TOF-MS	Plasma (500)	Immunoenrichment	0.216 $\mu\text{U}/\text{mL}$	2011	Oran et al. (2011)

^aUnits converted in $\mu\text{U}/\text{mL}$; HRMS: high-resolution mass spectrometry; IAC: immunoaffinity chromatography; NP: No Pretreatment; SPE: solid-phase extraction; VH: vitreous humor. To convert from $\mu\text{U}/\text{mL}$ to ng/mL, divide the value by 28.5. To convert from $\mu\text{U}/\text{mL}$ to pmol/L (pM), multiply the value by 6.

or sustained exercise, etc. (Critchley et al. 1984; Batalis and Prahlow 2004; Wong et al. 2006; Murad et al. 2009).

4.2. Blood

4.2.1. Physiological HI concentration in healthy subjects

HI is secreted by the pancreas at a low basal rate and in larger amounts in response to increased blood glucose level. Reference values of endogenous HI in healthy subjects are, thus, difficult to define, and should be based on corresponding glucose levels (Musshoff et al. 2011). In clinical practice, insulinemia is generally assessed after overnight fasting. Even so, significant intra-individual variation is observed, partly due to the pulsations of constitutive endogenous HI secretion (Widjaja et al. 1999; Magnan and Ktorza 2005). Physiological variation in HI secretion is also observed according to age: children usually have lower plasma endogenous HI levels than adults, reflecting higher sensitivity to insulin (Chevenne et al. 1999). Reference values are also variable according to the method of determination, especially in immunoassays, for which the normal values indicated by the manufacturer must be considered (see Analytical aspects section). Overall, in healthy fasted subjects, endogenous HI serum concentration ranges from 2 to 35 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (Bowsher and Nowatzke 2011).

HI concentration secondary to food or beverage intake obviously varies greatly and is not only a function of the resulting blood glucose level (Holt et al. 1997). Several studies in healthy subjects after ingestion of various measured food intakes showed that endogenous HI plasma peak concentration was below 200 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (Fletcher 1983; Darby et al. 2001; Iwase et al. 2001; Hess et al. 2013; Crofts et al. 2016). Concentrations return to fasting range within 3–4 h (Fletcher 1983; Darby et al. 2001; Crofts et al. 2016); thus, the interval between intake and HI measurement is an important parameter to consider when interpreting insulinemia.

4.2.2. Pathological increase in HI concentration

To interpret elevated insulinemia in a forensic context, it is useful to be aware of pathological conditions entailing hyperinsulinism. Three clinical situations can be distinguished.

First, conditions associated to insulin resistance are linked to a compensatory hyperinsulinemia (Kim and Reaven 2008),

except if beta-cell secretory capacity is impaired. Insulin resistance consists in a decreased ability of a given quantity of HI to increase glucose uptake and utilization (Lebovitz 2001); thus, endogenous HI secretion increases, to maintain glucose homeostasis. Secondarily, hyperinsulinemia can cause beta-cell exhaustion and increase the risk of diabetes (Fujita et al. 2017). Kim et al. demonstrated that insulin response was multiplied almost 4-fold between subjects most sensitive and resistant to insulin (Kim and Reaven 2008). In the same study, mean fasting endogenous HI level was 49 pmol/mL (7.06 $\mu\text{U}/\text{mL}$) in the most insulin-sensitive individuals and 118 pmol/mL (16.99 $\mu\text{U}/\text{mL}$) in the most resistant. Insulin resistance can be associated with insulin receptor gene mutations (Fujita et al. 2017), in type-2 diabetes (Guillausseau et al. 2008), some obese individuals (Borissova et al. 2004), insulin resistance syndrome (also called metabolic syndrome) (Reaven 2003), and various endocrinopathies, as some hormones are antagonistic to insulin (Rogowicz-Frontczak et al. 2017).

Second, diseases associated with unregulated HI secretion can cause more or less severe hypoglycemia. Kapoor et al. and Service reviewed the known causes of hyperinsulinemic hypoglycemia in the neonatal and infancy period (Kapoor et al. 2009) and in adults (Service 2004), respectively. Hyperinsulinism can be one of the symptoms in a large range of pathologies and syndromes, such as congenital metabolic disorders, developmental syndromes and severe renal or hepatic failure (Chevenne et al. 1999; Kapoor et al. 2009). Endogenous hyperinsulinism can also occur in apparently healthy subjects, who may experience recurrent hypoglycemic episodes, either fasting or postprandial (Service 2004). The most common origin in adults is insulinoma, which is a pancreatic beta-cell tumor characterized by autonomous secretion of HI and/or proinsulin. Another cause is sporadic or familial congenital hyperinsulinism and its equivalent in adults, known as non-insulinoma pancreatogenous hypoglycemia syndrome, corresponding to beta-islet dysplasia (Kapoor et al. 2009). Despite the name referring to hyperinsulinemia, an absolute elevated insulinemia is rarely observed; and it mostly corresponds to an HI secretion inappropriate to blood glucose level (Marks and Teale 1993; De Leon and Stanley 2013). As emphasized by De León et al., during hypoglycemia, any detectable level of HI can be considered

abnormal (De Leon and Stanley 2013). In clinical practice, a $\geq 3 \mu\text{U/mL}$ threshold of insulinemia associated to venous glycemia $<0.45 \text{ g/L}$ (2.5 mmol/L) is recommended for diagnosis of insulin-secreting tumor (Agin et al. 2013). Hyperinsulinism can also have an autoimmune origin. Insulin Autoimmune Syndrome (IAS) is a rare cause of hypoglycemia, characterized by the presence of insulin autoantibodies in individuals who had not received exogenous insulin. IAS shows the highest HI level, but it is a rare and transient condition, mainly encountered in Japanese subjects with history of autoimmune disease or of exposure to certain infections or drugs (Ismail 2016). Total insulin serum concentration is generally above 1000 pmol/L ($143 \mu\text{U/mL}$), whereas free insulin levels may be normal or elevated (Wong et al. 2014). Concerning the maximal insulin level that can be induced by insulin-secreting tumors, data are scarce. Woo et al., in 74 cases of characterized insulinoma, reported that plasma HI concentrations during hypoglycemia ranged from 2.3 to $155 \mu\text{U/mL}$ for an average of $14.5 \mu\text{U/mL}$ (Woo et al. 2015). Jenkins et al. reported one case of fatality, where insulinoma was found at autopsy and HI level was $460 \mu\text{U/mL}$ in postmortem femoral blood (Jenkins et al. 1982). Various authors emphasized that such HI levels are rarely seen in insulinoma (Redmon and Nuttall 1999; Wong et al. 2014; Woo et al. 2015).

Third, insulin level can be increased not by the pathology itself, but by the treatment. This is the case for some non-diabetic drugs (e.g. cibenzoline, quinine), which able to increase endogenous HI secretion and exert adverse hypoglycemic effects, either alone or in association to certain drugs or pathological conditions (Binder and Bendtsen 1992; Virally and Guillausseau 1999). Concerning oral antidiabetics, only some classes are known to be insulin secretagogues: the glinides and sulfonylureas act directly at the level of beta-cells, whereas the most recent molecules, glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, have an indirect effect on HI secretion (Yun et al. 2006; Hess et al. 2011b; Ruscica et al. 2017). Stimulation of endogenous HI secretion induced by secretagogues at therapeutic level helps in counterbalancing diminution of insulin sensitivity or secretion in type-2 diabetes, but does not substantially increase circulating HI levels in absolute terms (Yun et al. 2006; Hess et al. 2012). In case of intoxication by hypoglycemic compounds, HI levels are greater than expected in a hypoglycemic setting. DeWitt et al. (2007), in a review of the literature concerning 97 insulin measurements in 76 cases of sulfonylurea-induced hypoglycemia, found that insulin level was generally higher than $3.9 \mu\text{U/mL}$ during hypoglycemic episodes. Blood insulin concentrations rose to $102 \mu\text{U/mL}$, except in one case in which the level was $1,115 \mu\text{U/mL}$. However, this concentration was measured after administration of glucagon, which is known to stimulate HI release. Hypoglycemia induced by oral antidiabetics can be demonstrated by targeted drug screening in biological samples (Cazabat and Chanson 2009). In type-1 and some forms of type-2 diabetes, endogenous HI secretion deficiency is compensated by exogenous insulin therapy; blood insulin level then depends especially on dose, administration route, injection site, and type of insulin (rapid, intermediate or

long-acting). Table 1 shows some concentrations that can be observed after therapeutic administration. It is important to underline that the new analogs Detemir and Degludec are associated with high blood concentration after therapeutic administration, as they are mostly reversibly bound to serum albumin to prolong their time of action (Monnier et al. 2013).

If the insulin prescribed is not known or not identified by analysis, serum values can be falsely interpreted as overdose (Marks 2015). In clinical practice, some authors advocate considering factitious hypoglycemia (administration of exogenous insulin or drugs that stimulate insulin secretion) when insulin is higher than $100\text{--}200 \mu\text{U/mL}$ during hypoglycemia, as such concentrations are only rarely observed in pathological contexts (Redmon and Nuttall 1999; De Leon and Stanley 2013). Diabetic status must also be considered when interpreting blood concentration, both ante- and postmortem. Qualitatively, presence of insulin analogs is to be expected only in diabetic patients. Quantitatively, therapeutic administration must be distinguished from overdose. This distinction can be hard to achieve, especially as insulin toxicity differs in diabetic subjects, as some regulatory mechanisms may be altered (downregulation of insulin receptor, post-receptor abnormalities, anti-insulin antibodies, etc.) (Mégarbane et al. 2007). Moreover, diabetic patients presenting anti-insulin antibodies or insulin resistance may need a higher therapeutic dose to achieve efficient control of their glycemia, as only the free insulin is active. Direct insulin measurement must then be interpreted with caution (Sapin 2002).

In conclusion, increased insulinemia is found in a wide variety of pathologies, but few induce a significant or absolute increase that can be mistaken for exogenous administration.

4.2.3. Limitations of postmortem blood insulin determination

The challenge of insulin analysis in postmortem whole blood can be well illustrated by the study of Hess et al. (2012). Femoral blood of 20 subjects was collected at autopsy (no indication as cause of death or diabetic status was available) and stored in exemplary conditions until analysis: addition of an insulinase-inhibitor (diamide, at 1 mmol/L), centrifugation after collection, and freezing at -20°C . Analysis was performed with a validated LC-MS/MS method after immunoaffinity purification, which exhibited an LOD of $1 \mu\text{U/mL}$ for HI, far below the normal fasting range in live patients. This procedure was successfully applied to detect HI both in clinical samples and in HI-spiked postmortem whole blood samples. However, no HI was detected in the 20 real forensic samples and the authors postulated total insulin degradation during the time between death and autopsy (more than 48 h). Whole blood collected postmortem is often said to be not very useful, either for establishing exogenous insulin administration or for interpreting its role in the cause of death. However, in postmortem investigations, blood is still the most common matrix to be collected and to undergo toxicological evaluation. Understanding the limitations of blood as

a matrix is essential for interpreting insulin level with due caution.

The major bias in postmortem blood insulin measurement is related to rapid decomposition after death: clotting, hemolysis and putrefaction (Palmiere et al. 2015; Labay et al. 2016). As underlined in the analytical section, hemolysis plays a major role in insulins degradation. Insulin loss can occur both *in corpore* during the postmortem interval (PMI) (Hess et al. 2012) and *in vitro* after sample collection (Wunder et al. 2014). The influence of the latter can be reduced by respecting some preanalytical considerations: separation of serum by centrifugation quickly after collection, early analysis, and immediate storage (at least refrigerated, and ideally frozen) (Sunderland et al. 2016). However, in forensic practice, these practices are not systematically applied and the involvement of insulin is not always suspected at the outset of investigation. Even if it is, adequate non-hemolyzed serum may be difficult to obtain due to postmortem changes (Palmiere et al. 2015). Insulin degradation *in corpore* has been shown to occur in the first hours after death. For example, Uezono et al. (2002) reported a case of infanticide by malicious administration of synthetic HI. HI was measured by enzyme-immunoassay in postmortem blood, at 694 µU/mL when death was pronounced at admission to hospital and at 295 µU/mL at autopsy performed 11h30 later. Kumar et al. (Kumar and Verma 2016) measured endogenous HI in 22 traumatic deaths with no history of disease, for which the exact time of death was known; PMI was between 4 and 27 h. They demonstrate that the decrease in HI level significantly correlated with PMI, falling below the limit of detection (0.2 µU/mL) by 27 h. Consequently, postmortem blood insulin concentrations do not correspond to the level at time of death. Time between death and sample collection, sample quality, in particular hemolysis, and storage conditions must be taken into account to suspect a possible degradation of insulin. Secondarily to postmortem decomposition, insulin blood concentrations theoretically decrease, however, some immunoassays can show erroneously elevated measurements (Sapin et al. 1997; Skowronek et al. 2018).

Postmortem redistribution (PMR) has also been suspected to contribute to the unreliability of postmortem HI measurement. In the early 1970s, Lindquist et al. (Lindquist and Rammer 1975), in 29 cases of sudden death not related to administration of insulin, observed a 10-fold difference in concentration between femoral blood (FB) (mean, 23 µU/mL) and right cardiac blood (CB) (mean, 222 µg/mL) concentration. Diffusion of endogenous HI from the pancreas through the portal vein to the CB was hypothesized. Since then, several authors advocated using FB when insulin analysis is required (Fletcher 1983; Marks and Wark 2013; Palmiere et al. 2015). In contrast, Marks et al. (Marks 1995) found equivalent endogenous HI levels in blood collected from the femoral vein and right and left ventricle in four cases of death unrelated to insulin. To the best of our knowledge, no evaluation of PMR in case of exogenous administration of HI or analogs has been undertaken.

At time of death, blood insulin concentration depends greatly on time since injection. Except in some sporadic atypical forms (Junge et al. 2000) or in rare cases of lethal

accident secondary to hypoglycemic loss of consciousness, with short agony (Kernbach-Wighton and Puschel 1998), death induced by acute insulin poisoning occurs hours after intake. Marks et al. (Marks 2009) reported that it takes at least 20 min to develop hypoglycemic coma after subcutaneous injection and that irreversible cerebral damage seldom occurs in less than 3 h of coma, and generally after 6 h or more. During this interval, metabolism of insulin takes place, although elimination of exogenous insulin, especially in overdose, takes much longer than for endogenous insulin. Mégarbane et al. (2007) observed half-lives ranging between 0.8 and 11.7 h in a pharmacokinetic study on 6 patients admitted to hospital following exogenous insulin administration. The kinetics of exogenous insulin also plays an important role in blood insulin level and onset and duration of hypoglycemia (Baud et al. 2006; Mégarbane et al. 2007). Rapid-acting analogs feature a rapid high peak of plasma concentration that can speed up the onset of symptoms of hypoglycemia. On the contrary, intermediate and long-acting insulin is characterized by a lower plasma peak and long elimination half-life, which can delay and prolong hypoglycemia. Obviously, dose and administration route (IV, SC, or accidental intramuscular) affect blood concentration. Absorption is faster when insulin is injected into muscle (Fletcher et al. 1979). On SC route, overdose may be associated with a deposition effect: i.e. compression by the large injected volume that reduces local blood flow and delays absorption (Mégarbane et al. 2007). Finally, when victims are managed in hospital after insulin administration, time of survival in coma or vegetative state can be days (Sturner and Putnam 1972) or even months (Koskinen et al. 1999). Thus, postmortem insulin determination in blood may no longer be informative, and analysis of samples collected at admission or during hospital stay is advised, if stored under good conditions (Patel 1992; Koskinen et al. 1999).

4.2.4. Postmortem blood insulin concentrations

To help in interpreting HI results, postmortem blood concentrations have been determined in deaths unrelated to insulin intoxication. In all studies, preanalytical precautions specific to insulin assay were complied. The only study using mass spectrometry failed to detect intact HI, but autopsy was undertaken more than 48 h after death (Hess et al. 2012). In contrast, immunoanalysis allowed measurement of HI in postmortem serum, but without identification of the exact reactive form. In non-diabetic controls, HI concentration was assessed, depending on the study, at a mean 23 µU/mL ($n=29$; range, 5–60 µU/mL; PMI 39–144 h) (Lindquist and Rammer 1975), 8.1 µU/mL ($n=18$; range, 2.5–25 µU/mL; PMI 4–30 h) (Iwase et al. 2001), and 2.4 µU/mL ($n=20$; PMI 12–20 h) (Palmiere et al. 2015). These values are lower than expected from physiological values in live patients in various fasting states, indicating a postmortem decrease in HI level. In insulin-treated diabetics, mean postmortem insulin was 26 µU/mL ($n=20$; PMI 12–20 h) (Palmiere et al. 2015) and 71 µU/mL ($n=9$; range, <10–240 µU/mL; PMI 4–10 days) (Ojanpera et al. 2013). Insulin levels were higher than in the



non-diabetic population due to administration of HI or analogs.

Data are scarce for postmortem values in case of fatal insulin overdose. Kernbach-Wighton et al. (Kernbach-Wighton and Puschel 1998) studied postmortem findings in 12 cases of lethal hypoglycemia secondary to HI injection. PMI ranged from 1 day to 6 weeks, and putrefaction was evident in 4 cases. HI levels were determined by RIA at a mean 49 µU/mL (range, 1–155 µU/mL) and were, according to the authors, massively increased in 8 of the 12 deceased. However, the range in this study covered the physiological range in live patients fasting and not fasting. The results underlined the difficulty of interpreting postmortem blood insulin concentration alone.

Table 3 reports 31 fatal cases involving insulin administration and reporting postmortem determination of insulin in blood and/or alternative matrices. Diabetes status and age at death, analytical method, cause and manner of death, circumstances of administration, and insulin species were detailed. In the majority of cases, the victim was found dead ($n=23$) or death was pronounced at admission to hospital ($n=4$); four subjects were treated in hospital, and death occurred between 1 and 9 days after insulin administration (case nos. 1, 4, 5, and 21). Blood insulin levels were assayed in almost all cases ($n=24$); blood was not analyzed in 1 case (no. 13) due to hemolysis; measurement in alternative matrices (injection site and VH) was preferred in seven cases (nos. 3, 4, 13, 21, 29, 30, and 31). Postmortem blood insulin was mostly measured by various immunoassays. Thus, results are poorly comparable. Mass spectrometric detection on postmortem blood was performed in only two cases (nos. 22 and 24), both in self-administered intoxication with rapid acting analogs. Aspart insulin was quantified at 4000 µU/mL in postmortem serum (Sunderland et al. 2016). Lispro insulin was not detected in FB or CB despite being detected in other matrices (Hess et al. 2013). In a case of murder by insulin (no. 21) (Thevis et al. 2012), HI was quantified by mass spectrometry in antemortem serum available before and after onset of hypoglycemia, at levels ranging from 0.2 to 3.5 ng/mL (5.8–101 µU/mL). During hypoglycemia, serum concentration was assessed, only by RIA, at 5551 µU/mL; and HI was assessed postmortem only in VH, as death occurred after 4 days of coma. Concerning all the cases in Table 3, postmortem blood insulin levels ranged from 0.2 to 18,015 µU/mL, with a median of 338 µU/mL. Postmortem blood concentrations of insulins are included over a wide range. Indeed, they were higher than 1000 µU/mL in eight cases, between 200 and 1000 µU/mL in five cases, between 5 and 200 µU/mL in six cases and below 5 µU/mL in five cases. This review of published cases well illustrates the wide range of postmortem blood insulin levels associated with exogenous administration of insulin with fatal outcome. Interpretation of insulin results is, thus, only contributive in the light of anamnesis, investigation data, analytical process, and sample quality.

4.3. Alternative matrices

In 1954, Elgee et al. studied the distribution of iodine-131labelled insulin in more than 20 tissues in rat and humans (Elgee et al. 1954), and found radioactivity in almost all

tissues, which opened up a large area of investigation. In case of suspected insulin overdose in postmortem cases, identification and quantification of insulin may be of interest in other matrices than blood as degradation of the protein occurred quickly after death. Various alternative matrices including liver, kidney, muscle, adipose tissue, brain, urine, bile, VH, and injection sites have already been suggested for the quantification of insulin. In this section, we focus on these specific matrices. Studies in humans as well as in animals are reported. The analytical approach is specified to distinguish data obtained from immunoanalysis, with potential cross-reaction, and a more selective analysis based on mass spectrometry. For each matrix, the concerned case reports from Table 3 are listed. The pancreas is not mentioned as an alternative matrix, since it undergoes rapid autolysis (Kernbach-Wighton and Puschel 1998) and is the site of HI synthesis and storage.

4.3.1. Liver

After secretion by the pancreas, HI is first transported up to the liver via the hepatic portal vein, where it undergoes a significant first-pass metabolism: approximately 50% of secreted HI is removed by the liver (Duckworth et al. 1998). The liver was described as being the major site of insulin clearance (Duckworth and Kitabchi 1981). To the best of our knowledge, neither formal insulin identification nor quantification by immunoanalysis had been reported in the liver. However, HI distribution studies have been performed, using radiolabeled insulin, *in vivo* (Hachiya et al. 1987) and in animals (Elgee et al. 1954; Thompson et al. 1991). Hachiya et al. reported that the liver was the organ presenting the second highest radioactive insulin concentration after the kidneys. In 1993, Hovorka et al. (1993) studied a five-compartment model of HI kinetics, in which 80% of the total HI in the body was bound to liver receptors. Thus, liver samples seem to be interesting. In Table 3, case nos. 2 and 22 report insulin analyses in liver, but neither HI nor Lispro was detected.

4.3.2. Bile

Bile is secreted by hepatocytes, which are insulin-sensitive cells able to capture and degrade HI. HI has been detected in bile by RIA (Sturmer and Putnam 1972; Zingg et al. 1987) and chemiluminescence enzyme immunoassay (Palmière et al. 2015) but not using spectrometric techniques. In 1987, Zingg et al. (1987), in a rat model, observed that bile HI concentration increased after glucose administration. The increase was less than in plasma, and HI concentrations remained lower in bile than in plasma. In humans, Palmière et al., using RIA (Palmière et al. 2015), also observed that HI concentrations in bile were lower than in serum, whether death was related or not related with insulin. In 1972, Sturmer et al. (Sturmer and Putnam 1972) studied HI in bile samples collected from 20 deceased persons, whose death was not related to insulin, and from a man, who was hospitalized after self-injection of HI. HI was detected by RIA in 16 of the 20 bile samples, even in putrefied samples, with concentrations ranging from 6.5 to 487.5 µU/mL. Postmortem serum and bile concentrations

Table 3. Fatal case reports involving insulin and reporting insulin concentrations in various matrices and analysis techniques.

No. publication	Year of publication	Diabetes status	Age (years)	Insulin species	Analysis technique	Cause of death (Manner)	Insulin concentrations in blood	Insulin concentrations in alternative matrices	Circumstances	References
1 1972	Non-diabetic	32	HI (regular and mixed with Zinc)	RIA	Insulin intoxication (suicide)	AM Serum (at admission, about 9h after injection); on average 1900 µU/mL PM serum (about 9 days after injection); 42.5 µU/mL PM CB serum: 714 µU/mL	Bile: 768 µU/mL 0.91 to 744 µU/g	Died in hospital Interval injection/ death: 9 days (coma) PM: 5 h Alleged insulin dose: 9 × 800 Units	Stuner and Putnam (1972) Dickson et al. (1977)	
2 1977	Diabetic	37	HI (mixed with Zinc)	RIA (after extraction for tissue)	Insulin intoxication (suicide)	PM CB serum: 714 µU/mL	Brain: ND Kidney: ND Liver: ND Injection sites (dermis + fat + muscle, n = 3); 11,600 to 17,000 µU/g	Found dead	Fletcher et al. (1979)	
3 1979	Diabetic	NS	Not specified	RIA (after extraction)	Insulin intoxication (suicide)	–	Control tissue: 193 µU/g Injection sites (dermis + fat + muscle): Recent (n = 2): 334 and 916 µU/g Previous (n = 3): 20–93 µU/g	Died in hospital Interval Medical management/death: 1 day	Fletcher et al. (1979)	
4 1979	Non-diabetic, addicted to insulin	NS	Not specified	RIA (after extraction)	Insulin intoxication (accidental)	–	Control tissue (n = 1): 10 µU/g Injection sites (n = 2): 0.17–1.02 µU/g Pancreas 0.75–0.95 µU/g	Died in hospital Interval injection/death: 26 h PM: 71 h Alleged insulin dose 1080 UI Dead at hospital admission	Stofer (1970)	
5 1983	Diabetic	50	Not specified	Not specified	Not specified	PM serum Free 1600–1800 µU/mL Bound 1000–1100 µU/mL	Injection site: presence of insulin by immunohistochemical assay –	Interval injection/death: 26 h PM: 71 h Alleged insulin dose 1080 UI Dead at hospital admission	Hood et al. (1986)	
6 1986	Non-diabetic	5 months	Not specified	RIA	Insulin intoxication (murder)	PM CB Serum: 1400 µU/mL PM iliac venous blood: Free 1200 µU/mL Total 1257 µU/mL	Injection site: 113 mU AT in injection site: 13.1 mU/g AT at control site: 1.1 mU/g	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Patel (1992)	
7 1992	Non-diabetic	NS	Not specified	RIA	Insulin intoxication (suicide)	PM CB Serum: 382 µU/mL PM CB Serum: 120 µU/mL	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Logemann et al. (1993) Beastall et al. (1995)	
8 1993	Non-diabetic	51	HI	RIA	Insulin intoxication (suicide)	PM plasma: 72440 pmol/L (10,431 µU/mL)	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Kernbach-Wighton and Puschel (1998)	
9 1995	Non-diabetic	33	Not specified	RIA	Insulin intoxication (suicide)	PM plasma: 72440 pmol/L (10,431 µU/mL)	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Junge et al. (2000)	
10 1995	Not specified	2 months	Not specified	Not specified	Intoxication by insulin and potassium (murder)	PM plasma: 72440 pmol/L (10,431 µU/mL)	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Marks (1995)	
11 1998	Non-diabetic	43	Old insulin Combined insulin	RIA	Insulin intoxication (suicide)	PM CB: 155 µU/mL PM FB: 78 µU/mL	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Kernbach-Wighton and Puschel (1998)	
12 2000	Non-diabetic	68	HI	Not specified	Lung embolism secondary to convulsions induced by insulin intoxication (suicide)	PM Serum: 1848.8 µU/mL	Liquor humor: 6.9 µU/mL Aqueous humor: 0.4 µU/mL VH: 31 µU/mL	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Winston (2000)	
13 2000	Case no. 3 Non-diabetic	24	Not specified	Not specified	Insulin intoxication (suicide)	Not analyzed (hemolysis)	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Winston (2000)	
14 2000	Case no. 4 Non-diabetic	44	HI/NPH (30:70)	Not specified	Insulin intoxication (suicide)	PM FB: 840 µU/mL	–	Interval sample collection/analysis: 21 days storage +4 °C Found dead Alleged insulin dose 300 UI Found dead Interval injection/discover: 14h PM: 18h for blood sample, 3 days for injection site sample Dead at hospital admission Plasma potassium 18.8 mmol/L	Winston (2000)	

(continued)

**Table 3.** Continued.

No. publication	Year of publication	Diabetes status	Age (years)	Insulin species	Analysis technique	Cause of death (Manner)	Insulin concentrations in blood	Insulin concentrations in alternative matrices	Circumstances	References
15 2001	Non-diabetic	25	Long-acting insulin	RIA	Air embolism due to injection of air into a vein after injection of insulin (murder)	PM CB Serum: 54 µU/mL	—	—	Found dead	Iwase et al. (2001)
16 2002	Non-diabetic	5	HI/NPH (40:60)	Enzyme immunoassay	Insulin intoxication (murder)	PM CB serum At admission: 694 µU/mL At autopsy: 295 µU/mL	—	Alleged insulin dose: 1200U Interval injection/death: 1h PMI 30h	Alleged insulin dose: 1200U Interval injection/death: 1h Dead at hospital admission	Uezono et al. (2002)
17 2007	Non-diabetic	43	Not specified	Not specified	Insulin intoxication (manslaughter)	PM Serum: 346 pmol/L (498 µU/mL) —	—	Interval injection/death: 6h30 Co-administration of glibenclamide Autopsy serum: 103 ng/mL	Interval injection/death: 6h30 Co-administration of glibenclamide Autopsy serum: 103 ng/mL	Marks and Richmond (2007), Marks (2009)
18 2007	Diabetic	69	Not specified	RIA	Insulin intoxication (murder)	PM serum : 11,500 pmol/L (1656 µU/mL)	Injection site: 309 pmol/kg (44.5 µU/g) Control tissue: 67 pmol/kg (9.65 µU/g)	Found dead	Interval injection/death: some hours	Marks and Richmond (2007)
19 2007	Non-diabetic	34	Not specified	RIA	Insulin intoxication (unknown manner)	PM blood: 125.175 pmol/L (18,015 µU/mL)	—	Found dead	Interval injection/death: 6–8 h	Marks and Richmond (2007)
20 2007	Non-diabetic	60	Not specified	RIA	Insulin intoxication (murder)	PM blood : 16–35 pmol/L (2.3–5.0 µU/mL) but hemolyzed	PM urine: 197–412 pmol/L (28.4–59.3 µU/mL)	Found dead	Interval injection/death: 6–8 h	Marks and Richmond (2007)
21 2012	Non-diabetic	55	HI	RIA	Insulin intoxication (murder)	AM Serum incidence: 5551 µU/mL – During hypoglycemia – 20 h before, 4 h and 8 h after hypoglycemia incidence:	WH: 1 ng/mL (28.8 µU/mL) 0.2 – 3.5 ng/mL (5.76 – 101 µU/mL) (serum during hypoglycemia incidence not available for re-analysis)	Died in hospital after 4 days of coma	Interval injection/death: 7h	Thevis et al. (2012)
22 2013	Case no. 2 Non-diabetic	62	Insulin analog (Lispro: rapid-acting)	MB-nanoLCMS/MS MB-UHPLC/HRMS	Insulin intoxication (suicide)	PM FB : ND PM CB: ND	WH: 103 µU/mL Injection site: 581 or 808 µU/g according to extraction method	Found dead	Hess et al. (2013)	
23 2015	Non-diabetic	68	HI	Chemiluminescence immunoassay	Insulin intoxication (suicide)	PM FB Serum: 582.5 µU/mL	Injection site: positive insulin staining immunohistochemical Kidney: 334 µU/g Brain: ND Myocardium: ND Lung: ND Liver: ND Stomach content: ND	Died outside hospital in presence of witnesses PMI: 18h	Palmiere et al. (2015)	

(continued)

**Table 3. Continued.**

No. publication	Year of publication	Diabetes status	Age (years)	Insulin species	Analysis technique	Cause of death (Manner)	Insulin concentrations in blood	Insulin concentrations in alternative matrices	Circumstances	References
24	2016	Diabetic	29	Insulin analog (Aspart: rapid-acting)	MB-LC-MS/MS Electrochemiluminescence immunassay Roche® Cobas c411	Insulin intoxication (suicide)	PM FB Serum: 4000 µU/mL PM FB Serum: 5.2 µU/mL PM FB Serum: 4741 µU/mL	—	Found dead	Sunderland et al. (2016)
25	2017	Not specified	27	HI (mixed with protamine and zinc)	Not specified	Insulin intoxication (murder)	PM Blood: 214 µU/mL	Injection sites Insulin positive luminescence immunoassay: case 2, 3, 4 Insulin positive immunofluorescence staining: Case 1, 2, 4	Found dead Alleged dose : 800 UI Survival interval <2h PMI : 15 days (frozen 12 days before autopsy)	Tong et al. (2017)
26	Not specified	27	HI	Not specified	Insulin intoxication (murder)	PM Blood: 0.2 µU/mL	PMI : 12 hours	Found dead Alleged dose: 400 UI Survival interval <10h		
27	Not specified	55	HI	Not specified	Insulin intoxication (murder)	PM Blood: 0.2 µU/mL	PMI : frozen 4 days before autopsy	Found dead Alleged dose : >1500 UI Survival interval <8 h PMI : frozen 4 days before autopsy		
28	Diabetic	86	Insulin Analog (Aspart: rapid-acting)	Not specified	Insulin intoxication (murder)	PM Blood: 2.5 µU/mL	PMI : 1200 UI	Found dead Alleged dose : 1200 UI Survival interval <6 h		
29	2018	Diabetic	NS	Not specified	IRMA	Suspected Insulin intoxication (accidental)	—	VH: 4.25 µU/mL	Found dead	Skowronek et al. (2018)
30	2012	Non-diabetic	NS	Not specified	IRMA	Insulin intoxication (suicide)	—	VH: 24.42 µU/mL	Found dead	Nowicka et al. (2013), Skowronek et al. (2018)
31	2019	Case no. 4	38	Insulin Analog (lispro: LC-MSMS rapid-acting)	—	Insulin intoxication (suicide)	—	VH: 2.0 ng/mL (57.6 µU/mL)	Found dead	Legg et al. (2019)

AM: antemortem; CB: cardiac blood; CSF: cerebrospinal fluid; FB: femoral blood; HI: human insulin; HRMS: high-resolution tandem mass spectrometry; IRMA: radiometric immunoassay; MB: magnetic beads; ND: not detected; NPH: Neutral Protamine Hagedorn; NS: not supplied; PF: pericardial fluid; PM: postmortem; PMI: postmortem interval; PPT: precipitation; RIA: radioimmunoassay; VH: vitreous humor. To convert from µU/ml to ng/ml, divide the value by 28.5. To convert from µU/ml to pmol/L (pM), multiply the value by 6.

from the man, who self-injected HI were, respectively, 42.5 µU/mL and 768 µU/mL. These results demonstrate that HI can be detected in bile. The development of analytical tools for identification would enable further study of the interest of this matrix. Like for xenobiotics, this matrix of elimination might be interesting from a qualitative point of view (Bévalot et al. 2016). Moreover, the case reported by Palmiere et al. and the related study suggest a quantitative interest, by demonstrating that in the case of intoxication, insulin concentration was higher than those of study (Palmiere et al. 2015). In Table 3, bile HI concentrations are reported in case nos. 1 and 23.

4.3.3. Kidney

After the liver, the kidneys are the second major site of HI clearance from systemic circulation (Hachiya et al. 1987; Duckworth et al. 1998). Two different mechanisms are involved: glomerular filtration, and proximal tubular reabsorption. Glomerular filtration of HI is performed by nonspecific diffusion and by specific receptor-mediated transport. Proximal tubular cells reabsorb 99% of HI, which leads to very limited excretion of intact HI in urine (Duckworth et al. 1998). Moreover, HI is degraded in the kidneys via mechanisms previously described, but with a prime role of lysosomes in degradation, resulting in smaller sequences of amino acids (Duckworth et al. 1998). HI was detected in HI-spiked kidney samples by RIA (Dickson et al. 1977) and Lispro was detected in real kidney sample by LC-MS/MS (Hess et al. 2013). Animal experiments and human postmortem observations seem to indicate that HI concentrations are more elevated in the renal cortex than in the medulla (Elgee et al. 1954; Rubenstein and Spitz 1968; Thompson et al. 1991), probably because there are fewer insulin-binding sites in the medulla than in the cortex (Thompson et al. 1991). The kidneys, and especially the cortex, may be an interesting alternative matrix for studies of intact insulin and, like the liver, for degradation products and metabolites. In Table 3, renal insulin concentrations are reported in case nos. 2 and 22.

4.3.4. Urine

Little intact HI reaches the urinary matrix, due to intense proximal tubular reabsorption by the kidneys. Given this low and highly variable elimination in urine in the intact form, particularly in case of kidney malfunction (Marks 2009), insulin is rarely determined in urine in postmortem toxicology. On the other hand, urine is a matrix of interest for insulins analyses in the doping field. Today, insulin analysis in urine can be performed by RIA, LC-MS/MS or LC-HRMS. The reached LODs are very low of the order of 0.03 µU/mL or less. For example, Thomas et al. (2009) proposed an analytical method which displayed an LOD of 0.5 fmol/mL (0.07 µU/mL) for HI. This LOD can be reached because a large volume of urine sample can be available (Thevis et al. 2006). Reported HI concentrations *in vivo* range from 0.05 to 2.50 ng/mL (1.44–72 µU/mL) for a healthy person, depending on fasting status (Thevis et al. 2006). Rapid-acting insulins, such as Lispro, Glulisine or Aspart, can be retrieved intact in urine

samples from treated patients, with concentrations comparable to those of HI (Thevis et al. 2006). In contrast, long-acting insulins are less excreted in urine in their intact form, because of longer exposure to metabolic processes in subcutaneous tissue and systemic circulation (Thomas et al. 2007). The resulting intact form concentrations are too low to be detectable with current techniques. As intact insulin is difficult to detect, some authors focused rather on metabolites as markers of HI or analogs (Thomas et al. 2007; Thevis et al. 2008). DesB30 HI is the major insulin metabolite found in urine from healthy subjects and from diabetic patients receiving synthetic HI (Thomas et al. 2015). Urine analysis may be useful to study HI and analogs metabolism or degradation (Marks 2009). In Table 3, urine insulin concentration is reported in case no. 20.

4.3.5. Injection site

In diabetes treatment, insulin is usually administered subcutaneously. The injection site, in the skin and subcutaneous fat down to the muscle, acts as a repository. In case of suspicion of fatal intoxication involving insulin, injection sites are looked for during corpse examination with a suitable technique (skinning). Some authors reported difficulties in finding these injection sites (Birkinshaw et al. 1958; Winston 2000) and in distinguishing fresh ones from old ones (Kernbach-Wighton and Puschel 1998). Putrefaction also considerably diminishes the chances of identifying injection sites (Kernbach-Wighton and Puschel 1998). Sampling consists in excision of the dermal area and subcutaneous tissue around the injection mark during autopsy. A contralateral sample, or at least a sample without injection mark, should be systematically collected as a control tissue providing a reference concentration. According to Birkinshaw et al. (1958), unequal distribution within subcutaneous adipose tissue from various body sites (injection sites/control sites) demonstrates exogenous administration of insulin, whereas a high but homogeneous insulin concentration in subcutaneous adipose tissue may be related to pancreatic tumor. Insulin analysis of injection sites can be conducted in four different ways: characterization by immunohistochemistry (Lutz et al. 1997; Hess et al. 2013; Palmiere et al. 2015), detection by RIA (Fletcher 1983; Beastall et al. 1995), LC coupled to scintillation counter (Berger et al. 1979), or formal identification by LC-HRMS (Hess et al. 2013). Because concentration at the injection site depends on many parameters (dose, type of insulin, absorption flow at the site, etc.), a positive injection-site sample in an insulin-treated diabetic patient does not allow any interpretation except to check correspondence with the nature of the prescribed insulin. Injection-site sampling and analysis can provide useful information distinguishing administration of HI and analogs, especially for subjects not under treatment. Theoretically, depending on the interval between death and sample collection, insulin may be undetectable in blood, due to degradation, while some insulin remains unabsorbed under the skin. In Table 3, injection-site insulin concentration is reported in case nos. 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 18, 22, 23, and 25.

4.3.6. Adipose tissue

As well that present subcutaneously at the injection site, adipose tissue (AT) is of forensic interest in the same way as other tissues. HI uptake and degradation have been described in adipocytes (Duckworth et al. 1998). AT is composed of adipocytes and other nonfat cells, such as vascular or connective matrix tissue. It is located at 80% in the subcutaneous area and 20% in the visceral area (Ibrahim 2010). HI plays a significant role at AT level, both subcutaneous and visceral, stimulating glucose and free fatty acid uptake, inhibiting lipolysis, and stimulating de novo fatty acid synthesis in adipocytes (Laviola et al. 2006). Insulin activity and insulin receptors in adipocytes were, therefore, widely studied (Duckworth et al. 1997; Fawcett et al. 2010; Ibrahim 2010). In some insulin intoxication cases, insulin concentration in subcutaneous AT at a different site from that of injection was used as a reference (control tissue) (Fletcher 1983). To assess the interest of the analysis of the AT, it would be useful to develop analytical tools and to conduct studies to shed light on insulin distribution and its concentration evolution in postmortem visceral and subcutaneous AT in various populations (diabetic, non-diabetic, treated, non-treated, other pathologies, etc.). In Table 3, insulin concentration in AT is reported in case nos. 2, 3, and 4.

4.3.7. Muscle

Muscle is considered by Duckworth et al. as the third main HI disposal organ (Duckworth et al. 1998). HI metabolism was demonstrated in several muscles: soleus, diaphragm or epitroclaris (Duckworth and Kitabchi 1981). Insulin Lispro was formally identified in muscle by LC-MS/MS (Hess et al. 2013). In non-diabetic humans, Fletcher et al. (1979) studied postmortem HI concentration in gluteus muscle ($n=3$), calf muscle ($n=2$), and abdominal wall tissue ($n=5$). Each sample comprised dermis, subcutaneous AT and muscle. They observed a concentration range of 10–75 µU/g (mean = 30 µg/g), considered similar to plasma levels. Birkinshaw suggested, in 1958, that as HI is more stable in acidic media, it could be stabilized by release of lactic acid in peripheral muscular tissue after death (Birkinshaw et al. 1958). More recently, Bryant et al. confirmed the stability of HI in acidic media, implicitly supporting Birkinshaw's hypothesis (Bryant et al. 1993). Moreover, it was demonstrated that IDE has little proteolytic activity at pH of 6 or less (Duckworth et al. 1998). Considering the potential longer stability of insulin and the large total muscle mass, muscle may be an interesting postmortem matrix for insulin analysis. In Table 3, muscle insulin concentrations are reported in case nos. 3, 4, and 22.

4.3.8. Vitreous humor

VH is not subject to hemolysis, which is an advantage over blood for insulin stability (Palmiere et al. 2015). VH uptake of endogenous molecules or xenobiotics from the systemic circulation is limited by the blood-retina barrier (Bévalot et al. 2016). Passage through this barrier consists mainly in passive diffusion, although numerous transporters were described there. In view of its size, HI penetrates mainly via transporters

(Nowicka et al. 2013). Insulin analysis in VH has been performed by RIA (Nowicka et al. 2013), chemiluminescence enzyme assay (Ojanpera et al. 2013, Palmiere et al. 2015), nanoLC-HRMS (Ojanpera et al. 2013), and LC-MS/MS (Thevis et al. 2012; Hess et al. 2013; Legg et al. 2019). Skowronek et al. (2018) quantified insulin in 93 random VH autopsy samples by immunoradiometric assay. Insulin concentration was below the LOD of 0.5 µU/mL in 86 cases. For six positive cases, concentration ranged from 1.42 to 5.20 µU/mL, without any suggestion of overdose. In one case, the concentration was 24.42 µU/mL, in a non-diabetic male found dead beside an insulin syringe in what was presumed to be a case of suicidal poisoning. Legg et al. (2019) quantified HI and analogs by LC-MS/MS in VH in eight cases where insulin overdose was suspected, based on history. From 225 µL and with a limit of quantification (LOQ) of 0.5 ng/mL for HI and analogs (14.4 µU/mL), they detected Aspart in two VH samples (<LOQ and 0.74 ng/mL (21.3 µU/mL)) and Lispro in one (2.0 ng/mL (57.6 µU/mL)). The latter case was of a woman, who killed herself with the insulin analog prescribed to her diabetic husband. Ojanpera et al. (2013), using nanoLC-HRMS, analyzed 10 VH samples from deceased persons treated by insulin, with postmortem intervals ranging between 4 and 10 days. HI was detected in one case and analog metabolite M2 was detected with this method in two cases. Hess's research group used LC-MS/MS to study 46 VH autopsy samples from diabetic and non-diabetic persons. With LOD of 4.5 µU/mL, no insulin was detected in any sample (Hess et al. 2013). Thevis et al. (2012) studied VH from 10 diabetic and non-diabetic cases of non-insulin related death, using LC-MS/MS: neither intact HI nor analogs was detected (LOD of 0.10–0.20 ng/mL (2.88–5.76 µU/mL)). Palmiere et al. (2015) reported a mean VH insulin value of 2.20 mU/L (2.20 µU/mL) in insulin-treated diabetics ($n=20$), using chemiluminescence enzyme assay, while levels in VH samples from non-diabetic patients ($n=20$) were all below the LOD of 0.20 mU/L (0.20 µU/mL). According to these observations, and probably due to low transfer from blood to VH, whatever the analysis technique, detection of basal HI concentration in VH of non-diabetic patients seems to be difficult even with recent highly effective analytical methods, while insulin can be determined in VH in insulin-treated diabetic subjects if the assay is sensitive enough. Interestingly, VH analysis allows detection of insulin in intoxication cases. Thus, VH can be a helpful matrix in interpreting postmortem insulin results. In Table 3, VH insulin concentrations are reported in case nos. 12, 13, 21, 22, 23, 29, 30, and 31.

4.3.9. Brain

Although mechanisms of HI entrance in the central nervous system are not yet totally elucidated, HI seems to penetrate essentially in the brain passing through the blood-brain barrier (BBB) by a saturable transport system (Banks et al. 2012; Begg 2015). HI has been detected in brain by RIA (Dorn et al. 1983; Banks et al. 1997), but was never formally identified by mass spectrometry. In rats after HI injection, Banks et al. found brain HI concentrations much lower than in blood (Banks et al. 1997). In addition to this problem of low

concentration, the brain undergoes rapid autolysis postmortem. Thus, the interest of this matrix is limited, as confirmed by the non-detection of insulin (HI and Lispro) in the two cases of death involving insulin intoxication reported in Table 3 (case nos. 2 and 22).

4.3.10. Cerebrospinal fluid

Like for the brain, the mechanisms of HI transport in cerebrospinal fluid (CSF) are debated. The hypothesis of a 3-compartment pharmacokinetic model (passage of HI from peripheral blood to brain interstitial liquid then to CSF) seems to be preferred to direct passage to the CSF at the choroid plexus (Begg 2015; Gray et al. 2017). According to this 3-compartment model, and given a saturable HI transport across the BBB, insulin concentration increase in CSF is saturable. HI in CSF was detected by RIA (Owen et al. 1974; Kernbach-Wighton and Puschel 1998) and chemiluminescence enzyme immunoassay (Palmiere et al. 2015). No publications report formal identification using mass spectrometry. Various authors investigated CSF insulin concentrations. In 1974, Owen et al. studied HI concentration in serum and lumbar CSF using RIA, in eight obese volunteers during starvation diet (Owen et al. 1974). After an overnight and a 21-day fast, the mean HI concentration in serum was $33 \pm 4 \mu\text{U/mL}$ and $13 \pm 5 \mu\text{U/mL}$, respectively. After the same diet, mean HI concentration in CSF was, respectively, $13 \pm 5 \mu\text{U/mL}$ and $6 \pm 3 \mu\text{U/mL}$. More recently, Palmiere et al. (2015) determined insulin concentration in postmortem CSF by chemiluminescence enzyme immunoassay in 20 insulin-treated diabetic patients, at 26 mU/L and 1.20 mU/L in serum and CSF, respectively, and in the same matrices in 20 non-diabetic patients at, respectively, 2.40 and 0.20 mU/L , corresponding to the limit of detection. Both these studies concerning non-insulin related death showed a lower concentration in CSF than in serum. In contrast, Kernbach-Wighton et al. (Kernbach-Wighton and Puschel 1998), in 12 deaths due to insulin, observed a 30% higher concentration of HI in CSF than in serum: mean, $63 \mu\text{U/mL}$ (range, 62 – $64 \mu\text{U/mL}$) in CSF, and $49 \mu\text{U/mL}$ (range, 1 – $155 \mu\text{U/mL}$) in serum. Moreover, CSF is a matrix protected by the BBB, which may limit the insulin degradation observed in blood due to hemolysis or putrefaction. Thus, CSF could be a helpful matrix in forensic toxicology, particularly in suspected intoxication. However, one of the limitations of CSF is availability: it disappears quickly when putrefaction sets in, and is difficult to collect postmortem. In Table 3, the only case reporting CSF HI concentration is no. 23.

5. Discussion/conclusion

Intoxication by insulin overdose can be accidental (error in insulin dose or type), or intentional: i.e. suicidal or criminal. In living subjects, overdose is easily diagnosed by hypoglycemia associated with inappropriate blood insulin concentration. Other biological examinations (C-peptide, anti-insulin antibodies, etc.) may exclude other pathologies underlying the hypoglycemia, such as insulin-secreting tumor or IAS, and screening for oral hypoglycemic drugs can rule out that route

of intoxication. In postmortem situation, these demonstrations are complicated by the relative unreliability of glycemia assay (Palmiere and Mangin 2012). Abnormal HI elevation or simply findings of an insulin analog in a non-treated subject provides important evidence. However, postmortem assay of HI and analogs and interpretation of results incur a number of pitfalls.

There has been a vast literature on the subject over the last 60 years since the first immunologic assay techniques came onto the market. However, for insulin perhaps more than any other substance, the highly heterogeneous data need to be compiled with caution before drawing conclusions: analytical techniques range from nonselective RIA to LC-MS/MS, treatments range from animal insulin to the most recent analogs, and circumstances of death vary greatly in administration-to-death interval, dosage and PMI. All this precludes determining a threshold for suspicion of overdose. For the same reasons, any lessons drawn from the present review will need to be adapted on a case-by-case basis, taking account of sample, analysis and anamnesis, to avoid misinterpretation.

We, therefore, conclude with a 2-step logic diagram (Figure 3) for postmortem assessment of insulin overdose. The first, analytical step highlights the importance of knowing the assay technique; the second, concerning interpretation, compiles the questions to be addressed to avoid false-positive or -negative conclusions.

Understanding results from a given assay analysis method is essential to correct interpretation. Immunoanalysis is the most widely used method to estimate insulinemia. Apart from physiological HI and its precursor, proinsulin, other molecules, and notably insulin analogs, can interfere in this technique. Thus, immunoanalysis measures an insulin concentration corresponding to all molecules reacting with the kit antibodies. Depending on antibody selectivity, the result may concern free HI or analogs, degradation products and metabolites, bound forms (depending on analytical pre-treatment) or similar molecules (such as proinsulin). Good knowledge of specific kit cross-reactivity is thus indispensable to interpretation. As advocated in the logic diagram, performing 2 analyses on a given sample, using antibodies of different selectivity, can provide precious information. A difference in findings between an HI-specific kit and one interacting with analogs can suggest the presence of one or more analogs, although without determining type or proportion. It should also be noted that most kits on the market, including the so-called "HI-specific" versions, fail to distinguish HI from metabolite M1 of Glargin. Unlike immunoanalysis, mass spectrometry identifies and specifically assays each intact insulin form, whether human or analog, and screens for metabolites and degradation products. Its limits of quantification, although higher than for immunoassays, have greatly improved with technical device progress, and notably high-resolution spectrometry, and more selective extraction procedures. LC-MS formally identifies the analyte and is, therefore, to be preferred forensically; it should ideally be systematic in this context, to confirm positive immunologic findings. Identifying and assaying each insulin form improves interpretation, taking account of their respective characteristics:

pharmacokinetics, dosage, etc. Identification also provides critical data for the purposes of the inquiry, allowing comparison with insulin types available to the victim and/or family and friends. For example, simply identifying such and such an analog, quite apart from measuring its concentration, can point the inquiry in the direction of exogenous administration; therapeutic, perhaps, for a diabetic patient, but highly suspicious otherwise.

The second step in the logic diagram concerns interpretation of blood insulin findings. All of the preanalytical, analytical, and clinical parameters liable to significantly affect postmortem assay interpretation set out in the present review are summarized in two series of questions. The first concerns parameters liable to lead to a false negative assessment of overdose, and the second to a false positive. The risk of falsely excluding overdose lies in postmortem determination of a concentration considered physiological or therapeutic or in non-detection of insulin, despite overdose. As seen above, the assay method may lead to underestimation (cross-reactivity with analogs < 100%, Hook effect). The possibility of degradation should also be taken into account; it has been definitely demonstrated for HI, especially in case of hemolysis, and it is reasonable to think that analogs also may undergo degradation, although fewer studies have focused on analog stability. It is thus important to allow for possible *in corpore* degradation during the death-to-sampling

interval, and for *in vitro* degradation due to sample hemolysis or poor storage conditions. Metabolism between injection and death, always with at least a few hours' delay, should also be taken into account. When death occurs after medical intervention for intoxication, it may be useful to analyze pre-death samples, less affected by degradation and metabolism. False-positive interpretation consists in considering the postmortem concentration to be abnormally elevated, when there has in fact been no overdose. The error may be due to analytic bias: on immunoassay due to antibody selectivity for analogs (cross-reactivity > 100%), or on quite a few immunological methods, due to degradation products of hemolysis. Another possible source of error is a pathology or medical treatment increasing blood HI level. Finally, the slow analogs Detemir and Degludec are administered at higher doses than other analogs due to their binding to albumin, and are found in high concentrations in blood. It is, therefore, recommended to use a technique able to detect and specifically quantify insulin and to interpret assay findings in the light of the anamnesis (underlying pathology, prescribed insulin, etc.).

The logic diagram is restricted to interpretation of blood insulin findings. The present review further showed that quite a few alternative postmortem matrices are able to circumvent some of the possible pitfalls of blood analysis and provide a valuable complement in diagnosing overdose. VH and

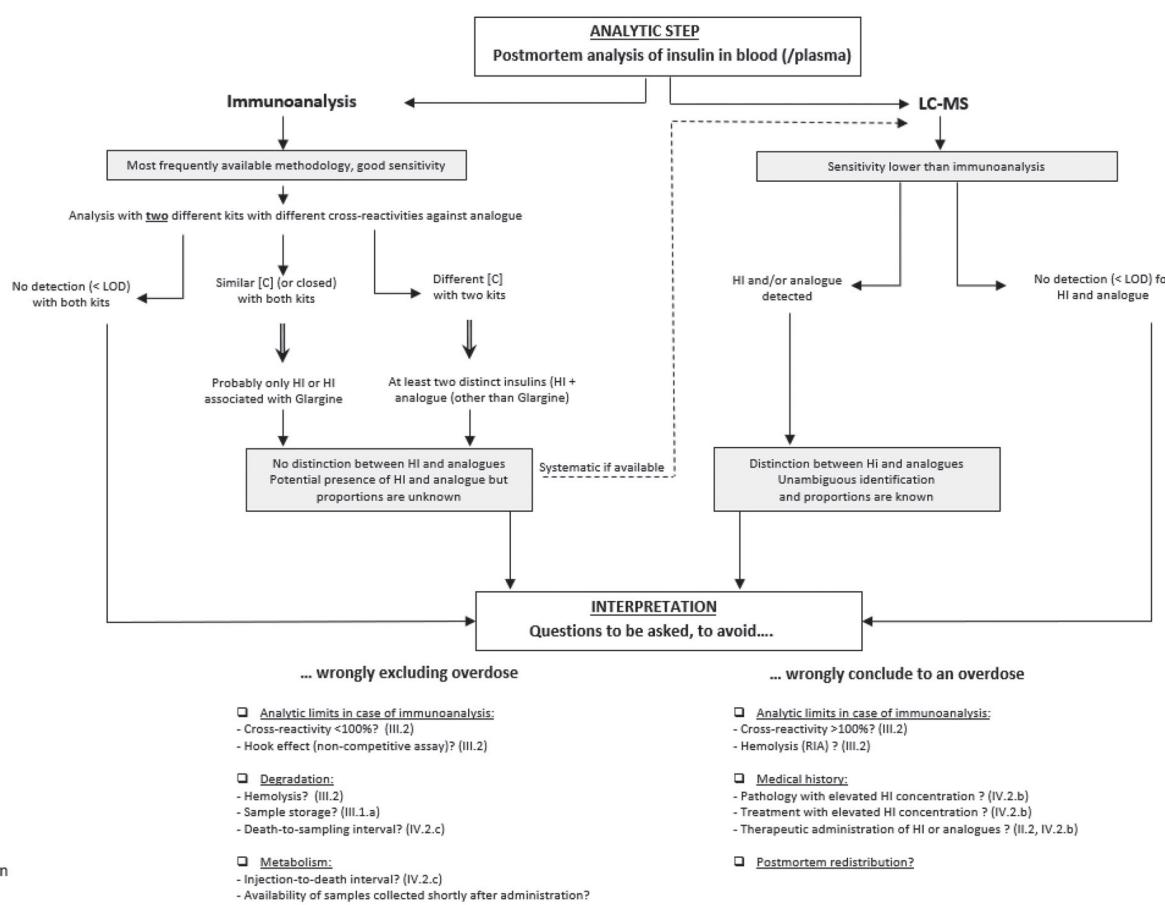


Figure 3. Insulin concentration interpretation aid (numbers in brackets refer to the subsection of the review dealing with the point). ([C]: concentration; LOD: limit of detection; HI: human insulin).

muscle, for example, can be contributive in case of suspected degradation by hemolysis. Injection-site sampling, with its large insulin residue, is of especial interest for identifying administered insulin.

In conclusion, the present review focused on postmortem analysis of insulins (HI and analogs) in blood and alternative matrices and on the interpretation of concentration findings. It leads to the conclusion that insulin analysis makes a real contribution to the toxicology report in case of suspected intoxication by insulin overdose, but that the toxicologist needs to be aware of several possible limitations. Evidence from the inquiry and good communication between the various key players (investigators, forensic physicians, and toxicologists) are important in optimizing the report. They identify, first of all, those cases in which insulin analysis would be contributive, enabling the forensic physician to collect the necessary samples and the toxicologist to take all necessary precautions in conserving the samples and implementing appropriate analysis methods. Establishing overdose as cause of death was outside the scope of the present review, but seems clearly to require going beyond the mere findings of the analysis, taking into account the circumstances of death, autopsy data, and the victim's diabetic status and insulin sensitivity and glycemic status at the time of death (glucose/lactate assay in vitreous humor, ketone bodies, etc.). Deciphering death secondary to hypoglycemia related to insulin overdose remains a challenge, but progress in techniques is making the "perfect crime" ever more difficult to commit by means of insulin.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge Dr. Jean-Michel Gaulier Pharm D, PhD, and Shanti Nassibou Pharm D (Toxicology laboratory, Medical University of Lille) and Dr Sybil Charriere MD, PhD, (Endocrinology, Medical University of Lyon), the two anonymous reviewers and the editor for reviewing the manuscript and for all their comments and suggestions which helped to improve this review.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The author's affiliation is as shown on the cover page. The authors participated in the development of the paper as individual professionals and have sole responsibility for the writing and content of the paper. Neither of the authors has been involved in the last 5 years with regulatory or legal proceedings related to the contents of the paper and neither has received funding in the last 5 years in support of the preparation of the paper.

References

- Agin A, Charrie A, Chikh K, Tabarin A, Vezzosi D. 2013. Fast test: clinical practice and interpretation. *Ann Endocrinol (Paris)*. 74(3):174–184.
- Arnolds S, Rave K, Hovemann U, Fischer A, Sert-Langeron C, Heise T. 2010. Insulin glulisine has a faster onset of action compared with insulin aspart in healthy volunteers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 118(09):662–664.
- American Diabetes Association. 2018. Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 41(Supp1): S13–S27.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. 1994. Rôle de l'endocytose dans la protéolyse de l'insuline et du glucagon dans l'hépatocyte. *Med Sci (Paris)*. 10(2):176–185.
- Authier F, Metiou M, Fabrega S, Kouach M, Briand G. 2002. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Biol Chem*. 277(11):9437–9446.
- Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ. 1997. Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides*. 18(8):1257–1262.
- Banks WA, Owen JB, Erickson MA. 2012. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther*. 136(1):82–93.
- Batalis NI, Prahlow JA. 2004. Accidental insulin overdose. *J Forensic Sci*. 49(5):1117–1120.
- Baud J, Deye N, Sonnevile R, Mégarbane B. 2006. Intoxication grave par l'insuline. *Réanimation*. 15(6):481–489.
- Beastall GH, Gibson IH, Martin J. 1995. Successful suicide by insulin injection in a non-diabetic. *Med Sci Law*. 35(1):79–85.
- Becker RH, Frick AD. 2008. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glulisine. *Clin Pharmacokinet*. 47(1):7–20.
- Begg DP. 2015. Insulin transport into the brain and cerebrospinal fluid. *Vitam Horm*. 98:229–248.
- Begg DP, May AA, Mul JD, Liu M, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. 2015. Insulin detemir is transported from blood to cerebrospinal fluid and has prolonged central anorectic action relative to NPH insulin. *Diabetes*. 64(7):2457–2466.
- Bellia F, Pietropaolo A, Grasso G. 2013. Formation of insulin fragments by insulin-degrading enzyme: the role of zinc(II) and cystine bridges. *J Mass Spectrom*. 48(2):135–140.
- Benzi L, Cecchetti P, Ciccarone AM, Di Cianni G, Iozzi LC, Caricato F, Navalesi R. 1990. Insulin degradation *in vivo*: a high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr*. 534:37–46.
- Berger M, Halban PA, Girardier L, Seydoux J, Offord RE, Renold AE. 1979. Absorption kinetics of subcutaneously injected insulin. Evidence for degradation at the injection site. *Diabetologia*. 17(2):97–99.
- Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. 2016. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicol*. 34(1):12–40.
- Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Guitton J, Fanton L. 2016. State of the art in bile analysis in forensic toxicology. *Forensic Sci Int*. 259: 133–154.
- Binder C, Bendtsen I. 1992. Endocrine emergencies. *Hypoglycaemia*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 6(1):23–39.
- Birkinshaw VJ, Gurd MR, Randall SS, Curry AS, Price DE, Wright PH. 1958. Investigations in a case of murder by insulin poisoning. *Br Med J*. 2(5094):463–468.
- Blackard WG, Guzelian PS, Small EE. 1979. Down regulation of insulin receptors. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 90:94–101.
- Blackburn M. 2013. Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 5(23):2933–2914.
- Bodenlenz M, Ellmerer M, Schaupp L, Jacobsen LV, Plank J, Brunner GA, Wutte A, Aigner B, Mautner SI, Pieber TR. 2015. Bioavailability of insulin detemir and human insulin at the level of peripheral interstitial fluid in humans, assessed by open-flow microperfusion. *Diabetes Obes Metab*. 17(12):1166–1172.
- Bolli GB, Hahn AD, Schmidt R, Eisenblaetter T, Dahmen R, Heise T, Becker RH. 2012. Plasma exposure to insulin glargin and its metabolites M1 and M2 after subcutaneous injection of therapeutic and supratherapeutic doses of glargin in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 35(12):2626–2630.
- Borer-Weir KE, Bailey SR, Menzies-Gow NJ, Harris PA, Elliott J. 2012. Evaluation of a commercially available radioimmunoassay and species-specific ELISAs for measurement of high concentrations of insulin in equine serum. *Am J Vet Res*. 73(10):1596–1602.
- Borissova AM, Tankova TI, Koev DJ. 2004. Insulin secretion, peripheral insulin sensitivity and insulin-receptor binding in subjects with different degrees of obesity. *Diabetes Metab*. 30(5):425–431.
- Boscato LM, Stuart MC. 1988. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem*. 34(1):27–33.
- Bowsher R, Nowatzke W. 2011. Insights in regulated bioanalysis of human insulin and insulin analogues by immunoanalytical methods. *Bioanalysis*. 3(8):883–898.
- Brodal BP. 1971. Evidence of an enzymatic degradation of insulin in blood *in vitro*. *Eur J Biochem*. 18(2):201–206.

- Bryant C, Spencer DB, Miller A, Bakaya DL, McCune KS, Maple SR, Pekar AH, Brems DN. 1993. Acid stabilization of insulin. *Biochemistry*. 32(32): 8075–8082.
- Cazabat L, Chanson P. 2009. [Hypoglycemia and insulinoma]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 70 (Suppl 1):S2–S11.
- Chambers EE, Legido-Quigley C, Smith N, Fountain KJ. 2013. Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge. *Bioanalysis*. 5(1):65–81.
- Chambers EE, Fountain KJ, Smith N, Ashraf L, Karalliedde J, Cowan D, Legido-Quigley C. 2014. Multidimensional LC-MS/MS enables simultaneous quantification of intact human insulin and five recombinant analogs in human plasma. *Anal Chem*. 86(1):694–702.
- Chen Z, Caulfield MP, McPhaul MJ, Reitz RE, Taylor SW, Clarke NJ. 2013. Quantitative insulin analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a high-throughput clinical laboratory. *Clin Chem*. 59(9):1349–1356.
- Chevenne D, Trivin F, Porquet D. 1999. Insulin assays and reference values. *Diabetes Metab*. 25(6):459–476.
- Cook PR, Glenn C, Armston A. 2010. Effect of hemolysis on insulin determination by the Beckman Coulter Unicell DXI 800 immunoassay analyzer. *Clin Biochem*. 43(6):621–622.
- Critchley JA, Proudfoot AT, Boyd SG, Campbell IW, Brown NS, Gordon A. 1984. Deaths and paradoxes after intentional insulin overdosage. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 289(6439):225–225.
- Crofts C, Schofield G, Zinn C, Wheldon M, Kraft J. 2016. Identifying hyperinsulinaemia in the absence of impaired glucose tolerance: an examination of the Kraft database. *Diabetes Res Clin Pract*. 118:50–57.
- Czock D, Aisenpreis U, Rasche FM, Jehle PM, Jehle PM. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lispro-insulin in hemodialysis patients with diabetes mellitus. *CP*. 41(10):492–497.
- Danne T, Lupke K, Walte K, Von Schuetz W, Gall MA. 2003. Insulin detemir is characterized by a consistent pharmacokinetic profile across age-groups in children, adolescents, and adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 26(11):3087–3092.
- Darby SM, Miller ML, Allen RO, LeBeau M. 2001. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. *J Anal Toxicol*. 25(1):8–14.
- de la Pena A, Riddle M, Morrow LA, Jiang HH, Linnebjerg H, Scott A, Win KM, Hompesch M, Mace KF, Jacobson JG, et al. 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high-dose human regular U-500 insulin versus human regular U-100 insulin in healthy obese subjects. *Diabetes Care*. 34(12):2496–2501.
- De la Pena A, Seger M, Soon D, Scott AJ, Reddy SR, Dobbins MA, Brown Augsburger P, Linnebjerg H. 2016. Bioequivalence and comparative pharmacodynamics of insulin lispro 200 U/mL relative to insulin lispro (Humalog(R)) 100 U/mL. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 5(1):69–75.
- De Leon D, Stanley C. 2013. Determination of insulin for the diagnosis of hyperinsulinemic hypoglycemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 27(6):763–769.
- DeWitt CR, Heard K, Waksman JC. 2007. Insulin & C-peptide levels in sulfonylurea-induced hypoglycemia: a systematic review. *J Med Toxicol*. 3(3):107–118.
- Dickson SJ, Cairns ER, Blazey ND. 1977. The isolation and quantitation of insulin in post-mortem specimens – a case report. *Forensic Sci*. 9(1): 37–42.
- Dong S, Gu Y, Wei G, Si D, Liu C. 2018. Direct comparison of LC-MS/MS and RIA methods for the pharmacokinetics assessment of human insulin in preclinical development. *Biomed Chromatogr*. 32(11):e4323.
- Dorn A, Rinne A, Bernstein HG, Hahn HJ, Ziegler M. 1983. Insulin and C-peptide in human brain neurons (insulin/C-peptide/brain peptides/immunohistochemistry/radioimmunoassay). *J Hirnforsch*. 24(5): 495–499.
- Duckworth WC, Kitabchi AE. 1981. Insulin metabolism and degradation. *Endocr Rev*. 2(2):210–233.
- Duckworth WC, Hamel FG, Peavy DE. 1997. Two pathways for insulin metabolism in adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1358(2):163–171.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. 1998. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*. 19(5):608–624.
- Elgee NJ, Williams RH, Lee ND. 1954. Distribution and degradation studies with insulin I131. *J Clin Invest*. 33(9):1252–1260.
- Fawcett J, Sang H, Permana PA, Levy JL, Duckworth WC. 2010. Insulin metabolism in human adipocytes from subcutaneous and visceral depots. *Biochem Biophys Res Commun*. 402(4):762–766.
- Fletcher SM, Richards L, Moffat AC. 1979. The detection of fatal insulin poisoning by tissue analysis. *Vet Hum Toxicol*. 21 (Suppl):197–199.
- Fletcher SM. 1983. Insulin. A forensic primer. *J Forensic Sci Soc*. 23(1): 5–17.
- Fujita S, Kuroda Y, Fukui K, Iwamoto R, Kozawa J, Watanabe T, Yamada Y, Imagawa A, Iwahashi H, Shimomura I. 2017. Hyperinsulinemia and insulin receptor gene mutation in nonobese healthy subjects in Japan. *J Endocr Soc*. 1(11):1351–1361.
- Garnet S, Fellahi S, Marlin G, Capeau J, Lefevre G, Bastard JP. 2014. Differential interferences of hemoglobin and hemolysis on insulin assay with the Abbott Architect-Ci8200 immunoassay. *Clin Biochem*. 47(6):445–447.
- Gray SM, Aylor KW, Barrett EJ. 2017. Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia*. 60(8): 1512–1521.
- Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Medeau V, Kevorkian JP. 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab*. 34 (Suppl 2):S43–S48.
- Haahr H, Heise T. 2014. A review of the pharmacological properties of insulin degludec and their clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 53(9):787–800.
- Hachiya HL, Treves ST, Kahn CR, Sodoyez JC, Sodoyez-Goffaux F. 1987. Altered insulin distribution and metabolism in type I diabetics assessed by [¹²³I]insulin scanning. *J Clin Endocrinol Metab*. 64(4): 801–808.
- Heise T, Nosek L, Ronn BB, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, Draeger E. 2004. Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes. *Diabetes*. 53(6):1614–1620.
- Heise T, Hovemann U, Nosek L, Hermanski L, Bottcher SG, Haahr H. 2015. Comparison of the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of insulin degludec and insulin glargine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 11(8):1193–1201.
- Heise T, Mathieu C. 2017. Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes. *Diabetes Obes Metab*. 19(1):3–12.
- Hess C, Musshoff F, Madea B. 2011a. Disorders of glucose metabolism—post mortem analyses in forensic cases: part I. *Int J Legal Med*. 125(2): 163–170.
- Hess C, Musshoff F, Madea B. 2011b. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 400(1):33–41.
- Hess C, Thomas A, Thevis M, Stratmann B, Quester W, Tschoepe D, Madea B, Musshoff F. 2012. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 404(6–7):1813–1822.
- Hess C, Madea B, Daldrup T, Musshoff F. 2013. Determination of hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem. *Drug Test Analysis*. 5(9–10):802–807.
- Heurtault B, Reix N, Meyer N, Gasser F, Wendling MJ, Ratomponirina C, Jeandidier N, Sapin R, Agin A. 2014. Extensive study of human insulin immunoassays: promises and pitfalls for insulin analogue detection and quantification. *Clin Chem Lab Med*. 52(3):355–362.
- Holt SH, Miller JC, Petocz P. 1997. An insulin index of foods: the insulin demand generated by 1000-kJ portions of common foods. *Am J Clin Nutr*. 66(5):1264–1276.
- Home PD. 2012. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences. *Diabetes Obes Metab*. 14(9):780–788.
- Hood I, Mirchandani H, Monforte J, Stacer W. 1986. Immunohistochemical demonstration of homicidal insulin injection site. *Arch Pathol. Lab Med*. 110(10):973–974.

- Hovorka R, Powrie JK, Smith GD, Sonksen PH, Carson ER, Jones RH. 1993. Five-compartment model of insulin kinetics and its use to investigate action of chloroquine in NIDDM. *Am J Physiol.* 265(1):E162–E175.
- Ibrahim MM. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 11(1):11–18.
- Idris I, Peng X, He X, Liu D, Balogh E, Kaushik P, Van Brunt K. 2018. The trend of high-dose insulin usage among patients with diabetes in the UK: a retrospective study. *Diabetes Ther.* 9(6):2245–2257.
- Ismail AA. 2016. The insulin autoimmune syndrome (IAS) as a cause of hypoglycaemia: an update on the pathophysiology, biochemical investigations and diagnosis. *Clin Chem Lab Med.* 54(11):1715–1724.
- Iwase H, Kobayashi M, Nakajima M, Takatori T. 2001. The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdosage. *Forensic Sci Int.* 115(1–2):123–127.
- Jarzuel F. 2008. Mise en évidence en post mortem d'une intoxication à l'insuline exogène. [PhD Thesis]. Lyon, France: Université Claude Bernard Lyon 1.
- Jayakrishnapillai PV, Shantikumar VN, Kaladhar K. 2017. Current trend in drug delivery considerations for subcutaneous insulin depots to treat diabetes. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 153:123–131.
- Jenkins D, Fletcher SM, Hoole A. 1982. Apparent suicide by carbon monoxide poisoning in a case of insulinoma. *Med Sci Law.* 22(2):135–139.
- Junge M, Tsokos M, Puschel K. 2000. Suicide by insulin injection in combination with beta-blocker application. *Forensic Sci Int.* 113(1–3):457–460.
- Kapoor RR, Flanagan SE, James C, Shield J, Ellard S, Hussain K. 2009. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Arch Dis Child.* 94(6):450–457.
- Kernbach-Wighton G, Puschel K. 1998. On the phenomenology of lethal applications of insulin. *Forensic Sci Int.* 93(1):61–73.
- Kim S, Yun YM, Hur M, Moon HW, Kim JQ. 2011. The effects of anti-insulin antibodies and cross-reactivity with human recombinant insulin analogues in the E170 insulin immunometric assay. *Korean J Lab Med.* 31(1):22–29.
- Kim SH, Reaven GM. 2008. Insulin resistance and hyperinsulinemia: you can't have one without the other. *Diabetes Care.* 31(7):1433–1438.
- Koskinen PJ, Nuutinen HM, Laaksonen H, Klossner JA, Irljala KM, Kalimo H, Viikari JS. 1999. Importance of storing emergency serum samples for uncovering murder with insulin. *Forensic Sci Int.* 105(1):61–66.
- Kumar S, Verma A. 2016. Estimation of postmortem interval using the data of insulin level in the cadaver's blood. *Data Brief.* 7:354–356.
- Kuuranne T, Thomas A, Leinonen A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W, Thevis M. 2008. Insulins in equine urine: qualitative analysis by immunoaffinity purification and liquid chromatography/tandem mass spectrometry for doping control purposes in horse-racing. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 22(3):355–362.
- Labay LM, Bitting CP, Legg KM, Logan BK. 2016. The determination of insulin overdose in postmortem investigations academic forensic pathology. *Acad Forensic Pathol.* 6(2):174–183.
- Lauritzen T, Pramming S, Gale EA, Deckert T, Binder C. 1982. Absorption of isophane (NPH) insulin and its clinical implications. *Br Med J (Clin Res Ed).* 285(6336):159–162.
- Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, Natalicchio A, Leonardini A, De Stefano F, Cuscito M, De Fazio M, Memeo V, Neri V, et al. 2006. Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes.* 55(4):952–961.
- Lebovitz HE. 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 109 (Suppl 2):S135–S148.
- Legg KM, Labay LM, Aiken SS, Logan BK. 2019. Validation of a fully automated immunoaffinity workflow for the detection and quantification of insulin analogs by LC-MS-MS in postmortem vitreous humor. *J Anal Toxicol.* 43(7):505–511.
- Lindquist O, Rammer L. 1975. Insulin in post-mortem blood. *Z Rechtsmed.* 75(4):275–277.
- Livesey JH, Hodgkinson SC, Roud HR, Donald RA. 1980. Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin Biochem.* 13(4):151–155.
- Logemann E, Pollak S, Khalaf AN, Petersen KG. 1993. Postmortem diagnosis of exogenous insulin administration. *Arch Kriminol.* 191(1–2):28–36.
- Lutz R, Pedal I, Wetzel C, Mattern R. 1997. Insulin injection sites: morphology and immunohistochemistry. *Forensic Sci Int.* 90(1–2):93–101.
- Luzio SD, Dunseath GJ, Atkinson MD, Owens DR. 2013. A comparison of the pharmacodynamic profiles of insulin detemir and insulin glargine: a single dose clamp study in people with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 39(6):537–542.
- Magnan C, Ktorza A. 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC – Endocrinologie.* 2(4):241–264.
- Marks V, Teale JD. 1993. Hypoglycaemia in the adult. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 7(3):705–729.
- Marks V. 1995. Hypoglycaemia – real and unreal, lawful and unlawful: the 1994 Banting Lecture. *Diabet Med.* 12(10):850–864.
- Marks V, Richmond C. 2007. Insulin murders – True life cases. London: Royal Society of Medicine Press.
- Marks V, Richmond C. 2008a. Colin Bouwer: professor of psychiatry and murderer. *J R Soc Med.* 101(8):400–408.
- Marks V, Richmond C. 2008b. Kenneth Barlow: the first documented case of murder by insulin. *J R Soc Med.* 101(1):19–21.
- Marks V. 2009. Murder by insulin: suspected, purported and proven—a review. *Drug Test Analysis.* 1(4):162–176.
- Marks V. 2010. Forensic aspects of hypoglycemia. *Diabetic Hypoglycemia.* 2(3):3–8.
- Marks V, Wark G. 2013. Forensic aspects of insulin. *Diabetes Res Clin Pract.* 101(3):248–254.
- Marks V. 2015. Insulin and the law. *Ann Clin Biochem.* 52(6):696–698.
- Mégarbane B, Deye N, Bloch V, Sonneville R, Collet C, Launay JM, Baud FJ. 2007. Intentional overdose with insulin: prognostic factors and toxicokinetic/toxicodynamic profiles. *Crit Care.* 11(5):R115.
- Monnier L, Colette C, Owens D. 2013. Basal insulin analogs: from pathophysiology to therapy. What we see, know, and try to comprehend? *Diabetes Metab.* 39(6):468–476.
- Morello CM. 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin analogs in special populations with type 2 diabetes mellitus. *Int J Gen Med.* 4:827–835.
- Murad MH, Coto-Yglesias F, Wang AT, Sheidaee N, Mullan RJ, Elamin MB, Erwin PJ, Montori VM. 2009. Clinical review: drug-induced hypoglycemia: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab.* 94(3):741–745.
- Musshoff F, Hess C, Madea B. 2011. Disorders of glucose metabolism: post mortem analyses in forensic cases – Part II. *Int J Legal Med.* 125(2):171–180.
- Nasrallah SN, Reynolds LR. 2012. Insulin Degludec, The new generation Basal insulin or just another Basal insulin? *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.* 5:31–37.
- Nedelkov D, Niederkofler EE, Oran PE, Peterman S, Nelson RW. 2018. Top-down mass spectrometric immunoassay for human insulin and its therapeutic analogs. *J Proteomics.* 175:27–33.
- Novo Nordisk. 2005. Levemir Prescribing Information [Bagsvaerd, Denmark]: Novo Nordisk; [accessed 2019 Feb 24]. <https://www.novo-pi.com/levemir.pdf>
- Novo Nordisk. 2015. Tresiba – Degludec Prescribing Information. [Bagsvaerd, Denmark]: Novo Nordisk; [accessed 2019 Feb 24]. <https://www.novo-pi.com/tresiba.pdf>
- Nowicka J, Skowronek R, Czech E, Kulikowska J, Olszowy Z. 2013. Comments on 'Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS' by Thevis et al. *Drug Test Analysis.* 5(2):133–134.
- Ojanperä I, Sajantila A, Vinogradova L, Thomas A, Schanzer W, Thevis M. 2013. Post-mortem vitreous humour as potential specimen for detection of insulin analogues by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 233(1–3):328–332.
- Oran PE, Jarvis JW, Borges CR, Sherma ND, Nelson RW. 2011. Mass spectrometric immunoassay of intact insulin and related variants for population proteomics studies. *Prot Clin Appl.* 5(7–8):454–459.
- Owen OE, Reichard GA Jr, Boden G, Shuman C. 1974. Comparative measurements of glucose, beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, and insulin in blood and cerebrospinal fluid during starvation. *Metabolism.* 23(1):7–14.
- Palmiere C, Mangin P. 2012. Postmortem chemistry update part I. *Int J Legal Med.* 126(2):187–198.

- Palmiere C, Sabatasso S, Torrent C, Rey F, Werner D, Bardy D. 2015. Post-mortem determination of insulin using chemiluminescence enzyme immunoassay: preliminary results. *Drug Test Analysis*. 7(9):797–803.
- Patel F. 1992. Fatal self-induced hyperinsulinaemia: a delayed post-mortem analytical detection. *Med Sci Law*. 32(2):151–159.
- Peterman S, Niederkofler EE, Phillips DA, Krastins B, Kiernan UA, Tubbs KA, Nedelkov D, Prakash A, Vogelsang MS, Schoeder T, et al. 2014. An automated, high-throughput method for targeted quantification of intact insulin and its therapeutic analogs in human serum or plasma coupling mass spectrometric immunoassay with high resolution and accurate mass detection (MSIA-HR/AM). *Proteomics*. 14(12):1445–1456.
- Petersen SB, Kildegaard J, Nielsen FS, Sondergaard E, Parkner T, Laursen T, Lauritzen T, Skyggebjerg O, Christiansen JS. 2010. Pharmacokinetics following continuous subcutaneous insulin infusion of insulin aspart with or without initial subcutaneous bolus. *Diabetes Obes Metab*. 12(4):334–340.
- Plum A, Agerso H, Andersen L. 2000. Pharmacokinetics of the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, in rats, dogs, and pigs, and pharmacodynamics of insulin aspart in pigs. *Drug Metab Dispos*. 28(2): 155–160.
- Rave K, Klein O, Frick AD, Becker RH. 2006. Advantage of premeal-injected insulin glulisine compared with regular human insulin in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 29(8):1812–1817.
- Reaven GM. 2003. The insulin resistance syndrome. *Curr Atheroscler Rep*. 5(5):364–371.
- Redmon JB, Nuttall FQ. 1999. Autoimmune hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 28(3):603–618.
- Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG, Concannon PW. 1982. Effects of storage, hemolysis, and freezing and thawing on concentrations of thyroxine, cortisol, and insulin in blood samples. *Proc Soc Exp Biol Med*. 170(4):509–516.
- Reyna R, Traynor KD, Hines G, Boots LR, Azziz R. 2001. Repeated freezing and thawing does not generally alter assay results for several commonly studied reproductive hormones. *Fertil Steril*. 76(4):823–825.
- Rogowicz-Frontczak A, Majchrzak A, Zozulińska-Ziółkiewicz D. 2017. Insulin resistance in endocrine disorders – treatment options. *Endokrynol Pol*. 68(3):334–351.
- Rubenstein AH, Spitz I. 1968. Role of the kidney in insulin metabolism and excretion. *Diabetes*. 17(3):161–169.
- Ruscica M, Baldessin L, Boccia D, Racagni G, Mitro N. 2017. Non-insulin anti-diabetic drugs: an update on pharmacological interactions. *Pharmacol Res*. 115:14–24.
- Sapin R, Gasser F, Grucker D. 1997. Prévention des effets de l'hémolyse sur le dosage d'insuline. *Immunoanal Biol Spéc*. 12(4):206–208.
- Sapin R. 2002. The interference of insulin antibodies in insulin immunoassays. *Clin Chem Lab Med*. 40(7):705–708.
- Sapin R. 2008. Interferences in immunoassays: Mechanisms and outcomes in endocrinology. *Ann Endocrinol (Paris)*. 69(5):415–425.
- Seabright PJ, Smith GD. 1996. The characterization of endosomal insulin degradation intermediates and their sequence of production. *Biochem J*. 320(3):947–956.
- Service F. 2004. Hyperinsulinemic hypoglycemia in adults. *Ann Endocrinol*. 65(1):88–95.
- Shahani S, Shahani L, Department of Pharmacology, MGM Medical College Mumbai (India), India. 2015. Use of insulin in diabetes: a century of treatment. *Hong Kong Med J*. 21(6):553–559.
- Skowronek R, Nowicka J, Czech E, et al. 2018. Evaluation of the usefulness of the immunoradiometric method for post-mortem measurement of insulin concentration in the intraocular fluid: preliminary results. *amsik*. 68(3):161–170.
- Steen H, Mann M. 2004. Tha abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(9):699–711.
- Steinstraesser A, Schmidt R, Bergmann K, Dahmen R, Becker RH. 2014. Investigational new insulin glargin 300 U/ml has the same metabolism as insulin glargin 100 U/ml. *Diabetes Obes Metab*. 16(9):873–876.
- Stofer A. 1970. Suicid mit Insulin und Nachweis des Insulins an der Leiche. *Arch Toxikol*. 26(1):1–7.
- Sturner WQ, Putnam RS. 1972. Suicidal insulin poisoning with nine day survival: recovery in bile at autopsy by radioimmunoassay. *J Forensic Sci*. 17(4):514–521.
- Sunderland N, Wong S, Lee CK. 2016. Fatal insulin overdoses: case report and update on testing methodology. *J Forensic Sci*. 61 (Suppl 1): S281–S284.
- Tambascia MA, Eliaschewitz FG. 2015. Degludec: the new ultra-long insulin analogue. *Diabetol Metab Syndr*. 7(1):57.
- Taylor SW, Clarke NJ, Chen Z, McPhaul MJ. 2016. A high-throughput mass spectrometry assay to simultaneously measure intact insulin and C-peptide. *Clin Chim Acta*. 455:202–208.
- Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. 2006. Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 78(6):1897–1903.
- Thevis M, Thomas A, Schanzer W. 2008. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing. *Mass Spectrom Rev*. 27(1):35–50.
- Thevis M, Thomas A, Schanzer W, Ostman P, Ojanperä I. 2012. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS. *Drug Test Analysis*. 4(1):53–56.
- Thomas A, Thevis M, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. 2007. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes. *Anal Chem*. 79(6):2518–2524.
- Thomas A, Schanzer W, Delahaut P, Thevis M. 2009. Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry. *Drug Test Analysis*. 15(5):219–227.
- Thomas A, Brinkkötter P, Schanzer W, Thevis M. 2015. Metabolism of human insulin after subcutaneous administration: a possible means to uncover insulin misuse. *Anal Chim Acta*. 897:53–61.
- Thomas A, Thevis M. 2019. Recent advances in the determination of insulins from biological fluids. *Adv Clin Chem*. 93:115–167.
- Thompson CS, Sykes RM, Muddle J, Dashwood MR. 1991. Distribution of ¹²⁵I-labelled insulin-binding sites in peripheral tissues of the normal and diabetic rat: an autoradiographic study. *J Endocrinol*. 128(1): 85–89.
- Tong F, Wu R, Huang W, Yang Y, Zhang L, Zhang B, Chen X, Tang X, Zhou Y. 2017. Forensic aspects of homicides by insulin overdose. *Forensic Sci Int*. 278:9–15.
- Uezono T, Shiono H, Shimizu K, Ogawa K, Saito O, Yoshida M, Mizukami H, Matsubara K. 2002. Simultaneous analyses of hypoglycemic agents and C-peptide are essential in a homicide case with the combined dosing insulin and insulin-releasing drug. *Leg Med (Tokyo)*. 4(1):34–36.
- Van Der Gugten JG, Wong S, Holmes DT. 2016. Quantitation of insulin analogues in serum using immunoaffinity extraction, liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 1378: 119–130.
- Vezzosi D, Bennet A, Fauvel J, Boulanger C, Tazi O, Louvet JP, Caron P. 2003. Insulin levels measured with an insulin-specific assay in patients with fasting hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol*. 149(5):413–419.
- Virally ML, Guillausseau PJ. 1999. Hypoglycemia in adults. *Diabetes Metab*. 25(6):477–490.
- Von Mach MA, Brinkmann C, Hansen T, Weilemann LS, Beyer J. 2002. Differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin lispro and aspart in healthy volunteers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 110(8):416–419.
- Vora J, Cariou B, Evans M, Gross JL, Harris S, Landstedt-Hallin L, Mithal A, Rodriguez MR, Meneghini L. 2015. Clinical use of insulin degludec. *Diabetes Res Clin Pract*. 109(1):19–31.
- Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, Frayn KN, Manley SE, Turner RC. 1999. Within- and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables. *Clin Chem*. 45(4):561–566.
- Winston DC. 2000. Suicide via insulin overdose in nondiabetics: the New Mexico experience. *Am J Forensic Med Pathol*. 21(3):237–240.
- Wong OF, Tsui KL, Kam CK. 2006. A case of acute insulin poisoning. *Hong Kong J Emerg Med*. 13(4):232–234.
- Wong SL, Priestman A, Holmes DT. 2014. Recurrent hypoglycemia from insulin autoimmune syndrome. *J Gen Intern Med*. 29(1):250–254.
- Woo C-Y, Jeong JY, Jang JE, Leem J, Jung CH, Koh EH, Lee WJ, Kim M-S, Park J-Y, Lee JB, et al. 2015. Clinical features and causes of

- endogenous hyperinsulinemic hypoglycemia in Korea. *Diabetes Metab J.* 39(2):126–131.
- World-Health-Organization. 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. WHO/NCD/NCS/9(2):1-69. [accessed 2019 Aug 15]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66040/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Wunder C, Kauert GF, Toennes SW. 2014. Factors leading to the degradation/loss of insulin in postmortem blood samples. *Forensic Sci Int.* 241:173–177.
- Yun HY, Park HC, Kang W, Kwon KL. 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of the effects of glimepiride on insulin secretion and glucose lowering in healthy humans. *J Clin Pharm Ther.* 31(5):469–476.
- Zingg W, Rappaport AM, Leibel BS. 1987. Transhepatic absorption and biliary excretion of insulin. *Can J Physiol Pharmacol.* 65(9):1982–1987.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

VI. PRESENTATION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE

Le sujet de ce travail de recherche s'est articulé autour de trois axes principaux : la détermination des matrices biologiques d'intérêt, majoritairement à partir de la littérature ; le développement de deux méthodes d'analyse des insulines dans les matrices choisies ; et l'application à des cas réels cliniques et post-mortem. Dans un premier temps, les deux premiers axes sont détaillés : le choix des matrices à étudier et les difficultés analytiques rencontrées lors de l'établissement de la méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-MS/HRMS), commune aux liquides et aux tissus. Dans un second temps, à travers deux articles analytiques, les différences de préparation des échantillons sont rapportées en fonction de leur type : fluides ou tissus. Dans ces mêmes articles, des cas authentiques illustrant le développement des méthodes sont présentés.

VII. LES CHALLENGES DU DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

1) Détermination des matrices d'intérêt

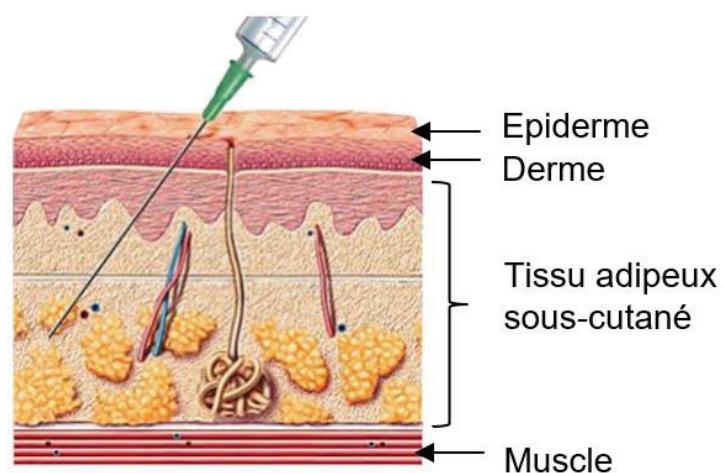
Usuellement, la matrice sanguine est la matrice de référence puisqu'elle est la seule matrice pour laquelle il existe des tables d'interprétation des concentrations en xénobiotiques. En toxicologie médico-légale, l'interprétation reste cependant complexe du fait de l'existence de nombreux phénomènes post-mortem : dégradation, néoformation, redistribution post-mortem. Concernant l'insuline, la mise en évidence d'une intoxication par le biais de l'analyse sanguine est véritablement complexe. En effet, comme évoqué précédemment, la protéine subit une rapide dégradation essentiellement due au phénomène d'hémolyse.

Même si à ce jour, plusieurs méthodes chromatographiques ont été publiées et validées pour déterminer les concentrations en insulines dans le plasma ou le sérum [11, 26, 37, 38, 86-88], seules deux équipes ont publié des résultats de dosage d'insulines dans du sang post-mortem. Les essais mis en œuvre étaient soit dédiés aux analyses cliniques [11] ou bien n'avaient pas fait l'objet d'une validation publiée [12]. Ainsi, à notre connaissance, aucune étude de quantification des insulines n'a été validée à partir d'échantillons sanguins post-mortem. Si la détermination des insulines dans le sang semble difficile sur le plan analytique, elle l'est également d'un point de vue pratique. En effet, dans certains cas, des cadavres sont retrouvés longtemps après le décès (plusieurs jours à plusieurs années), en état de putréfaction avancée ou bien carbonisés. La recherche de la cause d'un décès est parfois même demandée après

que le corps ait subit des soins d'embaumement. Dans toutes ces circonstances, le sang n'est plus disponible ou plus exploitable. Comme évoquées dans la revue de la littérature, d'autres matrices peuvent être utilisées pour rechercher la présence d'insuline. Les matrices les plus communément prélevées sont l'urine, la bile et l'HV. Concernant l'HV, pour détecter des valeurs physiologiques ou thérapeutiques, les limites de détection (LDD) à atteindre sont très faibles ($< 0,02 \text{ ng/mL}$). Dans les deux autres matrices, les insulines sont majoritairement présentes sous forme de métabolites, pour la plupart inconnus. Ainsi, l'analyse tissulaire semblait plus pertinente.

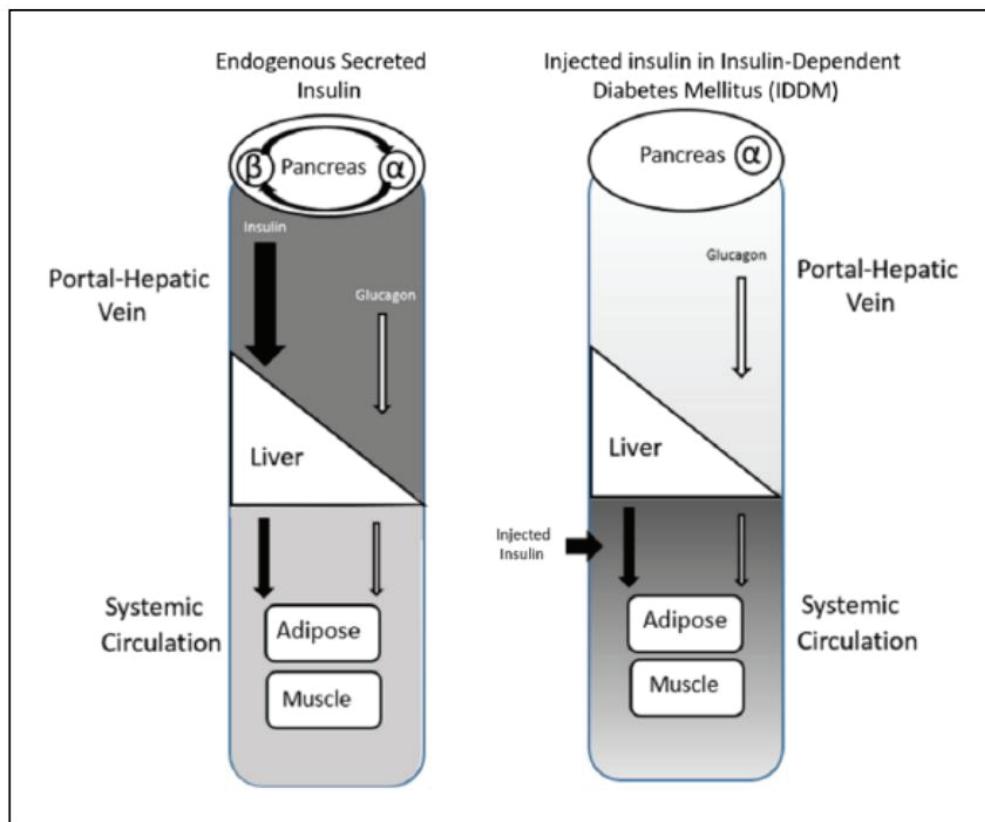
L'injection sous-cutanée d'insulines étant la voie d'administration la plus répandue (Figure 9), il apparaissait évident de s'intéresser au site d'injection. En effet, il contient les insulines sous forme de dépôts dus à leur cristallisation post-injection. Par conséquent, la quantité en insulines dans cette matrice est importante même si elle dépend de nombreux paramètres (dose/type administré, délai injection/prélèvement, etc...). De plus, l'analyse du site d'injection constitue une information importante puisqu'elle permet de déterminer le type d'insuline administré. A partir des réservoirs sous-cutanés, la protéine diffuse petit à petit dans l'organisme via la circulation sanguine. Cependant, le mécanisme par lequel l'insuline rejoint la circulation sanguine a été jusqu'alors peu documenté. Il est possible que l'hormone pénètre dans la circulation sanguine via la circulation lymphatique [89].

Figure 9 : Aperçu des couches de la peau jusqu'au muscle et représentation d'une administration sous-cutanée



Suite à une administration exogène, l'insuline est délivrée dans la circulation artérielle et est distribuée dans tout l'organisme avant de subir un effet de premier passage hépatique. Les tissus exposés au sang ayant la plus forte concentration en insulines et pouvant donc présenter un intérêt médico-légal sont les reins, les muscles et le tissu adipeux [89-91] (Figure 10). Le foie, quant à lui, est exposé au sang le moins concentré en insulines administrées, comparé à l'insuline sécrétée physiologiquement qui subit un effet de premier passage hépatique dans sa totalité [92]. Néanmoins, avec le rein, il constitue un échantillon intéressant, puisqu'ils sont les sites de clairance principaux. Afin de constituer des réserves, le glucose est stocké sous forme de glycogène dans le foie et le muscle particulièrement. Ce phénomène de glycogénogénèse place le tissu musculaire à la troisième place des sites d'intérêt [18]. Dans le contexte médico-légal, cet intérêt est d'autant plus justifié puisque la stabilité de l'insuline a été démontrée dans des milieux acides [93]. Or, de l'acide lactique est relargué à la suite du décès dans le muscle, ce qui laisse suggérer que l'insuline pourrait être mieux conservée dans cette matrice [94].

Figure 10 : Schéma de transport de l'insuline après sécrétion endogène ou administration sous-cutanée [95]



Plus les compartiments sanguins (veine portale hépatique / circulation systémique) sont grisés plus la concentration en insuline est élevée.

La recherche des insulines en post-mortem a déjà été étudiée dans de multiples tissus : site d'injection [7, 26, 47, 60, 61, 65, 71, 76, 96, 97], rein [26, 61], foie [26, 61], cerveau [26, 61], muscle [26], poumon [26], myocarde [26], et pancréas [47].

Pour les travaux présentés ici, le choix a été fait d'étudier particulièrement le foie, le cortex rénal, le muscle squelettique et le site d'injection. L'intérêt pour le rein et le muscle a été confirmé récemment par l'identification formelle par LC-MS/HRMS de l'analogue lispro, dans ces matrices dans un cas d'intoxication mortelle [26]. Lors de la même étude, l'analyse du poumon et du myocarde n'a pas mis en évidence l'analogue recherché. Aucune étude particulière n'a été reportée dans la littérature concernant ces deux matrices. Elles ne présentent à priori pas de grand intérêt. Concernant le cerveau et le pancréas, ces deux organes subissent une rapide autolyse après le décès, ce qui limite fortement leur intérêt [63] .

POINTS CLÉS

- ❖ La matrice sanguine est la matrice de référence en toxicologie mais elle est parfois altérée ou indisponible.
- ❖ L'analyse tissulaire est une alternative intéressante à l'analyse sanguine.
- ❖ Le site d'injection est un réservoir sous-cutané d'insulines exogènes.
- ❖ Suite à une administration sous-cutanée les tissus exposés à la plus forte concentration en insulines sont le rein, le muscle et le tissu adipeux.
- ❖ Le foie et le rein sont les sites de clairance principaux des insulines.

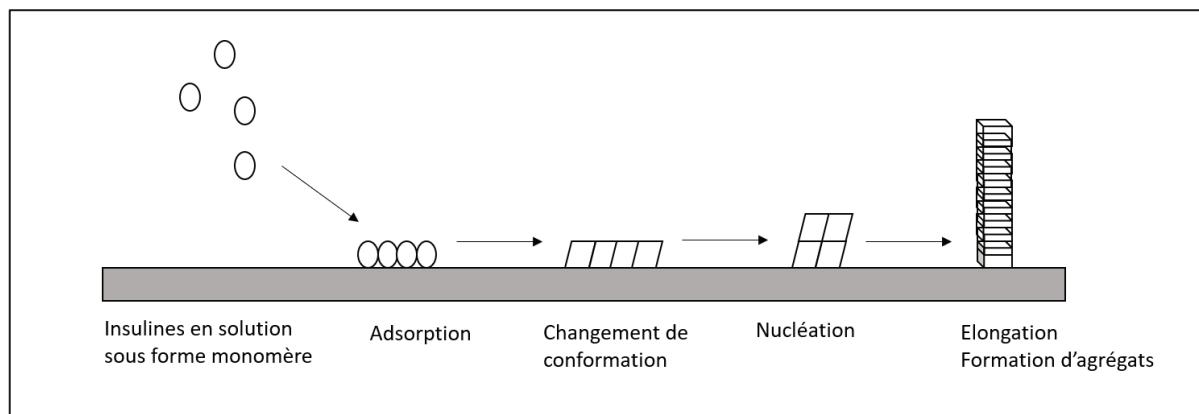
2) Adsorption/Agrégation : deux phénomènes à limiter

L'insuline se présente sous des formes multiples (monomère, dimère, hexamère, multi-hexamère) en fonction de sa concentration, de la présence de sels et du pH. Cette propriété complexifie le développement de méthodes d'analyse. Une solution en insulines dont la concentration est faible ($<0,5 \text{ mg/mL}$) est majoritairement composée de monomères [98]. Sous cette forme, les insulines présentent des groupements hydrophobes orientés vers l'extérieur de la protéine. Ils interagissent avec les groupements des matériaux utilisés (vials, pointes de pipettes, tubes). En effet, ces consommables majoritairement composés de plastique de type polypropylène ou de verre (borosilicaté ou sodo-calcique) présentent à leur surface des groupements également hydrophobes conduisant à des interactions de Van der Waals entre l'insuline et le matériau. C'est le phénomène d'adsorption.

L'interaction entre les monomères et la surface hydrophobe entraîne des répulsions électrostatiques encore non-élucidées, mais dépendantes du type de surface. Ces répulsions engendrent un changement de conformation des monomères de la forme hélicoïdale alpha vers le feuillet bêta [99, 100]. Par la suite, les monomères en solution vont s'assembler aux monomères adsorbés pour former un noyau. C'est la nucléation : première étape de l'agrégation. A partir de ce noyau, une fibre peut s'allonger par l'addition successive de monomères individuels : c'est l'étape d'élongation ou de croissance menant à la formation d'agrégats linéaires inactifs (Figure 11). Ce phénomène peut se dérouler en quelques minutes ou quelques heures en fonction du pH de la solution ou de la température. Dans le cas des insulines à action lente, détémir et dégludec, le groupement d'acide gras en bout de chaîne B favorise d'autant plus l'adsorption car les interactions hydrophobes sont augmentées [101].

Pour une concentration d'insulines plus élevée ($>0,5 \text{ mg/mL}$), les formes monomères, dimères et hexamères sont représentées simultanément. Sous leur forme dimère ou hexamère, les insulines présentent des groupements hydrophobes orientés vers l'intérieur de la protéine, rendant le complexe totalement polaire [101]. La couche de monomères adsorbée se formera de la même manière mais sera moins dense et l'agrégation sera moindre car les formes dimères et hexamères ne s'y assembleront pas [102].

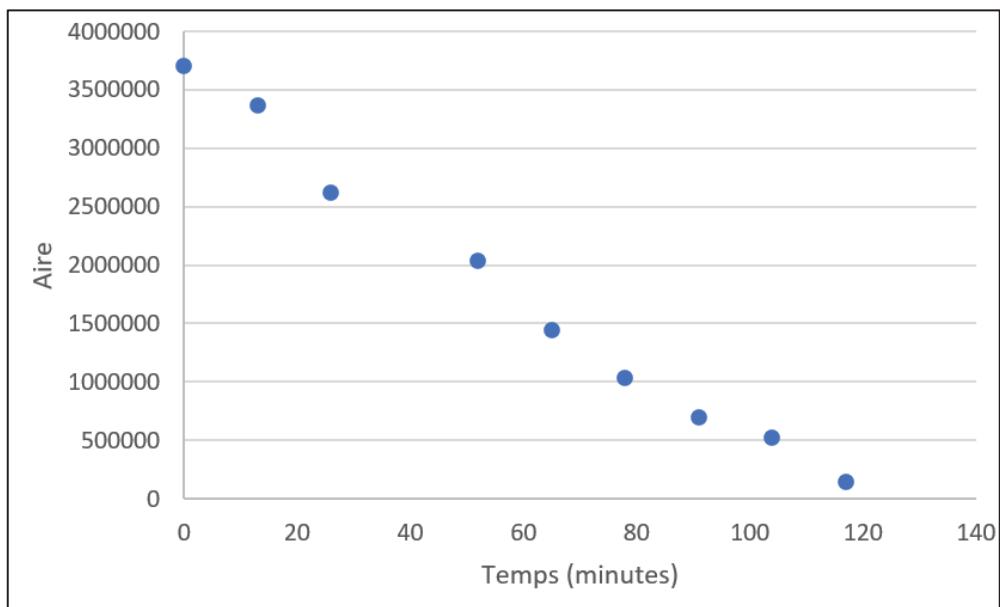
Figure 11 : Schéma d'adsorption et agrégation de l'insuline en solution (inspirée de [99, 100])



Lors du développement de la méthode d'analyse, ce problème d'adsorption s'est présenté. En effet, une diminution progressive de l'aire du pic chromatographique de l'insuline humaine a été observée dès quelques minutes suite à des injections successives d'une même solution (200 ng/mL) (Figure 12). Afin de limiter ce phénomène, différents tests ont été effectués à partir de données de la littérature. D'après Goebel-Stengel, l'utilisation de polypropylène pour l'analyse de l'insuline est fortement déconseillée [103]. Plusieurs études ont rapporté que l'utilisation de protéines de poids moléculaire plus élevé que l'insuline, telle que l'albumine humaine ou bovine, limite l'adsorption par effet de compétition spatiale [103, 104]. Les insulines ayant moins d'espace pour s'adsorber en présence d'autres protéines.

L'utilisation de dimethylsulfoxyde (DMSO) a également été rapportée. Ce solvant possède la capacité d'interagir simultanément avec la phase aqueuse par liaisons hydrogènes et avec les protéines par liaisons hydrophobes [105]. La dissolution des peptides est ainsi favorisée tout en limitant l'adsorption. Cependant, la concentration de DMSO doit faire l'objet d'une étude particulière car en concentration trop importante, le solvant entraîne un changement de conformation des protéines en les privant de leur interactions intramoléculaires [106].

Figure 12 : Evolution des aires du pic de l'insuline humaine en fonction du temps (minutes) d'une solution à 200 ng/mL (Eau/ACN 97 :3 v/v) dans un insert en verre



Les résultats des tests expérimentaux réalisés pour cette étude sont répertoriés dans le Tableau 1. Le critère de stabilité des insulines reposait sur le suivi de la variation de l'aire du pic chromatographique de l'ion pseudo-moléculaire (mode SIM).

L'augmentation de la part organique dans le solvant d'injection (10% d'acétonitrile (ACN)) et l'ajout d'un faible pourcentage de plasma (0,02 %) ont limité l'adsorption des insulines, améliorant ainsi la stabilité à plus de 4 h. En revanche, ni l'utilisation de vials silanisés, ni l'ajout d'un pourcentage de DMSO (testé entre 1 et 10 %) n'ont eu d'impact sur la stabilité des protéines.

Au fur et à mesure de l'avancée des travaux et de la possibilité d'augmenter la sensibilité, l'ajout de plasma s'est avéré limitant car malgré le faible pourcentage ajouté, l'apport de composés interférents reste important. Ces interférents élués en fin de run chromatographique ont largement impacté la détection de l'insuline détémir, éluée le plus tardivement. De plus, cet ajout encrassait particulièrement la source d'ionisation.

L'utilisation d'une plaque d'injection en matériau de type « Low Protein Binding » a été testée puisque ce matériau possède la propriété de limiter l'adsorption des protéines. Ainsi, la stabilité de la concentration en insuline a été prolongée à 5 h minimum. En remplaçant l'ensemble des consommables de la technique (pointes de pipettes, tubes, plaque d'injection), la LDD de l'insuline humaine dans le plasma a été améliorée passant à technique d'extraction équivalente de 5,0 ng/mL à 1,0 ng/mL.

Tableau 1 : Evaluation de la stabilité des insulines. Récapitulatif des tests expérimentaux par variation des matériaux et de la composition du solvant de dilution/injection à partir d'injections directes d'insulines.

Insuline et Concentration	Matériau des consommables	Composition solvant d'injection	Résultats
[HI] 200 ng/mL	Insert en verre SDC	3 % ACN	Stabilité < 13 min
[HI] 200 ng/mL		5 à 20 % ACN	26 min < Stabilité < 2 h
[HI] 200 ng/mL		10% ACN 5 % DMSO	26 min < Stabilité < 2 h
[HI] + [Détémir] 200 ng/mL		10 % ACN 0.01 % plasma 0.02 % plasma 0.03 % plasma 0.05 % plasma	Stabilité > 4 h Stabilité > 4 h Stabilité > 4 h – détection détémir interférée Stabilité > 4 h – détection détémir interférée
[HI] 200 ng/mL		10 % ACN	Stabilité < 2 h
[HI] 200 ng/mL	Insert en verre silanisé	10 % ACN 0.05% plasma	Stabilité > 3 h
[HI]+ [Analogues] 200 ng/mL	Consommables Low Protein Binding	20 % ACN	Stabilité = 5 h

HI : Insuline humaine ; SDC : sodocalcique

POINTS CLÉS

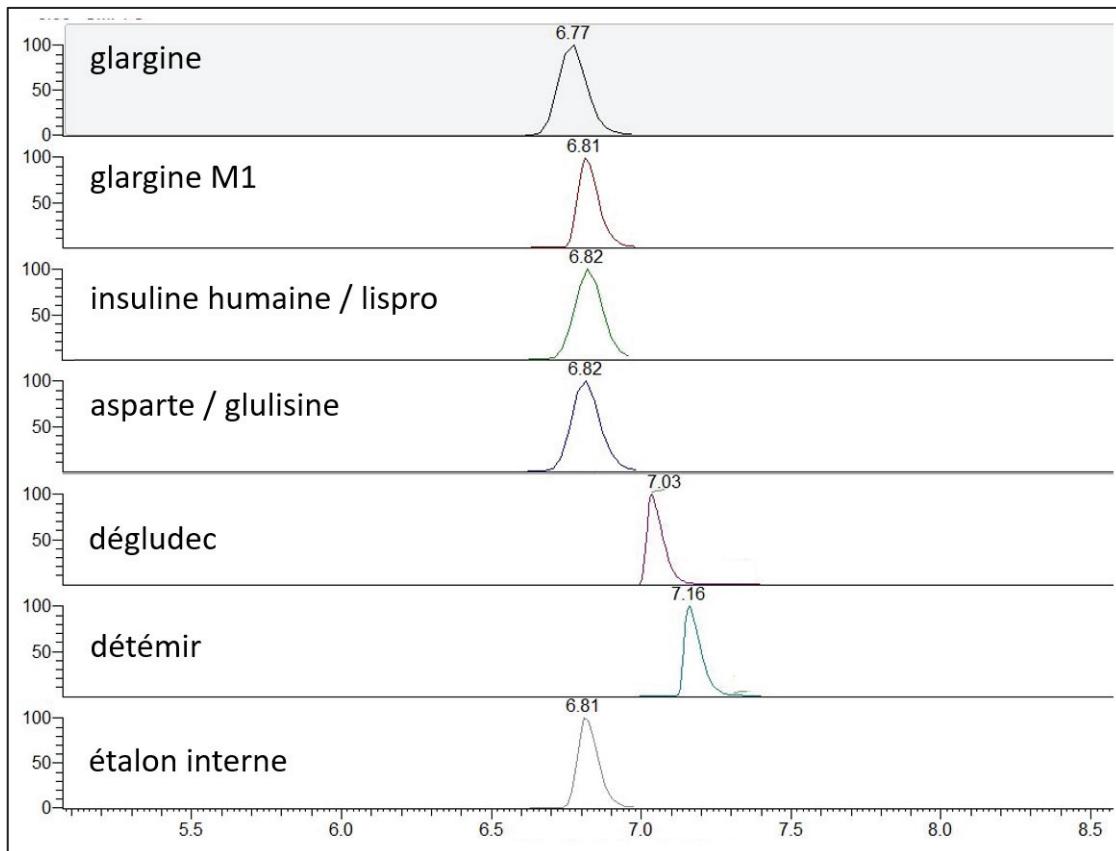
- ❖ L'insuline existe sous différentes formes en fonction de sa concentration, de la présence de sels et du pH : monomères, dimères, hexamères.
- ❖ L'adsorption et l'agrégation des insulines est favorisée par leur forme monomérique.
- ❖ La stabilité des insulines dans l'extrait final a été améliorée par l'augmentation du pourcentage d'ACN dans cet extrait et par l'utilisation de consommables Low Protein Binding.

3) Analyse par LC-MS/HRMS

Le développement de la méthode d'analyse s'est particulièrement concentré sur l'optimisation de la détection par spectrométrie de masse haute résolution de type Orbitrap. Concernant la partie chromatographique, la méthode présentée dans les articles suivants est inspirée de plusieurs méthodes d'analyse des insulines précédemment publiées [35, 75, 107, 108]. La colonne LunaOmega PS™ C18 (2.1 x 150 ; 1.6µm) de Phenomenex™ a été choisie puisque les pics chromatographiques obtenus présentaient un phénomène de traînée de pic limité. Les phases mobiles composées d'eau et d'ACN, acidifiées par 0,1% d'acide formique ont été sélectionnées, également d'après la littérature et plusieurs tests expérimentaux effectués sur des solutions pures d'insulines et des extraits d'échantillons biologiques. Le temps de run total pour une analyse est de 13 min. Les paramètres de volume d'injection, de température de colonne, de débit de phase mobile et de composition de l'extrait final ont fait l'objet d'une optimisation particulière et sont présentés dans l'article analytique n°1 (page 70). L'insuline humaine et ses analogues à action rapide présentant les mêmes propriétés physico-chimiques (structures proches), leur séparation chromatographique n'a pas été obtenue dans les conditions utilisées (Figure 13), de même que pour de précédentes études [35, 75, 107, 108].

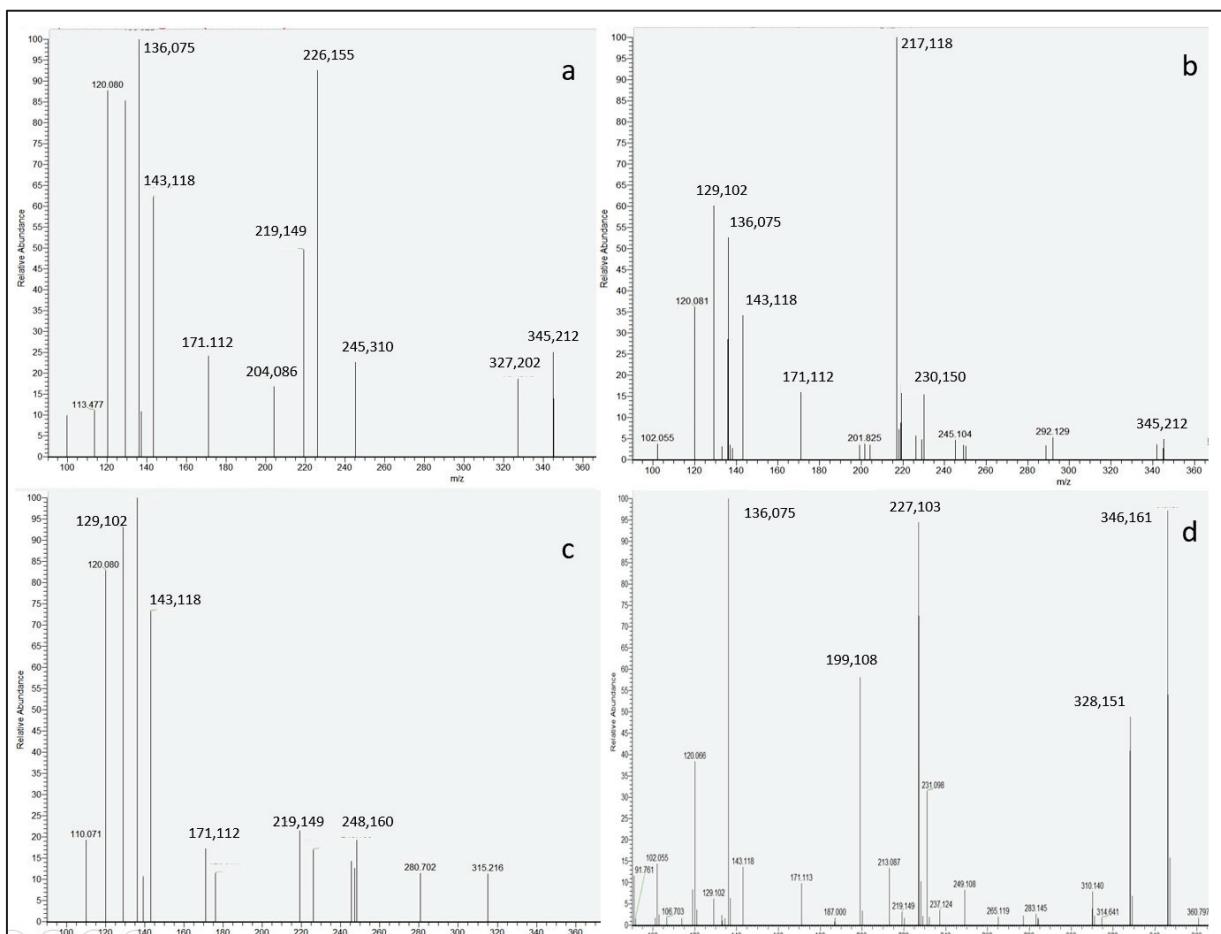
Concernant la détection, les paramètres de la source ont été optimisés en fonction du débit et de la composition de la phase mobile que nous avions déterminés. Deux modes de détection ont été utilisés : SIM et PRM. Avec le premier, une LDD plus faible a été atteinte. Néanmoins, bien que les masses moyennes des insulines glulisine et asparte soient différentes (respectivement 5823 Da et 5826 Da), leurs précurseurs chargés 5 fois ont des masses très proches : respectivement m/z 1165,538 et m/z 1166,131 ; ce qui rend leur distinction impossible avec ce mode de détection. Une résolution minimale de l'appareil de 400 000 FWH est requise pour distinguer ces deux insulines, or le spectromètre de masse haute résolution de type Orbitrap utilisé atteint une résolution maximale de 140 000 FWH [32]. De plus, les insulines humaine et lispro ne peuvent être distinguées l'une de l'autre par le mode SIM car elles partagent la même masse molaire de 5807 Da. Le mode PRM a alors été utilisé afin de distinguer ces quatre insulines à partir de leurs ions produits spécifiques (Figure 14).

Figure 13 : Chromatogramme représentant l'ensemble des insulines analysées et leur temps de rétention (détection en mode SIM). Les conditions d'analyses sont détaillées dans l'article analytique n°1.



La mise au point de la détection a débuté par l'infusion de chaque insuline dans les mêmes conditions de composition de phase mobile et de débit que lors de leur élution de la colonne chromatographique. Dans le but d'observer le maximum de points par pic chromatographique sur toute la gamme de concentration souhaitée, la résolution a été fixée à 35 000 FWH en mode SIM et à 17 500 FWH en mode PRM. Les ions précurseurs multichargés les plus abondants ont été sélectionnés. Il s'agit principalement des précurseurs protonés 5 fois, excepté pour l'insuline glargin pour laquelle le précurseur le plus abondant est celui protoné 6 fois. Quel que soit le mode de détection, SIM ou PRM, l'Automatic Gain Control Target (AGC Target) et le Maximum Ion injection Time (MIT) ont ensuite été optimisés par l'injection successives de solutions d'insulines et d'extraits d'échantillons biologiques dans le but d'obtenir la meilleure qualité de spectre et le maximum de points par pic.

Figure 14 : Spectres d'ions produits (mode PRM) des insulines : a) humaine (précurseur m/z 1162,533) ; b) lispro (précurseur m/z 1162,533) ; c) asparte (précurseur 1165,333) ; d) glulisine (précurseur 1165,333)



POINTS CLÉS

- ❖ La séparation chromatographique des insulines à action rapide n'a pas été obtenue dans les conditions utilisées.
- ❖ L'analyse en mode PRM était indispensable pour distinguer les insulines humaine/lispro et glulisine/asparte.

4) Immunopurification

Associée à la spectrométrie de masse, l'immunopurification est une technique d'analyse adaptée à l'identification et à la quantification des protéines. Basée sur les réactions antigène-anticorps, l'immunopurification a été recommandée pour sa sélectivité par M. Thevis et A. Thomas [10] pour l'analyse des insulines notamment dans un cadre médico-légal. En effet, elle cible les composés d'intérêt en réduisant l'impact des interférences des composés endogènes. Deux types de support pour l'immunopurification sont principalement utilisés pour les applications à l'insuline : les puits coatés [33, 109] et les billes magnétiques [11, 38, 41, 108, 110]. En ce qui concerne les billes magnétiques, leur usage n'est pas particulièrement recommandé pour des échantillons post-mortem. En effet, une étape de précipitation est requise pour ce type d'échantillons afin d'éliminer les interférents matriciels. Les solvants utilisés dans la majorité des cas sont le méthanol (MeOH) et l'ACN. Or il a été observé que les billes magnétiques s'agglutinent avec le précipité lors de cette étape de précipitation [11]. Pour les applications présentées dans les articles suivants, des puits en plaque Iso-Insulin ELISA de la marque Mercodia ont été utilisés. Ils ont été choisis car les anticorps greffés interagissent avec l'insuline humaine et l'ensemble de ses analogues.

VIII. ARTICLE 1

Développement et validation d'une méthode de quantification de l'insuline humaine et de ses analogues synthétiques dans le plasma et le sérum post-mortem par LC-MS/HRMS

L'analyse de l'insuline humaine et de ses analogues synthétiques est de plus en plus demandée à des fins de surveillance clinique, de lutte antidopage, mais également dans le cadre médico-légal. En effet, les analogues de l'insuline peuvent être détournés à des fins suicidaires ou criminelles. Les conditions de prélèvement et de stockage, ainsi que le phénomène de dégradation, rendent les échantillons de sérum post-mortem difficiles à analyser et, par conséquent, le nombre de décès dont la cause est l'administration exogène d'insuline est sans aucun doute sous-estimé. Cependant, avec les progrès technologiques récents et le développement de nouvelles techniques d'extraction, notamment dans le domaine de la lutte antidopage, la détection des insulines dans les échantillons post-mortem semble réalisable.

L'étude présentée décrit la première méthode quantitative validée pour l'analyse de l'insuline humaine et de ses six analogues (lispro, asparte, glulisine, glargin, détémir et dégludec) dans le plasma et le sérum post-mortem. Divers processus d'extraction, à savoir précipitation + extraction en phase solide (SPE), filtration + SPE, précipitation + SPE + immunopurification et filtration + immunopurification, ont été testés pour évaluer la LDD la plus faible pour tous les analogues cibles. La préparation d'échantillon sélectionnée consiste en une étape de filtration suivie d'une extraction par immunopurification pour le plasma. Pour le sérum post-mortem, une première étape de précipitation a été ajoutée pour éliminer les interférences matricielles. Les extraits ont été analysés par LC-MS/HRMS.

La méthode a été validée en termes de linéarité, précision, justesse, rendement d'extraction, effet-matrice, dilution et contamination. La limite de quantification (LDQ) dans le plasma est de 0,5 ng/mL pour l'insuline humaine et les insulines à action rapide, de 1,0 ng/mL pour l'insuline glargin, de 2,5 ng/mL pour l'insuline dégludec et de 10 ng/mL pour l'insuline détémir. Deux types de sérum post-mortem ont été étudiés en fonction du délai post-mortem (PMI) : inférieur ou supérieur à 48 h. Les LDQ obtenues sont les mêmes pour chaque analogue, indépendamment du PMI : 1,0 ng/mL pour l'insuline humaine et les insulines à action rapide, 1,0 ng/mL pour l'insuline glargin, 2,5 ng/mL pour l'insuline dégludec et 10 ng/mL pour l'insuline détémir. À la concentration de la LDQ, pour toutes les insulines et tous les types d'échantillons, la justesse a été mesurée entre 70 et 130 % et la précision a été évaluée à un pourcentage inférieur à 30 %. La méthode validée a été appliquée à cinq patients participant à une surveillance thérapeutique de leur traitement aux insulines ainsi qu'à sept cas post-mortem.



Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

C. Bottinelli ^{a,*}, R. Nicoli ^b, F. Bévalot ^a, N. Cartiser ^c, C. Roger ^d, K. Chikh ^d, T. Kuuranne ^b, L. Fanton ^{c,e}, J. Guittot ^{f,g}

^a LAT LUMTOX Laboratory, 32 Rue Du 35^{ème} Régiment D'Aviation, 69500, Bron, France

^b Swiss Laboratory for Doping Analyses, University Center of Legal Medicine, Lausanne and Geneva, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Switzerland

^c Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Service of Forensic Medicine, France

^d Biochemistry Laboratory, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, France

^e University of Lyon, UCBL1, Faculty of Medicine Lyon-Est, France

^f Toxicology Laboratory, ISPB Faculty of Pharmacy, University of Lyon, UCBL1, France

^g Pharmacology-Toxicology Laboratory, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Insulin
Liquid chromatography
Mass spectrometry
Post-mortem
Forensic
Validation

ABSTRACT

Analysis of human insulin and its synthetic analogues is increasingly requested for clinical monitoring, for anti-doping purposes, but also for forensic cases. Indeed, insulin analogues may be abused for suicide or homicide – whence their forensic interest. Collection and storage conditions, as well as the phenomenon of degradation make post-mortem serum samples analytically challenging and consequently, the rate of exogenous insulin administration as cause of death is undoubtedly underestimated. However, with recent technological advances and the development of new extraction techniques particularly for anti-doping analyses, detection of insulins in post-mortem samples seems to be achievable. This study describes the first validated quantitative method for analysis human insulin and its six analogues (lispro, aspart, glulisine, glargine, detemir and degludec) in plasma and post-mortem sera. Various extraction processes, namely precipitation + solid phase extraction (SPE), filtration + SPE, precipitation + SPE + immunopurification, and filtration + immunopurification, were assessed to evaluate the lowest limit of detection for all target analogues. The selected sample preparation consists of filtration step followed by immunopurification extraction with an anti-body precoated ELISA plate for plasma. For post-mortem sera, the first step of precipitation was added to remove matrix interferences. The extracts were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), interfaced by electrospray (ESI). The method was validated with respect linearity, precision, accuracy, recovery, matrix effect, dilution and carryover. The limit of quantification (LOQ) in plasma was 0.5 ng/mL for human insulin and rapid-acting insulins, 1.0 ng/mL for glargin, 2.5 ng/mL for degludec and 10 ng/mL for detemir. Two types of post-mortem sera were studied based on the post-mortem interval (PMI): inferior or superior to 48 h. The obtained LOQ were the same for each analogue, independent from the PMI: 1.0 ng/mL for human insulin and rapid-acting insulins, 1.0 ng/mL for glargin, 2.5 ng/mL for degludec and 10 ng/mL for detemir. At the LOQ level, for all insulins and all samples, accuracy was between 70 and 130% and precision inferior to 30%. The validated method was applied to five subjects participating in therapeutic monitoring of insulin and to seven post-mortem cases.

Abbreviations: HI, Human Insulin; PMI, Post-mortem interval; ME, Matrix effect.

* Corresponding author.

E-mail address: c.bottinelli@latlumtox.com (C. Bottinelli).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122047>

Received 1 September 2020; Received in revised form 21 December 2020; Accepted 22 December 2020

Available online 24 December 2020

0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Insulin is a peptide hormone naturally secreted by the beta cells of the islets of Langerhans in the pancreas. Its main action is regulation of carbohydrate metabolism, leading to regulation of blood glucose level [1]. Human insulin (HI) is made up two polypeptide chains, A chain (with 21 amino acids) and B chain (with 30 amino acids), covalently linked by two disulfide bridges. HI and its synthetic analogues are primarily administered to patients with type 1 diabetes, as the pancreas is no longer able to produce insulin. In some cases, injections of insulin or insulin analogues also needed as support treatment for patients with type 2 diabetes. Two types of insulin analogue are available, according to onset and half-life. The first, rapid-acting insulin analogues (aspart, glulisine, lispro), are characterized as “meal-time insulin”, with a peak action period of 60–120 min, and elimination within approximately 4 h. The second type, long-acting insulin analogues (glargine, detemir, degludec), lead to a relatively constant insulin levels for many hours after injection.

Aside from therapeutic use, insulin analogues can be misused in sports as performance-enhancing substances [2,3]. Insulins have been reported to improve intra-cellular storage of glycogen and to exert potential anabolic effects by increasing glucose and amino acid transport into skeletal muscle fibers [4,5]. Since an overdose of insulin can lead to lethal hypoglycemia [6], insulins may also be abused for suicide or homicide – whence their forensic interest [7–12]. Moreover, during authorized medical treatment by insulin, accidental overdose can be an issue. In these situations, identification and quantification of HI and analogues is essential. However, determination of insulins in biological matrices with high levels of proteins is difficult, particularly in post-mortem blood, since cellular degradation and hemolysis may aggravate analytic interference.

Several recent comprehensive reviews described the two most widely used analytical approaches for quantitative analysis of insulins: immunoassay, and separation methods based on coupling liquid chromatography to mass spectrometry (LC-MS) [5,13,14]. Immunoassay has the advantage of using commercially available kits and having a very low limit of quantification, but there are still unsolved problems of specificity. LC-MS has an advantage of good identification capability, being able to analytically distinguish between insulin analogues. Anti-doping and forensic analysis require unambiguous identification of insulins. Recent progress with sample preparation and instrument performance has enabled very high sensitivity. Several chromatographic methods dedicated to insulins analysis in sport drug testing have been described, mostly in urine and some in plasma [15–19]. To obtain high sensitivity and selectivity, various extraction processes have been evaluated, sometimes coupled with protein precipitation [19,20], solid phase extraction (SPE) [19,21], immunopurification using magnetic beads [22,23] or ELISA plate [16], or immunoaffinity chromatography [17,24]. High-tech platforms such as liquid chromatography at nano-scale [23] and high-resolution mass spectrometry (HRMS) [19,23] or MALDI-TOF [25] allow analyses of samples of only few hundred microliters, even for complex matrices such as blood. Some validated chromatographic methods have been described for insulins determination in plasma or serum [7,19,21–23,25,26] but, to the best of our knowledge, there have been no studies to validate LC-MS for insulins quantification in post-mortem blood samples.

In the present study, we developed and validated an LC-MS/HRMS method based on immunopurification and high-resolution orbitrap mass spectrometry to determine HI and six rapid- and long-acting insulin analogues in plasma and post-mortem serum. The focus was on sample preparation and method validation. Several authentic cases, carried out on plasma or post-mortem serum, are also reported, to provide proof of concept for applications in overdose and intoxication.

2. Material and methods

2.1. Solutions and reagents

Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) at HPLC grade, and ammonium formate, ammonium hydroxide solution at 30%, formic acid, and acetic acid were purchased from Sodipro (Echirolles, France). Tween 20 was obtained from Merck (Fontenay-sous-bois, France) and was diluted in phosphate buffer (0.01 M, pH 7) to obtain a concentration of 0.05%. Water was dispensed by a PurelabElga purifier (Veolia Water, Solutions & Technologies, Décines, France). Mercodia Iso-Insulin ELISA immunopurification plates were purchased from Bioconnect (Huissen, Netherlands). SPE microelution well-plates were purchased from Phenomenex (Courtaboeuf, France). Amicon Ultra filters (3 kDa, 500 µL) were obtained from Merck (Fontenay-sous-bois, France). Recombinant Human Insulin, lispro (Humalog), and glargin (Abasaglar) were obtained from Lilly (Neuilly sur Seine, France) and glulisine (Apidra), aspart (Novorapid), detemir (Levemir) and degludec (Tresiba) were purchased from Novo Nordisk (Chartres, France). Porcine insulin was purchased from Merck (Fontenay-sous-bois, France). Pharmaceutical solutions were stored according to the manufacturer's recommendations. Stock solutions were prepared each day, by dilution in water with 2% acetic acid in polypropylene tubes (low protein binding), Eppendorf, Montesson, France) to reach the required concentration. The [$[{}^2\text{H}_{10}\text{Leu}^{B6,B11,B15,B17}]$ -insulin (human) used as internal standard (ISTD) was purchased from Peptanova (Sandhausen, Germany). ISTD solution was prepared at a concentration of 300 pg/µL in distilled water acidified with 2% acetic acid.

2.2. Blood specimens

2.2.1. Samples from clinical patients

Total blood from clinical patients was collected in heparinized tubes and immediately centrifuged for 10 min at 2500 g. These samples are referred to as “plasma” throughout the article. In line with French legislation relating to research with human subjects (decree No. 2017–884 of May 9, 2017), samples were anonymized and no identifying data were available to the researchers involved in the study. Samples for validation were obtained from healthy non-diabetic non-fasting patients and corresponded to an excess plasma taken to monitor biochemistry parameters. Real samples to demonstrate method application were obtained from diabetic patients in the framework of therapeutic management in a hospital endocrinology department.

2.2.2. Samples from deceased subjects

During autopsy, blood samples were collected in dry tubes and immediately centrifuged in polypropylene tubes (low protein binding) for 10 min at 2500 g. These samples are referred to as “post-mortem sera” throughout the article. Post-mortem blood samples for validation assays were obtained from subjects not known to be diabetic, for whom blood matrix was collected for toxicological analyses. As the appearance of post-mortem blood may be more or less altered and that this alteration can have analytical impact [14,27], the limit of quantification (LOQ) was studied in two post-mortem samples: one using blood samples from cadavers with post-mortem interval (PMI) less than 48 h (PMI < 48 h samples), and one using blood samples from cadavers with a PMI more than 48 h (PMI > 48 h samples). This interval of 48 h was chosen because it was the minimum time between death and the reception of samples at the lab after autopsy.

Blank samples were stored in polypropylene tubes for 24 h at room temperature, in order to degrade endogenous HI [28–30]. Absence of signal from HI was checked on LC-MS/HRMS analysis. Samples were then stored at –20 °C until use for the validation process.

2.3. Sample preparation: workflow optimization

Five workflows for sample preparation were tested (Fig. 1). The lowest limit of detection (LLOD) that could be reached from blood samples was used as selection criteria. In a first step, experiments were performed on plasma. LLOD was determined in two distinct experiments using samples spiked with increasing concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 30.0, 60.0 and 100 ng/mL) for each insulin. LLOD was the lowest concentration at which targeted analytes were detected using chromatographic peak from extracted masses in SIM mode with retention time difference less than 0.05 min with respect to the reference. In a second step, experiments were performed on post-mortem sera using the two most efficient workflows selected in the first step.

2.4. LC-MS/HRMS analysis

LC separation was performed on an UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). The LC system was equipped with PS C18 precolumn (internal diameter 2.1 mm) and a Luna PS C18 (150 mm × 2.1 mm × 1.6 µm particle size) used as analytical column (Phenomenex, Le Pecq, France). The mobile aqueous phase (A) was water and the organic phase (B) was ACN, both acidified with 0.1% formic acid. The mobile phase flow rate was 0.25 mL/min and the column temperature was kept at 40 °C. The gradient started at 0% of B for 2 min, raised to 90% in 3.5 min and held 1 min. Phase B then rose to 98% in 0.5 min and returned to 3% in 0.5 min and then 0% in 1.5 min for 4 min to equilibrate the column before the next injection. Samples were loaded on column by injecting 25 µL. A Q-Exactive™ Plus mass spectrometer (ThermoFisher, Courtaboeuf, France) was used to detect the target compounds. Ionization in positive mode was performed at a spray voltage of 3.5 kV. The temperature of the transfer capillary was set to 300 °C. The gas supply consisted of nitrogen. Two methods were developed. In the first, the instrument was acquiring in full scan mode (m/z = 400–1,500, resolution = 35,000 FWHM) and in Single Ion

Monitoring mode (SIM; resolution = 35,000 FWHM) to detect all insulins. To distinguish aspart from glulisine and lispro from HI, a second method, based on full scan mode (m/z = 400–1,500, resolution = 17,500 FWHM) and on Parallel Reaction Monitoring (PRM) acquisition, was also performed (resolution = 17,500 FWHM). Both methods were linked to an inclusion list consisting of the accurate mass-charge ratio of the targeted compounds (Table 1). The quadrupole settings were set to an isolation window of 2 m/z for SIM and PRM modes. For analysis in SIM mode, signals of the five main m/z ratios from isotopic distribution were extracted and summed. In PRM mode, one or two transitions were used to formally identify lispro, HI, glulisine and aspart. Metabolites from glargin (M1; DesB31-32 glargin and M2; DesB30-32 glargin) were also added to the detection method, because glargin has an extensive metabolism, usually implying detection of M1 rather than glargin [31]. Table 1 presents detection parameters for each insulin.

2.5. Method validation

Validation was performed on plasma samples from clinical patients and on post-mortem sera, distinguishing PMI >48 h and PMI <48 h. HI, lispro, aspart, glulisine, glargin, detemir and degludec were included in the full validation process. As porcine insulin is available for certain professionals, such as veterinarians, and could potentially be used in a forensic context, its LOD was assessed in plasma and post-mortem serum. For plasma validation, standards were spiked using: i) Mix 1 containing the three analogues (lispro, glulisine and glargin) at 0.5 (except glargin), 1.0, 2.5, 5.0 and 10 ng/mL, or ii) Mix 2 containing HI and aspart, both at 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 ng/mL. For post-mortem serum validation, the standard at 0.5 ng/mL for Mix 1 and Mix 2 was not included in the calibration. Degludec and detemir were analyzed separately at 2.5, 5.0, 10, 30, 60 ng/mL and 10, 30, 60 ng/mL, respectively, whatever the matrix (plasma or serum). This distribution allowed antibody saturation threshold not to be reached during the immunopurification step (sum of concentrations of the upper standards not

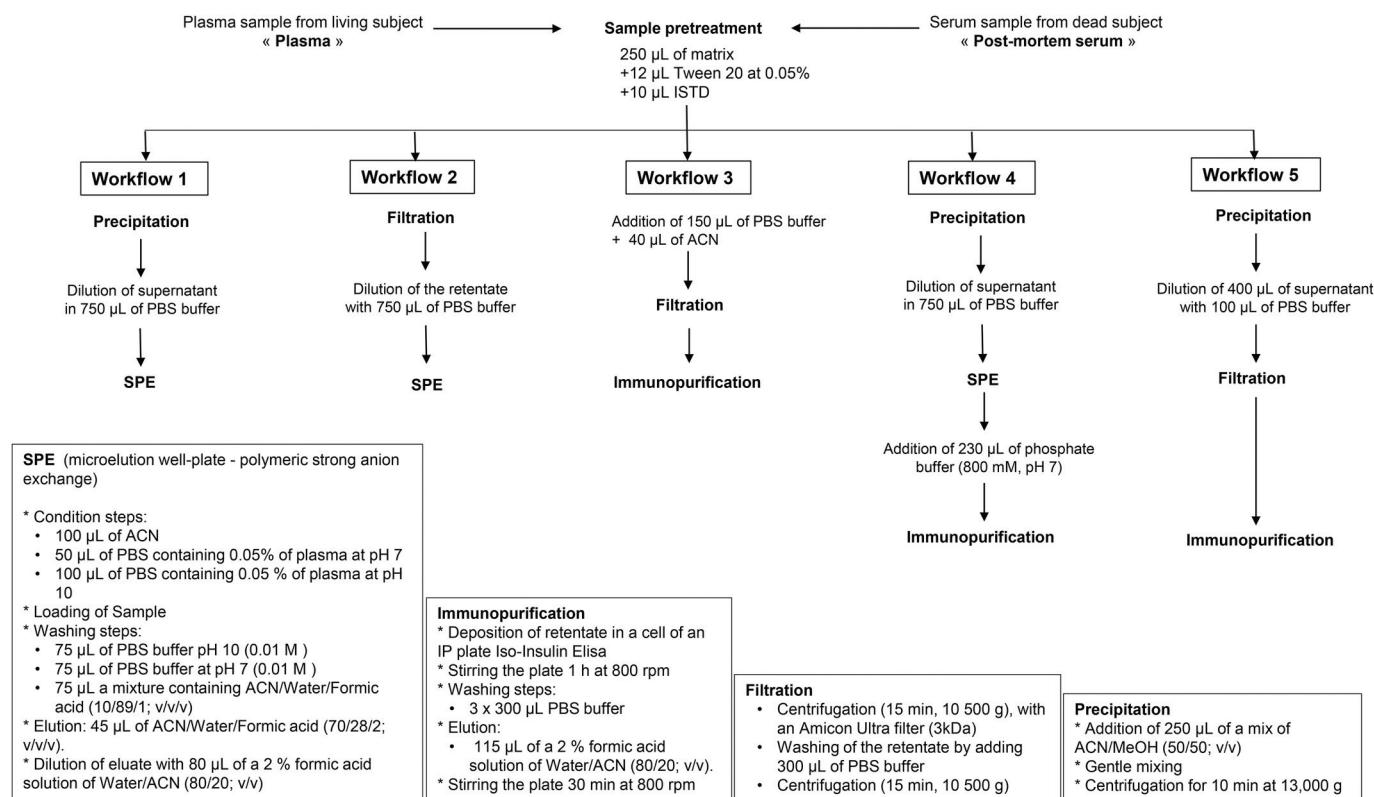


Fig. 1. Workflows of the five procedures tested for the determination of insulins in plasma and post-mortem sera samples.

Table 1
Detection parameters for each insulin.

Insulins	Molecular weight (Da)	Charge state	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Extracted <i>m/z</i> in fullscan/SIM mode ^b	Characteristic product ions for PRM mode (<i>m/z</i>)	Normalized Collision energy
Human	5807	[M+5H] ⁵⁺	1162.533	1161.944; 1162.142; 1162.342; 1162.542; 1162.742	226.154 ^a	30
Lispro	5807	[M+5H] ⁵⁺	1162.533	1161.944; 1162.142; 1162.342; 1162.542; 1162.742	217.118 ^a	30
Glulisine	5823	[M+5H] ⁵⁺	1165.538	1164.939; 1165.141; 1165.340; 1165.541; 1165.737	346.160 ^a 328.149	30
Aspart	5826	[M+5H] ⁵⁺	1166.131	1165.538; 1165.736; 1165.936; 1166.135; 1166.336	248.161 ^a 249.159	30
Glargine	6062	[M+6H] ⁶⁺	1011.316	1011.147; 1011.316; 1011.482; 1011.647; 1011.814	Not used	30
Degludec	6104	[M+5H] ⁵⁺	1221.777	1221.179; 1221.380; 1221.583; 1221.782; 1221.982	Not used	30
Detemir	5917	[M+5H] ⁵⁺	1184.368	1183.975; 1184.174; 1184.372; 1184.574; 1184.775	Not used	30
ISTD	5848	[M+5H] ⁵⁺	1170.600	1169.989; 1170.189; 1170.390; 1170.589; 1170.787	Not used	30
Glargine metabolite M1	5751	[M+5H] ⁵⁺	1151.134	1150.542; 1150.741; 1150.934; 1151.139; 1151.331	Not used	30
Glargine metabolite M2	5646	[M+5H] ⁵⁺	1130.200	1130.200	Not used	30
Porcine	5777	[M+5H] ⁵⁺	1156.337	1156.139; 1156.336; 1156.535; 1156.731; 1156.929	Not used	30

^a Product ions used for quantification.

^b For quantification, signals of the five main *m/z* ratio were extracted and summed.

exceeding 70 ng/mL); also, to determine unambiguously the quantitative data of the method, HI and lispro were not spiked in the same samples as glulisine and aspart, since quantification of each associated compound was more difficult (Table 1). The validation process included study of linearity, precision, accuracy, recovery, matrix effect (ME), dilution and carryover. Linearity was assessed by repeating the calibration curve on three different days. Internal calibration curves were constructed by plotting the ion abundance peak area ratio (HI or analogue/ISTD) as a function of plasma HI or analogue concentration. The same ISTD ([²H₁₀]Leu^{B6,B11,B15,B17}-insulin (human)) was used for all insulins at a final concentration of 12 ng/mL. Accuracy and precision were assessed from the three replicates of each calibration standard. LOQ was chosen as the concentration of the lowest calibration standard. Samples were repeated five times to assess LOQ with an acceptable limit of variation (within 30% for both precision and accuracy). Extraction recovery was studied at 20 ng/mL for detemir and degludec and at 5 ng/mL for the other insulins. Recovery experiments were performed in triplicate on three different days from three different pools of each matrix. Extraction efficiency was determined by comparing the mean peak area ratio (HI or analogue/ISTD) from three spiked samples obtained through the complete procedure of extraction with those obtained from blank matrix sample spiked after extraction. ME was evaluated by comparing signal intensities from three blank samples spiked at the same concentration as for the extraction recovery assessment after extraction with those obtained from injection of neat standard solutions of the same amount dissolved in the injection solvent (2% formic acid solution of water/ACN (80/20; v/v)). The dilution process (dilution factor 1/10) was validated from five spiked samples (300 ng/mL for degludec and detemir and 50 ng/mL for all other insulins) of plasma and post-mortem sera by performing the extraction process with only 25 µL matrix and 225 µL phosphate buffer instead of 250 µL matrix. To take into account the new ratio matrix/buffer and therefore the modification of the matrix effect, a new calibration curve was prepared under the same conditions using only 25 µL of each standard. The presence of potential interference from endogenous compounds was also assessed by analyzing 10 blank samples from untreated patients. Potential interference between insulins were tested by separately injecting insulin solutions at 50 ng/mL. Carryover was evaluated by injecting the highest calibration standard (10 or 60 ng/mL), followed by injection of 10 µL mobile phase.

2.6. Applications

Five samples were obtained from hospitalized patients with suspicion of unintentional overdose. Peripheral and/or cardiac blood collected during autopsy of seven cases for which insulin intoxication was suspected were also analyzed.

3. Results

3.1. LC-MS/HRMS analysis

Inspired by previous published methods for insulins analysis [24, 32–34], the liquid chromatography method was developed by testing two columns: HSS Acuity C18 (2.1 mm × 150 mm; 1.8 µm) from Waters™ and LunaOmega PST™ C18 (2.1 mm × 150 mm; 1.6 µm) from Phenomenex™. Acetonitrile and formic acid were selected and several experiments were performed on neat standard solutions and on extracted samples to determine optimal column temperature (from 20 to 50 °C), mobile phase flow rate (from 150 to 300 µL/min), injection volume (from 10 to 25 µL) and composition of the final extract, by varying percentage ACN (from 0 to 40%). Gradient was optimized to improve separation of insulins from matrix interferences, in particular for the analogues detemir and degludec. The best results were obtained with the Luna Omega PST™ C18 column, notably with lower peak tailing for all insulins. With the selected chromatographic conditions, retention time was 6.75 min for glargine, 7.05 min for degludec, 7.16 min for detemir, and 6.82 min for HI, lispro, glulisine, aspart, porcine, glargin metabolites M1 and M2 and ISTD (Supplemental data). The spectroscopic method detailed above was the result of numerous experiments performed to obtain the lowest possible LOD for all the studied insulins. First, all insulins were directly infused in the mass spectrometer in the solvent composition corresponding to their elution time during the chromatographic gradient. A protein charge state equal to +5 was used for analysis of the precursor ion. Charge states of +4 and +6 were also seen, but at low abundance, except for glargin, for which the most abundant precursor ion was at +6. Then, Automatic Gain Control Target (AGC Target), Maximum Ion injection Time (MIT) and Resolution were optimized by successive injections of neat solutions and of extracted samples to obtain as many data points as possible for each peak. All the following ESI parameters were also assessed to obtain the best trade-off:

flows of sheath gas, auxiliary gas and sweep gas, spray voltage, capillary temperature and auxiliary gas temperature. Moreover, each insulin was separately analyzed in neat solution at an equivalent concentration of 50 ng/mL. With separate injections of degludec, detemir and glargine, no interference with other insulins was observed. For HI and lispro, which have the same mass, no distinction was possible in SIM mode. In PRM mode, product ion at m/z 226.154, corresponding to the fragment B (y3-y1), was detected for HI [18]. For lispro, two product ions at m/z 226.154 and 217.118, corresponding to fragments B (y3-y1) and B (y2), were produced [18]. Under the analytic conditions of the present study, in presence of lispro, the ratio of the produced product ions m/z 217.118/226.154 was 32. Although the molecular weight of glulisine and aspart are different (5823 Da and 5826 Da, respectively), their precursor ion masses are too close (m/z 1165.538 and m/z 1166.131, respectively) to be differentiated with the unit resolution of the quadrupole mass analyzer set at 2 Da according to compound m/z (Table 1). The isotopic distribution patterns of the two insulins are different, but not sufficiently to distinguish them unambiguously with resolution set at 35,000 (Table 1 and Supplemental data). In PRM mode, these two insulins were distinguishable using product ions at m/z 248.161 for aspart and at m/z 346.160 for glulisine, corresponding to fragments B (y2) and B (y3) respectively [18]. In SIM mode, the run was divided in two segments: S1 from 6.60 to 7.00 min, used to monitor glargine and its metabolites M1 and M2, HI, lispro, glulisine, aspart, porcine insulin and ISTD, and S2 from 7.01 to 7.40 min, for analysis of degludec and detemir. For each segment, two parameters were optimized: AGC Target value, and MIT. Both parameters are dependent and allow the number of ions in the mass analyzer to be controlled. This space charge effects to be reduced, improving mass accuracy and LOD (particularly for detemir and degludec).

3.2. Selection of the sample preparation workflow

The criterion used to select the sample preparation was the lowest LOD obtained on the five workflows. Table 2 presents data for plasma and post-mortem sera. The lowest LODs for plasma were for workflow 3 (filtration + immunopurification) or workflow 5 (precipitation + workflow 3). For the rapid-acting insulins and for glargine, all five workflows gave relatively similar results. However, for long-acting insulins detemir and degludec, results with workflows 3 and 5 were clearly better than with the other sample preparations. According to these results, degludec and detemir are the most complicated insulin analogues to extract, and were therefore selected to be tested on five various workflows in post-mortem sera. Workflow 5 gave the most effective results, and all other insulins were then tested (Table 2). Neither insulin was not detected at 150 ng/mL without precipitation step (workflow 3), whereas respective LODs were 2.5 and 10.0 ng/mL with the precipitation step (workflow 5). Likewise, LOD for porcine insulin was 0.5 ng/mL in plasma using workflow 3 and 1.0 ng/mL in post-mortem serum using workflow 5.

3.3. Linearity, accuracy and precision

For plasma samples, workflows 3 and 5 provided the lowest LODs. Since the results were the same with both workflows, validation used the simpler and shorter workflow 3. Accuracy ranged from 70% to 130% and precision was below 30% for all compounds and most of the results were within $\pm 20\%$ (Table 1S in Supplemental data). For all insulins, calibration curves were determined using linear regression analysis. Data were weighted [1/concentration] for least-squares regression, except for detemir and degludec, for which linear ranges were not weighted. LOQ ranged from 0.50 to 10 ng/mL according to the insulin. At LOQ, precision and accuracy were below 30% for all insulins (Table 2S in Supplemental data). For post-mortem sera, validation was based on workflow 5. For all insulins spiked in post-mortem sera (PMI < 48 h and PMI > 48 h), accuracy ranged from 70% to 130% and precision was below 30% (Table 3, and Table 3S in Supplemental data). For all insulins, standard curves were determined using linear regression analysis. Data were weighted [1/concentration] for least-squares regression, except for detemir and degludec, for which linear ranges were not weighted. LOQ ranged from 1.0 to 10.0 ng/mL according to the

Table 3

Assessment of accuracy and precision for post-mortem serum samples (PMI < 48 h). Data from 3 replicates for each concentration and analyzed on three different days.

Insulins	Concentration (ng/mL)	Mean \pm SD (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Human	1.00	0.91 \pm 0.13	13.8	90.8
	2.50	2.94 \pm 0.33	11.3	118
	5.00	4.97 \pm 0.37	7.41	99.5
	10.0	9.68 \pm 0.11	1.10	96.8
Lispro	1.00	0.93 \pm 0.07	7.88	93.0
	2.50	2.70 \pm 0.25	9.22	108
	5.00	5.01 \pm 0.62	12.4	100
	10.0	9.86 \pm 0.48	4.87	98.6
Glulisine	1.00	1.01 \pm 0.14	13.8	101
	2.50	2.31 \pm 0.40	17.2	92.3
	5.00	5.52 \pm 0.19	3.41	110
	10.0	9.67 \pm 0.34	3.52	96.7
Aspart	1.00	0.90 \pm 0.02	1.92	90.1
	2.50	2.69 \pm 0.18	6.59	108
	5.00	5.32 \pm 0.44	8.36	106
	10.0	9.59 \pm 0.28	2.94	95.9
Glargine	1.00	1.04 \pm 0.09	8.34	104
	2.50	2.45 \pm 0.51	21.0	97.8
	5.00	4.84 \pm 0.76	15.8	96.8
	10.0	10.3 \pm 0.39	3.76	103
Degludec	2.50	2.79 \pm 0.15	5.43	112
	5.00	4.72 \pm 0.32	6.70	94.5
	10.0	8.51 \pm 0.27	3.21	85.1
	30.0	29.8 \pm 1.22	4.09	99.3
Detemir	60.0	60.3 \pm 0.56	0.92	101
	10.0	10.1 \pm 1.02	10.1	101
	30.0	29.2 \pm 4.32	14.8	97.4
	60.0	60.4 \pm 2.07	3.43	101

Table 2

Limit of detection (ng/mL) for each insulin in plasma (P) and post-mortem sera (PMS) according to preparation workflow.

Insulins	Workflow 1		Workflow 2		Workflow 3		Workflow 4		Workflow 5	
	(PPT + SPE)	PMS	(FTT + SPE)	PMS	(FTT + IP)	PMS	(PPT + SPE + IP)	PMS	(PPT + FTT + IP)	PMS
Human	1.0	–	1.0	–	0.50	–	1.0	–	0.50	1.0
Lispro	1.0	–	2.5	–	0.50	–	1.0	–	0.50	1.0
Glulisine	1.0	–	2.5	–	0.50	–	1.0	–	0.50	1.0
Aspart	2.5	–	2.5	–	0.50	–	1.0	–	0.50	1.0
Glargine	2.5	–	2.5	–	1.0	–	1.0	–	1.0	1.0
Degludec	30	100	30	>150	2.5	>150	30	60	2.5	2.5
Detemir	30	100	60	>150	10	>150	30	60	10	10

–: not determined; PPT: Precipitation; SPE: solid phase extraction; FTT: filtration; IP: immunopurification.

insulin. At LOQ, precision and accuracy were below 30% for all insulins (Table 2S in Supplemental data).

3.4. Extraction recovery, matrix effect, dilution, interference and carryover

Since LOQs were the same for all insulins in post-mortem sera samples with PMI <48 h and PMI >48 h, recovery, ME, dilution, interference and carryover were assessed with a pool of post-mortem sera whatever the PMI. Extraction recovery and ME were determined from plasma and post-mortem serum (Table 4). The highest recovery was observed for aspart in plasma samples and for lispro in post-mortem serum samples. The differences in extraction yield were pronounced, depending on the insulin and the matrix. For plasma, extraction recovery ranged from $2.5\% \pm 0.6$ for glargine to $58.8\% \pm 24.7$ for aspart. In PM matrix, yield ranged from $1.7\% \pm 1.4$ for detemir to $31.6\% \pm 19.1$ for lispro. Independently of matrix, ME was between 83.1% (glulisine in plasma) and 100% (HI in plasma) for HI, lispro, glulisine, aspart and glargin. These results indicated that, overall, ME was moderate in most cases. However, in post-mortem samples, ME was approximately 60% for detemir and degludec. The process involving a dilution step was applied in plasma and post-mortem sera, and consisted of 25 μ L sample volume and 225 μ L phosphate buffer. Precision and accuracy were below 30% for all insulins (Table 4 S in Supplemental data). Ten plasma and ten post-mortem sera samples from twenty untreated subjects were analyzed. No signal corresponding to recombinant insulin analogues was detected. HI was detected only for two plasma samples, but at a concentration below the LOQ. No interference from other endogenous compounds was observed. To assess carryover, the mobile phase injected after three higher concentration standards showed no signal related to HI or analogues.

3.5. Applications

3.5.1. Samples from clinical patients

In all cases, insulin analogues used for treatment were clearly identified with the LC-MS/HRMS method (Table 5). For cases 2 to 4, the LC-MS/HRMS method determined insulin concentrations in the range of the calibration curves. For case 1, aspart was detected but its concentration was below the LOQ. Case 5 was a patient admitted for hypoglycemic coma. After various clinical and biological investigations, accumulation of degludec insulin was strongly suspected. A high insulin concentration was measured on immunoassay (normal range, 5–25 mU/L; result, 1336 mU/L, corresponding to 47 ng/mL). LC-MS/HRMS analysis confirmed

only presence of degludec in the sample, at high concentration and accumulation of the analogue.

3.5.2. Post-mortem samples

Table 6 presents seven post-mortem cases for which analyses were carried out on cardiac and/or peripheral blood. Several elements of the context suggested insulin injection by the decedent: diabetic patient, medical worker with needle marks on the body, or insulin pen or bottle discovered near the corpse. LC-MS/HRMS allowed identification of the insulins prescribed to the victims (cases 2–5) or discovered near the body of the non-diabetic victims (cases 6 and 7). In case 1, treatment was not known and LC-MS/HRMS identified aspart and the metabolites M1 and M2 of glargin. In all cases, the first analysis carried out in SIM mode detected the insulins involved in the subjects' treatments or suspected of having been used. Analysis in PRM mode confirmed identification as HI for case 4, glulisine for case 2, lispro for case 3, and aspart for cases 1, 4, 5, 6 and 7. Fig. 2 shows chromatograms from peripheral blood in case 6 in SIM and PRM modes. Finally, in two cases (1 and 2) insulins concentrations were, as expected, low, as death was probably unrelated to insulin. In three other cases (3, 4 and 5), inappropriate insulin intake may be suspected as cause of death and, in cases 6 and 7, death was directly linked to non-therapeutic self-administration of insulin (and of atracurium in case 7).

4. Discussion

Intoxication by insulin overdose may be accidental (error in insulin type or dose) or intentional (suicidal or criminal); samples can be taken from living or dead subjects. The highlight of insulins overdose is challenging, and particularly in post-mortem cases since degradation processes and other parameters can impact concentration and interpretation. From an analytic point of view, a validated method selectively detecting and quantifying the several insulins should be used. The aim of the present study was to develop a method for application to overdose and intoxication involving HI and its six analogues using plasma and post-mortem sera in low volume (250 μ L).

Five workflows for sample preparation were optimized, based on a review of literature, and tested. Using workflows 1, 2 and 4, the SPE method was optimized from Chambers et al. [32], lowering LOD five-fold by using phosphate buffer containing 0.05% plasma. The phosphate buffer prevented proteins aggregation and the plasma prevented insulin adsorption [13]. For precipitation, we choose an ACN-/methanol mixture with a ratio of 1/1 for organic solvent and matrix, as a ratio of 2/1 could precipitate insulins [20]. For workflow 3 (filtration and immunopurification), adapted from the methods of Judak and Thomas [16,23], the percentage of ACN was diminished at the filtration step and in the final extract, to, respectively, limit risk of filter clogging and improve response for long-acting insulins.

As proposed by Thevis and Thomas [5], immunopurification was chosen for its selectivity in sample preparation. Immunopurification was one of the steps that potentially highly influenced the response, since various parameters could contribute to antibody saturation, such as endogenous compounds, insulin degradation product (Insulin B-chain), or high insulin concentration. Wunder et al. [27], in hemolyzed blood samples, identified insulin A-chain and B-chain as the major degradation products resulting from a reaction between insulin disulfide bonds and free thiol groups present in cysteine residues of hemoglobin. They notified that B-chain could interfere with immunopurification but, as the maximum B-chain response was 25-fold lower than the initial insulin response, interference can be expected to be negligible. As reported in the present Supplemental Data, a study of response according to concentration for 4 analogues determined the range of linearity and the concentration beyond which the sample should be diluted. In addition to immunopurification, endogenous insulin antibodies, albumin-binding of detemir and degludec, unspecific binding and potential degradation during storage and sample preparation are among the non-exhaustive

Table 4
Extraction recovery and matrix effect from plasma samples (workflow 3) and post-mortem serum (PM) samples (workflow 5).

Insulins	Extraction Recovery ^a Mean \pm SD (%)	Matrix effect ^b (%)
Human	Plasma: 22.6 ± 4.7 PM Serum: 16.4 ± 14.2	Plasma: 100 PM Serum: 94.6
Lispro	Plasma: 36.8 ± 13.0 PM Serum: 31.6 ± 19.1	Plasma: 95.0 PM Serum: 92.0
Glulisine	Plasma: 5.0 ± 1.2 PM Serum: 11.9 ± 7.6	Plasma: 83.1 PM Serum: 85.8
Aspart	Plasma: 58.8 ± 24.7 PM Serum: 10.4 ± 11.1	Plasma: 96.1 PM Serum: 89.1
Glargine	Plasma: 2.5 ± 0.6 PM Serum: 15.1 ± 8.5	Plasma: 88.8 PM Serum: 91.1
Degludec	Plasma: 5.2 ± 1.0 PM Serum: 2.1 ± 0.9	Plasma: 88.0 PM Serum: 65.1
Detemir	Plasma: 6.2 ± 2.1 PM Serum: 1.7 ± 1.4	Plasma: 101 PM Serum: 60.6

^a Analyses performed in triplicate on three different days from different pools of each matrix.

^b Analyses performed in triplicate on 1 day.

Table 5

Clinical cases involving insulin, with diabetic status and clinical information and insulin analysis by LC-MS/HRMS results.

N°	Context			Insulin analysis by LC-MS/HRMS			
	Gender - Age (years)	Diabetic status and insulin treatment	Clinical Information	Administration to Collection Interval (hours)	Cmax ^a (ng/mL)	Insulin Identified	Concentration (ng/mL)
1	M - 47	T1D Aspart + Glargine	Therapeutic monitoring after suspected dose error	Aspart: 3 h Glargine: 15 h	Aspart: For 0.05 U/kg: 0.86 ± 0.05† M1 Glargine: For 0.6 U/kg: 0.78‡	Aspart Glargine M1	<LOQ NQ
2	F - 73	T2D Lispro + Glargine	Therapeutic monitoring after suspected dose error	Lispro: 2 h Glargine: 24 h	Lispro: For 0.05 U/kg: 0.72 ± 0.04†	Lispro Glargine M1	0.54 NQ
3	M - 48	T1D Aspart	Therapeutic monitoring after suspected dose error	Aspart: 1 h		Aspart	2.42
4	M - 48	T1D Aspart	Therapeutic monitoring after suspected dose error	Aspart: 1.5 h		Aspart	3.62
5	M - 47	T1D Degludec	Hypoglycemic coma	Unknown	Degludec**: For 0.4 U/kg: 24.4^	Degludec	>60

M: Male; F: Female; T1D: type 1 diabetes patient; T2D: type 2 diabetes patient; LOQ: limit of quantification; NQ: not quantified.

^a Concentrations were obtained by immunoanalysis using various immunoassay kits; thus concentration data are not comparable. ** total insulin concentration taking account of insulin bound to albumin, which is different from the active insulin concentration. †Von Mach (2002); ‡ Bolli (2012); ^ Haar and Heise (2014).

Table 6

Post-mortem cases involving insulin, with diabetic status and information from inquest and autopsy and insulin analysis by LC-MS/HRMS results.

N°	Context			Post-mortem Interval	Matrix ^a	Insulin Identified	Concentration (ng/mL)
	Gender - Age (years)	Diabetic status and insulin treatment	Information available				
1	M - 41	D unknown	Insulin intoxication not suspected	>48 h	PB	Aspart Glargine M1 + M2	<LOQ NQ
2	M - 69	D Glulisine + Detemir	Insulin intoxication not suspected	<48 h	CB ^b	Glulisine Detemir	2.39 <LOQ
3	M - 82	D Lispro	Insulin intoxication suspected	<48 h	PB CB	Lispro	1.45 <LOQ
4	M - 70	D HI + Aspart	Insulin intoxication suspected	<48 h	PB CB PB	HI Aspart	17.2 ^b 1.32 15.9 ^b 3.62
5	M - 68	D Glargine + Aspart	Insulin intoxication suspected	>48 h	PB	Aspart Glargine M1	16.6 ^b NQ
6	F - 47	Non-D	Suicide by insulin Aspart administration	<48 h	PB CB	Aspart	96.0 ^b 75.0 ^b
7	M - 36	Non-D	Suicide by insulin and atracurium administration	<48 h	PB CB	Aspart	432 ^b 6.98

PB: Peripheral Blood; CB: Cardiac Blood; D: Diabetic; HI: Human Insulin; NQ: not quantified; Non-D: Non-Diabetic.

^a All samples were hemolyzed with serum color close to pink or slightly red.

^b Serum was very viscous and brown. ^b concentration obtained after dilution.

list of elements could affect quantitative analysis.

One of the most crucial steps in the development of insulins analysis was to stabilize insulins in a medium during extraction and injection. One of the particularities of insulin is its high capacity of adsorption in all material [28,35]. Various experiments with silanized tubes and tubes coated with a solution of BSA (0.1 mg/mL) and EDTA (0.05 mg/mL) and addition of DMSO were performed to limit adsorption. Detemir and degludec binding to BSA with or without presence of EDTA and the deterioration of chromatographic peak shapes in presence of DMSO encouraged us to use material low protein binding, which was easy to use, induced no extra interference and diminished soiling of the mass spectrometer compared to addition of DMSO or BSA.

As previously described for LC and nano-LC methods [24,32–34], and despite numerous tests, we did not succeed in determining chromatographic conditions that would best distinguishing rapid-acting insulins or retain elution of several matrix components. To detect HI and its analogues simultaneously, use of a quadrupole mass analyzer [8,16, 20,32] or high-resolution mass spectrometry, especially with Orbitrap technology [19,22,23], have been described. SIM mode with

data-dependent MS2 [23] or PRM mode [22] were mainly used with Orbitrap. SIM mode did not formally distinguish HI from lispro or glulisine from aspart (except at resolution > 400,000 FWHM [36]). Thus, in the present study, a first analysis was performed in SIM mode, and a second injection was carried out in PRM mode if HI, lispro, glulisine or aspart was suspected. The product ion at *m/z* 226 used for HI quantification was also observed with lispro. Thus, HI concentration may be overestimated if samples contained both insulins [22].

The LOQs obtained with the present method from plasma samples were close to the performance previously reported for HI and rapid-acting insulin by Thomas et al. who quantified insulins from 200 µL plasma, associating filtration and immunopurification using magnetic beads with nanoLC-HRMS analysis [23], or from 250 µL plasma associating precipitation and SPE with LC-HRMS analysis [19]. However, for glargine, degludec and particularly for detemir, we did not achieve LOQs as low as previously reported. However, analysis of samples from clinical patients treated with various analogues demonstrated that the method was fit for our main objective: to identify overdoses and intoxications involving insulin. In cases 1 to 4, the insulins were well

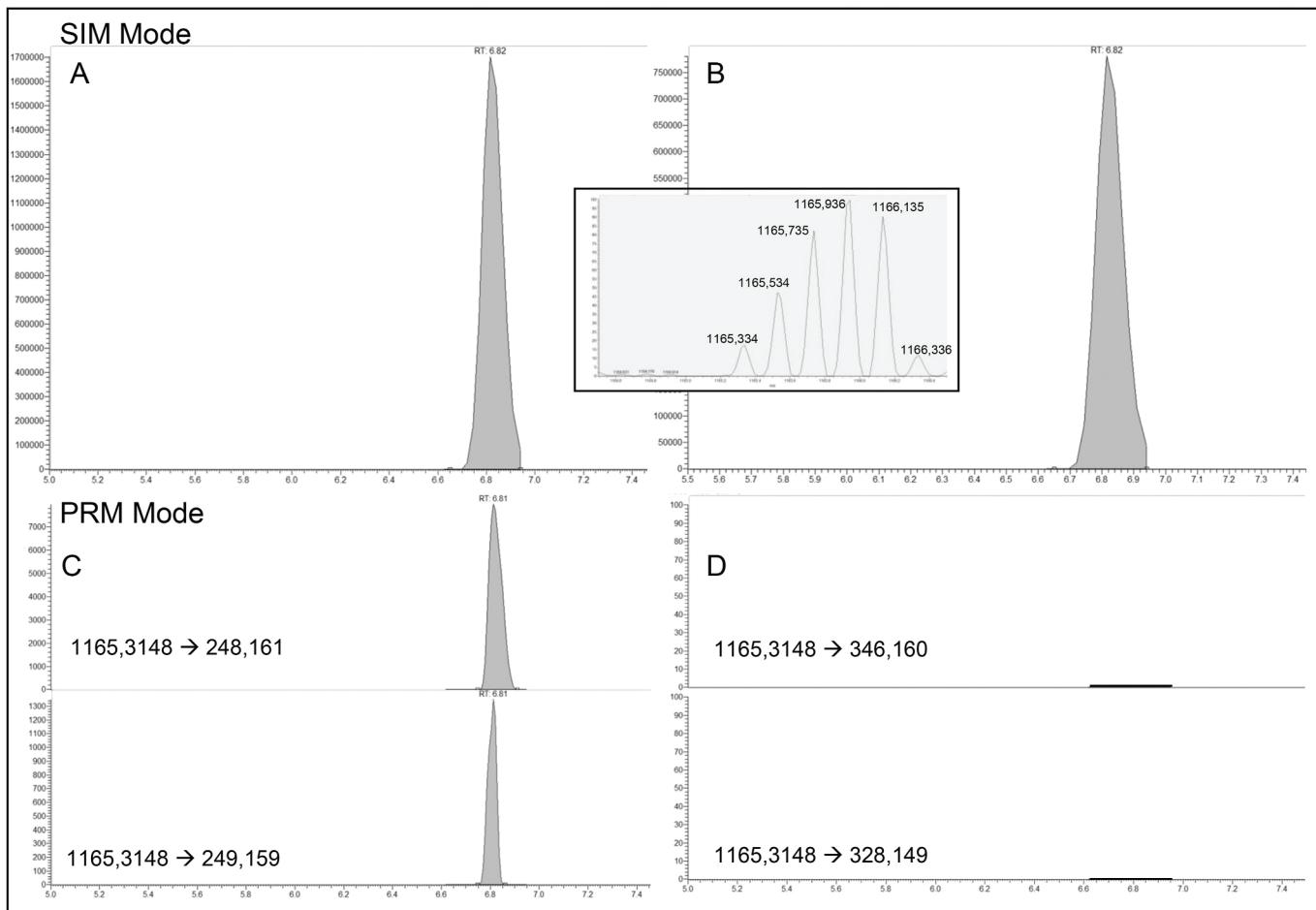


Fig. 2. Chromatogram from peripheral blood of post-mortem case n°6 in A: SIM mode extracting ions for aspart detection; B: SIM mode extracting ions for glulisine detection; C: PRM mode targeting aspart with product ions 248.161 and 249.159; D: PRM mode targeting glulisine with product ions 346.160 and 328.149.

identified and quantified and the error in insulin dose did not lead to a significant insulin concentration. Due to intensive metabolism, glargin is rarely detected in blood samples, unlike its main metabolite M1 [31]. Unfortunately, at the time of method validation we did not have access to M1 reference material, and thus validation and quantification of this metabolite was not possible. For the fifth case, although it was not possible to exclude accidental or voluntary insulin overdose, the measured concentration of degludec (>60 ng/mL) suggested accumulation with dramatic consequences leading to hypoglycemic coma.

In seven forensic post-mortem cases, insulins (HI and four analogues) were quantified. Even in cases of severe hemolysis (case 2) or for a sample with PMI > 48 h (case 1), insulins were detected. In 6 out of 7 cases, we successfully quantified insulins, while very few studies have been able to demonstrate the presence of insulin in post-mortem samples. Hess et al. analyzed femoral blood collected during autopsy from 20 subjects, and did not detect HI (LOD 1 μ U/mL, 0.035 ng/mL); HI and analogues were only determined after spiking post-mortem femoral blood, but unfortunately there were no details available on the analogues or on the concentrations tested [7,22]. In 2013, Hess et al. did not detect insulin in 60 real post-mortem cases, even in a case of suicide by lispro administration in a non-diabetic woman [7]. Sunderland et al. quantified aspart at 140 ng/mL in a case of suicide [11]. In the present study, the sample preparation described for post-mortem serum achieved LOQs close to those obtained with plasma.

5. Conclusion

A validated assay was proposed for quantification of human insulin

and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera. Long-acting insulins, such as detemir and degludec, were the most complicated to analyze, due to matrix effects and variations in protein structure compared to HI. Although less efficient for LOQs than previous methods developed for clinical use [22] or anti-doping [19,26], the present method reached the main goal of determining insulins overdose. The method detected and/or quantified insulins at therapeutic and toxic concentrations in both matrices, as illustrated by the analysis of authentic samples from clinical and forensic cases. Sample-related limitations such as degree of hemolysis or PMI with unclear degradation processes should be taken into account for interpretation.

Credit author statement

C.Bottinelli: Methodology, Validation, Writing – original draft. R. Nicoli: Methodology, Writing – review & editing. F. Bévalot: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Resources, Supervision. N. Cartiser: Writing – original draft, Writing – review & editing. C. Roger: Resources . K. Chikh: Resources . T. Kuuranne: Writing – review & editing. L. Fanton: Resources. J. Guitton: Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Resources, Supervision.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122047>.

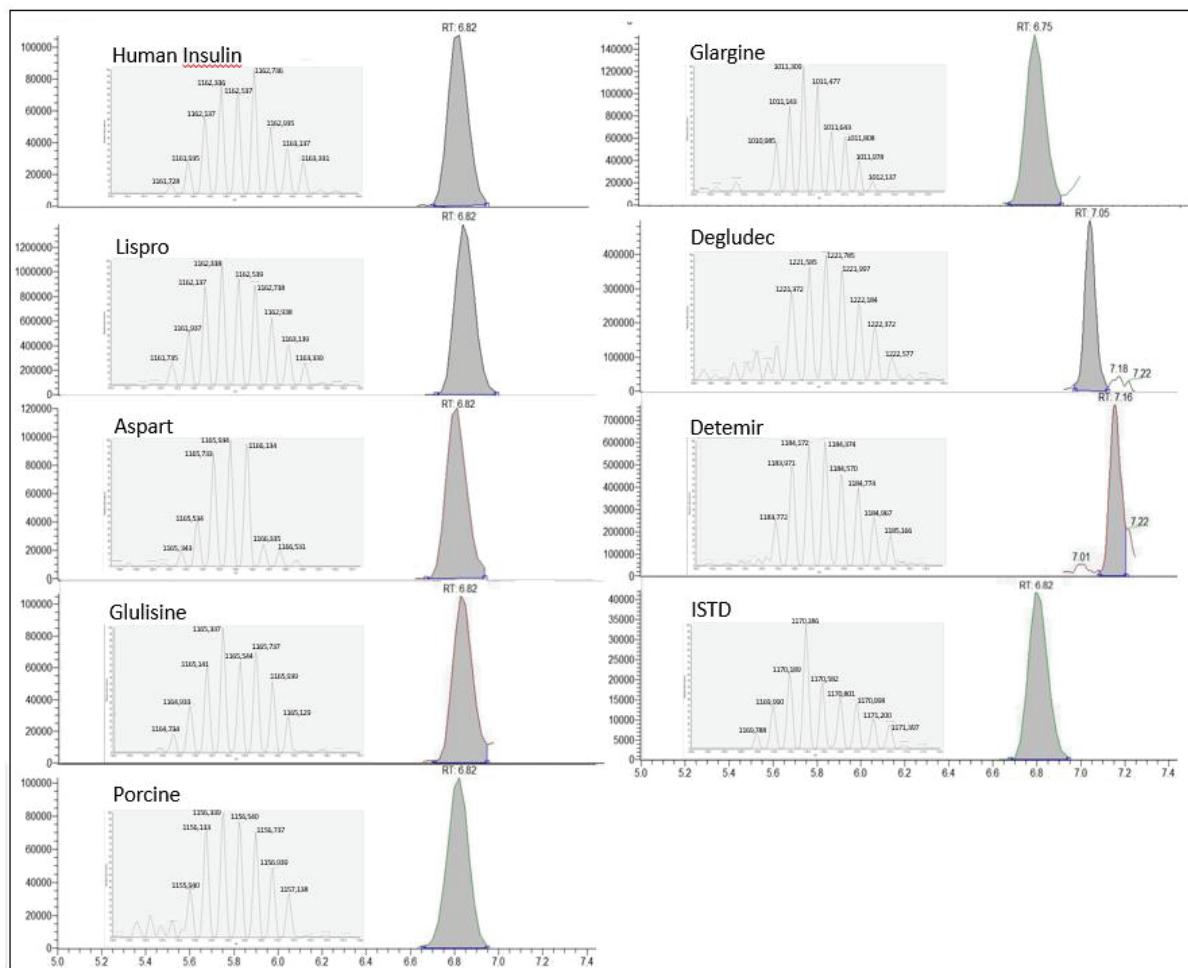
References

- [1] C. Binder, I. Bendtsen, Endocrine emergencies. Hypoglycaemia, *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 6 (1992) 23–39.
- [2] R.I. Holt, P.H. Sonksen, Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 542–556, <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.99>.
- [3] M. Thevis, A. Thomas, W. Schanzer, Insulin, *Handb Exp Pharmacol.* 2010, pp. 209–226, https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_10.
- [4] L.J. Anderson, J.M. Tamayose, J.M. Garcia, Use of growth hormone, IGF-I, and insulin for anabolic purpose: pharmacological basis, methods of detection, and adverse effects, *Mol. Cell. Endocrinol.* 464 (2018) 65–74, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.010>.
- [5] A. Thomas, M. Thevis, Recent advances in the determination of insulins from biological fluids, *Adv. Clin. Chem.* 93 (2019) 115–167, <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.003>.
- [6] J.F. Baud, N. Deye, R. Sonneville, B. Mégarbane, Intoxication grave par l'insuline, *Reanimation* 15 (2006) 481–489.
- [7] C. Hess, B. Madea, T. Daldrup, F. Musshoff, Determination of hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem, *Drug Test. Anal.* 5 (2013) 802–807, <https://doi.org/10.1002/dta.1500>.
- [8] K.M. Legg, L.M. Labay, S.S. Aiken, B.K. Logan, Validation of a fully automated immunoaffinity workflow for the detection and quantification of insulin analogs by LC-MS-MS in postmortem vitreous humor, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 505–511, <https://doi.org/10.1093/jat/bkz014>.
- [9] V. Marks, Murder by insulin: suspected, purported and proven—a review, *Drug Test. Anal.* 1 (2009) 162–176, <https://doi.org/10.1002/dta.38>.
- [10] C. Palmiere, S. Sabatasso, C. Torrent, F. Rey, D. Werner, D. Bardy, Post-mortem determination of insulin using chemiluminescence enzyme immunoassay: preliminary results, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 797–803, <https://doi.org/10.1002/dta.1775>.
- [11] N. Sunderland, S. Wong, C.K. Lee, Fatal insulin overdoses: case report and update on testing methodology, *J. Forensic Sci.* 61 (Suppl 1) (2016) S281–S284, <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12958>.
- [12] F. Tong, R. Wu, W. Huang, Y. Yang, L. Zhang, B. Zhang, et al., Forensic aspects of homicides by insulin overdose, *Forensic Sci. Int.* 278 (2017) 9–15, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.015>.
- [13] M. Blackburn, Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS, *Bioanalysis* 5 (2013) 2933–2946, <https://doi.org/10.4155/bio.13.257>.
- [14] C. Bottinelli, N. Cartiser, F. Bevalot, L. Fanton, J. Guittion, Is insulin intoxication still the perfect crime? Analysis and interpretation of postmortem insulin: review and perspectives in forensic toxicology, *Crit. Rev. Toxicol.* 50 (2020) 324–347, <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762540>.
- [15] P. Judak, G. Coppieters, B. Lapauw, P. Van Eenoo, K. Deventer, Urinary Detection of Rapid-Acting Insulin Analogs in Healthy Humans, *Drug Testing and Analysis*, 2020, <https://doi.org/10.1002/dta.2817>.
- [16] P. Judak, P. Van Eenoo, K. Deventer, Utilizing ELISA-plate based immunopurification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the urinary detection of short- and long acting human insulin analogues, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 153 (2018) 76–81, <https://doi.org/10.1016/j.jpb.2018.02.024>.
- [17] M. Thevis, A. Thomas, P. Delahaut, A. Bosseloir, W. Schanzer, Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1897–1903, <https://doi.org/10.1021/ac052095z>.
- [18] M. Thevis, A. Thomas, W. Schanzer, Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 35–50, <https://doi.org/10.1002/mas.20154>.
- [19] A. Thomas, R. Yang, S. Petring, L. Bally, M. Thevis, Simplified quantification of insulin, its synthetic analogs and C-peptide in human plasma by means of LC-HRMS, *Drug Test. Anal.* 12 (2020) 382–390, <https://doi.org/10.1002/dta.2765>.
- [20] E.E. Chambers, K.J. Fountain, N. Smith, L. Ashraf, J. Karalliedde, D. Cowan, et al., Multidimensional LC-MS/MS enables simultaneous quantification of intact human insulin and five recombinant analogs in human plasma, *Anal. Chem.* 86 (2014) 694–702, <https://doi.org/10.1021/ac403055d>.
- [21] S. Dong, Y. Gu, G. Wei, D. Si, C. Liu, Direct comparison of LC-MS/MS and RIA methods for the pharmacokinetics assessment of human insulin in preclinical development, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) e4323, <https://doi.org/10.1002/bmc.4323>.
- [22] C. Hess, A. Thomas, M. Thevis, B. Stratmann, W. Quester, D. Tschoepe, et al., Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1813–1822, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6271-5>.
- [23] A. Thomas, K. Walpurgis, L. Tretzel, P. Brinkkötter, E. Fichant, P. Delahaut, et al., Expanded test method for peptides >2 kDa employing immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 990–998, <https://doi.org/10.1002/dta.1868>.
- [24] A. Thomas, W. Schanzer, P. Delahaut, M. Thevis, Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 1 (2009) 219–227, <https://doi.org/10.1002/dta.35>.
- [25] P.E. Oran, J.W. Jarvis, C.R. Borges, N.D. Sherma, R.W. Nelson, Mass spectrometric immunoassay of intact insulin and related variants for population proteomics studies, *Proteomics Clin. Appl.* 5 (2011) 454–459, <https://doi.org/10.1002/prca.201000112>.
- [26] A. Thomas, P. Brinkkötter, W. Schanzer, M. Thevis, Metabolism of human insulin after subcutaneous administration: a possible means to uncover insulin misuse, *Anal. Chim. Acta* 897 (2015) 53–61, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.036>.
- [27] C. Wunder, G.F. Kauert, S.W. Toennes, Factors leading to the degradation/loss of insulin in postmortem blood samples, *Forensic Sci. Int.* 241 (2014) 173–177, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.003>.
- [28] M. Goebel-Stengel, A. Stengel, Y. Tache, J.R. Reeve Jr., The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides, *Anal. Biochem.* 414 (2011) 38–46, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.02.009>.
- [29] M. Henry, C. Dupont-Gillain, P. Bertrand, Characterization of insulin adsorption in the presence of albumin by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy, *Langmuir* 24 (2008) 458–464, <https://doi.org/10.1021/la701850p>.
- [30] S.W. Taylor, N.J. Clarke, Z. Chen, M.J. McPhaul, A high-throughput mass spectrometry assay to simultaneously measure intact insulin and C-peptide, *Clin. Chim. Acta* 455 (2016) 202–208, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.01.019>.
- [31] G.B. Bolli, A.D. Hahn, R. Schmidt, T. Eisenblaetter, R. Dahmen, T. Heise, et al., Plasma exposure to insulin glargine and its metabolites M1 and M2 after subcutaneous injection of therapeutic and supratherapeutic doses of glargine in subjects with type 1 diabetes, *Diabetes Care* 35 (2012) 2626–2630, <https://doi.org/10.2337/dc12-0270>.
- [32] E.E. Chambers, C. Legido-Quigley, N. Smith, K.J. Fountain, Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge, *Bioanalysis* 5 (2013) 65–81, <https://doi.org/10.4155/bio.12.290>.
- [33] S. Peterman, E.E. Niederkofer, D.A. Phillips, B. Krastins, U.A. Kiernan, K.A. Tubbs, et al., An automated, high-throughput method for targeted quantification of intact insulin and its therapeutic analogs in human serum or plasma coupling mass spectrometric immunoassay with high resolution and accurate mass detection (MSIA-HR/AM), *Proteomics* 14 (2014) 1445–1456, <https://doi.org/10.1002/pmic.201300300>.
- [34] M. Thevis, A. Thomas, W. Schanzer, P. Ostman, I. Ojanperä, Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS, *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 53–56, <https://doi.org/10.1002/dta.368>.
- [35] L. Nault, P. Guo, B. Jain, Y. Brechet, F. Bruckert, M. Weidenhaupt, Human insulin adsorption kinetics, conformational changes and amyloidal aggregate formation on hydrophobic surfaces, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5070–5079, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.025>.
- [36] A. Thomas, M. Thevis, P. Delahaut, A. Bosseloir, W. Schanzer, Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2518–2524, <https://doi.org/10.1021/ac062037t>.

SUPPLEMENTAL DATA :

Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

Figure 1S: Chromatograms and ESI mass spectra of human insulin, porcine insulin, lispro, glulisine, aspart and glargin at 10 ng/mL; detemir and degludec at 60 ng/mL and internal standard $[{}^2\text{H}_{10}]\text{Leu}^{\text{B}6,\text{B}11,\text{B}15,\text{B}17}\text{-human-insulin}$ at 12 ng/mL spiked in plasma.



SUPPLEMENTAL DATA :

Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

Table 1S: Assessment of accuracy and precision for plasma samples. Data from 3 replicates for each concentration and analyzed on three different days.

Insulins	Concentration (ng/mL)	Mean ± SD (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Human	0.50	0.43 ± 0.05	11.3	86.1
	1.00	0.99 ± 0.27	26.8	99.8
	2.50	2.33 ± 0.41	17.4	93.3
	5.00	5.05 ± 0.12	2.35	101
	10.0	10.2 ± 0.43	4.18	102
Lispro	0.50	0.46 ± 0.06	13.1	93.2
	1.00	0.95 ± 0.23	24.8	94.8
	2.50	2.34 ± 0.29	12.5	93.5
	5.00	4.89 ± 0.21	4.23	97.8
	10.0	10.3 ± 0.51	4.93	103
Glulisine	0.50	0.54 ± 0.09	15.9	108
	1.00	1.08 ± 0.07	6.67	108
	2.50	2.27 ± 0.17	7.69	90.9
	5.00	4.93 ± 0.13	2.66	98.7
	10.0	10.2 ± 0.06	0.59	102
Aspart	0.50	0.57 ± 0.04	7.27	114
	1.00	0.96 ± 0.05	5.29	96.2
	2.50	2.12 ± 0.33	15.6	84.8
	5.00	4.87 ± 0.32	6.59	97.5
	10.0	10.5 ± 0.16	1.56	105
Glargine	1.00	1.04 ± 0.01	1.16	104
	2.50	2.40 ± 0.20	8.14	96.0
	5.00	5.28 ± 0.38	7.27	106
	10.0	9.79 ± 0.36	3.71	97.9
Degludec	2.50	2.41 ± 0.37	15.2	96.6
	5.00	5.08 ± 0.50	9.83	102
	10.0	9.06 ± 0.89	9.90	90.6
	30.0	31.6 ± 1.49	4.73	105
	60.0	59.4 ± 0.60	1.01	98.9
Detemir	10.0	9.14 ± 0.63	6.84	91.4
	30.0	25.0 ± 1.75	6.98	83.4
	60.0	65.8 ± 1.80	2.74	110

SUPPLEMENTAL DATA :

Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

Table 3S: Assessment of accuracy and precision for post-mortem serum samples (PMI > 48 h). Data from 3 replicates for each concentration and analyzed on three different days.

Insulins	Concentration (ng/mL)	Mean ± SD (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Human	1.00	0.97 ± 0.22	22.8	97.0
	2.50	2.87 ± 0.49	16.9	115
	5.00	4.45 ± 0.39	8.74	89.0
	10.0	10.2 ± 0.48	4.69	102.1
Lispro	1.00	1.27 ± 0.20	15.7	127
	2.50	2.17 ± 0.26	11.9	86.7
	5.00	4.93 ± 0.39	7.95	98.6
	10.0	10.1 ± 0.43	4.27	101
Glulisine	1.00	0.96 ± 0.12	12.6	96.2
	2.50	2.75 ± 0.30	11.0	110
	5.00	4.59 ± 0.21	4.52	91.8
	10.0	10.2 ± 0.37	3.62	102
Aspart	1.00	1.06 ± 0.10	9.94	106
	2.50	2.26 ± 0.28	12.5	90.6
	5.00	5.20 ± 0.31	6.03	104
	10.0	9.98 ± 0.36	3.58	99.8
Glargine	1.00	1.10 ± 0.17	15.2	110
	2.50	2.26 ± 0.48	21.3	90.6
	5.00	4.79 ± 0.25	5.2	95.8
	10.0	8.74 ± 2.53	28.9	87.4
Degludec	2.50	2.68 ± 0.41	15.4	107
	5.00	4.01 ± 0.20	4.9	80.3
	10.0	10.4 ± 1.10	10.6	104
	30.0	32.2 ± 1.81	5.61	107
	60.0	49.0 ± 13.3	27.1	81.7
Detemir	10.0	11.4 ± 0.89	7.80	115
	30.0	27.1 ± 2.03	7.49	90.4
	60.0	61.2 ± 0.92	1.51	102

SUPPLEMENTAL DATA :

Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

Table 4S: Assessment of accuracy and precision of dilution process determined with the workflow 3 for the plasma samples and with the workflow 5 for post-mortem serum (PM).
Data from 5 replicates for each insulin.

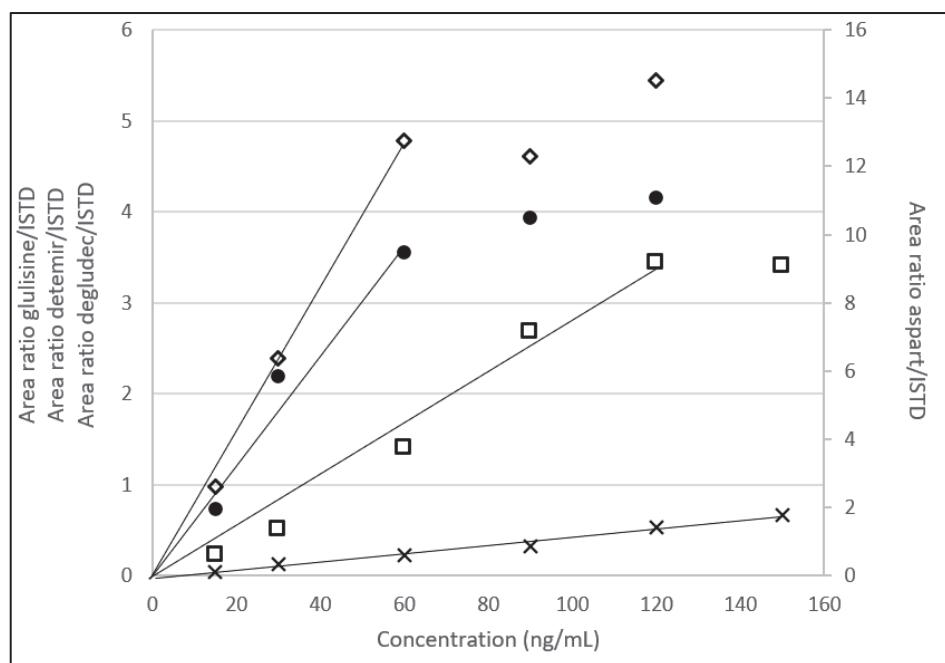
Insulins	Samples	Concentration (ng/mL)	Mean ± SD (ng/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Human	Plasma	50.00	39.3 ± 7.3	18.6	78.6
	PM Serum		42.1 ± 4.9	11.8	84.2
Lispro	Plasma	50.00	36.6 ± 4.7	12.9	73.3
	PM Serum		48.7 ± 4.7	9.70	97.3
Glulisine	Plasma	50.00	43.1 ± 6.5	15.1	86.2
	PM Serum		47.1 ± 9.4	19.9	94.2
Aspart	Plasma	50.00	35.4 ± 5.5	15.5	70.8
	PM Serum		37.3 ± 9.5	25.4	74.7
Glargine	Plasma	50.00	37.3 ± 3.6	9.80	74.6
	PM Serum		44.8 ± 2.5	5.60	89.6
Degludec	Plasma	300.0	319 ± 34.9	10.9	106
	PM Serum		225 ± 55.4	24.7	74.9
Detemir	Plasma	300.0	271 ± 35.0	12.9	90.4
	PM Serum		319 ± 35.8	11.2	107

SUPPLEMENTAL DATA :

Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS

Study of saturation of the immunopurification step

As it could limit the linearity of the analytic response, the saturation of antibodies from immunopurification was studied. Experiments with four analogues were designed from the data provided by the immunopurification plate manufacturer. These data indicated a theoretical saturation threshold for antibodies of 70 ng/mL in HI and a percentage cross-reactivity with antibodies of 100 %, 123% and 28% for aspart, glulisine and detemir, respectively. Data for degludec were not provided. In our experiments, plasma samples were spiked separately with glulisine or aspart or detemir or degludec at 15, 30, 60, 90, 120 ng/mL, respectively, with an additional concentration at 150 ng/mL for detemir and degludec. Internal standard was added at 12 ng/mL in each spiked sample. Sample preparation corresponded to the validated workflow 3. Thus, before the immunopurification step, spiked plasma samples were subjected to filtration. Standards were plots of peak area ratio of analog/internal standard versus analog concentration. The following figure represents the calibration curves in human plasma from 15.0 to 120 ng/mL for aspart (\diamond) and glulisine (\bullet) and from 15.0 to 150 ng/mL for detemir (\square) and degludec (\times).



Linearity was estimated up to around 50 ng/mL for glulisine, up to 60 ng/mL for aspart, up to 120 ng/mL for detemir and up to 150 ng/mL for degludec. These results were in agreement with data from the supplier. For degludec, an equivalent percentage than those of detemir could be expected, as they have comparable structural differences from human insulin (removal of B30, acylation of B29 to a fatty acid). The effective cross-reactivity was inferior to 28%. Taking into account that the internal standard (human insulin, cross-reactivity equal to 100%) was added at 12 ng/mL, the saturation threshold of about 70 ng/mL for a cross-reactivity of the analogue of 100% has been validated. Note that for the three of the four analogues tested, the loss of linearity appeared as soon as the threshold was exceeded. Conversely, for degludec, the response was linear from 0 to 150 ng/mL.

Discussion & Conclusion :

Concernant l'étude présentée, plusieurs prétraitements ont été testés, afin d'uniformiser au maximum la préparation, quel que soit le type d'échantillon à analyser : plasma ou sérum. Les anticorps anti-insuline endogènes, les liaisons aux protéines plasmatiques des insulines détémir et dégludec ainsi que la dégradation potentielle au cours du stockage et de la préparation des échantillons font partie d'une liste non-exhaustive d'éléments pouvant affecter le résultat de l'analyse des insulines. Pour limiter les effets sur l'analyse, plusieurs stratégies ont été mises au point. La précipitation du sérum post-mortem par MeOH et ACN présente les avantages d'éliminer de nombreux interférents et de rompre les liaisons insuline-anticorps anti-insuline et insulines-protéines plasmatiques, tout en conservant les insulines en solution [36]. L'utilisation d'un tampon phosphate limite l'agrégation des insulines [111]. Comparé aux publications précédentes [33, 38], le pourcentage d'ACN a été optimisé à l'étape de filtration dans le but de favoriser l'extraction des insulines détémir et dégludec et de diminuer le risque d'obstruction du filtre. Ainsi, les LDQ atteintes sont en adéquation avec les concentrations thérapeutiques [112] et proches des performances atteintes dans des études précédemment publiées [37, 38]. En effet, A. Thomas et ses collaborateurs ont rapportés la validation de deux méthodes dans le plasma. L'une met en œuvre la filtration et l'immunopurification, en utilisant la technologie des billes magnétiques, puis une détection par nanoLC-MS/HRMS [38]. La seconde combine une extraction SPE à une détection LC-MS/HRMS [37]. Dans les deux cas, la LDQ rapportée est inférieure à 1,0 ng/mL pour toutes les insulines sauf les insulines détémir et dégludec dont la limite est supérieure ou égale à cette même valeur.

Dans le but de conforter l'aspect quantitatif de la méthode développée, une comparaison de méthodes a été réalisée avec une technique d'essai immunoradiométrique (IRMA) (de référence au laboratoire – kit IRMA Bi-Insulin Cisbio). Des échantillons de plasma et de sérum post-mortem exempts d'insuline ont été surchargés à 7 ng/mL d'insulines humaine, asparte et lispro, et à 50 ng/mL d'insuline détémir. Ces surcharges ont été réalisées séparément en raison des limites analytiques de la technique IRMA (absence de distinction entre les insulines). Les échantillons ont été analysés par chaque méthode en triplicata. Concernant l'analyse par IRMA, le calcul de la concentration finale a tenu compte du pourcentage de réactivité croisée dans le sérum pour chaque analogue testé : humaine (100%), asparte (74%), lispro (68%) et détémir (199%) [113]. La réactivité croisée spécifique au kit pour les insulines glulisine et dégludec est respectivement de 1 % et inconnue. Par conséquent, ces deux insulines n'ont pu être incluses dans l'étude. Les résultats

présentés dans le Tableau 2 démontrent une justesse et une précision satisfaisantes pour la méthode LC-MS/HRMS, sauf pour l'insuline lispro dans le sérum post-mortem. Les valeurs de précision et de justesse obtenues avec la méthode de spectrométrie de masse sont proches ou meilleures que celles observées avec la technique IRMA. Ces résultats montrent que l'approche quantitative de la méthode LC-MS/HRMS est pertinente.

La méthode d'analyse a été appliquée à 12 cas : cinq cliniques et sept post-mortem. L'ensemble des insulines a été représenté dans ces cas réels. Les insulines à action lente se sont révélées être les plus complexes à analyser : soit dû à un métabolisme important pour l'insuline glargin ; soit dus à des effets matricés considérables et des variations de structure pour les insulines détémir et dégludec. Cependant, l'analyse des cas cliniques a confirmé que la technique validée permet de distinguer un surdosage ou une intoxication d'une concentration thérapeutique.

Tableau 2 : Comparaison de méthodes RIA vs LC-MS/HRMS

Insulines	[Surcharge] (ng/mL)	RIA			LC-MS/HRMS		
		Moyenne ± écart-type (ng/mL)	Justesse (%)	Précision (%)	Moyenne ± écart-type (ng/mL)	Justesse (%)	Précision (%)
Plasma							
Humaine	7	5,31 ± 0,84	75,8	15,9	5,21 ± 0,76	74,4	14,6
Lispro	7	11,0 ± 1,56	157	14,2	6,72 ± 0,18	96,0	2,70
Asparte	7	5,12 ± 0,24	73,1	4,60	6,02 ± 0,48	86,0	8,00
Détémir	50	45,4 ± 0,34	90,7	0,80	39,1 ± 4,55	78,1	11,7
Sérum PM							
Human	7	4,55 ± 0,82	65,0	18,0	5,95 ± 1,02	84,9	17,1
Lispro	7	11,2 ± 0,31	161	2,80	3,24 ± 0,54	46,3	16,5
Asparte	7	3,72 ± 0,48	53,2	13,0	8,26 ± 0,41	118	5,00
Détémir	50	43,7 ± 1,15	87,4	2,60	63,1 ± 1,40	126	2,20

PM : Post-mortem

IX. ARTICLE 2

Détection des insulines dans les tissus post-mortem : une technique optimisée basée sur l'immunopurification et la détection par LC-MS/HRMS

Le diabète est une maladie mondiale en expansion perpétuelle, nécessitant pour les patients diabétiques de type 1 et parfois de type 2, l'administration quotidienne d'insuline humaine ou d'analogues. La facilité d'accès aux insulines pour les diabétiques traités à l'insuline ainsi que pour leurs proches ou les professions médicales implique certains détournements d'usage à des fins suicidaires ou criminelles. Cependant, la mise en évidence d'une surdose d'insuline dans le sang post-mortem reste complexe. Les analyses de tissus sembleraient être pertinentes, car il est possible que les insulines s'accumulent avant le décès ou subissent une dégradation limitée dans certains tissus comparé au sang.

La présente étude décrit une méthode d'analyse de l'insuline humaine et de ses analogues synthétiques (lispro, asparte, glulisine, détémir et dégludec, glargin et son principal métabolite (M1)) dans des échantillons de foie, de rein, de muscle et de site d'injection. Cette technique est basée sur une préparation d'échantillon en cinq étapes (réduction de la taille de l'échantillon, homogénéisation, extraction, concentration, immunopurification) associée à une analyse par LC-MS/HRMS. La sélectivité et la LDD de tous les analogues cibles ont été évaluées dans les matrices précitées. La LDD est de 25 ng/g pour l'insuline humaine et les analogues quelle que soit la matrice, à l'exception des insulines détémir et dégludec pour lesquels la LDD s'élève à 50 ng/g dans les échantillons de rein et de site d'injection et à 80 ng/g dans le foie et le muscle. La méthode mise au point a été appliquée à 13 cas médico-légaux dans lesquels l'utilisation d'insulines était soupçonnée.



Detection of insulins in postmortem tissues: an optimized workflow based on immunopurification and LC–MS/HRMS detection

Charline Bottinelli¹ · Fabien Bévalot¹ · Nathalie Cartiser² · Laurent Fanton^{2,3} · Jérôme Guitton^{4,5}

Received: 24 December 2020 / Accepted: 5 April 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Diabetes is a worldwide disease in perpetual expansion. Type 1 and sometimes type 2 diabetic patients require daily human insulin (HI) or analog administration. Easy access to insulins for insulin-treated diabetics, their relatives, and medical professionals can enable abuse for suicidal or homicidal purpose. However, demonstrating insulin overdose in postmortem blood is challenging. Tissue analyses are contributive, as insulins can accumulate before death or undergo only limited degradation. The present study describes an assay for HI and synthetic analogs (lispro, aspart, glulisine, detemir and degludec, glargine and its main metabolite (M1)) in liver, kidney, muscle, and injection site samples. It is based on a 5-step sample preparation (reduction of tissue sample size, homogenization, extraction, concentration, and immunopurification) associated with liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC–MS/HRMS). Selectivity and limit of detection (LOD) for all target analogs were assessed in the above matrices. LOD was determined at 25 ng/g for HI and for analogs except detemir and degludec, where LOD was 50 ng/g in kidney and injection site samples and 80 ng/g in the liver and muscle. The method was applied to 13 forensic cases in which insulin use was suspected.

Keywords Insulin · Liquid chromatography · HRMS mass spectrometry · Postmortem · Forensic · Tissues

Introduction

Human insulin (HI) is constituted by 51 amino acids (molecular weight, 5807 Da) containing 2 chains (A and B) connected by disulfide bonds [1]. In patients with type 1 diabetes and sometimes in type 2, insulin or synthetic analogs are required. Treatment may involve rapid-acting insulin analogs (aspart, glulisine, lispro) and long-acting insulin analogs (glargine, detemir, degludec) [2]. Insulins act on carbohydrate, lipid, and protein metabolism, mainly by regulating

blood glucose level [1]. Insulin overdose could thus induce deep prolonged hypoglycemia, leading to hypoglycemic coma progressing to irreversible brain damage and death, if the victim does not receive prompt medical attention in intensive care [3]. Proven murders and suicides by insulin overdose are relatively uncommon, although there are several publications on both [4]. However, these cases may be underestimated because demonstrating insulin overdose in postmortem blood samples is challenging. On the one hand, insulin metabolism is rapid, while severe hypoglycemia and eventually death occur several hours after administration, leading to low insulins blood concentrations that can be difficult to detect [5]. On the other hand, after death, insulins undergo fast degradation in blood, essentially due to hemolysis [6]. Protected from hemolysis and degradation phenomena, vitreous humor (VH) has proved its interest as an alternative matrix to blood for insulin detection [4]. However, due to a limited diffusion through the blood-retinal-barrier, insulins vitreous concentrations are very low and their determination in this matrix remains challenging with mass spectrometric assays. Nevertheless, insulin analogs have been determined in VH from insulin-treated diabetic subjects not dying from an overdose using nanoLC-HRMS

✉ Charline Bottinelli
c.bottinelli@latlumtox.com

¹ LAT LUMTOX Laboratory, 32 Rue du 35ème Régiment d'Aviation 69500, Bron, France

² Department of Forensic Medicine, Edouard Herriot Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³ Faculty of Medicine Lyon-Est, University of Lyon, UCBL1, Lyon, France

⁴ Toxicology Laboratory, ISPB Faculty of Pharmacy, University of Lyon, UCBL1, Lyon, France

⁵ Pharmacology-Toxicology Laboratory, Lyon-Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

[7] and in some overdose cases. Furthermore, tissue analyses could also be relevant. As early as 1954, Elgee et al. [8], studying the distribution of labeled insulin (I^{131}) in rat models, showed that insulin is intensively distributed over the whole body and especially in the kidneys (21% of total dose 15 min after administration), muscles (19%), and liver (11%). Wide distribution of insulin in the human body was recently confirmed by imaging [9]. Assays for insulins in the kidney [5, 10], liver [5, 10], brain [5, 10], muscles [5], lung [5], myocardium [5], and pancreas [11] have been reported. As administration is mostly by subcutaneous injection, analysis of injection site (Inj-S) samples was also proposed [4]. A few assays were developed to highlight presence of insulin in tissue samples. Immunohistochemistry in several cases proved Inj-S presence or absence of insulin [12–15]. As in blood, insulins analyses in tissues were mostly performed by radioimmunoassay (RIA). With good sensitivity, this technique assessed insulin presence in several matrices such as the Inj-S, kidney, liver, brain, and pancreas [10, 11, 16]. However, with this type of assay, cross-reactions which are dependent of the commercial kit used have to be known because HI is rarely distinguishable from precursors or metabolites or degradation products or analogs [17]. These limitations can lead to misinterpretations as false negative and to an overestimation or underestimation [18]. The only technique distinguishing between insulins is currently mass spectrometry [19]. Analyses based on LC–MS/MS from postmortem alternative matrices were mainly performed on VH samples. Only one case report describes quantification of insulin lispro in postmortem tissues (kidney, muscle, and Inj-S) using this analytical approach [5].

In the present paper, we propose a sample preparation protocol for tissue analysis followed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC–MS/HRMS). This tissue-adapted qualitative method was assessed in terms of selectivity and limit of detection (LOD) for HI and 6 synthetic analogs (lispro, aspart, glulisine, detemir and degludec, and glargine), glargine's main metabolite (M1; DesB31-32 glargine), and porcine insulin. The 6 synthetic analogs are rapid or long-acting insulins currently available on the market. M1 was added to the method, as glargine had been shown to rapidly and intensively metabolize, often leading to undetectable blood concentrations [20]. Porcine insulin, although no longer used in human therapeutics, is a veterinary drug which could be involved in forensic cases. As the liver and kidneys are the main sites of HI clearance from systemic circulation and the muscle is the third main HI disposal organ, these 3 tissues were studied [21, 22]. Inj-S was also included for its obvious interest in forensic issues. The aim of this study was to develop a targeted screening to identify insulins in tissue samples. The method was tested by applying to authentic forensic cases.

Material and methods

Stock solutions and reagents

Acetonitrile (ACN) at HPLC grade, hexane, absolute ethanol, ammonium formate, formic acid, orthophosphoric acid, and acetic acid were purchased from Sodipro (Echirolles, France). Tween 20 was purchased from Merck (Fontenay-sous-bois, France) and was diluted in phosphate buffer (PB) (0.01 M, pH 7) to obtain a concentration of 0.05%. Water was dispensed by a PurelabElga purifier (Veolia Water, Solutions & Technologies, Décines, France). Mercodia Iso-Insulin ELISA immunopurification plates were purchased from Bioconnect (Huissen, The Netherlands). Amicon ultra filters (3 kDa, 500 μ L) were purchased from Merck (Fontenay-sous-bois, France). Recombinant human insulin (Umuline), lispro (Humalog), and glargin (Abasaglar) were obtained from Lilly (Neuilly sur Seine, France). Aspart (Novorapid), degludec (Tresiba), and detemir (Levemir) were purchased from Novo Nordisk (Chartres, France). Glulisine (Apidra) was obtained from Sanofi-Aventis (Frankfort, Germany). Porcine insulin was purchased from Merck (Fontenay-sous-bois, France). Glargine metabolite desB31-B32 (M1) was obtained from Analytical Department, Łukasiewicz—Industrial Chemistry Institute (ICI) (Warsaw, Poland). [$^2H_{10}$]Leu^{B6,B11,B15,B17}-insulin (human), purchased from Peptanova (Sandhausen, Germany), was used as internal standard (ISTD). According to the manufacturers' recommendations, pharmaceutical solutions were stored at +4 °C. Stock solutions of insulins and ISTD solution were prepared each day by dilution of pharmaceutical solutions in water with 2% acetic acid in polypropylene tubes (low protein binding, Eppendorf, Montesson, France) to reach the required concentration.

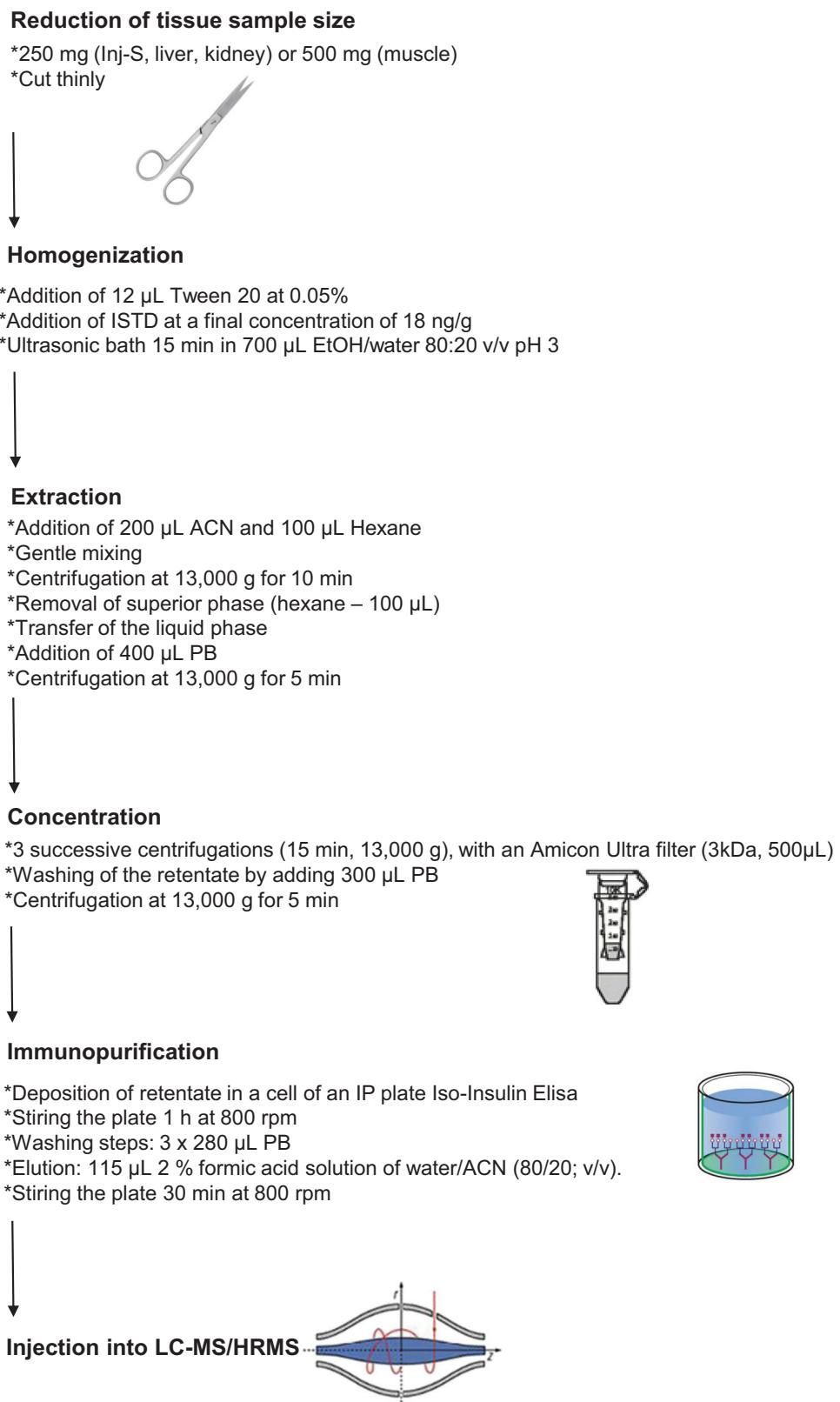
Tissue specimens and case selection

Tissue samples consisted of the kidneys (cortex), liver (site not specified), and upper or lower limb skeletal muscle. Injection sites comprised the skin and underlying fat tissue. After collection, samples were immediately stored at –20 °C until analysis. Blank samples were obtained from forensic autopsy of non-diabetic subjects for which an injection of insulin prior to death was not expected. Ten diabetic forensic cases treated by various insulins were selected to test the method. Three non-diabetic cases were analyzed as insulin use was presumed: Insulin pen or syringe found at body discovery site.

Sample preparation

The optimized 5-step sample preparation process is detailed in Fig. 1. Analyses were performed from 250 mg Inj-S, liver, and kidney and from 500 mg muscle. All test tubes were composed of “low protein binding” material to avoid adsorption of insulin. ISTD was added to the sample, with a final

Fig. 1 Workflow for detection of human insulin and its analogs in tissues. ACN: acetonitrile; EtOH: ethanol; ISTD: internal standard; PB: phosphate buffer



concentration of 18 ng/g at the beginning of homogenization process. Insulin spiking, during development of the method and LOD evaluation, was performed at the same time as

ISTD addition. The ethanolic solution used to homogenize tissue samples was an ethanol/water mixture (80:20 v/v) adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid. As the sample

volume obtained after PB addition (extraction step) was approximately 1400 µL, 3 successive centrifugations were necessary to filter the whole sample with Amicon® filter (500µL); the resulting retentate varied from 50 to 100 µL. After the last step of immunopurification, the final extract was transferred to a low protein binding 96-deepwell plate and 25 µL was injected into LC–MS/HRMS.

Liquid chromatography and mass spectrometry

The LC system consisted of a UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher, San Jose, CA, USA). Samples were separated on a Luna PS C18 column (150 mm × 2.1 mm × 1.6 µm particle size) equipped with a PS C18 precolumn (internal diameter 2.1 mm) (Phenomenex, Le Pecq, France). Mobile phases were water (A) and ACN (B), both acidified with 0.1% formic acid, and delivered through the column (temperature +40 °C) with a flow rate of 250 µL/min. The gradient started at 0% B for 2 min, raised to 90% in 3.5 min, and held for 1 min. Phase B then rose to 98% in 0.5 min, returned to 3% in 0.5 min, then to 0% in 1.5 min for 4 min, to equilibrate the column before the next injection. MS data were acquired using a Q-Exactive™ Plus mass spectrometer (ThermoFisher, Bremen, Germany) equipped with a heated electrospray ionization source (HESI-II) interface operating in positive mode. Spray voltage and capillary temperature were set at 3.5 kV and 300 °C. The first method associated a full scan mode (m/z =400–1500; resolution = 35,000 FWH) and a single ion monitoring mode (SIM; resolution = 35,000 FWH) to detect all insulins. In SIM mode, signals of the 5 main m/z ratios from isotopic distribution were extracted and summed. A second method was used in full scan mode (m/z =400–1500; resolution = 17,500 FWH) and parallel reaction monitoring (PRM) acquisition (resolution = 17,500 FWH). PRM mode was essential, to distinguish HI from lispro and aspart from glulisine, using 1 or 2 transitions (Table 1).

Selectivity and determination of LOD

Selectivity was tested for all insulins by analyzing 5 blank samples per matrix (liver, kidney, muscle, and Inj-S) from 5 different subjects. As the quantity of human blank tissue available was limited, the LOD study was performed by systematically spiking 2 insulins in the same tissue sample. Samples were spiked as follows: lispro with detemir, glulisine with degludec, HI with glargin, and aspart with M1.

LOD was determined in 2 steps. Firstly, 250 mg liver or kidney and 500 mg muscle from a same subject were spiked with increasing concentrations from 10 to 80 ng/g. The presumed LOD was defined as the lowest concentration at which the targeted analyte was detected on chromatographic peak from extracted masses in SIM mode,

Insulins	Human	Lispro	Glulisine	Aspart	Glargine	M1	M2	Degludec	Detemir	ISTD	Porcine
Molecular weight (Da)	5807	5807	5823	5826	6062	5751	5646	6104	5917	5848	5777
Charge state	[M+5H] ⁵⁺	[M+5H] ⁵⁺	[M+5H] ⁵⁺	[M+5H] ⁵⁺	[M+6H] ⁶⁺	[M+5H] ⁵⁺					
Precursor ion (m/z)	1162.533	1162.533	1165.538	1166.131	1011.316	1151.134	1130.200	1221.777	1184.368	1170.600	1156.337
Characteristic product ions for PRM mode (m/z)	226.154	217.118	346.160	248.161	-	-	-	-	-	-	-
Retention time (min)	6.82	6.82	6.82	6.78	6.82	6.82	7.05	7.05	7.15	6.82	6.82

Table 1 Chromatographic retention time and HRMS parameters used for detection of insulins

PRM mode was only used to distinguish human insulin from lispro and aspart from glulisine

with signal-to-noise ratio > 3 and retention time difference < 0.05 min with respect to the reference. Then, this presumed LOD was tested on 5 samples collected from different subjects. The LOD obtained in SIM mode was assessed in the PRM mode used for HI/ lispro and aspart/glulisine differentiation. Due to the limited quantity of Inj-S samples, only the second step was performed for these: The concentration tested was 50 ng/g for detemir and degludec, and 25 ng/g for other insulins according to the results in the other matrices.

Assessment of stability

Bench-top stability in final extracts was assessed for all insulins in each tissue (liver, kidney, muscle, and Inj-S). Blank samples were extracted according to the previous described process (Fig. 1). After the final step of immunopurification and before injection into LC–MS/HRMS, extracts were spiked with insulins at an equivalent concentration of 50 ng/g for HI, M1, glargine, lispro, aspart, and glulisine in all matrices. Final concentrations of detemir and degludec were respectively at 100 ng/g in the kidney and Inj-S, and at 160 ng/g in the liver and muscle. The resulted solutions were immediately injected (T0). Insulins stability was assessed at 3, 6, 9, and 12 h at the autosampler constant temperature of $+5$ °C, by monitoring the variation of the area of the chromatographic peak. Sample stability was completed by assessing the difference between the area at T0 and the area at each time T of analysis, within an acceptable range of 70–130%.

Results and discussion

Qualitative approach

Whatever the molecule, accurate reproducible quantification in tissue is challenging. There are wide variations in tissue composition, both intra-individually (sampling location in the organ) and inter-individually (state of conservation of the body, age, and medical history). This may entail variable matrix effects impacting the calibration curve and the accuracy of quantification. Based on autoradiography methods, using labeled HI, some studies revealed that insulin is more concentrated in perivenous zones in the liver [23] and in the renal cortex in the kidney [23, 24]. Concerning muscles, to the best of our knowledge, no information is available on uniformity of insulin distribution. Finally, Inj-S insulin concentration does not depend only on insulin dose; many other parameters may have an influence, such as blood flow, insulin type, time elapsed between injection and sampling, and onset of lipodystrophy after repeated insulin injection [14]. Thus, interpretation of insulins tissue concentration seems currently

very hazardous. We therefore focused on optimization and evaluation of method performance for a qualitative rather than quantitative method.

Sample preparation

In the present study, 5 steps can be distinguished to prepare tissue samples before analysis by LC–MS: tissue sample size reduction, homogenization, extraction, concentration, and finally immunopurification (Fig. 1). Concerning size reduction, using scissors to cut matrix was preferred to Ultraturrax®, which was used by Beastall et al. [25], and provided satisfying results (data not shown), but was poorly compatible with batch analysis and, at low concentrations, the risk of adsorption of insulins in the plastic walls of the Ultraturrax® device was high. Before homogenization, Tween 20 was added, to dissociate potential complexes formed between degludec or detemir and other proteins [26, 27]. During optimization of the homogenization step, among different solvents proposed in literature (aqueous solution [14, 25], methanol [5], and ethanolic solution adjusted at pH 3 [10, 16]), the acidic ethanolic solution provided the best results, whatever the matrix. At the beginning of the extraction step, 200 µL ACN and 100 µL hexane were added: ACN enhanced precipitation of proteins and limited insulins binding to other proteins; hexane reduced the lipid content of the extract. To concentrate the extract, Fletcher et al. added a step of evaporation under reduced pressure at 50 °C before processing RIA [16]. To limit the risk of insulins loss by adsorption, we used filtration with Amicon® filters. In accordance with the recommendation from the manufacturer concerning solvent proportions supported by the Amicon® filter (ACN < 20%), addition of PB was required, leading to 1400 µL extract. Although it required 3 successive centrifugations, 500-µL filters were chosen instead of 4-mL filters, which systematically became clogged. Finally, immunopurification was performed as previously described in recent methods [28, 29].

LC–MS/HRMS

Despite numerous gradients of mobile phase tested, HI and its analogs had very close retention times, except for detemir and degludec, which were eluted later (Table 1). Previous studies also mentioned the impossibility of distinguishing between rapid-acting insulins, since they exhibit only minor differences in structure [28, 30]. As HI/lispro and aspart/glulisine had the same precursor ion in SIM mode, a second injection in PRM mode had to be performed if one of them was detected. The second run formally identified the detected insulin, using the specific product ions.

Selectivity, determination of the LOD, and stability

The analysis of liver, kidney, muscle, and Inj-S samples from 5 different subjects without insulin treatment did not show any interference. Endogenous HI was not detected suggesting that the LOD of 25 ng/g was too high to detect physiological concentration in these tissue samples.

Dose escalation, by spiking samples from one subject, showed that HI, lispro, glargine, aspart, and M1 insulins were detected at 25 ng/g in the 4 matrices. Degludec and detemir were detected at 80 ng/g in the liver and muscle and at 50 ng/g in the kidney and Inj-S. These LODs, summarized in Table 2, were confirmed in samples from 5 different subjects. LOD discrepancies between matrices for detemir and degludec could be certainly linked to matrix effects. HI, lispro, aspart, and glulisine were also detectable in PRM mode at 25 ng/g in each type of matrix. Inj-S assessments were restricted to LOD for all insulins and selectivity in 5 different subjects. Indeed, blank sample quantity was not sufficient to study dose escalation for LOD determination.

Stability of all insulins was progressively tested at 3, 6, 9, and 12 h. The same sample was injected from T0 to T12 h. Peak areas of insulins varied by less than 30% up to 12 h in all matrices. Thus, the bench-top stability of insulins was observed for 12 h at +5 °C.

Application

Thirteen autopsy cases were analyzed: 5 females and 8 males, with a median age of 56 years (range, 32–82 years). Samples were collected from 13 livers, 12 kidneys, 13 muscles, and only 6 Inj-Ss due to the difficulty of identifying insulin injection traces, especially postmortem [31]. Ten subjects were diabetics and insulin treatment was known for 8 of these. Demographic information, diabetic status, and circumstances of death are summarized in Table 3. Suicide was highly suspected for the 3 non-diabetic subjects, who were medical staff with easy access to insulins. Approximate PMI was evaluated from inquest data and was <48 h in 8 cases and >48 h in 5.

Figure 2 shows chromatograms obtained from blank samples, samples spiked at LOD, and samples from the forensic cases. Taking into account the 4 matrices, in 11 out of 13 cases, at least one insulin was detected in at least one tissue. In the 11 positive cases, aspart, degludec,

glargine, M1, lispro, and/or HI were identified. Aspart insulin was detected in the 3 non-diabetic patients (cases no. 11, 12, 13). Unfortunately, glulisine, detemir, and porcine were not detected, making it impossible to test the method for these insulins in real cases. In each positive case, the result was consistent with the information, when available, on the insulin prescribed or found near to the corpse. In only 1 case (no. 11, suicide by atracurium and aspart injection suspected) was insulin detected in all 4 matrices; this was a non-diabetic patient, presumed to have committed suicide.

Since Inj-S acts as a reservoir, injected insulin may remain unabsorbed under the skin for hours or days, depending on various parameters such as dose, type of insulin, and absorption flow at the site [14]. RIA quantification of Inj-S HI showed, as expected, a very wide range of concentrations, from 44.5 µU/g to 7.44 U/g (corresponding to 1.5–258,168 ng/g) [10, 11, 25, 32]. Moreover, this repository highlights insulin presence even if PMI is long or if postmortem degradation of the corpse has begun. This was observed by Tong et al., who identified insulins in Inj-S from a cadaver which had been immersed 3 days then frozen 15 days before sampling [14]. Thus, if fatal insulin poisoning is suspected, the Inj-S should be sought during examination of the cadaver and removed by excision of the skin area and subcutaneous tissue around the injection mark. Five of the 6 Inj-S samples analyzed in this study were highly positive for at least one insulin, regardless of diabetic status. Inj-S analysis in case no. 1, a diabetic treated by HI plus aspart, was negative. As distinguishing between recent and old Inj-Ss can be challenging, especially postmortem [31], it could be hypothesized that this Inj-S was not recent and contained few or no insulin deposits. In cases no. 3 and no. 7, aspart, glargine, and its metabolite M1 were detected in the same Inj-S sample. Several hypotheses were possible to explain these results: Either both insulins were injected in the same small area at the same time; or the 2 insulins were administered at different times and one of them was at a residual concentration from an older injection; or the presence of insulins was the result of diffusion from blood circulation to adipose tissue. As proposed by Fletcher, sampling and analyzing a control tissue would have been interesting to discuss about the origin of insulin detected in Inj-S samples [11]. M1 was systematically detected

Table 2 Limit of detection (ng/g) of each insulin in the four studied matrices

	Human	Lispro	Glulisine	Aspart	Glargine	M1	Degludec	Detemir	Porcine
Kidney	25	25	25	25	25	25	50	50	25
Injection site									
Muscle							80	80	
Liver									

Table 3 Postmortem cases involving insulin, with diabetic status and information from inquest and autopsy and insulin analysis by LC–MS/HRMS

Case no	Gender-age (years)	Context			Insulin analysis by LC–MS/HRMS				
		Status (insulin treatment)	Death circumstances (time from last injection, if known)	PMI	TAA (month)	Inj site	Kidney	Liver	Muscle
1	M—70	Diabetic (HI + aspart)	Found dead at home (< 12 h before death)	< 48 h	21	nd	HI Aspart	nd	HI Aspart
2	M—82	Diabetic (lispro)	Found dead at home (14 h before discovery)	< 48 h	15	/	Lispro	nd	Lispro
3	M—66	Diabetic (aspart + glargine)	Found dead at home—suicide suspected Drugs and insulins discovered near to the corpse	< 48 h	24	Aspart Glargine M1	/	nd	Aspart Glargine
4	F—69	Diabetic (lispro + glargine)	Found dead at home—suicide by drug overdose suspected	< 48 h	8	/	nd	nd	Glargine
5	M—68	Diabetic (aspart + glargine)	Found dead at home	> 48 h	21	/	nd	nd	nd
6	M—49	Diabetic (degludec)	Found dead at home—suicide by psychoactive drugs overdose suspected (12 h before discovery)	> 48 h	9	/	Degludec	nd	nd
7	M—41	Diabetic (unknown)	Found dead in his car	> 48 h	17	Aspart Glargine M1	nd	nd	Aspart
8	M—32	Diabetic (unknown)	Found dead at home	> 48 h	19	/	nd	nd	nd
9	F—65	Diabetic (glulisine + glargine)	Found dead at home	> 48 h	1	Glargine M1	nd	nd	nd
10	F—52	Diabetic (aspart)	Collapsed at her workplace	< 48 h	19	/	Aspart	nd	nd
11	M—36	Non-diabetic	Found dead at his workplace Suicide by atracurium and insulin administration suspected (few minutes before death)	< 48 h	33	Aspart	Aspart	Aspart	Aspart
12	F—47	Non-diabetic	Found in her car—suicide suspected Drugs and insulins discovered near to the corpse	< 48 h	9	/	nd	Aspart	nd
13	F—56	Non-diabetic	Found in her car—suicide suspected Drugs and insulins discovered near to the corpse	< 48 h	23	Aspart	nd	nd	Aspart

M male; *F* female; *nd* not detected; / tissue sample not available; *PMI* postmortem interval; *HI* human insulin; *TAA* time from autopsy to analysis

with glargine in Inj-S (Fig. 2). Indeed, glargine is known to undergo enzymatic reaction leading to formation of its metabolites M1 and M2, immediately after subcutaneous injection [20].

After subcutaneous injection, insulin passes through membranes to reach the bloodstream [33], where it is metabolized and eliminated via insulin-sensitive cells, mainly located in the kidney, liver, and muscle [22]. In the present study, the liver was the sample where insulin was least often detected (in only 2 cases out of 13). Several hypotheses may explain this. Conversely to endogenous

processes, after subcutaneous injection, insulin first reaches the arterial circulation without undergoing the hepatic first pass, and thus the liver is lesser exposed to insulin [34]. Moreover, the liver was reported to be the major site of insulin clearance, and is rapidly metabolized there into products not included in the detection method. Surprisingly, in case no. 12, for which Inj-S was not available, the liver was the only sample that allowed identification of an insulin analog. To the best of our knowledge, this was the first time that an analog of insulin was formally identified in this matrix. Previous work in forensic contexts reported

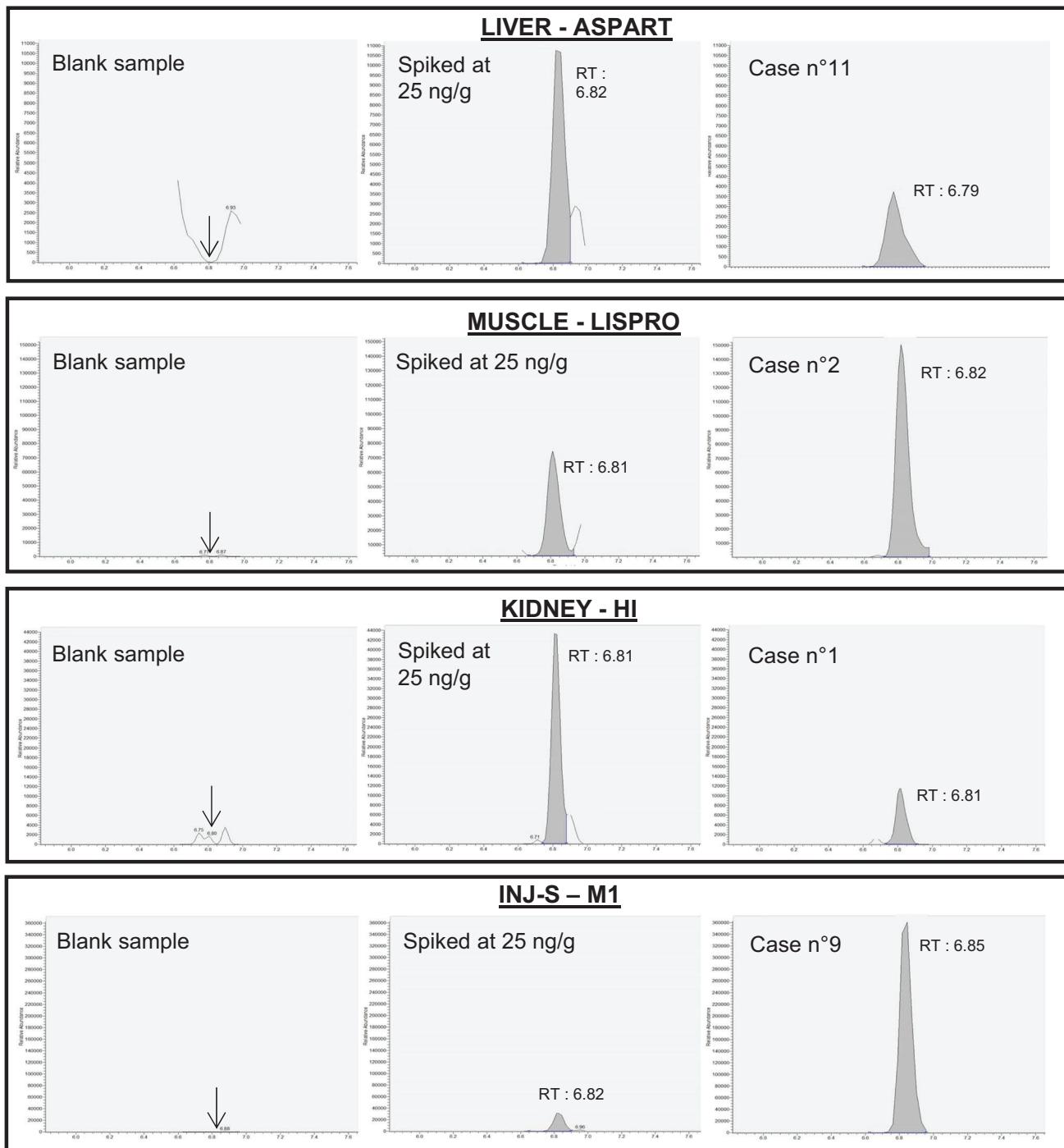


Fig. 2 Chromatograms from SIM mode extracting ions for aspart in the liver, lispro in the muscle, HI in the kidney, and M1 in the injection site (Inj-S). Vertical arrows in column A represent the expected retention time of each insulin

negative results in the liver [5, 10]. After the liver, the kidneys are the second major site of HI clearance from systemic circulation [21, 22]. In the present study, all the kidney samples were collected in the cortex, and insulins were detected in 5 cases out of 12. In forensic contexts, the first kidney sample analysis using RIA, in 1977, concerned the

suicide of a diabetic person under treatment, but no insulin was detected [10]. More recently, 1 case of kidney analysis by LC-HRMS was reported after suicide in a non-diabetic subject, with lispro quantified at 13.3 ng/g [5]; lispro muscle concentration was 12.9 ng/g. In the current study, it was from muscle samples that we most often identified

insulins (7 cases out of 13), perhaps due to greater stability. Birkinshaw suggested that HI may be stabilized in muscle, which becomes an acidic environment after death due to the release of lactic acid in peripheral muscular tissue [35]. The stability of HI in acidic media was confirmed by Bryant et al. [36]. Despite strong and quick metabolism, glargin was detected without M1 in muscle samples from cases no. 3 and no. 4. Maybe the LOD of M1 in muscle was too high to detect it in authentic cases. It would be interesting to investigate this hypothesis with more real cases and an assay more sensitive for M1.

Apart the limitations of inhomogeneity and the wide intra-individual and inter-individual variability of distribution of insulin in the body, matrix effects are a significant parameter in the development of a method of tissue matrix analysis. Sample pretreatment comprising multiple steps proved to be necessary prior to LC–MS/HRMS analysis to achieve a sufficient sensitivity. However, this process is obviously time-consuming. Moreover, immunopurification was performed, based on anti-insulin antibodies in limited quantity. Antibody saturation, various cross-reactivities according to analog, competition in presence of multiple insulins and endogenous compounds close to insulin, and insulin degradation products are elements which potentially impact the detectability of insulins in a given sample. Span time between autopsy and analysis (TAA) and PMI could have an impact on the detection of insulins in postmortem samples. In the present study, given the limited number of cases, no trend about insulins detection in function of these 2 parameters could be established. Thus, at this stage of knowledge, we suggest systematically analyzing all the samples from the different matrices in order to have, in the long term, numerous real data to conclude. In a forensic context, this qualitative method can unambiguously prove exogenous administration of insulin in a non-diabetic subject. In a diabetic subject, however, except if the identified analog is not part of the prescribed treatment, a qualitative result may not be sufficient to demonstrate overdose. Other biologic parameters such as glucose and lactate concentration in VH, ketone bodies (acetone, beta-hydroxybutyrate), and C peptide in blood should be measured in order to evaluate the hypothesis of insulin intoxication. Moreover, data from inquiries and observations at autopsy are supplemental elements which have to be taken into account when interpreting results.

Conclusion

This paper presents a qualitative method for analysis of HI and its synthetic analogs, based on immunopurification and LC–MS/HRMS detection for liver, kidney, muscle, and Inj-S samples. Sample preparation was optimized for each tissue

matrix and LOD was evaluated for the different tissues and insulins. The method was shown to be efficient, enabling identification of insulins in 11 forensic cases out of 13. These results demonstrated the importance of sampling and analyzing at least these 4 tissues to maximize the chances of highlighting administration of insulin.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the staff from Medicolegal Institute of Lyon for their practical collaboration and their investment in this work and Iain McGill (freelance translator specializing in health and life sciences) for proofreading the article.

Declarations

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Samples were obtained from forensic autopsies and corresponded to a complete protocol of sample collection for forensic toxicological evidence. Toxicological results can be used anonymously for scientific purposes.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

1. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A (2018) The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol* 217:2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
2. Sirhan W, Piran R (2020) Current approaches in diabetes treatment and other strategies to reach normoglycemia. *Curr Top Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/156802662066200716113813>
3. Marks V (2009) Murder by insulin: suspected, purported and proven—a review. *Drug Test Anal* 1:162–176. <https://doi.org/10.1002/dta.38>
4. Bottinelli C, Cartiser N, Bevalot F, Fanton L, Guitton J (2020) Is insulin intoxication still the perfect crime? Analysis and interpretation of postmortem insulin: review and perspectives in forensic toxicology. *Crit Rev Toxicol* 50:324–347. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762540>
5. Hess C, Madea B, Daldrup T, Musshoff F (2013) Determination of hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem. *Drug Test Anal* 5:802–807. <https://doi.org/10.1002/dta.1500>
6. Wunder C, Kauert GF, Toennes SW (2014) Factors leading to the degradation/loss of insulin in postmortem blood samples. *Forensic Sci Int* 241:173–177. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.003>
7. Ojanperä I, Sajantila A, Vinogradova L, Thomas A, Schanzer W, Thevis M (2013) Post-mortem vitreous humour as potential specimen for detection of insulin analogues by LC-MS/MS. *Forensic Sci Int* 233:328–332. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.009>
8. Elgee NJ, Williams RH, Lee ND (1954) Distribution and degradation studies with insulin I131. *J Clin Invest* 33:1252–1260. <https://doi.org/10.1172/JCI103000>
9. Johansson E, Lubberink M, Heurling K, Eriksson JW, Skrtic S, Ahlstrom H, Kullberg J (2018) Whole-body imaging of tissue-specific insulin sensitivity and body composition by using an integrated PET/MR system: a feasibility study. *Radiology* 286:271–278. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017162949>

10. Dickson SJ, Cairns ER, Blazey ND (1977) The isolation and quantitation of insulin in post-mortem specimens—a case report. *Forensic Sci* 9:37–42
11. Fletcher SM (1983) Insulin. A forensic primer. *J Forensic Sci Soc* 23:5–17
12. Lutz R, Pedal I, Wetzel C, Mattern R (1997) Insulin injection sites: morphology and immunohistochemistry. *Forensic Sci Int* 90:93–101
13. Palmiere C, Sabatasso S, Torrent C, Rey F, Werner D, Bardy D (2015) Post-mortem determination of insulin using chemiluminescence enzyme immunoassay: preliminary results. *Drug Test Anal* 7:797–803. <https://doi.org/10.1002/dta.1775>
14. Tong F, Wu R, Huang W, Yang Y, Zhang L, Zhang B, Chen X, Tang X, Zhou Y (2017) Forensic aspects of homicides by insulin overdose. *Forensic Sci Int* 278:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.015>
15. Wehner F, Mittmeyer HJ, Wehner HD, Schieffer MC (1998) Insulin- or morphine-injection? Immunohistochemical contribution to the elucidation of a case. *Forensic Sci Int* 95:241–246. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(98\)00099-1](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(98)00099-1)
16. Fletcher SM, Richards L, Moffat AC (1979) The detection of fatal insulin poisoning by tissue analysis. *Vet Hum Toxicol* 21(Suppl):197–199
17. Parfitt C, Church D, Armston A, Couchman L, Evans C, Wark G, McDonald TJ (2015) Commercial insulin immunoassays fail to detect commonly prescribed insulin analogues. *Clin Biochem* 48:1354–1357. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.017>
18. Sunderland N, Wong S, Lee CK (2016) Fatal insulin overdoses: case report and update on testing methodology. *J Forensic Sci* 61(Suppl 1):S281–284. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12958>
19. Thomas A, Thevis M (2019) Recent advances in the determination of insulins from biological fluids. *Adv Clin Chem* 93:115–167. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.07.003>
20. Bolli GB, Hahn AD, Schmidt R, Eisenblaetter T, Dahmen R, Heise T, Becker RH (2012) Plasma exposure to insulin glargine and its metabolites M1 and M2 after subcutaneous injection of therapeutic and supratherapeutic doses of glargine in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 35:2626–2630. <https://doi.org/10.2337/dc12-0270>
21. Hachiya HL, Treves ST, Kahn CR, Sodoyez JC, Sodoyez-Goffaux F (1987) Altered insulin distribution and metabolism in type I diabetics assessed by [123I]insulin scanning. *J Clin Endocrinol Metab* 64:801–808. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-801>
22. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19:608–624. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.5.0349>
23. Watanabe M, Hayasaki H, Tamayama T, Shimada M (1998) Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Braz J Med Biol Res* 31:243–256. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000200008>
24. Thompson CS, Sykes RM, Muddle J, Dashwood MR (1991) Distribution of 125I-labelled insulin-binding sites in peripheral tissues of the normal and diabetic rat: an autoradiographic study. *J Endocrinol* 128:85–89
25. Beastall GH, Gibson IH, Martin J (1995) Successful suicide by insulin injection in a non-diabetic. *Med Sci Law* 35:79–85. <https://doi.org/10.1177/002580249503500116>
26. Blackburn M (2013) Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS. *Bioanalysis* 5:2933–2946. <https://doi.org/10.4155/bio.13.257>
27. Thomas A, Walpurgis K, Tretzel L, Brinkkötter P, Fichant E, Delahaut P, Schanzer W, Thevis M (2015) Expanded test method for peptides >2 kDa employing immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS. *Drug Test Anal* 7:990–998. <https://doi.org/10.1002/dta.1868>
28. Judak P, Van Eenoo P, Deventer K (2018) Utilizing ELISA-plate based immunopurification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the urinary detection of short- and long acting human insulin analogues. *J Pharm Biomed Anal* 153:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.024>
29. Bottinelli C, Nicoli R, Bevalot F, Cartiser N, Roger C, Chikh K, Kuuranne T, Fanton L, Guittot J (2021) Development and validation of a method for quantification of human insulin and its synthetic analogues in plasma and post-mortem sera by LC-MS/HRMS. *Talanta* 225:122047. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.122047>
30. Legg KM, Labay LM, Aiken SS, Logan BK (2019) Validation of a fully automated immunoaffinity workflow for the detection and quantification of insulin analogs by LC-MS-MS in postmortem vitreous humor. *J Anal Toxicol* 43:505–511. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz014>
31. Kernbach-Wighton G, Puschel K (1998) On the phenomenology of lethal applications of insulin. *Forensic Sci Int* 93:61–73
32. Marks V, Richmond C (2007) Insulin murders—true life cases. Royal Society of Medicine Press, London
33. Heise T, Mathieu C (2017) Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes. *Diabetes Obes Metab* 19:3–12. <https://doi.org/10.1111/dom.12782>
34. Farmer TD, Jenkins EC, O'Brien TP, McCoy GA, Havlik AE, Nass ER, Nicholson WE, Printz RL, Shiota M (2015) Comparison of the physiological relevance of systemic vs. portal insulin delivery to evaluate whole body glucose flux during an insulin clamp. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308:E206–222. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00406.2014>
35. Birkinshaw VJ, Gurd MR, Randall SS, Curry AS, Price DE, Wright PH (1958) Investigations in a case of murder by insulin poisoning. *Br Med J* 2:463–468
36. Bryant C, Spencer DB, Miller A, Bakaysa DL, McCune KS, Maple SR, Pekar AH, Brems DN (1993) Acid stabilization of insulin. *Biochemistry* 32:8075–8082

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Discussion & Conclusion

L'analyse tissulaire constitue un réel challenge, puisque ces matrices présentent une importante variabilité de composition entre individus en fonction de l'état de conservation du corps, de l'âge et de l'historique médical du patient. Pour un même sujet d'ailleurs, cette variabilité peut exister en fonction du site d'échantillonnage du tissu. Les effets matriciels fluctuants qui en découlent rendent impossible l'établissement d'une calibration répétable et exacte. De plus, la distribution des insulines au sein des organes étudiés ne semble pas homogène, rendant la mesure d'une concentration dépendante du site de prélèvement. Ainsi, le choix a été fait de mettre au point une méthode qualitative plutôt que quantitative.

Dans 11 des 13 cas post-mortem étudiés, l'insuline la plus représentée est l'analogue à action rapide : asparte. Au moins une insuline a été identifiée dans au moins une matrice (foie ou cortex rénal ou muscle ou site d'injection). Au moins 1 insuline a été détectée dans les échantillons de 2 foies, 5 reins, 5 points d'injection et 7 muscles. Les résultats d'analyse tissulaire des 13 cas ont démontré qu'il semble important de prélever et d'analyser au moins ces 4 tissus pour maximiser les chances de mettre en évidence l'administration d'insuline.

D'un point de vue médico-légal, un résultat qualitatif prouve sans conteste l'administration exogène d'insuline chez un patient non diabétique. Cependant, pour un patient diabétique traité, l'identification d'insuline ne peut suffire à mettre en évidence une intoxication, excepté si l'anologue identifié ne fait pas partie du traitement de la victime, ce qui limite l'interprétation du résultat.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

X. DISCUSSION & PERSPECTIVES

1) Apports du travail

L'objectif de ce travail était de développer des protocoles analytiques dans le but de mettre en évidence l'implication de l'insuline humaine ou de ses analogues en post-mortem dans un contexte médico-légal. Deux méthodes d'analyse ont été mises au point pour extraire des insulines : l'un à partir de matrices sanguines (plasma et sérum post-mortem), l'autre à partir d'échantillons tissulaires. La technique d'analyse des insulines dans les prélèvements sanguins est la première méthode à avoir été validée à partir de sérum post-mortem. Jusqu'alors seules des méthodes d'immunoessai ont été proposées ou bien des méthodes chromatographiques validées pour les échantillons cliniques et appliquées à des échantillons post-mortem. La méthode présentée est aussi bien applicable aux deux types d'échantillons, même si l'objectif premier ne visait pas les prélèvements issus de patients vivants. Une simple étape de précipitation de protéines dans le cas des échantillons post-mortem a été ajoutée afin de limiter les effets dus à la complexité de la matrice.

La technique d'analyse tissulaire développée est une adaptation de la méthode sanguine. Des étapes de réduction de la taille de l'échantillon et d'homogénéisation ont été ajoutées pour s'adapter à la nature de l'échantillon à analyser. Il s'agit de la première méthode LC-MS d'analyse des insulines dans des tissus post-mortem pour laquelle une LDD a été déterminée et évaluée en termes de répétabilité. De plus, même si le nombre de cas présentés reste limité ($n=13$), il s'agit de la première série de patients pour laquelle autant de tissus ont été analysés. Même si aucune interprétation en fonction du cas n'est réellement envisageable à ce stade, il est intéressant d'observer que dans 11 cas sur 13, les insulines sont détectables dans au moins une matrice, chez des patients non diabétiques et diabétiques traités, qu'il y ait suspicion d'intoxication ou non.

Appliquées à plusieurs cas cliniques et post-mortem, il a été démontré que ces méthodes sont adaptées à ces deux contextes. Les résultats obtenus démontrent l'importance de multiplier les prélèvements sanguins et tissulaires pour rechercher une éventuelle implication d'une insuline dans le cadre d'une recherche des causes toxiques de la mort. En effet, un résultat négatif dans une matrice donnée ne signifie pas l'absence d'administration d'insulines. A partir des cas étudiés il apparaît donc intéressant d'analyser un maximum de matrices pour mettre en évidence l'exposition de la victime à l'insuline.

A l'aide des données de quantification dans les matrices sanguines, il est possible d'argumenter en faveur ou non d'un surdosage d'insulines. Cependant,

l'interprétation reste complexe compte tenu des nombreux facteurs influençant la concentration en insulines. Ainsi, afin de prendre en considération les points essentiels de l'analyse et d'aider à l'interprétation qui doit être spécifique à chaque cas, un outil a été proposé sous la forme d'un logigramme (page 51). Il répertorie sous forme de questions à se poser, les nombreux paramètres ante-mortem (dose, pathologies associées, délai administration/injection, etc) et post-mortem (dégradations *in corpore* et dégradation *in vitro* liée à l'hémolyse, PMI, etc) impliqués dans l'interprétation des concentrations d'insulines, pour conclure ou non à un surdosage d'insulines. Les valeurs de concentrations rapportées dans la littérature sont très hétérogènes et reflètent l'importance de systématiquement documenter le résultat avec le type d'analyse mis en œuvre (immunoessai ou LC-MS), les circonstances du décès, les délais entre l'administration et le décès, le type d'insuline administrée, la dose et le délai entre le décès et les prélèvements. L'ensemble des paramètres, pré-analytiques, analytiques, cliniques et notions d'enquête est évoqué dans ces questionnements afin d'éviter de conclure ou d'exclure faussement un surdosage.

2) Limites analytiques

a) Surcharge des matrices d'intérêt

Tout au long du développement et de la validation des méthodes, les insulines ont été ajoutées à des échantillons de matrices biologiques exempt des protéines d'intérêt dans le but d'imiter au maximum les conditions d'analyses d'un échantillon réel. Des échantillons de plasma ou de sérum post-mortem ont été surchargés avec des solutions d'insulines, puis immédiatement vortexés. Le ratio de volumes [solution de surcharge/matrice] était au maximum de 10%, afin de recréer les conditions les plus proches de celles d'une analyse d'un échantillon réel. Dans le cas des tissus, les solutions d'insulines ont été ajoutées après réduction de la taille de la matrice tissulaire. Néanmoins, compte tenu de la complexité des matrices analysées (hémolysée ou tissulaire), la surcharge des échantillons en composés d'intérêt ne mime pas totalement l'intégration des protéines dans un échantillon réel. En effet, les liaisons entre protéines, l'incorporation à la matrice et le degré de dégradation ou de putréfaction de l'échantillon sont autant d'éléments impossibles à simuler pour le nombre infini de possibilités rencontrées dans des échantillons réels. Ce biais pouvant affecter l'efficacité de l'extraction et l'exactitude des tests [114], les limites des critères de performance de la méthode d'analyse sanguine comme la justesse et la précision ont été établies à 30 % [115, 116]. Dans le domaine médico-légal, une variabilité du

résultat de 30% pour ce type d'analytes reste tout à fait acceptable puisqu'elle n'influencera pas l'interprétation du résultat.

b) LC-MS/HRMS

Comme abordé précédemment, l'analyse par LC-MS est un outil indispensable dans l'identification et la quantification des insulines dans le domaine médico-légal. Cependant, il est possible de dénombrer certaines limites à l'application actuelle. Dans les conditions chromatographiques mises au point, nous n'avons pas réussi à retenir l'élation de plusieurs composants de matrice. Ainsi, les insulines dégludec et détémir sont co-élues à certains composants des matrices étudiées, ce qui implique des LDD et LDQ plus importantes comparées à celles des insulines à action rapide. De plus, la séparation chromatographique des insulines humaine, lispro, glulisine, asparte, M1 et de l'étalon interne (EI - insuline humaine marquée) n'a pas été atteinte. Le mode de détection SIM a rendu possible la distinction entre M1, EI, insulines humaine/lispro et asparte/glulisine. Dans le cas d'un échantillon positif en insuline humaine ou lispro ou asparte ou glulisine, une seconde analyse de l'extrait en mode PRM a été nécessaire. Afin d'obtenir toutes les informations nécessaires à l'identification et la quantification en une seule injection, une méthode associant SIM et PRM a été testée. Le nombre de points par pics obtenu était insuffisant (entre 5 et 8) aux concentrations proches de la LDD ou LDQ. Par conséquent, une double injection est indispensable pour conclure sur l'identification de l'insuline détectée.

c) Limites de l'immunopurification

La mise en œuvre de techniques d'immunopurification par le biais de plaque d'anticorps immobilisés [33, 109] ou par le biais de billes magnétiques coatées a déjà été rapportée pour l'analyse des insulines [11, 38, 41, 108, 110]. Pour les études présentées ici, c'est la mise en œuvre de la méthode de purification sur plaque qui a largement amélioré les LDD des analogues lents détémir et dégludec, comparée aux autres techniques testées (SPE, workflows 1,2 et 4 de l'article analytique 1). Toutefois, l'immunopurification comporte plusieurs limites dont certaines sont illustrées dans la figure 15. Premièrement, la présence de certains interférents comme les protéines plasmatiques ou les phospholipides peuvent empêcher les liaisons antigène-anticorps (Figure 15 : Réaction : cas 1). Deuxièmement, la complexation des insulines à d'autres protéines ou à des anticorps anti-insulines, présents dans l'échantillon, entraîne

l'encombrement et l'indisponibilité du site de liaison de la protéine qui interagit avec l'anticorps immobilisé (Figure 15 : Réaction : cas 2). Pour ces deux raisons, des étapes de précipitation et/ou extraction et/ou filtration ont été ajoutées préalablement à l'immunopurification. D'autre part, les produits de dégradation ou métabolites des insulines comportant sur leur chaîne peptidique le site de liaison ont également la capacité de se lier aux anticorps immobilisés (Figure 15 : Réaction : cas 3). Enfin, en fonction de l'analogue à analyser, les réactions croisées avec les anticorps sont variables, comme indiqué dans le tableau 3. L'ensemble de ces limites dont la liste n'est pas exhaustive doit être pris en compte au moment de l'interprétation des concentrations mesurées.

Figure 15 : Schéma des étapes de l'immunopurification et des potentielles interférences pouvant impactées le résultat

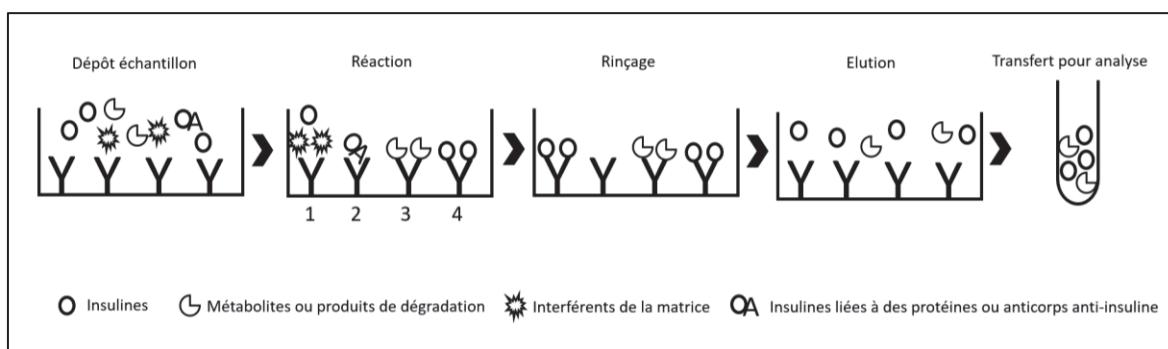


Tableau 3 : Pourcentages des réactions croisées de l'insuline humaine, ses analogues et les métabolites de l'insuline glargin avec les anticorps utilisés pour l'immunopurification (données fabricant - Mercodia)

Insulines	Pourcentage de réactions croisées
Humaine	100%
Lispro	112%
Asparte	100%
Glulisine	123%
Glargine	58%
Glargine métabolite M1	47%
Glargine métabolite M2	32%
Détémir	28%
Dégludec	Non renseigné

Etant donné que le nombre d'anticorps anti-insuline présents dans les puits est fixe, la saturation est une autre limite de la technique. En effet, il existe un risque que la concentration d'insuline soit sous-estimée, en cas d'analyse d'un échantillon très concentré. Les données du fabricant indiquent une limite de saturation à 70 ng/mL pour l'insuline humaine. Une évaluation de cette concentration limite a été réalisée dans du plasma dans nos conditions d'analyse. Pour cette étude, le choix s'est porté sur l'insuline asparte dont le pourcentage de réactions croisées est identique à celui de l'insuline humaine, ainsi que sur les insulines glulisine, détémir et dégludec qui possèdent les pourcentages de réactions croisées extrêmes (Tableau 3). Ainsi, des échantillons de plasma ont été surchargés séparément, à des concentrations croissantes de 15 à 120 ng/mL (jusqu'à 150 ng/mL pour les insulines dégludec et détémir uniquement). Les échantillons ont été extraits selon la procédure d'analyse complète (article n°1) en présence de l'EI (réaction croisée 100 %). Les résultats présentés dans les données supplémentaires de l'article analytique n°1 page 84, démontrent une linéarité de l'immunopurification jusqu'à 50 ng/mL pour l'insuline glulisine, 60 ng/mL pour l'insuline asparte, 120 ng/mL pour l'insuline détémir et plus de 150 ng/mL pour l'insuline dégludec. Au-delà de ces concentrations (excepté pour l'insuline dégludec), le ratio d'aires [insuline/EI] n'est plus proportionnel à la concentration en insuline. En prenant en compte la présence de l'EI à 12 ng/mL, les seuils de saturation observés pour les insulines glulisine et asparte sont compatibles avec les données du fabricant. Les différences structurelles des insulines détémir et dégludec diminuent leur capacité de liaison aux anticorps anti-insuline du test (Figure 15 : Réaction : cas 2). La saturation sera donc observée pour des concentrations plus élevées que pour les analogues à action rapide. Quelle que soit l'insuline, un protocole de dilution de l'échantillon est donc réalisé lorsqu'une concentration élevée, proche ou supérieure au seuil de linéarité, est mesurée. Un protocole de dilution au 1/10^{ème} à partir de 25 µL de matrice a été validé, lors de la mise au point de la technique d'analyse des matrices sanguines (article n°1).

Enfin, dans le cas de l'analyse qualitative tissulaire, il est possible qu'un phénomène de compétition entre insulines, n'ayant pas la même affinité avec les anticorps, favorise la détection de l'une au désavantage de l'autre. Ainsi, ce phénomène de compétition a été évalué en associant les deux insulines ayant les plus hauts pourcentages de réactions croisées (Tableau 3) : lispro et glulisine. Ce test a été réalisé dans des échantillons de rein, de foie et de muscle. Les deux insulines ont été surchargées à 150 ng/g dans chaque tissu. Systématiquement, les deux analogues ont été détectés. Par conséquent, à une concentration six fois supérieure à la LDD, aucune compétition n'a été observée. Ce phénomène semble donc peu impacter l'analyse qualitative.

d) Analyse des analogues

Globalement, toutes les insulines à action rapide possèdent des propriétés proches de l'insuline humaine : temps de rétention chromatographique identiques, taux de réaction croisée du même ordre et schéma de fragmentation proche. Leur analyse est de ce fait simplifiée. Les insulines les plus complexes à analyser étaient les insulines à action lente.

Dans un premier temps, une LDQ plus importante a été observée dans le plasma pour l'insuline glargin, comparée à celle des analogues à action rapide (1,0 ng/mL vs 0,5 ng/mL). Cette différence de sensibilité peut être expliquée par une combinaison de trois caractéristiques résultant de sa structure particulière : i) une faible réaction croisée avec les anticorps anti-insuline de l'étape d'immunopurification (58%) (Tableau 3) ; ii) une plus faible fragmentation en masse que les autres insulines [117]; iii) un métabolisme intense et rapide en faveur de la production du métabolite actif majoritaire M1. Par conséquent, il est important de rechercher et de quantifier le M1 si l'analogue glargin est soupçonné de faire partie du traitement ou d'être impliqué dans l'intoxication du patient. Seul l'acide aminé A21 diffère entre les structures de M1 et de l'insuline humaine. Il consiste en un remplacement d'asparagine par un acide aminé de glycine (Figure 4). Même si son taux de réaction croisée de l'immunopurification est de 47% (Tableau 3), ses caractéristiques le rapprochent des insulines à action rapide avec un temps de rétention chromatographique et une fragmentation similaire. Une solution purifiée de concentration connue de ce métabolite n'était disponible qu'à partir de la mise en place de l'analyse tissulaire à laquelle il a pu être intégré. Malheureusement, il n'a pu être validé pour l'analyse sanguine.

Dans un second temps, les insulines détémir et dégludec possédant des caractéristiques proches ont été les deux insulines, les plus complexes à analyser. Tout d'abord, leur capacité de liaison à l'albumine extrêmement élevée : > 98% pour l'insuline détémir [29] et > 99% pour l'insuline dégludec [30] ; implique de les dissocier pour les analyser. Parallèlement, l'acylation de l'extrémité de leur chaîne B a trois impacts. Elle engendre un taux de croisement avec les anticorps anti-insuline de l'étape d'immunopurification plus faible que pour les autres insulines [33] (Tableau 3). Elle augmente leur affinité pour la phase stationnaire de la colonne chromatographique, retardant leur temps de rétention quel que soit le gradient de phase mobile. Ainsi les deux analogues sont élués au même moment que les interférents de la matrice, ce qui a pour conséquence d'accroître l'effet matrice. Enfin,

leur différence de structure les éloigne physico-chimiquement des propriétés de l'EI. Par conséquent, il compense moins les disparités et les interférences liées à la matrice, comparé aux autres analogues [34, 37].

Dans nos conditions, la seule optimisation réalisable afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse pour les insulines dégludec et détémir, est la dissociation de l'albumine par précipitation. Elle est effectuée dans les échantillons de plasma et de tissus par ajout d'ACN avant l'étape de filtration, et par ajout d'un mélange ACN/MeOH dans les échantillons de sérum post-mortem. De plus, l'ajout de détergent Tween 20 a pour but de favoriser cette dissociation [38, 111].

3) Limites toxicologiques

Au-delà de l'aspect analytique, l'interprétation des concentrations en insulines est difficile et chaque cas est particulier. En effet, en fonction du statut diabétique, du traitement, des insulines identifiées et des délais connus ou non entre l'administration et le prélèvement, l'interprétation d'une concentration en insulines peut varier selon les cas.

Le statut diabétique du patient est une information primordiale. Concernant les victimes non diabétiques, la seule mise en évidence d'insulines analogues argumentera la thèse de leur implication dans l'intoxication. La présence d'insuline humaine devra être discutée avec les éléments observés lors de l'autopsie pour éliminer une autre cause pouvant augmenter la sécrétion d'insuline endogène. En revanche, pour un patient diabétique traité, seule la comparaison du traitement aux protéines retrouvées peut être réalisée. En effet, il apparaît difficile à ce jour d'interpréter de manière certaine les concentrations en insulines compte tenu des nombreux facteurs qui peuvent les influencer.

Parmi ces facteurs, le type d'insuline a un impact considérable sur l'interprétation d'une concentration. En effet, les concentrations maximales atteintes sont variables selon que l'insuline administrée possède une action rapide, intermédiaire ou lente (revue de la littérature page 31). L'administration d'insuline glargin implique d'estimer la concentration de son métabolite actif M1 sur lequel les études de pharmacocinétiques ont été établies [27, 28]. D'autre part, les concentrations des analogues détémir et dégludec sont à interpréter différemment des autres insulines puisque leur taux de liaison à l'albumine est très important. Les préparations d'échantillon développées dans ce travail brisent ces liaisons. Les concentrations mesurées sont donc des concentrations totales en insulines et non les

concentrations actives. De plus, la diffusion retardée de ces analogues ainsi que la faible affinité de l'insuline détémir au récepteur spécifique de l'insuline impliquent l'administration de doses généralement plus importantes [118]. L'interprétation de concentrations élevées devra donc être réalisée avec prudence.

Le métabolisme et la dégradation des insulines sont deux autres facteurs qui influencent de manière certaine les concentrations mesurées et par conséquent l'interprétation. Si elles sont disponibles les informations liées aux délais d'administration/décès ou prise en charge et administration/prélèvement ou décès/prélèvement, sont indispensables à prendre en considération lors de l'interprétation. Malheureusement, elles sont rarement disponibles. De même que les informations de conditions de stockage qui peuvent impliquer une dégradation *in vitro* si elles ne sont pas optimales. La température de stockage recommandée étant -20°C [12, 65, 110]. Enfin, la dégradation fortement influencée par l'hémolyse pourra être suspectée en fonction de l'aspect de l'échantillon analysé.

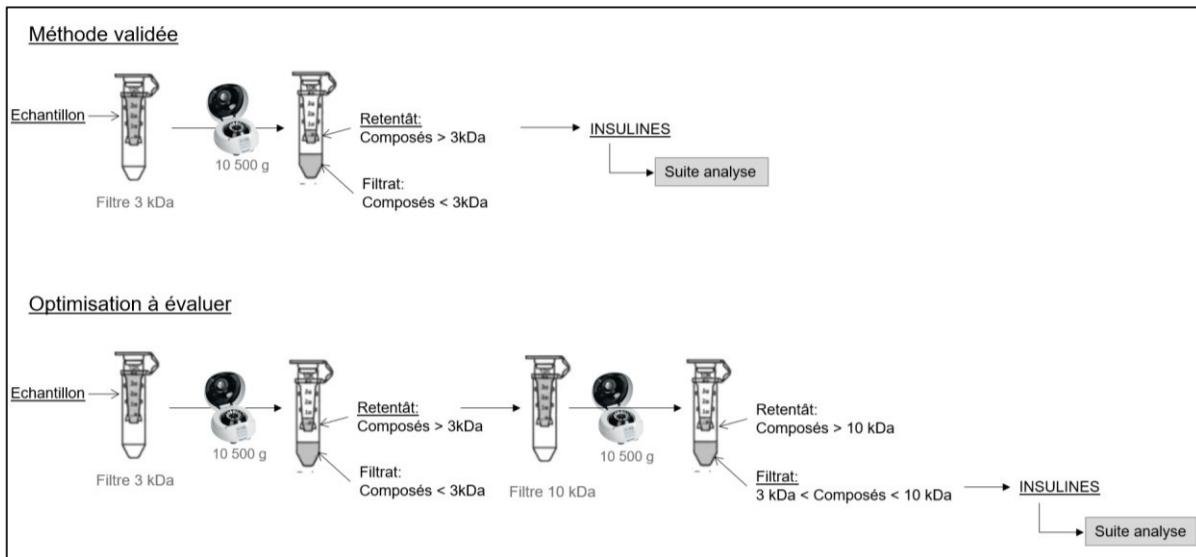
4) Perspectives

a) Améliorations analytiques

Les méthodes analytiques développées ont permis d'identifier et/ou quantifier des insulines que ce soit dans des échantillons sanguins cliniques ou post-mortem ou des échantillons tissulaires. Ces méthodes ont été démontrées comme efficaces et suffisamment sensibles pour l'objectif de mettre en évidence un surdosage. Cependant, certains aspects pourraient être améliorés.

Dans un premier temps, l'effet matrice constitue le paramètre le plus limitant dans la détection des insulines à action lente détémir et dégludec. Au niveau chromatographique, malgré des modifications de gradient de phase mobile, il n'a pas été possible de séparer certains composants de la matrice des insulines. Lors de la préparation d'échantillon, les filtres utilisés pour concentrer l'échantillon éliminent une partie des interférents, mais uniquement ceux dont le poids moléculaire est inférieur à 3000 Da. Il pourrait être envisagé d'ajouter une étape de préparation de l'échantillon en filtrant le premier retentat à travers une membrane retenant les composés de masse moléculaire supérieure à 10 000 Da (exemple albumine 66 437 Da). Ainsi, seuls les composés de masse moléculaire comprise entre 3000 et 10 000 Da seraient soumis à l'immunopurification (Figure 16). L'ajout de cette étape augmenterait le temps d'analyse de quelques minutes et une partie des protéines pourraient être perdue lors des transferts d'extraits. Mais il serait intéressant d'évaluer le ratio bénéfice/perte sur l'ensemble des insulines à analyser.

Figure 16 : Amélioration proposée dans le but de limiter l'impact des molécules à haut poids moléculaire sur l'analyse des insulines à action lente



Dans un second temps, il serait intéressant d'améliorer la stabilité des extraits. Dans les conditions analytiques développées, la stabilité des protéines a été évaluée à 5 h (300 min) malgré l'utilisation de consommables de type Low Protein Binding. Ce délai est court compte tenu du fait qu'une double injection (SIM et PRM) est indispensable pour distinguer certaines insulines et que l'identification complète d'un échantillon de patient prend donc 26 min (2 x 13 min). L'extrait final analysé est composé à 80% d'eau, 20 % d'ACN et acidifié par 2% d'acide formique. Le pH résultant est d'environ 2,5. Il a été observé qu'en condition acide prolongée (une nuit à pH 6), certains acides aminés, et particulièrement l'asparagine, subissent une déamination [119], modifiant ainsi la masse de la protéine et empêchant sa détection. Excepté pour l'insuline glargin et M1, l'acide aminé A21 est une asparagine. Son positionnement en bout de chaîne A pourrait favoriser cette déamination [119], ce qui pourrait constituer une hypothèse quant à la faible stabilité des extraits finaux. Une étude plus poussée pourrait être envisagée à l'avenir pour déterminer le pH optimal de la solution d'injection afin d'une part de dissocier les insulines des anticorps de l'immunopurification et d'autre part d'augmenter la stabilité des extraits.

Enfin, la majeure partie des avancées technologiques de ces dernières années dans le domaine de l'analyse des insulines sont issues de la recherche dans le domaine de la lutte antidopage. Plusieurs méthodes d'analyses par nanoLC ont été publiées et présentent des sensibilités de l'ordre du ng/mL ou plus faible [41, 88, 108]. La sensibilité analytique de la technique développée associée à une analyse par nanoLC-HRMS a été testée au sein du laboratoire antidopage suisse de Lausanne. À technique d'extraction équivalente, la LDD de l'insuline humaine dans le plasma est

de 1,0 ng/mL par LC-MS/HRMS et de 0.10 ng/mL par nanoLC-MS/HRMS. Cette technologie n'est pas disponible au laboratoire mais elle constitue un axe d'amélioration pour augmenter considérablement la sensibilité des analyses.

b) Une nouvelle matrice à analyser

Au cours de ce travail de recherche, les matrices étudiées étaient le sang et les tissus. A travers la revue de la littérature [112], même si les LDD à atteindre sont très faibles, il semble intéressant de rechercher les insulines dans l'HV puisque cette matrice est protégée des phénomènes de dégradation.

Une étude préliminaire a été réalisée afin d'évaluer si la technique développée pour les matrices sanguines serait adaptée à l'analyse des insulines dans l'HV. Le même traitement d'échantillon que pour le sang a été appliqué à 250 µL d'HV. Les extraits ont été analysés par la même technique chromatographique associée à une détection en mode SIM. Une gamme d'étalonnage de 0,25 à 5,0 ng/mL a été réalisée pour les insulines humaine, lispro, asparte, glulisine, glargin, M1 et de 1,0 ng/mL à 30,0 ng/mL pour les insulines dégludec et détémir. Au total 9 échantillons de cas post-mortem authentiques ont été analysés. Cinq cas correspondaient à des personnes non-diabétiques pour lesquels une administration d'insuline était suspectée ; 4 cas correspondaient à des personnes diabétiques traitées pour lesquels 2 surdosages étaient suspectés et 2 causes de décès ne semblaient pas impliquer d'insuline. A partir des données des traitements et des insulines présentes sur les lieux de découvertes, l'ensemble des insulines était représenté, excepté l'insuline dégludec.

La LDD évaluée est de 0,5 ng/mL pour l'insuline humaine, glargin, M1 et les rapides ; de 2,5 ng/mL pour l'insuline dégludec et 10,0 ng/mL pour l'insuline détémir. Aucune insuline n'a été détectée pour les cas de diabétiques traités. Cependant, pour trois cas de suspicion de suicide par administration d'insuline chez des individus non diabétiques, l'insuline asparte a été détectée. Pour l'un d'entre eux, l'analyse sanguine était négative.

Le tableau 4 présente les méthodes publiées d'analyse des insulines dans l'HV par LC-MS. L'application à des cas de décès liés ou non aux insulines démontre qu'en règle générale, lorsque l'insuline ne semble pas être impliquée dans le décès, elle n'est pas détectée même pour des patients traités. L'inverse n'est pas vérifié puisque même si un surdosage en insuline est suspecté, l'analyse de l'HV n'est pas systématiquement positive. La seule technique mettant en évidence des insulines pour des cas de décès n'impliquant à priori pas l'insuline, est celle publiée par Ojanpera et ses collaborateurs [41]. Il s'agit d'une méthode d'analyse par nanoLC-HRMS qui représente la technologie la plus sensible de celles rapportées.

Tableau 4 : Données de l'étude préliminaire et méthodes d'analyse des insulines publiées dans l'humeur vitrée

	Thevis et al. [75]	Ojanpera et al. [41]	Hess et al. [26]	Legg et al. [34]	Beckett et al. [120]	Etude préliminaire
Volume de matrice (μL)	500	100	1000	225	500	250
LDD (ng/mL)	0,2	Non précisé	0,15 0,40	0,125-0,5 (Détémir) -	0,2 1,0	-
LDQ (ng/mL)	-					0,5 / 2,5 / 10,0
INS analysées	Humaine Rapides Glargine	Humaine Rapides Glargine	Humaine Rapides Glargine Détémir	Humaine Rapides Glargine+M1 Détémir	Humaine Rapides Glargine+M1 Détémir	Humaine Rapides Glargine+M1 Détémir + Dégludec
Technologie	PPT-IP LC-MS/MS	PPT-IP nanOLC-MS/MS	PPT-IP LC-MS/MS	IAC PPT-SPE LC-MS/MS	PPT-FTT-IP LC-MS/MS	PPT-FTT-IP LC-MS/HRMS
Applications	n = 10 Décès non liés INS → Négatifs	n = 10 DT Décès non liés INS → Négatifs (n=7) → Humaine (n=1) → M1 (n=2)	n = 46 Décès non liés INS → Négatifs	n = 6 DT Décès non liés INS → Négatifs	n = 4 DT Décès non liés INS → Négatifs	n = 5 ND Surdoses suspectées → Négatifs (n=2) Décès liés INS → Négatifs (n=2)
	n = 1 Admin Humaine → Positif Humaine	n = 8 → 3 positifs Admin Lispro → Lispro = 3,57 ng/mL	n = 3 Surdoses suspectées → Asparte < LOQ → Asparte 0,74ng/mL → Lispro 2,0 ng/mL	n = 3 Surdoses suspectées → M1 (n=2) → Asparte > 1,0 ng/mL	n = 3 Surdoses suspectées → Négatifs (n=2) → Asparte > 0,5 ng/mL (n=3)	

Admin : Administration ; DT : Diabétique traité ; FTT : Filtration ; IAC : Chromatographie par immunoaffinité ; INS : Insulines ; IP : Immunopurification ; LDD : Limite de détection ; LDQ : Limite de quantification ; ND : Non-diabétique ; PPT : Précipitation ; SPE : Extraction sur phase solide

Hormis la LDQ des insulines à action lente dégludec et détémir pour lesquelles une étude approfondie devrait être envisagée, la technique développée pour le sang et appliquée à l'HV permet d'obtenir des résultats équivalents aux techniques récemment publiées et dédiées à l'analyse d'insulines dans cette matrice. Ainsi l'HV pourrait constituer une alternative à l'absence d'autres matrices, ou bien pour confirmer un surdosage.

c) Perspectives de recherche des métabolites et des produits de dégradation

Dans le cas d'intoxication, les délais entre l'administration et le décès puis entre le décès et le prélèvement d'échantillons biologiques sont très variables. Dans le premier cas, c'est le métabolisme qui intervient diminuant la concentration en protéine mère au profit de la formation de métabolites. Dans le second cas, les insulines et leurs métabolites sont transformés par le phénomène de dégradation. En plus du challenge analytique de la mise en évidence des insulines dans des échantillons biologiques post-mortem, s'ajoute donc leur temps de présence limité dans l'organisme et leur faible stabilité. Afin d'augmenter les chances de mettre en évidence l'exposition aux insulines, il avait été envisagé au départ du travail de rechercher les métabolites ainsi que les produits de dégradation.

Métabolisme

Même si le schéma de métabolisation des insulines reste partiellement non élucidé, l'implication d'enzymes telles que l'IDE, la PDI ou la cathepsine D a été rapportée dans le mécanisme de métabolisme de l'insuline endogène au niveau des endosomes. Certains métabolites ont été identifiés suite à des études réalisées dans diverses conditions : *in vivo* [121], *in vitro* dans du tampon [122], en présence d'endosomes hépatiques [123] ou dans des cellules spécifiques telles que des adipocytes [88]. Les produits identifiés présentaient une chaîne A intacte liée à une chaîne B modifiée, mais dans certains cas la chaîne A aussi pouvait être clivée. L'enzyme PDI a la capacité de couper les ponts disulfures reliant les deux chaînes peptidiques, libérant ainsi la chaîne A ou B intacte ou modifiée.

A ce stade, les métabolites sont soit relargués dans la circulation sanguine par exocytose, soit transférés dans des sous-parties cellulaires comme les lysosomes, pour continuer le mécanisme de métabolisation [18]. Dans ce dernier cas, des protéinases non-spécifiques vont agir sur les métabolites précédés pour obtenir des chaînes A et B modifiées. L'étape finale consiste à relarguer tous les produits dans la circulation sanguine par exocytose [19].

Ainsi les métabolites de l'insuline humaine suivants ont été identifiés dans l'urine : DesB30 et DesB24-30 [32, 40]. DesB30 représente le métabolite principal. Il a été identifié dans des échantillons d'urine d'un patient sain non traité et d'un patient diabétique traité à l'insuline humaine recombinée [88]. L'ensemble des insulines synthétiques semblent suivre le même schéma de métabolisation étant donné que leurs modifications peptidiques ont lieu sur des parties de la protéine n'impliquant pas d'interférence à la liaison avec les récepteurs insulines. Seule l'insuline glargin fait exception. En effet, suite à l'injection sous-cutanée de cet analogue, des réactions enzymatiques engendrent la transformation de la protéine en son métabolite M1 (Figure 4) [27, 88]. Cette transformation a également été observée *in vitro* [117]. Les principales études actuelles portant sur le métabolisme des insulines sont réalisées dans le cadre de la lutte antidopage à partir de matrice urinaire et par analyse nanoLC-HRMS. Les LDD à atteindre sont de l'ordre du pg/mL pour une concentration physiologique ou thérapeutique. A notre connaissance, aucune étude n'a été rapportée concernant la recherche des métabolites dans des matrices post-mortem.

Lors de travail, aucune expérimentation concernant le métabolisme des insulines n'a été entreprise. Il serait intéressant dans un premier temps de reprendre les cas étudiés dans les articles pour lesquels des insulines ont été détectées dans les matrices sanguines et tissulaires et pour lesquels une intoxication impliquant l'insuline était suspectée voire avérée.

Produits de dégradation

Concernant la dégradation, il a été clairement démontré qu'elle est proportionnelle à l'hémolyse [124] tant dans le sérum hémolysé [26, 124, 125] qu'en présence d'hémolysât de globules rouges (GR) [110, 126].

Nous avons réalisé une étude préliminaire sur la dégradation de l'insuline humaine et de 4 de ses 6 analogues synthétiques (asparte, glulisine, glargin, détémir) dans le sérum et l'eau en présence de différents pourcentages de GR (0%, 1% et 10%). Les matrices sanguines ont été obtenues auprès de volontaires non-diabétiques. Chaque insuline a fait l'objet d'une étude séparée. Dix millilitres de sang total ont été centrifugés. Le culot a été congelé puis décongelé pour obtenir un hémolysât de GR. Les matrices (sérum et solution de GR) ont été surchargées en insuline à une concentration de 70 µg/mL afin de visualiser au mieux la diminution de leur concentration sans approcher les limites de la technique trop rapidement. Chaque étude a été réalisée à 37°C. La dégradation a été étudiée sur des périodes de 48 h

dans le sérum et 24 h dans les GR (T0, T1, T2, T4, T24, T48). En parallèle de chaque étude, un aliquot de la même matrice non surchargée en insuline a été analysé. Systématiquement, l'évolution de l'aire d'un ion pseudo-moléculaire multichargé de l'insuline a été suivie. De même pour toutes les masses m/z suspectées d'avoir un lien avec la dégradation des insulines. Chacune de ces masses a été recherchée dans les échantillons exempts d'insulines pour confirmer ou non leur lien avec l'insuline dégradée. Les différentes masses m/z observées ont été comparées entre chaque insuline pour suggérer de possibles schémas de dégradation. Un outil a été créé à partir de l'application Microsoft Excel® pour chaque insuline, représentant leurs chaînes peptidiques et recalculant selon chaque perte d'acide aminé suspectée, les masses des ions pseudo-moléculaires chargés 4 à 7 fois (Figures 17 et 18). Les masses observées expérimentalement ont été comparées aux masses théoriques.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. Dans un premier temps, quelle que soit la matrice étudiée, la formation de M1 (m/z 1151,134) a été observée suite aux surcharges en insuline glargin. Pour rappel, ce métabolite correspond à la perte de deux arginines en bout de chaîne B (Figure 4). En plus d'être le métabolite actif majoritaire de l'insuline glargin, le peptide M1 semble aussi être un produit de dégradation.

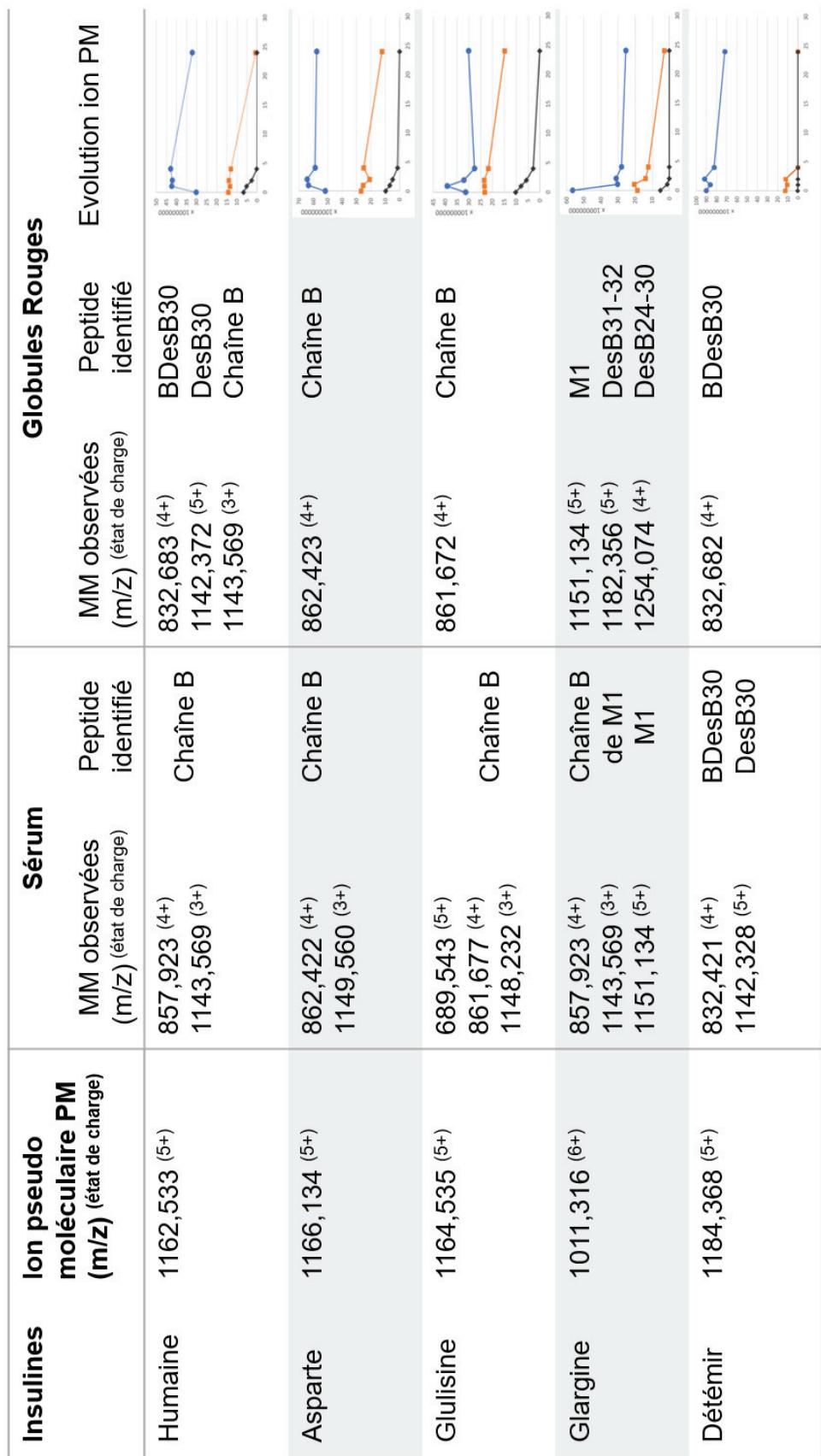
Lors de l'étude dans le sérum, plusieurs produits de dégradation ont été identifiés. Premièrement, une similitude a été observée entre des masses détectées lors de la dégradation de l'insuline glargin et celle de l'insuline humaine. Structurellement ces deux insulines partagent deux séquences peptidiques similaires correspondant à la chaîne A diminuée de l'acide aminé 21 et à la chaîne B diminuée des acides aminés B31 et B32 pour l'insuline glargin (équivalent à la chaîne B de M1). L'hypothèse que les masses observées concordent avec ces séquences peptidiques a été soumise à l'outil Excel® développé. La figure 17 illustre les représentations graphiques des chaînes B des insulines humaine et glargin. Les masses molaires des deux arginines B31 et B32 de l'insuline glargin ont été retirées du calcul de masse m/z des ions pseudo-moléculaires (cas décochées). Les m/z résultantes (1143,560 et 857,920) qui coïncident donc avec la chaîne B de M1, sont identiques à celles de la chaîne B de l'insuline humaine. Elles sont aussi similaires à celles observées expérimentalement. Ainsi, un des produits de dégradation des insulines est leur chaîne B. Ceci a été vérifié par la détection des ions m/z 1148,232 et m/z 1149,560, protonés 3 fois, correspondant respectivement aux chaînes B des insulines glulisine et asparte.

Deuxièmement, lors de l'étude de dégradation de l'insuline détémir, les masses m/z 832,421 et 1142,328 ont été observées. Ces deux ions ont également été détectés lors de l'étude de dégradation de l'insuline humaine en présence de GR. A partir de

l'outil Excel® conçu pour l'insuline humaine, il est probable que la masse m/z 1142,328 corresponde à l'insuline humaine dont l'acide aminé B30 a été clivé (DesB30) (Figure 18). La masse m/z 832,421 pourrait correspondre à la chaîne B de l'insuline humaine diminuée de l'acide aminé B30 (BDesB30). Pour rappel, la chaîne B de l'insuline détémir est composée de la même suite peptidique que l'insuline humaine hormis la suppression du B30 et l'acylation par un acide myristique du B29. La dégradation de l'insuline détémir dans le sérum semble mener à des produits de dégradation identiques à ceux de l'insuline humaine dans les solutions de GR.

Concernant l'étude de dégradation en présence de GR, la même méthode d'identification des ions inconnus pouvant correspondre à des produits de dégradation des insulines a été réalisée (Tableau 5). De plus, pour l'ensemble des insulines, il a été observé que plus le pourcentage de GR augmente, plus le signal de l'ion pseudo-moléculaire étudié diminue dès T0, du fait d'apport d'interférents et de la dégradation. L'insuline humaine devient indétectable au bout de 24 h en présence de 1 % de GR et après 4 h en présence de 10 % de GR.

Tableau 5 : Etude des produits de dégradation des insulines dans le sérum et des solutions aqueuses de globules rouges.
 L'évolution de l'aire de l'ion pseudo moléculaire de la protéine mère était suivi en fonction du pourcentage de globules rouges dans la solution aqueuse : ○ : 0% (bleu) ; □ : 1 % (orange) ; ◇ : 10 % (noir).



PM : Protéine mère ; MM : Masse Moléculaire

Figure 17 : Exemple d'utilisation de l'outil Excel pour déterminer la structure peptidique d'un produit de dégradation commun aux insulines humaine et glargin

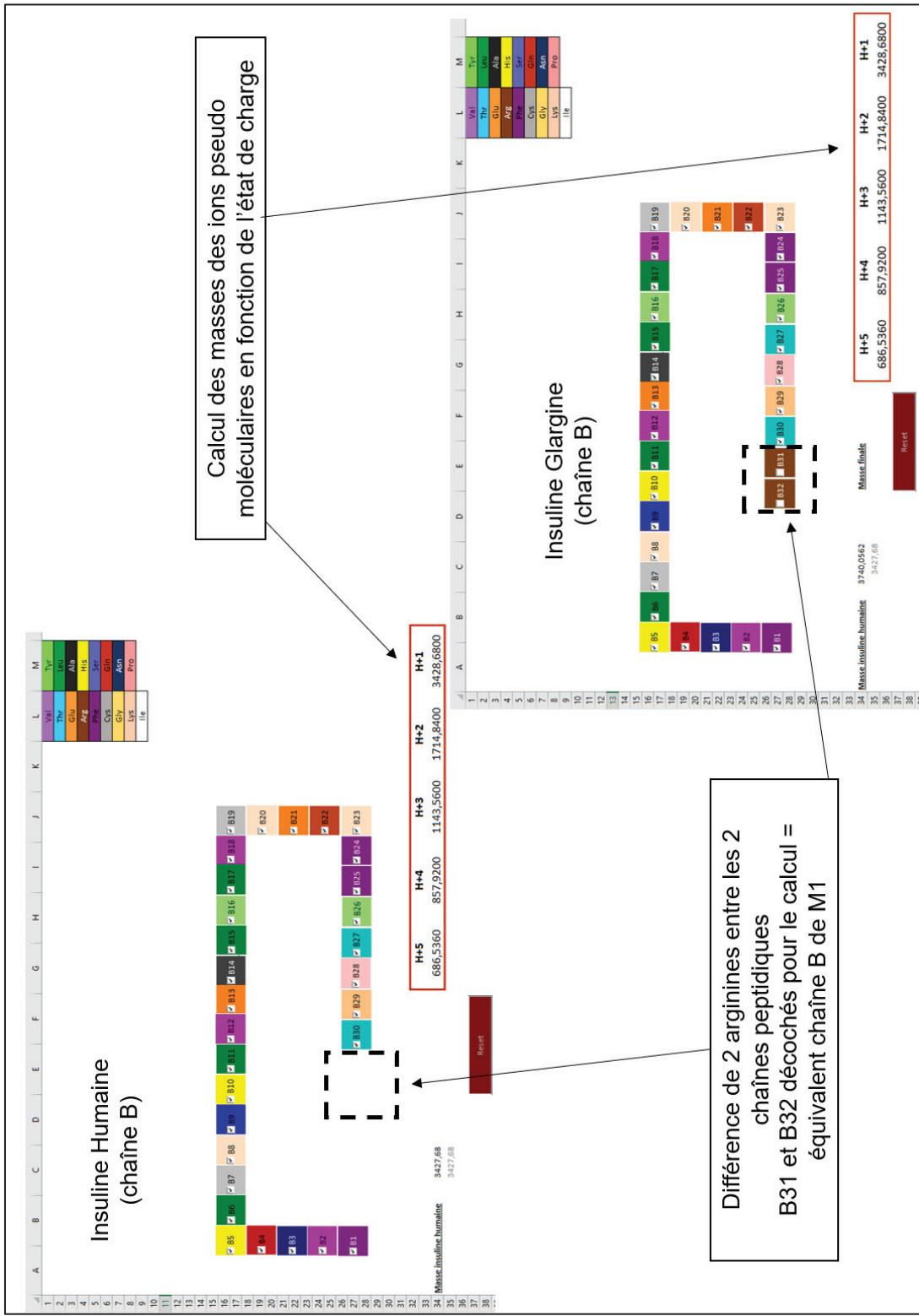
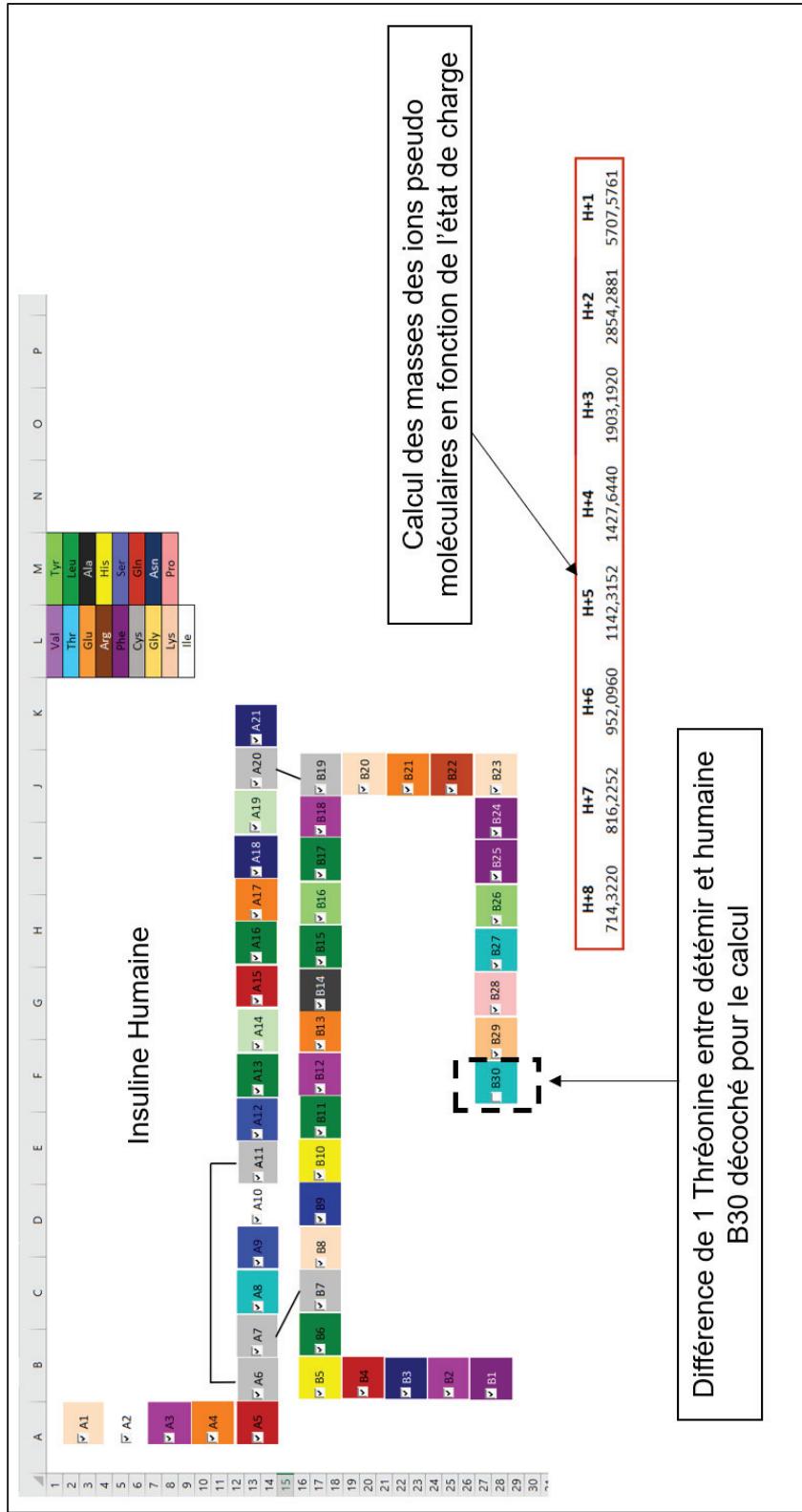


Figure 18 : Exemple d'utilisation de l'outil Excel pour déterminer la structure peptidique d'un produit de dégradation commun aux insulines humaine détémir



Les résultats de cette étude préliminaire sont en adéquation avec ceux rapportés en 2014 par C. Wunder et ses collaborateurs [126] qui ont également observé la formation de chaîne B dans leur étude de dégradation en présence d'hémolysât de GR à partir de solution à 100 µg/mL d'insuline. La dégradation des analogues lispro, glulisine, asparte et glargin a été étudiée et semblait être identique à celle de l'insuline humaine [126]. L'insuline détémir ne faisait pas partie de l'étude. D'après les résultats obtenus lors de notre étude préliminaire, elle semble se comporter de la même manière.

De manière rétrospective, les ions majoritaires des diverses chaîne B ont été recherchés dans les chromatogrammes issus des analyses sanguines des cas étudiés dans l'article analytique n°1. La recherche a été effectuée à partir des données full scan. Aucune chaîne B n'a été identifiée, même pour des cas d'intoxication avérée à l'insuline (cas post-mortem n°6 et 7).

Cette étude préliminaire comporte de nombreuses limites. Tout d'abord, d'autres masses m/z différentes de celles présentées ici ont été observées mais sans suggestion de chaîne peptidique associée. Le tableur de calcul ne permet actuellement pas d'associer des fragments issus de la dégradation et reformant de nouvelles chaînes comme proposé par F. Authier et ses collaborateurs [127]. Chaque dégradation n'a été réalisée qu'une seule fois, ce qui ne permet pas de garantir que le même processus a lieu systématiquement. Les résultats obtenus sont néanmoins en accord avec une précédente étude [126]. Ceci constitue une perspective de recherche des produits déjà identifiés dans des cas de suspicion d'intoxication pour lesquels l'insuline n'est plus détectable dans le sang.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GENERALE

La mise en évidence de l'implication des insulines dans des intoxications qu'elles soient mortelles ou non est délicate. Les difficultés pré-analytiques, analytiques et d'interprétation présentées tout au long de ce manuscrit font état de cette complexité. L'objectif de ce travail était de développer et de valider des techniques analytiques basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, pour l'analyse de l'insuline humaine et de ses analogues, dans des milieux biologiques. Des stratégies analytiques ont été développées pour disposer à terme de données biologiques solides pour accroître les connaissances sur l'implication potentielle des insulines lors d'une intoxication mortelle ou non. Les aspects analytiques ont été au centre de ce travail et les prélèvements obtenus à partir de cas réels ont permis de montrer tout le potentiel des outils analytiques.

Les aspects pré-analytiques sont primordiaux. Concernant les matrices sanguines, les prélèvements sont à réaliser le plus précocement possible suite à l'administration ou après le décès. Une centrifugation dans les plus courts délais est indispensable pour éviter l'hémolyse et en réduire l'impact sur la quantification. En post-mortem les prélèvements tissulaires (foie, cortex rénal, muscle squelettique, site d'injection) sont fortement recommandés. Enfin, une température de conservation des échantillons à -20°C est nécessaire.

Deux méthodes basées sur la LC-MS/HRMS ont permis d'analyser l'ensemble des insulines dans plusieurs matrices biologiques : plasma, sérum post-mortem et tissus. L'analyse sanguine a été validée quantitativement pour trois types de matrices : plasma, sérum post-mortem selon deux intervalles post-mortem > 48h et < 48h. Il s'agit de la première méthode de quantification des insulines validée dans du sang post-mortem. Les LDQ atteintes devraient contribuer à mettre en évidence une intoxication. La méthode d'analyse du sang a été validée aussi bien pour des prélèvements sanguins réalisés sur personne vivante que post-mortem.

L'analyse qualitative tissulaire a été validée en termes de limite de détection et de sélectivité pour l'ensemble des quatre types de tissus : foie, rein, muscle et site d'injection. A ce jour, aucune étude n'a rapporté l'identification de dégludec et détémir dans des échantillons tissulaires. Il s'agit également de la première méthode LC-MS rapportant des LDD pour chaque insuline dans ces quatre tissus. Une étape d'immunopurification constitue un des points essentiels de la préparation des échantillons. De par sa sélectivité, cette étape permet de s'affranchir de nombreux interférents. Bien qu'elle soit particulièrement pertinente dans un contexte médico-légal, elle présente certaines limites. La saturation des anticorps en cas de

concentration élevée, la possible compétition entre insulines, les différents taux de réactions croisées en fonction des analogues, ainsi que la liaison des anticorps à des produits de dégradation ou métabolites font partie de la liste non-exhaustive des limites de l'immunopurification.

D'autres problématiques telles que les phénomènes d'adsorption des insulines sur les contenants, l'agrégation de protéines et la dégradation *in vitro* ont été rencontrées et des solutions ont été apportées.

L'application à des cas réels a permis d'illustrer les performances des deux méthodes puisque différentes insulines ont été détectées, en post-mortem, dans l'ensemble des prélèvements de cette étude. Ces résultats ont démontré l'importance de multiplier les prélèvements pour mettre en évidence en post-mortem l'implication d'insulines dans la survenue d'une intoxication.

Cependant, l'interprétation des résultats des analyses des insulines dans un cadre médico-légal et en particulier en post-mortem reste complexe. En effet, la détection d'un analogue de l'insuline humaine chez une personne non diabétique est l'unique cas dans lequel la seule identification de l'insuline, quelle que soit la matrice, est en faveur de l'implication de la protéine dans l'intoxication. L'identification d'une insuline non indiquée dans le traitement d'une personne diabétique traitée sera aussi considérée comme suspecte. En revanche, dans le cas de personnes diabétiques traitées par de l'insuline, la simple détection d'insulines conformes au traitement, dans quelque matrice que ce soit, ne permet pas d'évaluer leur éventuelle implication dans la survenue d'une intoxication. Une analyse et une interprétation quantitative sont alors indispensables.

L'interprétation des concentrations sanguines doit tenir compte de nombreux paramètres biologiques, pré-analytiques et analytiques. Ceux-ci ont été listés dans un logigramme proposé dans la revue de la littérature publiée dans le cadre de ce travail de thèse. Ce logigramme présente les multiples points à prendre en considération pour une interprétation des plus justes. Il s'agit principalement de données anamnestiques (statut diabétique, le cas échéant : nature du traitement, posologie...), d'enquête (heure d'administration, présence de stylo d'injection sur lieu de découverte d'un corps...) et d'autopsie (mise en évidence d'un site d'injection, de lipodystrophies...). D'autres paramètres devront être mesurés afin d'évaluer l'hypothèse d'une intoxication à l'insuline. Il s'agit de paramètres biologiques tel que le dosage des corps cétoniques (acétone et Beta Hydroxy Butyrate) dans divers prélèvements et l'estimation de l'état glycémique au moment du décès par analyse de l'HV.

Les méthodes développées et validées lors de ce travail de thèse contribueront à acquérir de nouvelles données, permettant de compléter les connaissances dans le but d'améliorer l'interprétation des résultats d'analyse des insulines dans un cadre médico-légal.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ahmed AM. History of diabetes mellitus, Saudi Med J.2002,23(4): 373-378.
- [2] World-Health-Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation.1999,WHO/NCD/NCS/9(2): 1-69.
- [3] Petersmann A., Müller-Wieland D., Müller UA., Landgraf R., et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2019; 127(S 01): S1-S7.
- [4] Tibaldi J. M. Evolution of insulin: from human to analog, Am J Med.2014,127(10 Suppl): S25-38.
- [5] Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy, Clin Chem.2002,48(12): 2270-2288.
- [6] Federation International Diabetes. IDF DIABETES ATLAS 2019 - 9th edition 2019 [en ligne] 2019. [Consulté le 29/0/2021] Disponible sur : <https://diabetesatlas.org/en/sections/demographic-and-geographic-outline.html>
- [7] Marks V., Richmond C. Insulin murders - True life cases. London: Royal Society of Medicine Press. 2007.
- [8] Marks V. Murder by insulin: suspected, purported and proven-a review, Drug Test Anal.2009,1(4): 162-176.
- [9] Marks V., Wark G. Forensic aspects of insulin, Diabetes Res Clin Pract.2013,101(3): 248-254.
- [10] Thomas A., Thevis M. Recent advances in the determination of insulins from biological fluids, Adv Clin Chem.2019,93: 115-167.
- [11] Hess C., Thomas A., Thevis M., et al. Simultaneous determination and validated quantification of human insulin and its synthetic analogues in human blood serum by immunoaffinity purification and liquid chromatography-mass spectrometry, Anal Bioanal Chem.2012,404(6-7): 1813-1822.
- [12] Sunderland N., Wong S., Lee C. K. Fatal Insulin Overdoses: Case Report and Update on Testing Methodology, J Forensic Sci.2016,61 Suppl 1: S281-284.
- [13] Magnan C., Ktorza A. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique, EMC - Endocrinologie.2005: 241-264.
- [14] Jarzuel F. Mise en évidence en postmortem d'une intoxication à l'insuline exogène - 207. Thèse: Diplôme d'Etat de Dr en Pharmacie: Pharmacie: Lyon: 2008; n°77.
- [15] Widjaja A., Morris R. J., Levy J. C., et al. Within- and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables, Clin Chem.1999,45(4): 561-566.
- [16] DeWitt C. R., Heard K., Waksman J. C. Insulin & C-peptide levels in sulfonylurea-induced hypoglycemia: a systematic review, J Med Toxicol.2007,3(3): 107-118.
- [17] Tokarz VL., MacDonald PE., Klip A. The cell biology of systemic insulin function, J Cell Biol.2018,217(7): 2273-2289.
- [18] Duckworth WC., Bennett RG., Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential, Endocr Rev.1998,19(5): 608-624.
- [19] Authier F. Rôle de l'endocytose dans la protéolyse de l'insuline et du glucagon dans l'hépatocyte, médecine/sciences.1994,10: 176-185.
- [20] Nasrallah SN., Reynolds LR. Insulin Degludec, The New Generation Basal Insulin or Just another Basal Insulin?, Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.2012,5: 31-37.
- [21] S. Russell. Changing the game to improve availability and affordability of quality-assured insulin and associated devices. World Health Organization [en ligne] 2020 [consulté le 04/01/2021] Disponible sur : <https://www.who.int/news/item/25-09-2020-changing-the-game-to-improve-availability-and-affordability-of-quality-assured-insulin-and-associated-devices>
- [22] De la Pena A., Riddle M., Morrow L. A., et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high-dose human regular U-500 insulin versus human regular U-100 insulin in healthy obese subjects, Diabetes Care.2011,34(12): 2496-2501.
- [23] Megarbane B., Deye N., Bloch V., et al. Intentional overdose with insulin: prognostic factors and toxicokinetic/toxicodynamic profiles, Crit Care.2007,11(5): R115.

- [24] Morello CM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin analogs in special populations with type 2 diabetes mellitus, *Int J Gen Med.*2011,4: 827-835.
- [25] Arnolds S., Rave K., Hovemann U., et al. Insulin glulisine has a faster onset of action compared with insulin aspart in healthy volunteers, *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*2010,118(9): 662-664.
- [26] Hess C., Madea B., Daldrup T., et al. Determination of hypoglycaemia induced by insulin or its synthetic analogues post mortem, *Drug Test Anal.*2013,5(9-10): 802-807.
- [27] Bolli G. B., Hahn A. D., Schmidt R., et al. Plasma exposure to insulin glargine and its metabolites M1 and M2 after subcutaneous injection of therapeutic and supratherapeutic doses of glargine in subjects with type 1 diabetes, *Diabetes Care.*2012,35(12): 2626-2630.
- [28] Heise T., Mathieu C. Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes, *Diabetes Obes Metab.*2017,19(1): 3-12.
- [29] Bodenlenz M., Ellmerer M., Schaupp L., et al. Bioavailability of insulin detemir and human insulin at the level of peripheral interstitial fluid in humans, assessed by open-flow microperfusion, *Diabetes Obes Metab.*2015,17(12): 1166-1172.
- [30] NovoNordisk. Tresiba - insulin degludec injection. [en ligne] 2015 [mise à jour 12/2019 - consulté le 28/01/2021] Disponible sur: <https://www.novo-pi.com/tresiba.pdf>
- [31] Jayakrishnapillai P.V., Shantikumar V.Nair., Kaladhar K. Current trend in drug delivery considerations for subcutaneous insulin depots to treat diabetes, *Colloids Surf B Biointerfaces.*2017,153: 123-131.
- [32] Thomas A., Thevis M., Delahaut P., et al. Mass spectrometric identification of degradation products of insulin and its long-acting analogues in human urine for doping control purposes, *Anal Chem.*2007,79(6): 2518-2524.
- [33] Judak P., Van Eenoo P., Deventer K. Utilizing ELISA-plate based immunopurification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the urinary detection of short- and long acting human insulin analogues, *J Pharm Biomed Anal.*2018,153: 76-81.
- [34] Legg K. M., Labay L. M., Aiken S. S., et al. Validation of a Fully Automated Immunoaffinity Workflow for the Detection and Quantification of Insulin Analogs by LC-MS-MS in Postmortem Vitreous Humor, *J Anal Toxicol.*2019,43(7): 505-511.
- [35] Chambers E., Legido-Quigley C., Smith N., et al. Development of a fast method for direct analysis of intact synthetic insulins in human plasma: the large peptide challenge, *Bioanalysis.*2013,5(1): 65-81.
- [36] Chambers E., Fountain K. J., Smith N., et al. Multidimensional LC-MS/MS enables simultaneous quantification of intact human insulin and five recombinant analogs in human plasma, *Anal Chem.*2014,86(1): 694-702.
- [37] Thomas A., Yang R., Petring S., et al. Simplified quantification of insulin, its synthetic analogs and C-peptide in human plasma by means of LC-HRMS, *Drug Test Anal.*2020,12(3): 382-390.
- [38] Thomas A., Walpurgis K., Tretzel L., et al. Expanded test method for peptides >2 kDa employing immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS, *Drug Test Anal.*2015,7(11-12): 990-998.
- [39] Steen H., Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing, *Nat Rev Mol Cell Biol.*2004,5(9): 699-711.
- [40] Thevis M., Thomas A., Schanzer W. Mass spectrometric determination of insulins and their degradation products in sports drug testing, *Mass Spectrom Rev.*2008,27(1): 35-50.
- [41] Ojanperä I., Sajantila A., Vinogradova L., et al. Post-mortem vitreous humour as potential specimen for detection of insulin analogues by LC-MS/MS, *Forensic Sci Int.*2013,233(1-3): 328-332.
- [42] Anderson L. J., Tamayose J. M., Garcia J. M. Use of growth hormone, IGF-I, and insulin for anabolic purpose: Pharmacological basis, methods of detection, and adverse effects, *Mol Cell Endocrinol.*2018,464: 65-74.
- [43] Thevis M., Thomas A., Schanzer W. Insulin, *Handb Exp Pharmacol.*2010,(195): 209-226.
- [44] Holt R. I., Sonksen P. H., Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport, *Br J Pharmacol.*2008,154(3): 542-556.

- [45] Agence Mondiale Antidopage. Liste des interdictions 2020. Code Mondial Antidopage. [en ligne] 2020 [consulté le 15/01/2021] Disponible sur : https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_french_prohibited_list.pdf
- [46] Beuhler M. C., Spiller H. A., Alegas A. Demographics and outcome of unintentional insulin overdoses managed by three poison centers, *Clin Toxicol (Phila)*.2013,51(8): 789-793.
- [47] Fletcher S. M., Richards L., Moffat A. C. The detection of fatal insulin poisoning by tissue analysis, *Vet Hum Toxicol*.1979,21 Suppl: 197-199.
- [48] Skowronek R., Nowicka J., Czech E., et al. Evaluation of the usefulness of the immunoradiometric method for post-mortem measurement of insulin concentration in the intraocular fluid: preliminary results, *Arch Med Sadowej Kryminol*.2018,68(3): 161-170.
- [49] Uchida J., Oikawa Y., Katsuki T., et al. Insulin degludec overdose may lead to long-lasting hypoglycaemia through its markedly prolonged half-life, *Diabet Med*.2018,35(2): 277-280.
- [50] Thapa S., Fahim G., Ganne S. Inadvertent iatrogenic insulin detemir 1000 units overdose in a hospitalised patient, *BMJ Case Rep*.2019,12(12).
- [51] M. Lazaro. Insuline fortement concentrée et risque d'erreur d'administration. 28ème Journée nationale sur les dispositifs médicaux; Nancy, France. [en ligne] Octobre 2018 [consulté le 10/01/2021] Disponible sur: https://www.euro-pharmat.com/content_page/download/4140/2686/138
- [52] Von Mach M.-A. , Meyer S. , Omogbehin B. , et al. Epidemiological assessment of 160 cases of insulin overdose recorded in a regional poisons unit, *Int J Clin Pharm Th*.2004,42(5): 277-280.
- [53] Debnath CR., Debnath MR., Alam MM., et al. A case of acute insulin poisoning with attempt to suicide, *Mymensingh Med J*.2014,23(4): 800-802.
- [54] Dewaal CM., McGillis E., Mink M., et al. Octreotide for the treatment of intentional insulin aspart overdose in a non-diabetic patient, *CJEM*.2018,20(4): 643-647.
- [55] Mork TA., Killeen CT., Patel NK., et al. Massive insulin overdose managed by monitoring daily insulin levels, *Am J Ther*.2011,18(5): e162-166.
- [56] Russell KS., Stevens JR., Stern TA. Insulin overdose among patients with diabetes: a readily available means of suicide, *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*.2009,11(5): 258-262.
- [57] Thompson H., Lunt H., Fleckney C., et al. Insulin degludec overdose in an adolescent with type 1 diabetes: proactive management including monitoring using the Freestyle Libre flash glucose monitoring system, *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*.2018,2018(1): 18-0044.
- [58] Tofade T. S., Liles E. A. Intentional overdose with insulin glargine and insulin aspart, *Pharmacotherapy*.2004,24(10): 1412-1418.
- [59] Hiromine Y., Kawabata Y., Yamauchi T., et al. Prolonged hyperinsulinemia after subcutaneous injection of 2400 U regular insulin in a suicide attempt: Time course of serum insulin with frequent measurements, *J Diabetes Investig*.2012,3(5): 468-470.
- [60] Beastall G. H., Gibson I. H., Martin J. Successful suicide by insulin injection in a non-diabetic, *Med Sci Law*.1995,35(1): 79-85.
- [61] Dickson S. J., Cairns E. R., Blazey N. D. The isolation and quantitation of insulin in post-mortem specimens--a case report, *Forensic Sci*.1977,9(1): 37-42.
- [62] Junge M., Tsokos M., Puschel K. Suicide by insulin injection in combination with beta-blocker application, *Forensic Sci Int*.2000,113(1-3): 457-460.
- [63] Kernbach-Wighton G., Puschel K. On the phenomenology of lethal applications of insulin, *Forensic Sci Int*.1998,93(1): 61-73.
- [64] Nowicka J., Skowronek R., Czech E., et al. Comments on 'Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS' by Thevis et al, *Drug Test Anal*.2013,5(2): 133-134.
- [65] Palmiere C., Sabatasso S., Torrent C., et al. Post-mortem determination of insulin using chemiluminescence enzyme immunoassay: preliminary results, *Drug Test Anal*.2015,7(9): 797-803.
- [66] Patel F., Successful suicide by insulin injection in a non-diabetic, *Med Sci Law*.1995,35(2): 181-182.
- [67] Sturner WQ., Putnam RS. Suicidal insulin poisoning with nine day survival: recovery in bile at autopsy by radioimmunoassay, *J Forensic Sci*.1972,17(4): 514-521.

- [68] Winston D. C. Suicide via insulin overdose in nondiabetics: the New Mexico experience, *Am J Forensic Med Pathol.*2000,21(3): 237-240.
- [69] Sun Y. M., Kamel Y., Amin R., et al. Intentional Insulin Overdose for Euphoric Experience, *Prim Care Companion CNS Disord.*2017,19(6).
- [70] Marks V., Richmond C. Kenneth Barlow: the first documented case of murder by insulin, *J R Soc Med.*2008,101(1): 19-21.
- [71] Hood I., Mirchandani H., Monforte J., et al. Immunohistochemical demonstration of homicidal insulin injection site, *Arch Pathol Lab Med.*1986,110(10): 973-974.
- [72] Iwase H., Kobayashi M., Nakajima M., et al. The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdosage, *Forensic Sci Int.*2001,115(1-2): 123-127.
- [73] Marks V. Hypoglycaemia--real and unreal, lawful and unlawful: the 1994 Banting Lecture, *Diabet Med.*1995,12(10): 850-864.
- [74] Marks V., Richmond C. Colin Bouwer: professor of psychiatry and murderer, *J R Soc Med.*2008,101(8): 400-408.
- [75] Thevis M., Thomas A., Schanzer W., et al. Measuring insulin in human vitreous humour using LC-MS/MS, *Drug Test Anal.*2012,4(1): 53-56.
- [76] Tong F., Wu R., Huang W., et al. Forensic aspects of homicides by insulin overdose, *Forensic Sci Int.*2017,278: 9-15.
- [77] Uezono T., Shiono H., Shimizu K., et al. Simultaneous analyses of hypoglycemic agents and C-peptide are essential in a homicide case with the combined dosing insulin and insulin-releasing drug, *Leg Med (Tokyo).*2002,4(1): 34-36.
- [78] Marks V. Murder by insulin, *Med Leg J.*1999,67(Pt 4): 147-163.
- [79] Dejoie T., Ramos E., Baron S., et al. [Contribution of the laboratory in hypoglycemia diagnosis induced by insulin administration in a 2-year-old girl], *Ann Biol Clin (Paris).*2008,66(1): 82-86.
- [80] Marks V. Insulin and the law, *Ann Clin Biochem.*2015,52(Pt 6): 696-698.
- [81] Rabbone I., Galderisi A., Tinti D., et al. Case Report: When an Induced Illness Looks Like a Rare Disease, *Pediatrics.*2015,136(5): e1361-1365.
- [82] Green R. P., Hollander A. S., Thevis M., et al. Detection of surreptitious administration of analog insulin to an 8-week-old infant, *Pediatrics.*2010,125(5): e1236-1240.
- [83] Ben-Chetrit E., Melmed R. N. Recurrent hypoglycaemia in multiple myeloma: a case of Munchausen syndrome by proxy in an elderly patient, *J Intern Med.*1998,244(2): 175-178.
- [84] Sakurai T., Harada M., Takahashi T. Successful treatment with artificial pancreas for a patient who attempted suicide using a high-dose insulin s.c. injection, *Acute Med Surg.*2020,7(1): e518.
- [85] Lu M., Inboriboon P. C. Lantus insulin overdose: a case report, *J Emerg Med.*2011,41(4): 374-377.
- [86] Oran PE., Jarvis JW., Borges CR., et al. Mass spectrometric immunoassay of intact insulin and related variants for population proteomics studies, *Proteomics Clin Appl.*2011,5(7-8): 454-459.
- [87] Dong S., Gu Y., Wei G., et al. Direct comparison of LC-MS/MS and RIA methods for the pharmacokinetics assessment of human insulin in preclinical development, *Biomed Chromatogr.*2018,32(11): e4323.
- [88] Thomas A., Brinkkotter P., Schanzer W., et al. Metabolism of human insulin after subcutaneous administration: A possible means to uncover insulin misuse, *Anal Chim Acta.*2015,897: 53-61.
- [89] Farmer T. D., Jenkins E. C., O'Brien T. P., et al. Comparison of the physiological relevance of systemic vs. portal insulin delivery to evaluate whole body glucose flux during an insulin clamp, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*2015,308(3): E206-222.
- [90] Elgee NJ., Williams RH., Lee ND. Distribution and degradation studies with insulin I131, *J Clin Invest.*1954,33(9): 1252-1260.
- [91] Sanlioglu AD., Altunbas HA., Balci MK., et al. Clinical utility of insulin and insulin analogs, *Islets.*2013,5(2): 67-78.
- [92] Hachiya HL., Treves ST., Kahn CR., et al. Altered insulin distribution and metabolism in type I diabetics assessed by [123I]insulin scanning, *J Clin Endocrinol Metab.*1987,64(4): 801-808.
- [93] Bryant C., Spencer D. B., Miller A., et al. Acid stabilization of insulin, *Biochemistry.*1993,32(32): 8075-8082.

- [94] Birkinshaw VJ., Gurd MR., Randall SS., et al. Investigations in a case of murder by insulin poisoning, *Br Med J*.1958,2(5094): 463-468.
- [95] Arbit E., Kidron M. Oral Insulin Delivery in a Physiologic Context: Review, *J Diabetes Sci Technol*.2017,11(4): 825-832.
- [96] Stofer AR. Suicid mit Insulin und Nachweis des Insulins an der Leiche, *Archives of Toxicology*.1970,26(1): 1-7.
- [97] Logemann E., Pollak S., Khalaf A. N., et al. [Postmortem diagnosis of exogenous insulin administration], *Arch Kriminol*.1993,191(1-2): 28-36.
- [98] Jorgensen L., Bennedsen P., Hoffmann S. V., et al. Adsorption of insulin with varying self-association profiles to a solid Teflon surface--influence on protein structure, fibrillation tendency and thermal stability, *Eur J Pharm Sci*.2011,42(5): 509-516.
- [99] Nielsen L., Khurana R., Coats A., et al. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry*.2001,40(20): 6036-6046.
- [100] Nault L., Guo P., Jain B., et al. Human insulin adsorption kinetics, conformational changes and amyloidal aggregate formation on hydrophobic surfaces, *Acta Biomater*.2013,9(2): 5070-5079.
- [101] Pinholt C., Hostrup S., Bukrinsky J. T., et al. Influence of acylation on the adsorption of insulin to hydrophobic surfaces, *Pharm Res*.2011,28(5): 1031-1040.
- [102] Henry M., Dupont-Gillain C., Bertrand P. Characterization of insulin adsorption in the presence of albumin by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy, *Langmuir*.2008,24(2): 458-464.
- [103] Goebel-Stengel M., Stengel A., Tache Y., et al. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides, *Anal Biochem*.2011,414(1): 38-46.
- [104] Man Y., Lv X., Iqbal J., et al. Adsorptive BSA coating method for CE to separate basic proteins, *Chromatographia*.2013,76: 59-65.
- [105] Pezeshki A., Vergote V., Van Dorpe S., et al. Adsorption of peptides at the sample drying step: influence of solvent evaporation technique, vial material and solution additive, *J Pharm Biomed Anal*.2009,49(3): 607-612.
- [106] Jackson M., Mantsch HH. Beware of proteins in DMSO, *Biochim Biophys Acta*.1991,1078(2): 231-235.
- [107] Peterman S., Niederkofler EE., Phillips DA., et al. An automated, high-throughput method for targeted quantification of intact insulin and its therapeutic analogs in human serum or plasma coupling mass spectrometric immunoassay with high resolution and accurate mass detection (MSIA-HR/AM), *Proteomics*.2014,14(12): 1445-1456.
- [108] Thomas A., Schanzer W., Delahaut P., et al. Sensitive and fast identification of urinary human, synthetic and animal insulin by means of nano-UPLC coupled with high-resolution/high-accuracy mass spectrometry, *Drug Test Anal*.2009,1(5): 219-227.
- [109] Judak P., Coppieters G., Lapauw B., et al. Urinary detection of rapid-acting insulin analogs in healthy humans, *Drug Test Anal*.2020, 12(11-12):1629-1635.
- [110] Taylor SW., Clarke NJ., Chen Z., et al. A high-throughput mass spectrometry assay to simultaneously measure intact insulin and C-peptide, *Clin Chim Acta*.2016,455: 202-208.
- [111] Blackburn M. Advances in the quantitation of therapeutic insulin analogues by LC-MS/MS, *Bioanalysis*.2013,5(23): 2933-2946.
- [112] Bottinelli C., Cartiser N., Bévalot F., et al. Is insulin intoxication still the perfect crime? Analysis and interpretation of postmortem insulin: review and perspectives in forensic toxicology, *Crit Rev Toxicol*.2020,50(4): 324-347.
- [113] Agin A., Coumaros G., Le Gyader E., et al. [Réactions croisées de 4 immunodosages de l'insuline humaine: étude des analogues de l'insuline]. 24ème Colloque CORATA-IBS "Actualités en Immunoanalyse et Biologie Spécialisée »; Paris, France, 2007.
- [114] Wille SM., Peters FT., Di Fazio V., et al. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods, *Accreditation and Quality Assurance*.2011,16(6): 279.

- [115] Savoie N., Garofolo F., Van Amsterdam P., et al. 2010 white paper on recent issues in regulated bioanalysis & global harmonization of bioanalytical guidance, *Bioanalysis*.2010,2(12): 1945-1960.
- [116] Lowes S., Ackermann B. L. AAPS and US FDA Crystal City VI workshop on bioanalytical method validation for biomarkers, *Bioanalysis*.2016,8(3): 163-167.
- [117] Xu Y., Sun L., Anderson M., et al. Insulin glargine and its two active metabolites: A sensitive (16pM) and robust simultaneous hybrid assay coupling immunoaffinity purification with LC-MS/MS to support biosimilar clinical studies, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*.2017,1063: 50-59.
- [118] Monnier L., Colette C., Owens D. Basal insulin analogs: from pathophysiology to therapy. What we see, know, and try to comprehend?, *Diabetes Metab*.2013,39(6): 468-476.
- [119] Brange J., Langkjaer L., Havelund S., et al. Chemical stability of insulin. 1. Hydrolytic degradation during storage of pharmaceutical preparations, *Pharm Res*.1992,9(6): 715-726.
- [120] Beckett N., Tidy R., Douglas B., et al. Detection of intact insulin analogues in post-mortem vitreous humour-Application to forensic toxicology casework, *Drug Test Anal*.2020.
- [121] Benzi L., Cecchetti P., Ciccarone A. M., et al. Insulin degradation in vivo: a high-performance liquid chromatographic analysis, *J Chromatogr*.1990,534: 37-46.
- [122] Bellia F., Pietropaolo A., Grasso G. Formation of insulin fragments by insulin-degrading enzyme: the role of zinc(II) and cystine bridges, *J Mass Spectrom*.2013,48(2): 135-140.
- [123] Seabright PJ., Smith GD. The characterization of endosomal insulin degradation intermediates and their sequence of production, *Biochem J*.1996,320 (Pt 3): 947-956.
- [124] Brodal BP. Evidence of an enzymatic degradation of insulin in blood in vitro, *Eur J Biochem*.1971,18(2): 201-206.
- [125] Sapin R., Gasser F., Grucker D. Prévention des effets de l'hémolyse sur le dosage d'insuline, *Immunoanal Biol Spéc*.1997,12: 206-208.
- [126] Wunder C., Kauert GF., Toennes SW, Factors leading to the degradation/loss of insulin in postmortem blood samples, *Forensic Sci Int*.2014,241: 173-177.
- [127] Authier F., Metiou M., Fabrega S., et al. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D, *J Biol Chem*.2002,277(11): 9437-9446.

ANNEXES

ANNEXE 1

*Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique – Lille – Mai 2019
DOI : 10.1016/j.toxac.2019.03.043*

Characterization of suicide involving insulin analog injection: interest of injection site analysis by LC/HRMS

C.Bottinelli^{1*}, J.Guitton², L.Fanton³, F. Bévalot¹

1: Laboratoire LAT LUMTOX, Lyon, France

2: Laboratoire de Pharmaco-Toxicologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

3: Service de Médecine Légale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Objective To provide evidence of the role of insulin in the occurrence of death is always challenging: glycemic state can be estimated only in vitreous matrix, and postmortem blood sample detection of insulin or its analogs is known to be problematic. This case report is of a death involving insulin analog injection characterized at the injection site on liquid chromatography coupled to an exactive high-resolution/high accuracy mass spectrometry (LC/HRMS).

Case Report A 56-year-old nurse with suicidal tendencies was found dead in her car 24 hours after disappearing. An empty bottle of whiskey, empty alprazolam blisters and insulin pens were found near the corpse. Autopsy showed common signs of toxic death. Three needle marks were found on the left arm, and were sampled along with the usual toxicological matrices.

Methods General toxicological screening was performed to screen for ethanol, carbon monoxide, medical drugs and drugs of abuse. Glucose and lactate in vitreous humor (VH) and glycated hemoglobin (HbA1c) in whole blood were quantified by an enzymatic method on a Cobas® analyzer. Immunoassay (Cobas®) was performed on femoral blood (FB) serum to screen for insulin and C-peptide. For insulin assay in injection site tissue, 1 g of tissue was pretreated by grinding and ultrasonic bath in an acid ethanol solution; then solid-phase extraction by anion exchange was performed before analysis on LC/HRMS.

Results Ethanol was detected only in urine, at 0.11 g/L. Ethylglucuronide was quantified at 0.06 µg/mL and 133 µg/mL in FB and urine, respectively. Alprazolam (45 ng/mL) and tramadol (270 ng/mL) were found in FB. Morphine and codeine were quantified in urine at 102 ng/mL and 290 ng/mL respectively, but not detected in FB. HbA1c level was 4.5%. Glucose assay was negative (<0.10 mmol/L) in both VH samples. Lactate was quantified at 10.3 and 9.9 mmol/L in right and left VH, respectively. Serum immunoassays were negative for insulin (<1mU/L) and C-peptide (<0.03 nmol/L). Analysis of suspected injection site tissue identified aspart, an insulin analog.

Discussion Alprazolam and tramadol concentrations were subtoxic in blood; opiates and ethanol were detected only in urine. Toxic death was not demonstrated from these results. The values of glucose and lactate in vitreous humor suggested a potentially lethal hypoglycemic state, according to the reference values proposed by Karlovsek

[1]. However, despite the insulin pens found in the car, insulin immunoassay was negative in blood. Injection site analysis by LC/HRMS allowed identification of the insulin analog, aspart. This finding of insulin analog intake in a non-diabetic subject, associated with the glucose and lactate concentrations in VH, suggested severe hypoglycemia induced by insulin analog injection. Various hypotheses could explain the failure to detect aspart in serum: the poor ability of immunoassay to detect analogs, metabolism during the time between injection and death, and/or degradation by hemolysis during the postmortem interval.

Conclusion Demonstration of death by insulin injection is difficult and should not be limited to blood immunoassay. Estimation of glycemic status at time of death and identification of insulin or analogs by injection site analysis by LC/HRMS are fundamental to characterizing death involving insulin injection. In the present case, the medicolegal examiner diagnosed a hypoglycemic state with fatal outcome secondary to aspart injection as cause of death, and suicide as the manner.

References [1]. Karlovsek MZ. Diagnostic values of combined glucose and lactate values in cerebrospinal fluid and vitreous humour--our experiences. Forensic Sci Int. 2004; 146 Suppl:S19-23

Conflict of interest: none

ANNEXE 2

Congrès de la Société Française de Médecine Légale – Dijon – Juillet 2019

Proposition de protocole de mise en évidence des insulines en post-mortem

C.Bottinelli¹, J.Guitton², F.Bévalot¹, L.Fanton³

¹ : Laboratoire LAT LUMTOX, Lyon, France

² : Laboratoire de pharmacotoxicologie, Hospices civils de Lyon, France

³ : Service de Médecine Légale, Hospices civils de Lyon, Lyon, France

L'objectif de cette présentation est de présenter un protocole de prélèvements et d'analyse à mettre en œuvre dans les décès où l'implication d'une insuline est suspectée, ainsi que son application à des cas réels.

Contexte : La mise en évidence de l'implication de l'insuline ou de ses analogues en *post-mortem* reste complexe. En effet les insulines subissent un métabolisme rapide et présentent une grande instabilité. De plus, leur recherche est généralement limitée au prélèvement sanguin par technique immunologique, technique qui présente de nombreuses limites (sensibles à l'hémolyse, taux de réactions croisées variables en fonction de l'insuline et du kit d'analyse...). L'évolution des techniques chromatographiques permet aujourd'hui de détecter et d'identifier l'insuline et ses analogues dans différentes matrices : humeur vitrée, point d'injection, rein, muscle, tissu adipeux...

Méthodologie : Le protocole proposé ici est appliqué dans le Service de Médecine Légale de Lyon lors d'autopsies de victimes présentant des antécédents connus de diabète insulino-dépendants, ou lorsqu'un dispositif d'injection d'insuline est retrouvé à proximité du corps, ou encore en présence de traces d'injection indéterminées. Ce protocole concerne l'autopsie, les données d'enquêtes et l'analyse. Ainsi, les prélèvements réalisés au cours de l'autopsie sont, selon disponibilité : sanguins fémoral et cardiaque, humeur vitrée, urine, bile, muscle squelettique, cortex rénal, tissu adipeux et site(s) d'injection(s). Une centrifugation et décantation rapide du sang et une conservation des prélèvements à -20°C jusqu'à analyse est mise en place pour limiter la dégradation des insulines. La nature de l'insuline prescrite ou retrouvée sur les lieux, le cas échéant, est systématiquement recherchée par le médecin légiste en relation avec les enquêteurs. L'analyse des prélèvements est effectuée par chromatographie liquide couplée à un détecteur de masse haute résolution (UHPLC-HRMS) en complément des tests immunologiques et de l'estimation de l'état glycémique au moment du décès.

Résultats : L'application de ce protocole a permis de mettre en évidence des analogues de l'insuline dans différentes matrices sur plusieurs cas autopsiques.

Conclusion : L'analyse par technique immunologique de sang *post-mortem* pour rechercher une administration d'insuline est peu efficace et peut mener à des conclusions erronées. L'élaboration d'un protocole de prélèvements dédié en salle d'autopsie, une collaboration étroite avec les enquêteurs et le développement d'une méthode sensible d'analyse des insulines dans plusieurs matrices ont permis de caractériser de manière plus systématique une administration d'insuline.

ANNEXE 3

*Congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique – Grenoble – 2020
DOI : 101016/j.toxac.2020.09.030*

Analyse de l'insuline humaine et de ses analogues par techniques immunochimiques et LC-HRMS sur sang *postmortem* : à propos d'un cas de décès impliquant l'aspart.

C.Bottinelli^{1*}, J.Guitton², K.Chikh⁴, C.Roger⁴, N.Cartiser³, R.Nicoli⁵, L.Fanton³, F.Bévalot¹

1 : Laboratoire LAT LUMTOX, Lyon, France

2 : Laboratoire de Pharmaco-Toxicologie, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

3 : Service de Médecine Légale, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

4 : Laboratoire de Biochimie, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France

5 : Swiss Laboratory for Doping Analyses, CURML, CHUV and UNIL, Switzerland

Objectif Présenter un cas de décès impliquant un analogue de l'insuline et discuter les apports respectifs et limites des analyses immunochimiques et chromatographiques de l'insuline humaine (IH) et de ses analogues.

Description du cas Une infirmière de 47 ans est retrouvée décédée dans un champ. Dans son véhicule, stationné proche du corps, ont été retrouvés différents contenants de médicaments et une seringue d'insuline aspart. La victime n'était pas diabétique. Les constatations autopsiques ont mis en évidence un foie de choc, une congestion polyviscérale ainsi qu'un point d'injection au dos d'une main. Ce dernier a été prélevé, ainsi que les matrices usuelles en vue d'une expertise toxicologique.

Méthodes Une toxicologie de référence et une estimation de l'état glycémique au moment du décès ont été réalisées. Le dosage de l'IH et de ses analogues dans le sérum a été effectué par immunochimie de types ECLIA (ElectroChimiLuminescent ImmunoAssay)(Cobas E411) (LD_D = 1.0 mU/L) et IRMA (Cisbio) (LD_D = 0.2 mU/L) et par LC-HRMS (phase inverse) après préparation associant précipitation (ACN/MeOH 50:50 v/v), filtration et immunopurification par kit iso-insulin (Mercodia) (LD_D = 28.8 mU/L).

Résultats L'éthanolémie était négative. Différentes molécules médicamenteuses psychotropes ont été retrouvées : amitriptyline (52 ng/mL), nortriptyline (83 ng/mL), diazépam (30 ng/mL), nordiazépam (53 ng/mL), oxazépam (262 ng/mL), venlafaxine (129 ng/mL) et zopiclone (511 ng/mL). Les paramètres glycémiques étaient les suivants : Hémoglobine glyquée (HbA1c) = 5.3%, glucose et lactates dans l'humeur vitrée = 0.38 mmol/L et 9.0 mmol/L respectivement. Le peptide-C a été dosé à 0.047 nmol/L. Le dosage d'insuline était négatif (<1.0mU/L) par RIA et mesuré à 408 mU/L par IRMA. L'insuline aspart a été identifiée par LC-HRMS et quantifiée respectivement à 2161 et 2853 mU/L dans le sang cardiaque et le sang périphérique.

Discussion La divergence de résultats entre les méthodes immunochimiques peut s'expliquer par les réactivités croisées différentes des anticorps utilisés dans les kits : le kit RIA détecte l'IH et un métabolite de la glargin, alors que le kit IRMA détecte l'IH

et tous ses analogues commercialisés. La différence de concentration entre l'IRMA et la LC-HRMS pourrait être expliquée notamment par une réaction croisée <100% du kit IRMA pour l'insuline aspart, des interférences analytiques liées à la qualité du prélèvement ou encore un effet crochet. Les résultats d'analyse, les observations autopsiques et les données d'enquêtes ont permis de conclure à un suicide par intoxication médicamenteuse associant psychotropes et analogue d'insuline (aspart).

Conclusion Les kits immunochimiques disponibles en clinique présentent des limites qualitatives et quantitatives. Les réactions croisées avec les analogues propres à chaque kit peuvent mener à des résultats très variables allant d'une quantification erronée jusqu'à la non détection. Au contraire, la spectrométrie de masse permet d'identifier les insulines et donc de réaliser un dosage spécifique. En revanche, elle nécessite des analyseurs de haute performance et une préparation complexe de l'échantillon. Les auteurs préconisent l'analyse par 2 kits présentant des réactivités croisées différentes et par une technique chromatographique couplée à la spectrométrie de masse pour documenter les cas médicolégaux impliquant l'insuline ou ses analogues.

Absence de conflit d'intérêt