

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

LE PHÉNOTYPAGE PAR L'ADN EN CRIMINALISTIQUE : PORTRAIT D'UNE PROBLÉMATIQUE

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR
AUDRÉE GAREAU-LÉONARD**

JUILLET 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.”

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait su voir le jour sans une seule des personnes ci-après nommées. Je les remercie du fond du cœur pour leur aide, leurs conseils, leur support et leurs encouragements. En tout premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, **Dr Emmanuel Milot**, ainsi que mon co-directeur de recherche, **Dr Frank Crispino**, qui ont su m'aider et me conseiller depuis bien plus longtemps que la durée de cette maîtrise par leurs commentaires constructifs et leurs remarques acérées. Ceux-ci m'ont permis de demander le meilleur de moi-même et de mon travail. Je remercie également mes collègues du laboratoire de génétique des populations pour leurs échanges stimulants et leur aide. Il est étonnant qu'une phrase dite au passage puisse avoir de si profonds impacts quelquefois.

J'aimerais ensuite remercier tous les partenaires de ce projet; **Mr André Deslauriers** et **Mme Joanie Prince** de l'École nationale de police du Québec (ENPQ), **Mme Dominique Lafrenière**, **Mr Hugo Petit** et **Mr Marc Lépine** de la Sûreté du Québec (SQ), **Mme Diane Séguin** du Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML) ainsi que **Mme Julie Boudreau**, **Mme Sharen Roland** et **Mr Alexandre Montpetit** de Génome Québec. Les mots ne peuvent exprimer à quel point chacune de ces personnes a contribué à l'accomplissement de cet ouvrage. Sans eux, ce projet ne serait resté qu'une ébauche sur papier et du fait de tous ces échanges enrichissants, mon travail n'a pu qu'en être bénéficiaire. J'aimerais également exprimer ma sincère gratitude envers **Mr Vincent Mousseau**, doctorant en criminologie à l'Université de Montréal pour son aide précieuse tout au long du processus, que ce soit pour une question banale ou une réflexion profitable pour mener à bien l'entreprise.

Bien entendu, ces remerciements ne seraient pas complets sans évoquer ma famille et mes amis, qui me supportent depuis toujours dans mon besoin de savoir et me poussent à accomplir mes rêves, tout en étant présents pendant les bons comme les difficiles moments.

Je réserve mes derniers remerciements aux organismes ayant financé cette recherche, soit le **Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG)** et le **Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT)**, le **Centre international de criminologie comparée (CICC)**, le **Groupe de recherche en science forensique (GRSF)** et l'**Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)**. Le soutien financier fourni m'aura permis de mener au mieux ces années de travail acharné en me permettant de ne me soucier que de ce qui importe le plus.

AVANT-PROPOS

La genèse de mon projet de maîtrise a débuté alors que je terminais mes études du baccalauréat en chimie – profil criminalistique à l'Université du Québec à Trois-Rivières (maintenant baccalauréat en science forensique). Les études sur la prédiction de la couleur des yeux et des cheveux par le phénotypage étaient en plein essor et son potentiel en science forensique était déjà exploré. Toutefois, considérant que la prédiction des phénotypes regroupe l'implication de plusieurs facteurs, notamment les interactions entre les gènes, mais aussi avec l'environnement, le scepticisme du chercheur pour qui je travaillais à ce moment, Dr Emmanuel Milot, a été éveillé. Nous avons alors débuté la mise sur pied d'une banque de données génétiques, généalogiques et phénotypiques afin d'explorer plus en détail ce sujet de recherche. Entre-temps, j'ai également initié et conclu un second baccalauréat en sciences biomédicales à l'Université Laval afin de consolider mes connaissances sur la biologie humaine et les nouvelles technologies d'analyse de l'ADN. Je suis ensuite revenue bien outillée pour étudier plus en profondeur ce projet qui m'intéressait tant, à savoir, l'utilisation du phénotypage par l'ADN en science forensique.

L'exploration initiale du sujet nous a permis, moi ainsi que mes deux directeurs de recherche (Dr Emmanuel Milot et Dr Frank Crispino), d'identifier des lacunes d'ordre scientifique, mais également au niveau de l'utilité et de l'interprétation des résultats, qui méritaient d'être étudiées. Il a finalement été décidé d'explorer les deux premières pour ma maîtrise. Plus en détail, des policiers québécois ont été interrogés par rapport au phénotypage par l'ADN afin d'évaluer leur connaissance de cet outil et leur opinion par rapport à celui-ci pour accéder à sa potentielle utilité dans le cadre de leur travail. En concomitance, un protocole de prédiction des phénotypes pigmentaires (couleur des yeux, des cheveux et de la peau) a été évalué afin de se pencher sur la justesse de l'outil dans la population canadienne, plus précisément québécoise. Au niveau de l'utilité du phénotypage en science forensique, celle-ci n'a été évaluée qu'une fois auprès d'une petite cohorte de policiers en Europe (n=6). Nous avons donc comme objectif d'interroger une cohorte plus importante afin d'avoir un portrait plus global de l'utilité de cet outil au niveau des policiers, qui en sont les destinataires. D'un

autre côté, lors de l'élaboration du projet, la justesse du phénotypage avait déjà été évaluée dans plusieurs populations, mais jamais dans la population canadienne et aucune étude n'avait été effectuée dans la population québécoise (de laquelle provient notre échantillon). Cette dernière est particulièrement intéressante puisqu'elle possède une architecture génétique spécifique méritant d'être prise en compte afin d'évaluer la justesse du phénotypage dans cette population comparativement à l'ensemble du Canada. Toutefois, bien que l'étude menée dans ce mémoire a permis d'éclaircir certains points et amène une nuance intéressante sur cet outil, la limite majeure de ce projet repose sur le fait que celui-ci s'inscrit dans un ensemble d'enjeux liés au phénotypage par l'ADN qui restent encore à être étudiés afin de conclure généralement sur l'utilisation de cet outil dans un contexte forensique au Québec.

Ce mémoire introduit donc en première instance les connaissances utiles à la compréhension du sujet d'étude, plus spécifiquement, les fondements biologiques de base et les différents domaines d'étude reliés à l'analyse de l'ADN et des phénotypes en science forensique. Les connaissances sur le phénotypage et les fondements sur lesquels il siège sont finalement exposés en détail avant de poursuivre avec le corps du mémoire, qui explore en deux articles scientifiques l'utilité et la justesse du phénotypage par l'ADN dans un contexte forensique, pour conclure avec la portée de l'étude menée, ses limites ainsi que les perspectives futures envisagées.

RÉSUMÉ

Le phénotypage par l'ADN est un nouvel outil pressenti pour être utilisé entre autres en science forensique. Plus précisément, celui-ci serait envisagé dans un contexte où les techniques utilisées présentement pour l'analyse de l'ADN n'auraient pas permis de fournir une piste d'enquête (par exemple en identifiant de manière probabiliste une personne d'intérêt suite à l'analyse d'une trace biologique laissée sur une scène de crime, ou plus généralement, une scène d'investigation). Toutefois, les acteurs auquel le phénotypage est principalement destiné, c'est-à-dire les policiers, n'ont pas (ou très peu) été questionnés sur celui-ci, soulevant des doutes quant à sa réelle utilité dans ce contexte. De plus, l'évaluation de cet outil dans diverses populations a jusqu'à présent donné des résultats mitigés, questionnant ainsi sa justesse. De surcroît, il apparaît pertinent de se pencher sur cet outil puisque même s'il n'a pas été évalué dans la population canadienne, il a déjà été utilisé dans quelques dossiers judiciaires au pays.

Le but de cette recherche était donc de répondre à deux questions principales, soit 1) le phénotypage par l'ADN répond-il au besoin opérationnel du Québec ? et 2) est-il transposable au Québec ? Pour répondre à ces deux questions, une cohorte de 163 policiers de la Sûreté du Québec a été interrogée via un questionnaire électronique afin d'évaluer leurs connaissances et leur opinion par rapport à l'utilisation du phénotypage au Québec. De plus, l'ADN d'une cohorte de 139 participants provenant de trois régions géographiques du Québec a été analysé afin de prédire trois traits phénotypiques pigmentaires (couleur des yeux, des cheveux et de la peau) via le HIrisPlex-S, un ensemble de polymorphismes génétiques permettant la prédiction de ces traits et qui est de plus en plus utilisé.

L'hypothèse de travail pour la première partie, soit celle de l'utilité, était que les policiers ne connaissent pas suffisamment le phénotypage pour apprécier sa valeur véritable, résultant en une surestimation de son utilité. L'hypothèse pour la seconde partie, soit celle de la justesse, était que la compréhension des bases génétiques des phénotypes est insuffisante pour permettre des prédictions suffisamment justes dans un contexte forensique.

Les résultats obtenus suggèrent que la cohorte de policiers québécois interrogée aimerait pouvoir utiliser l'outil et est en mesure de voir plusieurs utilités rattachées au phénotypage dans leur travail. Cependant, leurs connaissances sur le sujet restent limitées. Pour ce qui est de la justesse de l'outil, elle n'est pas suffisante pour une utilisation en structuration de la preuve judiciaire au Québec, et même potentiellement en tant que renseignement d'enquête puisque moins de 40% des individus testés avaient des prédictions justes pour les trois phénotypes étudiés. Des études plus poussées sont donc nécessaires afin d'obtenir un ensemble de prédiction qui est plus juste et réellement utile.

Mots-clés : génétique quantitative, phénotypes pigmentaires, *single nucleotide polymorphisms*, HIrisPlex-S, analyse inductive, policiers québécois, science forensique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
AVANT-PROPOS	V
RÉSUMÉ	VII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	XVI
LISTE DES SYMBOLES	XVIII
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
1.1 Problématique	1
1.2 L'ADN.....	2
1.2.1 La variation génétique humaine.....	4
1.3 La science forensique	6
1.4 La génétique des populations et la génétique forensique	7
1.4.1 Méthodes d'analyse des SNP.....	11
1.5 Enjeux reliés aux analyses conventionnelles.....	16
1.6 Le phénotypage par l'ADN	17
1.6.1 Définition.....	17
1.6.2 Utilité en génétique forensique	18
1.6.3 Méthodes indirecte et directe.....	18
1.6.4 Création des ensembles de SNP et de leur modèle mathématique	20
1.6.5 Modèle de régression logistique multinomiale.....	24
1.7 La génétique quantitative.....	28
1.8 La pigmentation.....	30
1.8.1 Couleur des yeux	33
1.8.2 Couleur des cheveux.....	36
1.8.3 Couleur de la peau	37
1.8.4 Kits et services commerciaux	39
1.9 Objectifs et hypothèses de travail.....	46

1.10	Dimensions méthodologiques.....	46
1.10.1	L'analyse inductive.....	47
1.10.2	HIrisPlex-S.....	47
1.11	Résultats sommaires	48
 CHAPITRE II		49
LE PHÉNOTYPAGE PAR L'ADN EN CRIMINALISTIQUE : VISION OPÉRATIONNELLE DES OFFICIERS DE POLICE QUÉBÉCOIS		49
2.1.	Contribution des auteurs	49
2.2.	Résumé de l'article	50
2.3.	Forensic DNA Phenotyping: Accessing the operational view of police officers	51
	Abstract	51
	Introduction.....	51
	Methods.....	53
	Evaluation tool.....	53
	Experimental sample	53
	Data collection.....	54
	Data analysis and statistics	55
	Results.....	55
	Socio-demographic characteristics of respondents.....	55
	Knowledge on DNA phenotyping in a forensic context.....	57
	Opinion on DNA phenotyping in a forensic context.....	59
	General reliability and reliability of DNA phenotyping.....	59
	Practical utility of DNA phenotyping.....	60
	Physical characteristics of interest.....	61
	Issues related to DNA phenotyping	63
	Discussion.....	64
	Knowledge on DNA phenotyping in a forensic context.....	65
	Opinion on DNA phenotyping in a forensic context.....	66
	General reliability and reliability of DNA phenotyping.....	66
	Practical utility of DNA phenotyping.....	68
	Physical characteristics of interest.....	69

Issues related to DNA phenotyping	71
Limitations of the study	72
Conclusion	72
Acknowledgments.....	73
References	74
Supplemental data	78
S2.1. Three-part questionnaire administered to <i>Sûreté du Québec</i> police officers	78
Table S2.2. Socio-demographic characteristics of the participants (n = 163)	82
CHAPITRE III	83
LE PHÉNOTYPAGE PAR L'ADN EN CRIMINALISTIQUE : ÉVALUATION DU HIRISPLEX-S POUR LA PRÉDICTION DE LA PIGMENTATION DANS UNE POPULATION CANADIENNE	83
3.1. Contribution des auteurs	83
3.2. Résumé en français du deuxième article	83
3.3. Forensic DNA phenotyping: Evaluation of the HIRISPLEX-S panel for pigmentation prediction in a Canadian population.....	85
Abstract	85
Introduction	85
Methods.....	87
Participant recruitment and data collection	87
SNP panel for phenotyping.....	89
DNA extraction, quantification and sequencing.....	90
Data analysis and statistics	92
Bioinformatics pipeline.....	92
Statistical analysis.....	92
Results.....	94
Sample collection and phenotypic classification.....	94
Data analysis and statistics	96
Eye colour	96
Hair colour	98
Skin colour.....	99
Multi-trait phenotypic prediction.....	101

Discussion	102
Generalization of eye colour predictions to the Quebec and Canadian populations.....	102
Comparison of allele frequencies with the European population.....	103
Observer variation in phenotype calling.....	104
Performance and accuracy of predictions.....	105
Eye colour	105
Hair colour	107
Skin colour.....	108
Multi-trait phenotypic prediction.....	109
Comparison with other data/populations	110
Eye colour	110
Hair colour	111
Skin colour.....	112
Limitations of the study	112
Conclusion	112
Acknowledgments.....	113
References	114
Supplemental data	119
CHAPITRE IV	124
DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	124
4.1 Utilité du phénotypage par l'ADN en science forensique.....	124
4.2 Fiabilité du phénotypage par l'ADN en science forensique.....	126
4.2.1 Apports environnemental et génétique aux phénotypes	128
4.2.2 Variation génétique populationnelle.....	131
4.2.3 Classification subjective des phénotypes.....	132
4.3 Apport global du phénotypage par l'ADN en science forensique et améliorations possibles.....	132
4.4 Limites de la recherche	135
4.5 Perspectives de recherches futures	135
4.6 Conclusion générale.....	138
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Résumé des SNP contenus dans le HIrisPlex-S ainsi que les informations relatives à ceux-ci.....	41
1.2 Résumé de systèmes utilisés pour prédire la couleur des yeux, des cheveux et/ou de la peau ainsi que leur performance respective.....	42
1.3 Évaluation du IrisPlex, du HIrisPlex et du HIrisPlex-S dans différentes populations.....	45
2.1 Socio-demographic characteristics of the participants ($n = 163$)	57
2.2 Most interesting physical characteristics to predict by DNA phenotyping from the police officers' perspective ($n=142/163$)	63
2.3 Physical characteristics mentioned by police officers when asked which three they considered the most interesting ones to obtain from DNA phenotyping ($n=111/163$)	63
S2.2. Socio-demographic characteristics of the participants ($n = 163$)	82
3.1 Subjective phenotypic classification of eye, hair and skin colour by three observers	94
3.2 Observed allele frequencies of the 41 SNP in the Quebec population sample compared to the allele frequencies of the European sample from the 1,000 Genomes Consortium	95
3.3 Summary statistics for each eye colour category, based on the analysis of 139 participants from a Quebec population sample	97
3.4 Summary statistics (PPV, NPV, sensitivity, specificity and accuracy) for each hair colour category, based on the analysis of 139 participants from a Quebec population sample (without the prediction guidelines of Walsh & Kayser (2016)).....	99

3.5	Summary statistics (PPV, NPV, sensitivity, specificity and accuracy) for each skin colour category, based on the analysis of 125 participants from a Quebec population sample (without the prediction guidelines of Chaitanya <i>et al.</i> (2018))	100
3.6	Success of multi-trait prediction for the three phenotypes (eye, hair and skin colour) based on the analysis of a sample of 125 participants from Quebec	102
S3.1	Statistics when only the three observers agreed on the phenotypes	119
S3.2	Comparison of statistics obtained for eye colour from 139 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website and from the study of Fréreau (2022)	121
S3.3	Comparison of statistics obtained for hair colour from 139 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website and from the study of Fréreau (2022)	122
S3.4	Comparison of statistics obtained for skin colour from 125 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website	123
4.1	Données sur l'héritabilité de trois phénotypes (couleur des yeux, des cheveux et de la peau) dans différentes populations	128

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Schématisation de l'ADN et de ses composantes, les nucléotides	2
1.2 Les 23 paires de chromosome renfermant le matériel génétique humain	3
1.3 Principaux types de polymorphismes retrouvés dans l'ADN humain....	5
1.4 Exemple d'un profil génétique comprenant cinq marqueurs, soit l'amélogénine (marqueur de sexe) et quatre STR : vWA, D8S1179, TPOX et FGA	10
1.5 Étapes de la méthode dite de l'extension de base unique (SBE)	12
1.6 Adaptateurs adjoints aux fragments d'ADN à séquencer	13
1.7 Biopuce d'Illumina contenant sur sa surface de nombreuses séquences de quelques nucléotides permettant de fixer les fragments d'ADN à séquencer qui sont contenus dans la librairie	14
1.8 Amplification en pont de l'ADN lié sur la biopuce.....	15
1.9 Amplification du brin matrice à l'aide de terminateurs fluorescents réversibles	16
1.10 Schéma des différentes statistiques pouvant être calculées pour évaluer la performance d'un modèle de prédiction	21
1.11 Schématisation de la variance phénotypique dans la couleur de la peau	29
1.12 Mécanisme réactionnel permettant la production d'eumélanine et de phéomélanine dans les mélanosomes des mélanocytes	31
2.1 Level of respondents' knowledge about DNA phenotyping prior to this study, as a function of their job title (n=163)	58

2.2	Information sources from which 56 police officers already knew something about DNA phenotyping, prior to this study (out of 163 respondents).....	59
2.3	Number of responses to the question “Do you have a more unfavorable or favorable opinion regarding the use of DNA phenotyping in criminal investigations (1 being very unfavorable and 10 being very favorable)?” (n=145/163)	64
S3.1	Examples of participants classified as having intermediate eye colour but with a mixture of green and brown in their irises.....	120
4.1	Représentation des différents aspects composant la variance phénotypique.....	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique; <i>deoxyribonucleic acid</i>
ADNmt	ADN mitochondrial
AIM	Marqueur informatif d'ancestralité; <i>ancestry-informative SNP</i>
AUC	Aire sous la courbe ROC; <i>area under the ROC curve</i>
CMYK	Espace colorimétrique cyan, magenta, jaune et noir; <i>cyan, magenta, yellow, black</i>
CQEDS	Centre québécois d'enregistrement des délinquants sexuels
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
FDP	Phénotypage par l'ADN en criminalistique; <i>forensic DNA phenotyping</i>
GWAS	Études d'association pangénomique; <i>genome-wide association studies</i>
HIS	HIrisPlex-S
INDEL	Insertion-délétion d'une ou de plusieurs nucléotides à un endroit de l'ADN
LSJML	Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale
MLP	Sondes multi-locus
MLR	Régression logistique multinomiale; <i>multinomial logistic regression</i>
NGS	Séquençage de nouvelle génération; <i>next-generation sequencing</i>
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne; <i>polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Paired-end</i>
PI	Pouvoir d'inclusion
RFLP	Polymorphisme de longueur de fragment de restriction; <i>restriction fragment length polymorphism</i>
SBE	Extension de base unique ou mini-séquençage; <i>single-base extension</i>
SLP	Sondes mono-locus
SNP	Polymorphisme nucléotidique; <i>single nucleotide polymorphism</i>
SQ	Sûreté du Québec
STR	Microsatellite; <i>short tandem repeat</i>

SWGDM	Groupe de travail scientifique sur les méthodes d'analyse de l'ADN; <i>Scientific Working Group on DNA Analysis Methods</i>
UV	Rayons ultraviolets
VNTR	Minisatellite; <i>variable number tandem repeat</i>
VPN/NPV	Valeur prédictive négative; <i>negative predictive value</i>
VPP/PPV	Valeur prédictive positive; <i>positive predictive value</i>

LISTE DES SYMBOLES

\S	Paragraphe ou section
σ	Écart-type
σ^2	Variance
V_P	Variance phénotypique
V_G	Variance génotypique
V_E	Variance environnementale
h^2	Héritabilité au sens large
y	Couleur des yeux
x	Nombre d'allèles mineurs du SNP 'k' possédé par un individu (0, 1 ou 2)
k	Nombre de SNP analysés
π_1	Probabilité d'avoir les yeux bleus
π_2	Probabilité d'avoir les yeux intermédiaires
π_3	Probabilité d'avoir les yeux bruns
α, β	Coefficients dérivés d'un modèle d'entraînement

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Problématique

La commission d'un crime est un acte qui laisse derrière de nombreuses traces comme vestiges de l'événement ayant eu cours. Ces traces sont de natures diverses (chimique, biologique, physique, numérique), uniques et déposées de manière incontrôlée. Également, de par leur dépôt involontaire, elles sont généralement retrouvées dans un état dégradé et incomplet (Margot, 2011). En science forensique, l'analyse de ces traces permet d'éclairer les circonstances ayant entraîné leur dépôt et participe à répondre à plusieurs questions, par exemple, de quoi ou de qui elles proviennent. Un exemple frappant concerne la trace biologique, qui contient de l'information génétique sur la personne à son origine. L'identification de cet individu grâce à cet ADN peut faire progresser l'enquête du crime. Dans certaines circonstances cependant, l'ADN de la trace ne peut permettre l'identification de l'individu à son origine, et alors, le potentiel informatif de cette trace est réduit. Toutefois, d'autres informations peuvent être soutirées de cet ADN. Depuis les dernières années, plusieurs outils ont ainsi été élaborés afin de mettre à profit ces autres informations, dont fait partie le phénotypage par l'ADN, qui permet de prédire des caractéristiques physiques (ou phénotypes) à partir de l'ADN seul. Toutefois, l'évaluation de cette méthode dans différentes populations a jusqu'à présent donné des résultats mitigés, c'est-à-dire que les résultats varient parfois grandement entre celles-ci (Tableau 1.3) (Carratto *et al.*, 2019; Dembinski & Picard, 2014; Kastelic *et al.*, 2013). Le présent mémoire abordera donc le sujet du phénotypage par l'ADN en science forensique en s'intéressant particulièrement à sa justesse et à son utilité. Cependant, avant d'aborder plus en détail la théorie reliée au sujet d'étude, il importe d'abord de poser les fondements biologiques de base qui serviront à bien comprendre la suite et le projet mené.

1.2 L'ADN

L'ADN est le support physique de l'information nécessaire à la production des protéines et autres composants biologiques indispensables à la vie. Il est constitué d'une chaîne de molécules appelées nucléotides. Ces nucléotides sont au nombre de quatre : l'adénine, la guanine, la thymine et la cytosine (A, G, T et C respectivement) (Pierce, 2012). La conformation adoptée par l'ADN est une double chaîne hélicoïdale ayant comme caractéristique particulière que les deux brins la composant sont complémentaires, c'est-à-dire que les nucléotides A et T sont toujours retrouvés l'un face à l'autre, de même pour les nucléotides C et G (Figure 1.1) (Watson & Crick, 1953).

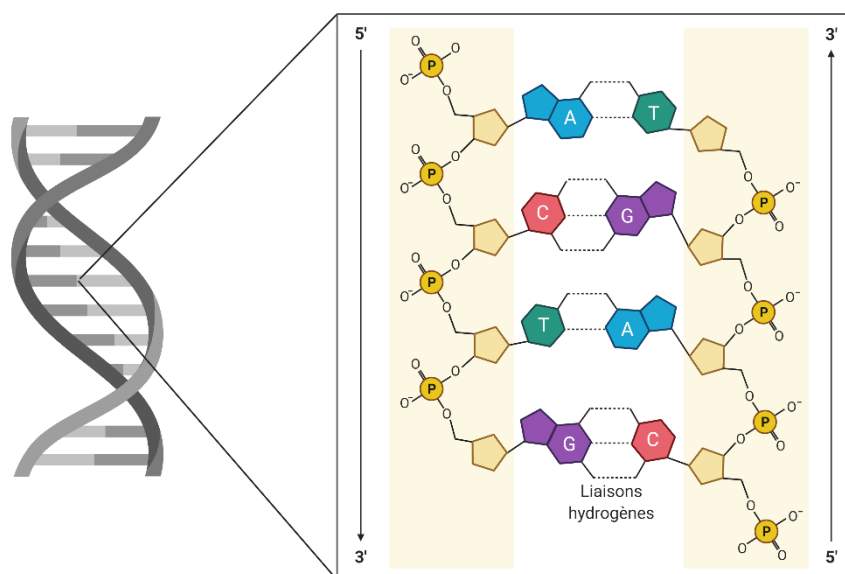


Figure 1.1. Schématisation de l'ADN et de ses composants, les nucléotides. Ces derniers sont au nombre de quatre : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). L'adénine et la thymine se lient ensemble par la formation de deux ponts hydrogène entre eux alors que la cytosine et la thymine se lient par la formation de trois ponts hydrogène (figure construite avec BioRender.com).

Cette double hélice est compactée dans des structures nommées chromosomes, qui sont au nombre de 23 paires chez l'humain (22 autosomales et une sexuelle). Ces

chromosomes sont transmis et par la mère, et par le père, formant ainsi un ensemble de 46 chromosomes au total; c'est ce qu'on appelle un individu diploïde (ayant deux copies de chaque chromosome) (Pierce, 2012). Chaque chromosome contient donc les mêmes régions (ou loci, c'est-à-dire des segments à des endroits physiques spécifiques de l'ADN) en double, qui peuvent cependant comporter des variations dans leur séquence ou leur taille. Ces différentes versions d'un locus sont nommées allèles. Du fait de cette diploïdie et de cette variation, chaque individu peut ainsi être soit homozygote (allèles identiques) ou hétérozygote (allèles différents) pour chaque région homologue observée (Figure 1.2). Ces chromosomes sont situés dans le noyau des cellules du corps humain et la séquence d'ADN y étant présente est parfaitement identique entre celles-ci, sauf si des mutations sont survenues lors de la mitose (Butler, 2010).

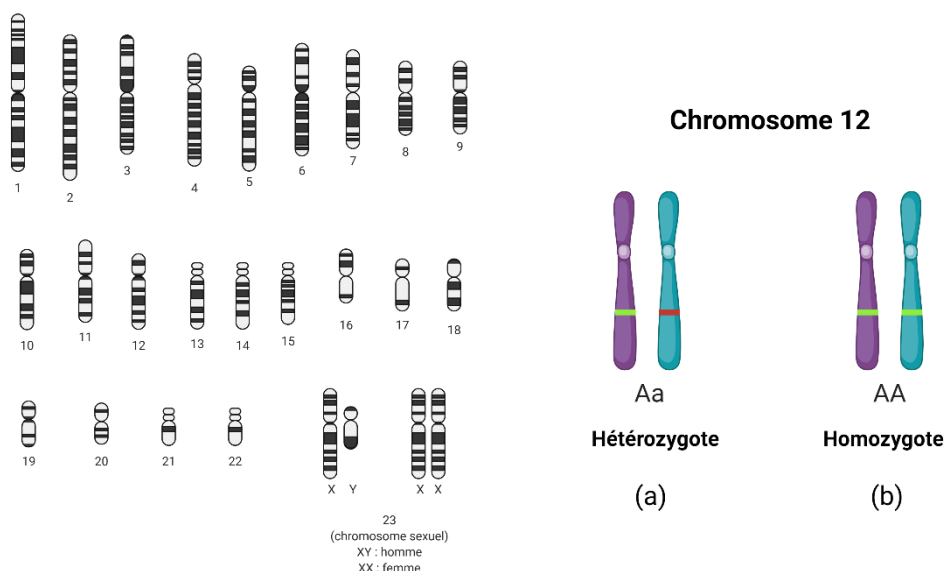


Figure 1.2. Les 23 paires de chromosome renfermant le matériel génétique humain. Chaque paire est composée d'un chromosome maternel (mauve) et d'un chromosome paternel (bleu). Chaque région est donc représentée deux fois et peut être (a) différente entre les deux chromosomes (hétérozygote) ou (b) identique entre les deux chromosomes (homozygote) (figure construite avec BioRender.com).

Il existe également un autre type d'ADN dans les cellules humaines, l'ADN mitochondrial (ADNmt), qui code pour des protéines nécessaires à l'activité de la mitochondrie, qui elle-même joue un rôle central dans la production de l'énergie cellulaire. Cet ADN circulaire est beaucoup plus petit que l'ADN nucléaire et sa

réplication mène plus souvent à des erreurs de nucléotides (mutations) en raison de l'absence de mécanismes biochimiques de contrôle et de réparation aussi sophistiqués que ceux impliqués dans la réplication de l'ADN nucléaire (Brown, 1981). De manière intéressante, l'ADNmt est exclusivement transmis de la mère aux enfants, permettant ainsi de retracer la lignée maternelle des individus (Schwartz, 2021). Toutefois, celui-ci ne sera pas traité plus en profondeur ici puisque le présent projet se concentre sur l'ADN retrouvé dans le noyau des cellules.

Il est d'usage de séparer l'ADN en deux catégories : l'ADN codant et l'ADN non-codant. Le premier est celui qui permet de produire les protéines nécessaires au fonctionnement de l'organisme et représente seulement ~1,5% de la totalité de l'ADN alors que l'ADN non-codant représente le reste (Singh-Cundy & Shin, 2017). Puisque ce dernier ne code pas pour des structures aussi essentielles, il est généralement moins astreint à la réplication exacte de sa séquence.

1.2.1 La variation génétique humaine

Chaque humain possède un bagage génétique qui lui est propre. Bien que seulement 0,3% des nucléotides diffèrent entre les individus, l'ADN est tellement imposant (environ 3 milliards de paires de base) que ces différences deviennent intéressantes dans un contexte où l'identification est souhaitée (par exemple, en génétique forensique, cf §1.4) (Butler, 2010).

Chez l'ADN humain, il existe deux types principaux de variations nucléotidiques entre les individus : les polymorphismes de taille, où une séquence plus ou moins longue de nucléotides (le « motif ») est répétée un nombre variable de fois, et les polymorphismes de séquence, où l'identité d'un ou de plusieurs nucléotides est modifiée (Figure 1.3). Les polymorphismes de taille comprennent les *short tandem repeats* (STR ou microsatellites) et les *variable number tandem repeat* (VNTR ou minisatellites), alors que ceux de séquence comprennent les *single nucleotide polymorphisms* (SNP) et les *insertions-délétions* (INDEL).

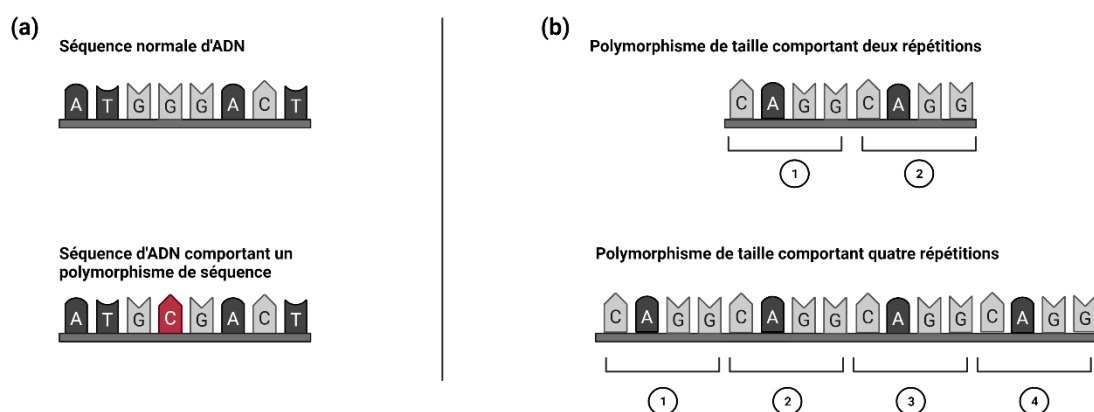


Figure 1.3. Principaux types de polymorphismes retrouvés dans l'ADN humain; (a) les polymorphismes de séquence, où l'identité d'un ou plusieurs nucléotides est modifiée entre différents individus et (b) les polymorphismes de taille, où le nombre de répétitions d'un motif de nucléotides est variable d'un individu à l'autre (figure construite avec BioRender.com).

Les STR sont situés dans l'ADN non-codant et se définissent comme un petit nombre de nucléotides, soit entre 2 et 7, qui forment un motif se répétant un nombre de fois changeant selon les individus analysés. Le nombre de répétitions du motif définit l'allèle que porte un chromosome. Également, la fréquence des allèles à un marqueur STR spécifique varie d'une population à l'autre. Par exemple, le STR nommé TPOX possède le motif [AATG] qui se répète généralement entre 4 et 16 fois selon les copies de chromosomes existant dans la population (Anker *et al.*, 1992; Butler, 2012b). Si un individu possède cinq répétitions du motif [AATG] pour le marqueur TPOX sur un de ses deux chromosomes homologues, et sept sur l'autre chromosome, alors son génotype (hétérozygote) est 5/7. Les STR sont les marqueurs utilisés de manière standard en génétique forensique afin d'identifier l'individu portant l'ADN analysé (cf §1.4).

Pour ce qui est des VNTR, ceux-ci sont formés selon le même principe que les STR, seulement, leur taille est significativement plus élevée (entre 400 et 1000 pb) et le nombre de nucléotide composant le motif répété est plus grand (entre 8 et 100 pb) (Butler, 2012b; Chambers & MacAvoy, 2000; Tautz, 1993). Bien qu'ils puissent toujours être utilisés dans des cas particuliers, les STR les supplantent la plupart du

temps, principalement grâce à leur petite taille plus facile à analyser, un avantage indéniable lors d'analyses de traces biologiques de faible quantité dans lesquelles l'ADN peut être dégradé (brisé en plusieurs morceaux).

Un autre polymorphisme intéressant est les SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Ceux-ci consistent en la modification d'un seul nucléotide (ou base) à un endroit précis de l'ADN entre différents individus. Les SNP, bien que pouvant théoriquement adopter les quatre types de nucléotides, ne se composent généralement que de deux nucléotides : un majeur, qui est retrouvé à plus haute fréquence dans la population étudiée, et un mineur, retrouvé en plus faible proportion. Ceci est dû au fait qu'il est plus improbable d'observer plus d'une mutation sur le même nucléotide (Børsting & Morling, 2013). Ils sont présentement déjà utilisés pour l'analyse de l'ADN mitochondrial en génétique forensique, mais sont aussi pressentis afin de prédire des caractéristiques physiques d'individus non-identifiés par d'autres méthodes plus classiques (cf §1.6). Les INDEL (insertion/délétion), quant à eux, consistent en l'ajout ou le retrait d'une ou plusieurs paires de base à un endroit du génome.

1.3 La science forensique

La science forensique combine l'analyse technique et l'interprétation scientifique de traces de natures diverses (biologique, physique, chimique, numérique) afin d'inférer sur un événement de nature criminelle ou litigieuse (homicide, vol, incendie, etc.) (Crispino *et al.*, 2011). L'objet d'étude de cette science, la trace, est un résidu unique (un spécimen), incomplet et imparfait d'une activité ou d'une présence et son analyse a pour but de reconstituer les causes et les circonstances ayant mené à son dépôt (Margot, 2011). Ainsi, le sang, les marques d'outils, les douilles d'arme à feu, les drogues peuvent tous constituer des exemples de traces pertinentes à analyser lorsqu'elles sont retrouvées sur une scène de crime ou d'investigation. Cette science se décline donc en plusieurs spécialités, dont celle de la génétique forensique, qui est abordée dans la prochaine section.

1.4 La génétique des populations et la génétique forensique

Il est nécessaire d'introduire les principes fondamentaux de la génétique des populations avant de poursuivre en détail sur la génétique forensique, domaine d'étude où se situe ce projet, puisque cette dernière en découle. La génétique des populations s'intéresse à l'étude des variations génétiques observables dans les populations ainsi que leur distribution et leur transmission afin d'inférer sur leur histoire migratoire et génétique. Ces variations génétiques sont généralement le résultat de pressions évolutives qui peuvent être divisées en quatre principales catégories : la sélection naturelle, la migration, la dérive génétique aléatoire et les mutations (Morgan, 2013). Afin d'obtenir le portrait génétique d'une population (aussi appelé pool génique), c'est-à-dire l'ensemble des allèles présents dans cette dernière, les généticiens calculent les fréquences alléliques et génotypiques. Ces calculs permettent de connaître la prépondérance des différents allèles et ainsi la rareté ou non d'un profil génétique formé d'une combinaison de ces allèles dans une population spécifique.

La génétique forensique, quant à elle, est une branche scientifique qui est soutenue par les principes de la génétique des populations et de la science forensique. Elle emploie l'analyse et l'interprétation de traces de nature biologique (sang, salive, sperme, tissus, etc.) ainsi que la variation génétique populationnelle afin de contribuer à éclaircir (ou prévenir) un événement criminel ou litigieux (Amorim, 2019).

Les premiers balbutiements de cette discipline ont vu le jour au début des années 1900 lorsque Landsteiner découvrit les groupes sanguins ABO, identifiant ainsi le premier des polymorphismes génétiques humains (Landsteiner, 1901). Toutefois, bien que les groupes sanguins aient été caractérisés dès l'année 1901, leur utilisation en science forensique ne débutera qu'à l'année 1916 grâce aux travaux de Lattes (1916). Suivant ces débuts, d'autres systèmes basés sur l'utilisation d'antigènes de groupes sanguins ainsi que de protéines polymorphiques seront exploités entre les années 1920 et 1970, notamment le système Rhésus par Landsteiner et Wiener en 1940 (Landsteiner & Wiener, 1940), mais aussi des protéines comme l'adénylate désaminase (ADA), l'adénylate kinase (AK), la phosphatase acide érythrocytaire (EAP) (Gill *et al.*, 1985), la transferrine, le plasminogène (Carracedo, 2013, p. 19) et l'antigène leucocytaire humain (HLA) (Van Rood & Van Leeuwen, 1963). Les divers

éléments retrouvés dans ces deux catégories (les groupes sanguins et les protéines) correspondent à des polymorphismes génétiques sous-jacents, c'est-à-dire des allèles différents pour chacun des éléments. Les polymorphismes génétiques seraient amenés à être étudiés plus en profondeur un peu plus tard, mais à ce stade, l'identification de sang humain, du groupe sanguin et de certaines protéines permettait, jusqu'à un certain degré, de renseigner principalement les litiges au niveau de la paternité et d'éliminer des suspects dont le groupe sanguin ne correspondait pas à celui retrouvé sur une scène de crime ou d'investigation (Lattes, 1916; Wiener, 1943, pp. 380-418). De plus, ces polymorphismes pouvaient parfois être analysés à partir d'autres substances que le sang, telles la salive et le sperme (Wiener, 1943, pp. 416-418). Malgré tout, ces analyses étaient somme toute restreintes par le peu de polymorphismes des groupes sanguins et protéines. En effet, une correspondance ne pouvait mener à identifier un seul individu, ceci étant dû au fait que plusieurs personnes portent le même groupe sanguin et/ou les mêmes protéines (Jobling & Gill, 2004). Finalement, la quantité de substance biologique nécessaire pour effectuer l'analyse des polymorphismes était assez importante (quelques milligrammes) et les tests étaient destructifs, signifiant que le sang ne pouvait être analysé de nouveau avec d'éventuelles nouvelles techniques ou outils (Wiener, 1943, pp. 380-418).

Ce n'est véritablement qu'en 1985 que l'utilisation de l'ADN, dans un contexte forensique, prend son essor, grâce à la découverte par Alec Jeffreys des « empreintes génétiques » (Gill *et al.*, 1985; Jeffreys, Wilson, *et al.*, 1985a, 1985b). Jeffreys avait observé que certaines régions de l'ADN, nommées subséquemment polymorphismes de longueur de fragment de restriction (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), étaient hautement polymorphiques et pouvaient être analysées grâce à la combinaison d'enzymes de restriction, de sondes multi-locus et de la technique d'hybridation *Southern Blot* (Jeffreys, Wilson, *et al.*, 1985a). Mais le fait le plus intéressant concernant ces « empreintes » était qu'elles étaient présumées uniques à chaque individu (excepté les jumeaux monozygotes), en plus d'être reproductibles et stables entre divers échantillons biologiques provenant du même individu (Jeffreys, Wilson, *et al.*, 1985b). Dès lors, cette découverte fût pressentie pour servir en science forensique, dans les dossiers de litige sur la paternité (Jeffreys, Wilson, *et al.*, 1985a, 1985b) ainsi que dans les dossiers d'immigration (Jeffreys, Brookfield, *et al.*, 1985). Puisque ces « empreintes » étaient pratiquement uniques, il était ainsi possible de

conclure, avec une forte probabilité, à une association positive entre une trace et un individu (et non pas exclusivement une association négative (exclusion) comme pour les tests sérologiques) (Gill *et al.*, 1985).

L'obstacle majeur à son utilisation était toutefois la quantité et la qualité d'ADN requis pour obtenir cette « empreinte génétique », soit entre 0,5 et 5 μ g d'ADN de haut poids moléculaire non-dégradé (Gill *et al.*, 1985; Jeffreys, Wilson, *et al.*, 1985b). De plus, la procédure était assez laborieuse et impliquait l'utilisation de sondes radioactives (Roewer, 2013). Celle-ci fût rapidement modifiée par le passage d'un système à sondes multi-locus (MLP) à un système de sondes mono-locus (SLP) permettant de diminuer la quantité d'ADN requis à 50 ng par sonde (bien que plusieurs sondes soient nécessaires pour obtenir un profil de plusieurs polymorphismes) et facilitant l'interprétation des bandes d'ADN (Carracedo, 2013, p. 20; Wong *et al.*, 1987). Malgré ces contraintes, la technique bouleversa le monde de la génétique forensique, et ce, dès 1987 avec l'arrestation et l'inculpation de Colin Pitchfork, confondu par son ADN, dans deux cas de viols suivis des meurtres de deux adolescentes en Angleterre (Royaume-Uni) (Dash *et al.*, 2021).

Les « empreintes génétiques » de Jeffreys furent graduellement remplacées après la découverte par Kary Mullis de la *polymerase chain reaction* (PCR) au milieu des années 1980 (Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987), une technique, et ses améliorations subséquentes (Saiki *et al.*, 1988), qui permettait d'utiliser d'infimes quantités d'ADN (de l'ordre d'un nanogramme) afin d'étudier entre autres, les polymorphismes humains (Jeffreys *et al.*, 1988). En effet, la PCR est une méthode qui permet de produire de nombreuses copies de segments de l'ADN en mimant la méthode utilisée par les cellules pour répliquer l'ADN lors de leur division. Les marqueurs alors analysés en génétique forensique passèrent des RFLP aux *variable number tandem repeats* (minisatellites; VNTR) puis aux *short tandem repeats* (microsatellites; STR), principalement à cause de leur plus petite taille, plus adaptée à l'analyse d'ADN de faible quantité et qualité (Carracedo, 2013, pp. 20-21). De plus, le développement de l'analyse en simultané (multiplex) de plusieurs marqueurs dans une même réaction PCR a permis la génération de profils génétiques contenant un plus grand nombre de STR. Ces profils étaient donc plus discriminants (Greenspoon *et al.*, 2004; Kimpton *et al.*, 1993).

Finalement, de nouvelles avancées technologiques, telles les sondes fluorescentes (Sullivan *et al.*, 1992) et l'électrophorèse capillaire (Kasper *et al.*, 1988; Moreno & McCord, 2007), ainsi que l'automatisation des procédés (Ziegle *et al.*, 1992), l'arrivée des kits commerciaux (Moretti *et al.*, 2001) et la mise en place de banques de données ADN (Corte-Real, 2004), vinrent compléter la boîte à outils que les laboratoires utilisent encore aujourd'hui pour les expertises génétiques standard.

Les STR sont couramment utilisés en génétique forensique afin de tenter d'identifier la source d'une trace biologique retrouvée sur une scène de crime ou d'investigation (par exemple, une trace de sang). Présentement, les kits commerciaux utilisés pour composer le profil ADN d'un individu peuvent analyser jusqu'à 25 STR, dont au-moins un sur les chromosomes sexuels, qui est utilisé afin d'inférer le sexe (Green *et al.*, 2021) (Figure 1.4). Cette combinaison de marqueurs permet d'obtenir un pouvoir d'inclusion (PI) faible, c'est-à-dire une faible probabilité de tirer au hasard, dans une population, deux individus ayant des profils génétiques identiques. Le pouvoir de discrimination, soit $1-PI$, est donc élevé et la probabilité que la concordance soit fortuite (due au hasard) est faible.

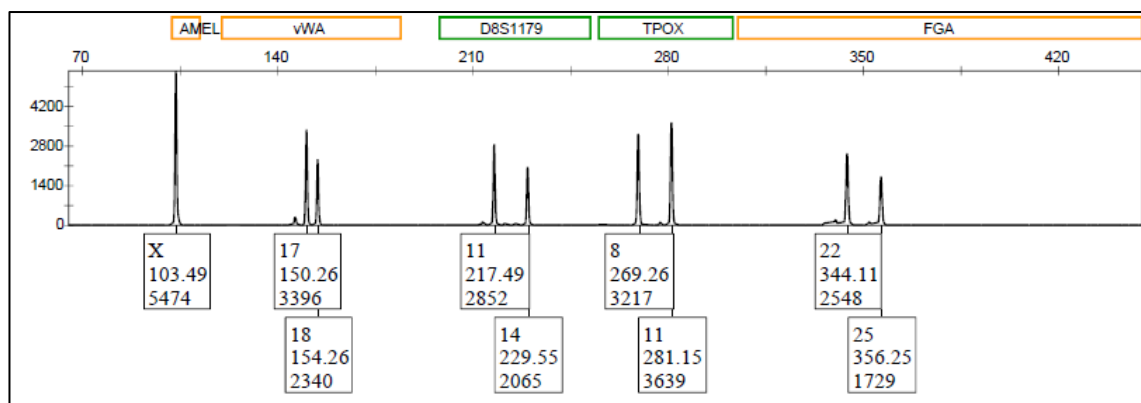


Figure 1.4. Exemple d'un profil génétique comprenant cinq marqueurs, soit l'amélogénine (marqueur de sexe) et quatre STR : vWA, D8S1179, TPOX et FGA. L'individu est hétérozygote (deux allèles) pour les quatre marqueurs STR et homozygote X/X pour l'amélogénine, signifiant qu'il s'agit d'une femme.

L'analyse forensique des SNP devient de plus en plus intéressante avec le développement du séquençage massif en parallèle, puisque leur petite taille rend possible leur typage même en présence d'ADN très dégradé, comme par exemple, chez

les victimes de désastre de masse ou les restes humains (Børsting & Morling, 2013). De plus, ces polymorphismes sont les plus abondants chez l'être humain, permettant ainsi un vaste choix pour l'analyse (Twyman, 2009). Leur taux de mutation plus faible que celui des STR se révèle également utile dans les disputes de paternité (Børsting & Morling, 2013). Au niveau technique, les SNP ne forment pas de « pics de bégaiement » (*stutters*), c'est-à-dire des artéfacts visibles dans les profils génétiques qui surviennent lors de l'amplification, comme c'est le cas avec les STR (Børsting & Morling, 2013). Toutefois, le pouvoir discriminant d'un seul de ces marqueurs est plus faible puisque seuls deux allèles sont généralement présents pour un SNP. Les mélanges d'ADN de plusieurs individus sont également plus difficiles à analyser et/ou déconvoluer (séparer) avec cette méthode (Børsting & Morling, 2013). Ces inconvénients sont toutefois compensés par la possibilité d'analyser en parallèle de très nombreux SNP (dans les milliers). Finalement, l'utilisation de ces SNP de façon routinière pour soutenir l'identification d'individus dans des dossiers judiciaires nécessiterait de revoir les banques de données pour inclure ces nouveaux marqueurs, ce qui peut s'avérer difficile, voire impossible si les échantillons ADN ont tous été consommés par des analyses antérieures (Børsting & Morling, 2013). Plusieurs méthodes peuvent être employées afin d'analyser ces marqueurs, dont deux sont présentées dans la prochaine section.

1.4.1 Méthodes d'analyse des SNP

Deux méthodes d'analyse des SNP seront discutées ici plus en détail, c'est-à-dire l'extension de base unique ou *single-base extension* (SBE) et le séquençage de nouvelle génération, puisqu'elles sont utilisées en génétique forensique (Sobrinho *et al.*, 2005).

Le SBE consiste à amplifier par PCR les segments d'ADN contenant les SNP d'intérêt, puis effectuer une extension de base unique. L'extension de base unique consiste à effectuer une seconde PCR avec une amorce qui se lie spécifiquement aux nucléotides directement adjacents au SNP désiré. Le premier nucléotide à incorporer sur le brin en formation suite à l'amorce correspond donc au nucléotide complémentaire du SNP voulu. Les nucléotides utilisés pour former le nouveau brin d'ADN sont des ddNTP marqués par des fluorochromes différents pour chaque

nucléotide (A, T, C, G). Les ddNTP arrêtent la progression de la polymérase lorsqu'ils sont incorporés. Ainsi, un seul ddNTP est ajouté au brin en formation, celui complémentaire au SNP ciblé (Børsting & Morling, 2013; Sobrino *et al.*, 2005). Les amplicons obtenus sont ensuite migrés dans le polymère visqueux de l'électrophorèse capillaire et la fluorescence émise par le ddNTP incorporé est captée puis analysée pour définir quel nucléotide est présent au niveau du SNP (Figure 1.5) (Sobrino *et al.*, 2005). Cette méthode est fiable et sensible tout en permettant l'analyse en multiplex (Børsting & Morling, 2013). Un autre des avantages de la technique SBE est qu'elle utilise les mêmes appareils que ceux utilisés jusqu'à présent dans les laboratoires judiciaires pour le typage des STR, soit le thermocycleur, afin d'amplifier l'ADN, et l'appareil à électrophorèse capillaire. C'est donc celle qui a d'abord été préconisée en génétique forensique pour l'analyse des SNP (Sobrino *et al.*, 2005).

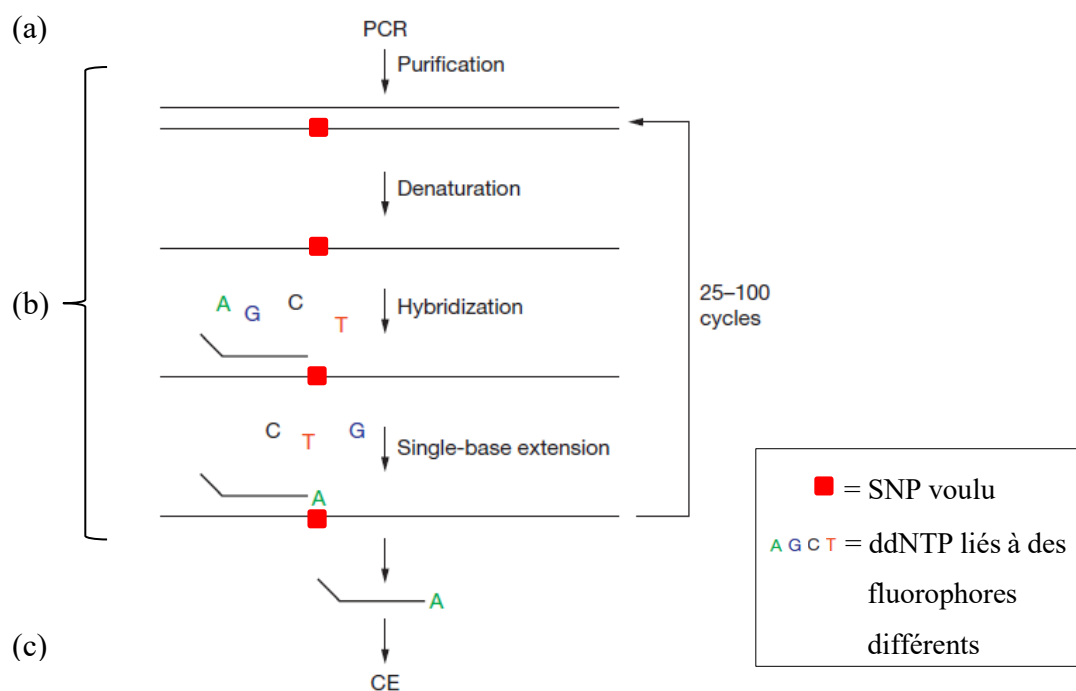


Figure 1.5. Étapes de la méthode dite de l'extension de base unique (SBE); (a) L'ADN est d'abord amplifié au niveau des régions contenant les SNP d'intérêt, **(b)** une seconde PCR incorpore ensuite un nucléotide (ddNTP) complémentaire au SNP désiré. Ce nucléotide est lié à un fluorophore distinct pour chaque ddNTP, **(c)** la fluorescence émise par le fluorophore sera finalement détectée lors de l'analyse par électrophorèse capillaire (CE), permettant ainsi de déterminer le nucléotide présent au niveau du SNP d'intérêt, dans ce cas-ci, une thymine (figure modifiée tirée de Børsting & Morling (2013)).

Plus récemment encore, le séquençage de nouvelle génération est considéré de plus en plus afin d'identifier les SNP d'intérêt. Le séquençage permet de lire chacune des bases nucléotidiques composant un segment d'ADN. Différentes méthodes existent pour ce faire, mais il ne sera fait mention ici que de la technologie d'Illumina, puisque c'est celle-ci qui a été choisie pour le présent projet. La technologie d'Illumina est une méthode dite « de synthèse », ce qui signifie qu'elle exploite le principe d'amplification d'un brin d'ADN mère afin de déduire sa séquence. Plus spécifiquement, elle se décline en quatre étapes principales : la préparation de la librairie, la génération des groupes (*clusters*), le séquençage à proprement parler et finalement, l'analyse bioinformatique (Illumina, 2017).

1. La préparation de la librairie

À cette étape, l'ADN à séquencer est tout d'abord fragmenté en plus petits morceaux afin de faciliter sa lecture. À chacun de ces fragments sera adjoint trois types d'adaptateurs composés de quelques nucléotides : **a)** les séquences de liaison d'amorces (Rd1 SP et Rd2 SP sur la Figure 1.6), qui sont complémentaires aux amorces qui seront utilisées pour le séquençage; **b)** les séquences code-barres (Index 1 et 2 sur la Figure 1.6), qui différencient de quel échantillon provient chaque brin d'ADN séquencé, et qui permettent donc de mélanger et séquencer plusieurs échantillons d'ADN provenant d'individus différents dans une même réaction; et **c)** les séquences P5 et P7 (Figure 1.6), qui permettent de lier les fragments d'ADN sur la biopuce (*flow-cell*) où la réaction de séquençage prend place (Illumina Knowledge, 2023). En résumé, ceux-ci permettent non seulement la synthèse de l'ADN, mais également de discriminer les différents échantillons entre eux et de lier les séquences à la biopuce. Ces fragments d'ADN liés à des adaptateurs sont nommés la « librairie ».

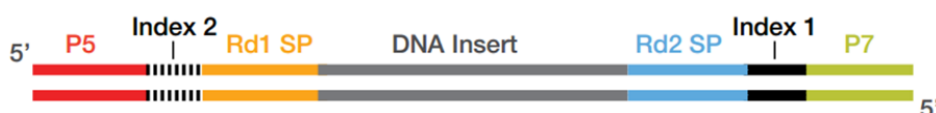


Figure 1.6. Adaptateurs adjoints aux fragments d'ADN à séquencer (tiré de Illumina Knowledge (2023)).

2. La génération des groupes de séquence (*clusters*)

Une fois la librairie préparée, les fragments d'ADN contenus dans celle-ci sont dénaturés en ADN simple brin afin qu'ils puissent s'hybrider sur une biopuce contenant une multitude de séquences de nucléotides qui sont complémentaires aux adaptateurs P5 et P7 (Figure 1.7). Une fois l'ADN fixé, celui-ci est dupliqué en de nombreuses copies grâce à une amplification PCR en pont, formant ainsi un groupe (ou *cluster*) de séquences identiques double-brin (Figure 1.8). La formation de ces groupes est nécessaire afin que le signal émis lors du séquençage soit suffisamment important pour être capté par l'appareil. L'ADN double brin est ensuite dénaturé en brins simples sur lesquels le séquençage pourra débiter (Westenberger, 2020).

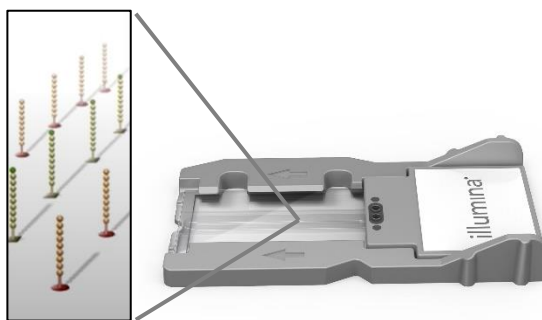


Figure 1.7. Biopuce d'Illumina contenant sur sa surface de nombreuses séquences de quelques nucléotides permettant de fixer les fragments d'ADN à séquencer qui sont contenus dans la librairie (figure modifiée tirée de Westenberger (2020) et d'Illumina (s.d.)).

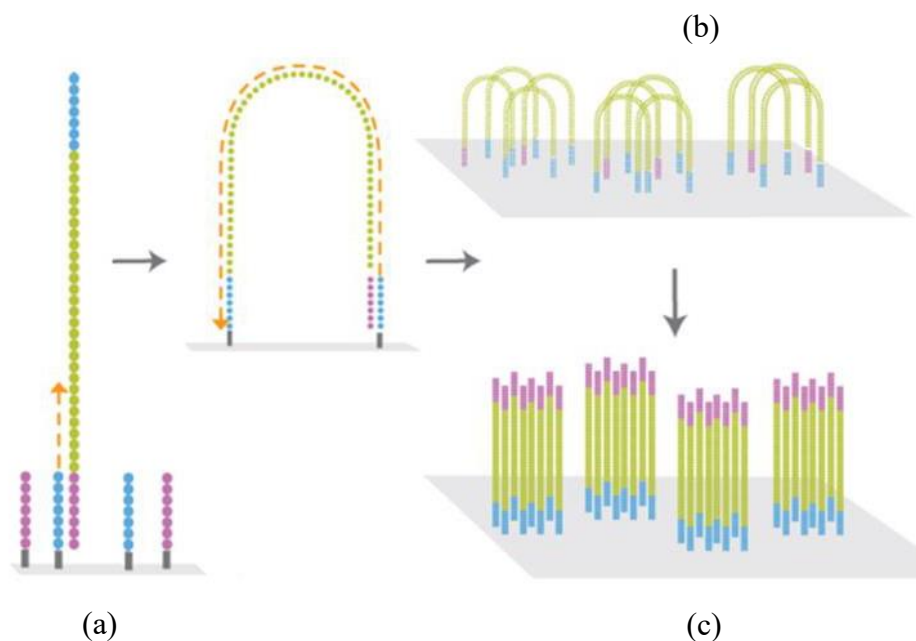


Figure 1.8. Amplification en pont de l'ADN lié sur la biopuce; (a) L'ADN simple brin attaché sur la biopuce lie son extrémité libre à une autre séquence d'ADN présente sur la biopuce pour former un pont. **(b)** Une amplification par PCR permet ensuite de copier le brin mère pour former un ADN double brin. Une dénaturation permet finalement d'obtenir de l'ADN simple brin. **(c)** Ces étapes sont répétées de nombreuses fois afin de créer des groupes de séquence identique (figure modifiée tirée de Townsend (2021)).

3. Le séquençage

Les simples brins présents dans les *clusters* sont de nouveau amplifiés par PCR, mais dans ce cas spécifique, les nucléotides qui sont incorporés dans le brin en formation sont des dNTP qui sont liés à un terminateur fluorescent réversible distinct pour chaque type de nucléotide (A, T, C ou G). Ces fluorochromes possèdent comme particularité de bloquer l'amplification PCR afin que l'ajout de nucléotides s'arrête à chaque fois qu'un dNTP est lié. Ainsi, lorsqu'un dNTP complémentaire à la séquence est adjoint au brin en formation, l'amplification s'arrête et le fluorophore lié au nucléotide incorporé émet une fluorescence correspondant à son type. Une fois la lecture de cette fluorescence effectuée par l'appareil de détection, le fluorochromes est éliminé, ce qui permet à l'amplification de se poursuivre. Ces étapes s'effectuent en boucle jusqu'à ce que le brin soit complètement synthétisé (Figure 1.9) (Westenberger, 2020).

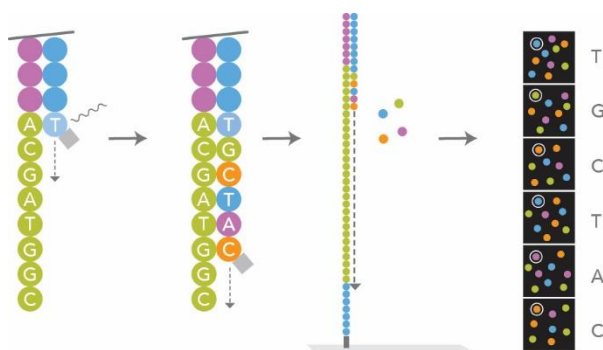


Figure 1.9. Amplification du brin matrice à l'aide de terminateurs fluorescents réversibles (Illumina (s.d.)). Dans cet exemple, une thymine est liée au brin en formation et émet une fluorescence bleue qui sera captée par l'appareil. Le terminateur fluorescent est ensuite éliminé pour que le séquençage se poursuive.

4. L'analyse des données

Les séquences brutes de l'ADN sont ensuite analysées par des outils bioinformatiques, qui permettent l'alignement des séquences obtenues sur un génome de référence afin de constituer, au final, un fichier contenant les nucléotides présents dans les séquences d'ADN analysées et leur position dans le génome (Illumina, 2017).

1.5 Enjeux reliés aux analyses conventionnelles

Lorsqu'une trace biologique potentiellement pertinente est prélevée sur une scène de crime (ou d'investigation) ou lorsque le corps d'une personne inconnue est retrouvé, il est d'usage qu'un profil ADN en soit obtenu en faisant intervenir un processus d'analyse comportant les étapes suivantes :

1. Extraction de l'ADN des cellules et purification
2. Dosage permettant de connaître la quantité d'ADN dans l'échantillon
3. Amplification de régions spécifiques sur cet ADN contenant les STR sélectionnés
4. Identification des allèles des STR de la trace par électrophorèse capillaire
5. Analyse du profil génétique obtenu (analyse de la qualité et identification des allèles et artéfacts).

6. Comparaison du profil génétique avec un ou plusieurs profils de référence (provenant d'un suspect, des membres familiaux d'une personne disparue (ex. père, frère, etc.) ou contenus dans une banque de données)
7. Évaluation des résultats et conclusion (ex. les allèles du profil de la trace et ceux du profil de référence sont les mêmes, la probabilité que l'individu à l'origine du profil de référence soit la source de la trace est de X)
8. Vérification des résultats par un pair ou un tiers qualifié

Cependant, la limite majeure de ce processus d'analyse est que lorsqu'aucune personne n'est appréhendée et qu'aucune correspondance n'est obtenue avec un membre familial ou les profils de la banque de données (autant pour les criminels que les corps non identifiés), la source de la trace ne peut pas être identifiée immédiatement. Le profil inconnu est donc stocké en attente qu'un jour, la personne à l'origine de la trace soit identifiée, par exemple, avec une correspondance génétique suivant l'arrestation de ladite source après la commission d'un autre crime. C'est dans ce contexte que le phénotypage par l'ADN peut s'avérer utile. Principalement, il permettrait de fournir, dans la phase d'enquête, du renseignement sur les caractéristiques physiques de la source inconnue d'une trace d'ADN. De plus, dans les cas de restes humains, il pourrait également être utilisé afin de prédire les caractères physiques d'un corps afin de faciliter sa reconnaissance (cf §1.6.2).

1.6 Le phénotypage par l'ADN

1.6.1 Définition

Ce récent outil met à profit l'analyse de l'ADN d'une trace afin de prédire les caractéristiques physiques observables et/ou mesurables (appelées aussi phénotypes) de sa source, c'est-à-dire de l'individu possédant cet ADN, lorsque celui-ci n'a pu être identifié par les méthodes traditionnelles. La section suivante s'emploie à expliquer plus en détail l'utilité projetée de cet outil dans un contexte forensique.

1.6.2 Utilité en génétique forensique

La première utilité du phénotypage par l'ADN en génétique forensique est bien évidemment sa capacité à fournir une piste d'enquête lorsque les analyses conventionnelles d'ADN n'ont pas donné de résultats. Plus précisément, le phénotypage servirait à prédire des caractéristiques physiques de la source inconnue à partir de la trace biologique retrouvée sur la scène de crime ou d'investigation afin de limiter les recherches et cibler ou écarter certains individus (Kayser, 2015). Il pourrait également appuyer un portrait-robot tiré d'un témoignage (Walsh, Liu, *et al.*, 2011) et/ou prédire les caractères physiques d'un corps non-identifié, par exemple, un corps en décomposition, afin d'aider à l'identification de ce corps, dans un contexte contemporain (Walsh, Liu, *et al.*, 2011) ou historique (Chaitanya *et al.*, 2017). Pensons par exemple aux restes humains retrouvés après des désastres de masse ou lors de guerres, telles que la Deuxième Guerre mondiale (comme dans l'article de Chaitanya *et al.* (2017)). Dans une optique plus large, on utiliserait aussi le phénotypage pour estimer l'ethnicité de la source inconnue de la trace (via les AIM SNP, bien que l'ethnicité ne soit pas à proprement parler un phénotype) (Kayser, 2015). L'identification de la source (individu) à l'origine d'une trace d'ADN retrouvée sur une scène de crime ou d'investigation pourrait aussi être une avenue possible pour son utilisation, rejoignant ainsi le même principe que les STR utilisés présentement en science forensique (Børsting & Morling, 2013). Toutefois, certains inconvénients sont à prévoir si les SNP sont utilisés à cette fin (cf §1.4).

1.6.3 Méthodes indirecte et directe

Afin de prédire les phénotypes, deux méthodes sont possibles. La première à avoir été explorée est celle nommée « méthode indirecte », qui prédit indirectement les phénotypes en inférant l'origine géographique ou ethnique d'une personne (Koops *et al.*, 2006). Elle consiste dans un premier temps à estimer quantitativement l'ascendance génétique d'un individu, c'est-à-dire la proportion de son génome provenant d'ancêtres de différentes origines ethniques. Par exemple, un individu pourrait être d'ascendance génétique à 80% européenne et à 20% africaine. Cette estimation probabiliste est possible grâce aux mouvements migratoires humains effectués sur plusieurs siècles, qui ont permis de former graduellement des groupes

d'individus évoluant différemment sur le plan génétique. Ainsi, certaines mutations sont apparues à certains endroits et sont restées ancrées, différenciant ainsi les populations (Koops *et al.*, 2006). Cette première étape est réalisée par l'analyse de marqueurs dits « informatifs de l'ascendance » (AIM; *ancestry informative markers*). Ces marqueurs sont des SNP qui présentent des fréquences suffisamment différentes entre les diverses populations humaines pour pouvoir les discriminer entre elles (Frudakis, 2016). Une fois l'ascendance estimée de manière probabiliste, il convient d'utiliser les liens documentés entre celle-ci et les phénotypes d'intérêt afin de pouvoir les prédire (Frudakis, 2016). Si nous prenons en exemple la couleur de la peau, des études ont révélé que le contenu en eumélanine chez des individus ayant plus de 75% d'ascendance africaine était beaucoup plus élevé que pour des individus ayant moins de 50% d'ascendance africaine (Shriver *et al.*, 2003). Une grande quantité d'eumélanine causant une couleur de peau plus foncée, on inférera que l'individu avec une ascendance majoritairement africaine possède une peau de couleur foncée.

La seconde méthode est celle dite « directe ». Cette approche consiste à analyser directement le génome d'un individu au niveau de gènes possiblement reliés aux phénotypes d'intérêt (Koops *et al.*, 2006). Celle-ci est avantageuse par rapport à la méthode indirecte puisque dans cette dernière, bien que des corrélations soient établies entre l'ascendance, ou les marqueurs de l'ascendance, et les phénotypes, ces marqueurs ne sont pas nécessairement situés dans ou près des gènes à l'origine de ces phénotypes. Les liens directs entre les phénotypes et les gènes contribuant suffisamment à l'expression de ces phénotypes peuvent ainsi mener à de meilleures prédictions (Frudakis, 2016).

La méthode indirecte a d'abord été privilégiée en science forensique puisque peu de connaissances sur la génétique derrière les phénotypes étaient disponibles à ce moment (Kayser, 2015). Aujourd'hui, une combinaison de ces deux approches est employée dans ce domaine (Van Laan, 2017). Cependant, la méthode indirecte est moins recommandée à utiliser, spécialement avec les populations d'ethnicité mixte (Kayser & de Knijff, 2011; Terrado Ortuño & May, 2023) et parce que certains allèles peuvent ne pas être reliés à l'ethnicité, mais bien à une exposition environnementale commune (Sankar, 2012; Terrado Ortuño & May, 2023). Quant au kit HIrisPlex-S, un

kit de prédiction de phénotypes pigmentaires qui est évalué dans ce mémoire, il utilise la méthode directe (Chaitanya *et al.*, 2018).

1.6.4 Création des ensembles de SNP et de leur modèle mathématique

Jusqu'à présent, la méthode directe préconisée pour créer les modèles de prédiction des phénotypes humains pour utilisation en science forensique a été celle décrite ci-bas, c'est-à-dire celle utilisant les études d'association pangénomique (*genome-wide association studies*; GWAS). Cette méthode a pour avantage de ne pas nécessiter d'hypothèses initiales sur les gènes reliés aux phénotypes (Hardy & Singleton, 2009). De plus, elle permet d'analyser de nombreux SNP en simultané. Il faut cependant mentionner que plusieurs études d'association (GWAS et autres) sont effectuées dans le milieu de la génétique humaine également (Uffelmann *et al.*, 2021).

1. Des études d'association pangénomique (GWAS) sont d'abord effectuées en sélectionnant des personnes volontaires provenant de populations homogènes, qui sont ensuite divisées en groupes représentatifs des différentes valeurs du phénotype concerné (ex. les personnes avec des cheveux bruns sont séparées de celles aux cheveux blonds, noirs et roux). Une fois ces groupes créés, le génome de ces personnes est analysé sur des milliers, voire des millions, de sites afin de découvrir des polymorphismes génétiques (le plus souvent des SNP) associés de manière statistiquement significative aux phénotypes sous étude (Hardy & Singleton, 2009).
2. Des ensembles de SNP sont ensuite créés et des modèles mathématiques sont construits afin de prédire la relation entre des variables dépendantes (traits phénotypiques comme la couleur des cheveux) et indépendantes (SNP) (Liu *et al.*, 2009) (plusieurs modèles sont possibles dont la régression logistique multinomiale (MLR) (Chaitanya *et al.*, 2018; Walsh *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2013), les classeurs bayésiens (Ruiz *et al.*, 2013), les arbres décisionnels (Allwood & Harbison, 2013) ainsi que l'approche par réseaux neuronaux artificiels (Katsara *et al.*, 2021)).

La performance de ces modèles est par la suite évaluée en utilisant différentes statistiques calculées à partir du nombre de vrais positifs, vrais négatifs, faux-positifs

et faux-négatifs (Figure 1.10). Ces statistiques sont expliquées plus bas en utilisant l'exemple de la prédiction des yeux bleus.





	Positif réel 	Négatif réel 	
Positif prédit 	Vrai positif (VP)	Faux positif (FP)	Valeur Prédictive Positive = VP / (VP+FP)
Négatif prédit 	Faux négatif (FN)	Vrai négatif (VN)	Valeur Prédictive Négative = VN / (VN+FN)
	Sensibilité = VP / (VP+FN)	Spécificité = VN / (VN+FP)	Exactitude = (VP+VN) / (VP+VN+FP+FN)

Figure 1.10. Schéma des différentes statistiques pouvant être calculées pour évaluer la performance d'un modèle de prédiction. Dans cette figure, l'exemple des yeux bleus a été choisi. La case « positif réel » représente les individus possédant réellement les yeux bleus alors que la case « négatif réel » représente les individus ne possédant pas cette couleur. La case « positif prédit » représente les individus prédits par le modèle comme ayant les yeux bleus alors que la case « négatif prédit » représente les individus prédits par le modèle comme n'ayant pas les yeux bleus.

Ces statistiques sont :

- La **valeur prédictive positive (VPP)**, qui représente le pourcentage de type de couleur correctement prédit parmi les prédictions positives (Liu *et al.*, 2009).

$$VPP = \frac{\text{Vrai positif}}{(\text{Vrai positif} + \text{Faux positif})}$$

Par exemple, si 5 individus sont prédits comme ayant les yeux bleus et 2 ne possèdent pas réellement cette couleur, alors la VPP pour les yeux bleus est de 60% (3/5);

- La **valeur prédictive négative (VPN)**, qui représente le pourcentage de non-couleurs correctement prédites parmi les négatifs prédits (Liu *et al.*, 2009).

$$VPN = \frac{Vrai\ négatif}{(Vrai\ négatif + Faux\ négatif)}$$

Par exemple, si 6 individus sont prédits comme n'ayant pas les yeux bleus et que 1 individu a réellement les yeux bleus, alors la VPN pour les yeux bleus est d'environ 83% (5/6);

- c. La **sensibilité**, qui représente le pourcentage d'un type de couleur correctement prédit parmi le type de couleur observé (Liu *et al.*, 2009).

$$Sensibilité = \frac{Vrai\ positif}{(Vrai\ positif + Faux\ négatif)}$$

Si les exemples précédents sont repris, la sensibilité pour les yeux bleus serait alors de 75% (3/4);

- d. La **spécificité**, qui représente le pourcentage de non-couleurs correctement prédites parmi les non-couleurs observées (Liu *et al.*, 2009).

$$Spécificité = \frac{Vrai\ négatif}{(Vrai\ négatif + Faux\ positif)}$$

Si les exemples précédents sont encore repris, la spécificité serait alors d'environ 71% (5/7);

- e. L'**exactitude**, qui représente la somme des vrais positifs (ex. l'individu a les yeux bleus et est prédit comme tel) et des vrais négatifs (ex. l'individu n'a pas les yeux bleus et n'est pas prédit comme tel) sur l'ensemble des prédictions.

$$Exactitude = \frac{Vrai\ positif + Vrai\ négatif}{(Vrai\ positif + Vrai\ négatif + Faux\ positif + Faux\ négatif)}$$

En se basant sur les exemples précédents, l'exactitude serait donc d'environ 73% (8/11);

- f. **L'aire sous la courbe ROC (AUC)**, qui vérifie, dans le cas présent, dans quelle mesure le modèle est capable de distinguer les couleurs des non-couleurs (ex. yeux bleus versus non-bleus). Sa valeur est comprise entre 0,5 (absence totale de prédiction) et 1 (prédiction parfaite) (Liu *et al.*, 2009). La courbe ROC sous laquelle l'aire est calculée mathématiquement est une courbe qui oppose sur un graphique le taux de vrais positifs, c'est-à-dire la sensibilité (axe des y), par rapport au taux de faux positifs, soit 1-spécificité (axe des x), pour chaque seuil utilisé. Ce graphique a permis aux concepteurs du HIrisPlex-S de déterminer un seuil à utiliser pour la couleur des yeux qui réduit le taux d'erreur au minimum (cf §1.6.1).
3. Une fois les ensembles de prédiction et leurs modèles mathématiques validés, les coefficients tirés de ces modèles sont ensuite utilisés pour prédire, de façon probabiliste, le phénotype d'un inconnu à partir des SNP observés sur une trace biologique retrouvée sur une scène de crime ou d'investigation (Liu *et al.*, 2009).

Toutefois, cette manière de faire a certains désavantages, notamment, que les GWAS ne détectent généralement que les allèles qui sont communs (présents chez plus de 5% des individus) (Hardy & Singleton, 2009). Cette méthode reste également simpliste, puisque les traits phénotypiques sont souvent contrôlés par plusieurs gènes avec de petits effets, et plusieurs SNP peuvent ainsi être manqués (Hirschhorn & Daly, 2005). Les GWAS n'indiquent pas non plus quel gène est affecté par le SNP associé au phénotype, si ce gène a réellement un effet sur le phénotype, ni même s'il y a un lien de causalité entre le SNP et le caractère phénotypique étudié (Gallagher & Chen-Plotkin, 2018). Finalement, la population échantillonnée pour construire le modèle de prédiction peut ne pas être la même que la population d'où provient la trace, les SNP choisis dans le modèle peuvent donc ne pas être aussi utiles à la prédiction dans d'autres populations.

Bien que la méthode classique afin de créer des ensembles de prédiction ait été décrite, il importe de creuser plus en détail le modèle mathématique de la régression logistique multinomiale, puisque c'est le plus utilisé, mais aussi, parce que c'est sur celui-ci que se base le système de prédiction HIrisPlex-S, qui est évalué dans ce mémoire.

1.6.5 Modèle de régression logistique multinomiale

Ce type de modèle calcule les probabilités de différentes observations catégoriques possibles (trois et plus) à partir d'un groupe de variables indépendantes. Dans le cas du phénotypage des caractères pigmentaires, les catégories possibles sont les couleurs que peuvent prendre les différents phénotypes (ex. bleu, intermédiaire ou brun pour la couleur des yeux) et les SNP servent de variables indépendantes pour prédire ces couleurs. Ce modèle suppose que les catégories sont sans ordre apparent (Liu *et al.*, 2009).

Le système HIrisPlex-S repose sur 41 SNP et trois modèles de régression logistique multinomiale pour chacun des trois phénotypes prédits (couleur des yeux, des cheveux et de la peau). Chaque modèle a été ajusté sur un échantillon de milliers d'individus. Pour la couleur des yeux, ces individus proviennent principalement de différentes populations d'Europe (Pays-Bas, Norvège, Estonie, Royaume-Uni, France, Italie, Espagne, Grèce) (n=9188), mais aussi des États-Unis (n=278) (Liu *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2012). Pour la couleur des cheveux, ces individus proviennent également majoritairement d'Europe (Irlande (n=339), Grèce (n=119), Pologne (n=1093)), mais aussi du Japon (n=50) et des États-Unis (n=277) (Walsh *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2013). Pour la couleur de la peau, ces individus proviennent d'Europe (Irlande (n=347), Grèce (n=119), Pologne (n=1159)), mais aussi des États-Unis (n=329), de l'Afrique (Sénégal (n=21), Nigéria (n=21), Kenya (n=11)) et de Papouasie-Nouvelle-Guinée (n=17) (Walsh *et al.*, 2017). Toutefois, le phénotype réel des individus provenant d'Afrique et de Papouasie-Nouvelle-Guinée a été estimé puisque ces données étaient manquantes (Walsh *et al.*, 2017). De plus, certains individus ont été éliminés de la base de données pour la couleur de la peau à cause de génotypes incomplets (Walsh *et al.*, 2017), sans savoir parmi quelles populations ceux-ci provenaient. La base de données du HIrisPlex-S comporte donc aujourd'hui un total

de 9 466 individus pour les yeux, 1 878 pour les cheveux et 1 423 pour la peau (<https://hirisplex.erasmusmc.nl>), qui sont majoritairement d'origine européenne, questionnant d'ores et déjà l'effet de cette prédominance sur les résultats obtenus dans d'autres populations. Un certain pourcentage de cet échantillon a servi à bâtir le modèle d'entraînement et le reste a été utilisé pour le tester (Chaitanya *et al.*, 2018; Walsh *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2014; Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Liu *et al.* (2009) ont publié le modèle sur lequel le IrisPlex s'est basé afin de prédire la couleur des yeux (incluant les coefficients de régression) alors que pour la couleur des cheveux (HirisPlex) et de la peau (HIrisPlex-S), les détails des modèles ne sont pas connus. De plus, pour chacun de ces modèles, des instructions d'interprétation sont données. Pour la couleur des yeux, les auteurs suggèrent d'utiliser une probabilité de 0,7 ou plus afin d'avoir le risque d'erreur le plus faible (faux positif ou faux négatif) (Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Ce seuil a été établi sur la base de la courbe ROC dérivée de l'étude de Liu *et al.* (2009), où au-delà d'un taux de faux positif de 0,3 (correspondant à une spécificité de 0,7), la diminution du taux de vrais positifs devient alarmante, augmentant ainsi le risque d'erreur (Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Pour la couleur des cheveux et de la peau, des tableaux décisionnels aident à affiner les résultats (Chaitanya *et al.*, 2018; Walsh & Kayser, 2016). Cependant, sans l'accès aux détails quantitatifs du modèle – coefficients de régression, intervalles de confiance, composition précise et distribution des données brutes pour le construire – l'interprétation des prédictions ne peut se faire en toute transparence et parfaite connaissance de cause.

Plus en détail, le IrisPlex se base sur le modèle mathématique présenté plus bas, une régression logistique multinomiale développée par Liu *et al.* (2009) afin de prédire la couleur des yeux :

$$\text{logit}(\Pr(y = \text{bleu} \mid x_1 \dots x_k)) = \ln\left(\frac{\pi_1}{\pi_3}\right) = \alpha_1 + \sum \beta(\pi_1)_k x_k$$

$$\text{logit}(\Pr(y = \text{intermédiaire} \mid x_1 \dots x_k)) = \ln\left(\frac{\pi_2}{\pi_3}\right) = \alpha_2 + \sum \beta(\pi_2)_k x_k$$

Où

y = Couleur des yeux

x = Nombre d'allèles mineurs du SNP 'k' possédé par un individu (0, 1 ou 2)

k = Nombre de SNP analysés

π_1 = Probabilité d'avoir les yeux bleus

π_2 = Probabilité d'avoir les yeux intermédiaires

π_3 = Probabilité d'avoir les yeux bruns

α et β = Coefficients dérivés du modèle d'entraînement, β est spécifique à chaque SNP et mesure la contribution partielle de chacun sur la probabilité d'avoir une certaine couleur des yeux alors que α est une constante invariable

Ces équations peuvent être lues de la manière suivante : le logit (une fonction mathématique utilisée pour la régression logistique) de la probabilité d'observer une couleur des yeux « bleu » étant donné le nombre d'allèles mineurs possédés par un individu pour chaque SNP du kit ($x_1 \dots x_k$) est égale au logarithme népérien (ln) de la probabilité d'avoir les yeux bleus sur la probabilité d'avoir les yeux bruns, qui est lui-même égal à l'addition d'une constante alpha (α) avec la somme des produits du coefficient β de chaque SNP avec la probabilité d'avoir les yeux bleus et le nombre d'allèles mineurs possédés par l'individu testé pour chaque SNP. L'équation directement dessous la première suit le même format pour prédire la couleur intermédiaire.

Il suffit alors de prendre l'inverse du logit afin de calculer les probabilités pour chaque couleur des yeux :

$$\pi_1 = \frac{\exp(\alpha_1 + \sum \beta(\pi_1)_k x_k)}{1 + \exp(\alpha_1 + \sum \beta(\pi_1)_k x_k) + \exp(\alpha_2 + \sum \beta(\pi_2)_k x_k)}$$

$$\pi_2 = \frac{\exp(\alpha_2 + \sum \beta(\pi_2)_k x_k)}{1 + \exp(\alpha_1 + \sum \beta(\pi_1)_k x_k) + \exp(\alpha_2 + \sum \beta(\pi_2)_k x_k)}$$

$$\pi_3 = 1 - \pi_1 - \pi_2$$

Afin de simplifier la compréhension, un exemple fictif est ici donné. On cherche à connaître la probabilité que Madame Lacouleur possède des yeux bleus en considérant qu'il y a trois résultats possibles, soit bleu, intermédiaire ou brun, et que la couleur des yeux peut être prédite grâce à deux SNP. Elle ne possède aucun allèle mineur pour le SNP1 et un allèle mineur au SNP2. Le modèle d'entraînement a donné les coefficients suivants.

$$\beta_{SNP1\ bleu} = -0,1 \quad \beta_{SNP2\ bleu} = 1,5 \quad \alpha_{bleu} = 1,12$$

La formule de base s'écrirait donc de la façon ci-après pour les yeux bleus.

$$\begin{aligned} \text{logit}(\Pr(y = \text{bleu} \mid x_1, x_2)) &= \ln\left(\frac{\pi_1}{\pi_3}\right) \\ &= \alpha_{bleu} + (\beta_{SNP1\ bleu} x_{SNP1} + \beta_{SNP2\ bleu} x_{SNP2}) \\ &= 1,12 + ((-0,1 * 0) + (1,5 * 1)) = 2,62 \end{aligned}$$

Selon le même principe, le logit de la probabilité d'avoir les yeux intermédiaires pourrait être de 1,31. Il faut ensuite calculer l'inverse du logit pour connaître les probabilités de chacune des couleurs.

$$\begin{aligned} \pi_1 &= \frac{\exp(2,62)}{1 + \exp(2,62) + \exp(1,31)} = 0,745 \\ \pi_2 &= \frac{\exp(1,31)}{1 + \exp(2,62) + \exp(1,31)} = 0,201 \\ \pi_3 &= 1 - 0,745 - 0,201 = 0,054 \end{aligned}$$

Au final, Madame Lacouleur possède donc une probabilité de 0,745 d'avoir les yeux bleus. De plus, puisque la probabilité est plus élevée que 0,7, la confiance en cette prédiction est plus élevée selon les recommandations des concepteurs du HIRISplex-S.

Maintenant que le sujet principal de l'étude a été abordé, il importe de connaître les fondements biologiques de cette approche. La section suivante présente donc la

génétique quantitative, discipline qui s'intéresse aux effets génétiques derrière la variation des phénotypes.

1.7 La génétique quantitative

La génétique quantitative s'emploie à l'étude des traits qui ont une variabilité pouvant être mesurée sur une échelle continue, comme la taille, le poids ou bien la couleur des yeux¹ (comparativement à des traits qui sont mesurés sur une échelle discrète, comme par exemple, le nombre de feuilles que possède une plante). Ces traits dits « quantitatifs » se construisent chez l'organisme par l'apport de plusieurs gènes, chacun ayant un effet plus ou moins grand sur le trait. Ils sont dits polygéniques (Falconer & Mackay, 1996; Klug *et al.*, 2008) et peuvent également être influencés par les interactions entre allèles/gènes différents (effets de dominance et épistatique) (Templeton, 2006). De plus, ces traits sont non seulement influencés par la génétique, mais également par l'environnement (c'est-à-dire tout ce qui n'a pas trait aux gènes), ainsi que par les interactions entre les deux. Ils sont donc qualifiés de traits complexes, ou multifactoriels (Falconer & Mackay, 1996; Klug *et al.*, 2008).

Les phénotypes peuvent être distribués sur une échelle continue de valeurs qui prend généralement la forme d'une courbe gaussienne. Cette distribution phénotypique peut ainsi être définie par deux paramètres, la moyenne et la variance. La variance phénotypique est définie comme étant la variance d'un phénotype dans une population donnée et mesure la dispersion des valeurs individuelles autour de la moyenne de la population (Falconer & Mackay, 1996; Templeton, 2006). Par exemple, si la couleur de la peau est considérée, ce phénotype peut s'étendre de la couleur très pâle, voire blanche, à la couleur très foncée, voire noire, et toutes les couleurs possibles entre ces deux extrêmes peuvent être distribuées de manière continue, où certaines couleurs seront plus fréquentes que d'autres dans une population donnée. Une fois cette distribution phénotypique obtenue, il est alors possible de mesurer la moyenne et la variance phénotypique (Figure 1.11).

¹ La couleur des yeux peut être mesurée sur une échelle continue, par exemple, en analysant ce trait par les paramètres de teinte et de saturation ou bien selon les valeurs d'un espace colorimétrique comme le CMYK (cyan, magenta, jaune et noir).

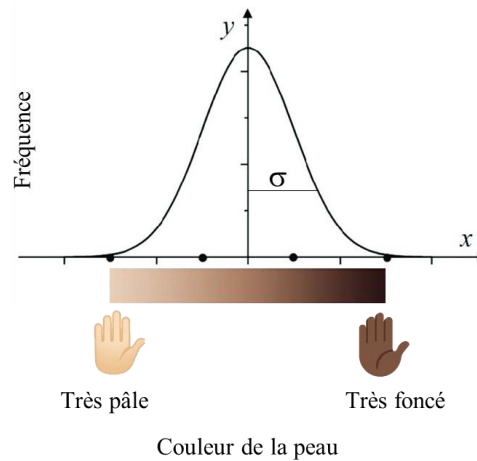


Figure 1.11. Schématisation de la variance phénotypique dans la couleur de la peau. Les deux valeurs extrêmes que peuvent prendre le phénotype sont représentées à l'extrême gauche et l'extrême droite. La variance (σ^2), soit l'écart-type (σ) au carré, mesure la dispersion des valeurs individuelles autour de la moyenne de la population (ici centrée sur l'axe des y).

Afin de calculer la variance phénotypique dans une population (V_P), il faut considérer la variance génotypique (V_G) ainsi que la variance environnementale (V_E) (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998).

$$V_P = V_G + V_E$$

L'héritabilité au sens large ($h^2 = V_G/V_P$) décrit la proportion de la variation phénotypique qui s'explique par l'effet des gènes (Templeton, 2006). Lorsqu'il existe une variation génétique entre les individus, ceux-ci ne porteront pas tous les mêmes allèles. Si cela touche des gènes ayant un effet sur le phénotype, alors cela se traduira par une certaine variation phénotypique dans la population. Puisque V_P est la somme des variations d'origines génétique et non génétique, alors l'héritabilité variera aussi selon les conditions environnementales et la population étudiée (Klug *et al.*, 2008). Afin d'être en mesure de prédire un trait phénotypique, il faut donc d'abord s'intéresser à quelle part de la variance phénotypique est expliquée par la variance génétique et laquelle est due à la variance environnementale (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Si la variance phénotypique d'un trait est majoritairement due à la variance environnementale, il sera alors inutile d'essayer de prédire ce trait seulement à partir de l'analyse des gènes. A contrario, si la variance est principalement expliquée

par les gènes, il est alors souhaitable de rechercher ceux ayant le plus fort effet sur le trait, car ils offriront le meilleur pouvoir de prédiction phénotypique.

Pour terminer, puisque le HRisPlex-S s'intéresse à prédire des caractères pigmentaires (couleur des yeux, des cheveux et de la peau) à l'aide du phénotypage, il faut nécessairement aborder le sujet de la pigmentation.

1.8 La pigmentation

La pigmentation est un trait partagé par l'ensemble des humains dont l'intensité varie entre les individus et les populations. Cette variation peut s'expliquer notamment par l'adaptation des différentes populations aux conditions environnementales locales grâce à la sélection naturelle, et selon les préférences sexuelles (Liu *et al.*, 2013; Parra, 2007). De fait, les différences dans la pigmentation de la peau sont expliquées entre autres par l'adaptation aux rayons ultraviolets, puisque les peaux foncées sont principalement retrouvées dans les régions équatoriales, où l'intensité et la durée de ces rayons sont les plus intenses. Pour ce qui est de la couleur des yeux et des cheveux, une des théories est que les individus avec des traits pigmentaires plus pâles étaient plus attractifs sexuellement, contribuant à la sélection de mutations produisant des phénotypes plus clairs (voir Liu *et al.* (2013) et Parra (2007) pour une revue de ces hypothèses évolutives).

La pigmentation est visible grâce à la présence de mélanine, qui représente le terme générique regroupant un ensemble de biopolymères synthétisés dans les mélanosomes des mélanocytes de l'épiderme, de l'iris et de la racine des cheveux à partir de tyrosine (Parra, 2007). Cet acide aminé est tout d'abord transformé en dopaquinone via l'action de l'enzyme tyrosinase dans les mélanosomes. En absence de cystéine, la dopaquinone est alors transformée en cyclodopa, puis en DOPA et dopachrome par une réaction redox avec la dopaquinone. DOPA est un substrat qui stimule l'enzyme tyrosinase, augmentant ainsi la production de dopaquinone. Le dopachrome, quant à lui, se décompose en 5,6-dihydroxyindole (DHI) grâce à l'action de la dopachrome tautomérase (DCT) et en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA). Ces deux produits sont finalement oxydés en eumélanine (un pigment brun-noir) par l'action des enzymes tyrosinase et TYRP1. En présence de cystéine

cependant, la dopaquinone est transformée en 5-S-cysteinyl-dopa et 2-S-cysteinyl-dopa pour ensuite être oxydés en intermédiaires benzothiazine, qui sont incorporés dans la phéomélanine (un pigment jaune-rouge) (Figure 1.12) (Sturm & Frudakis, 2004).

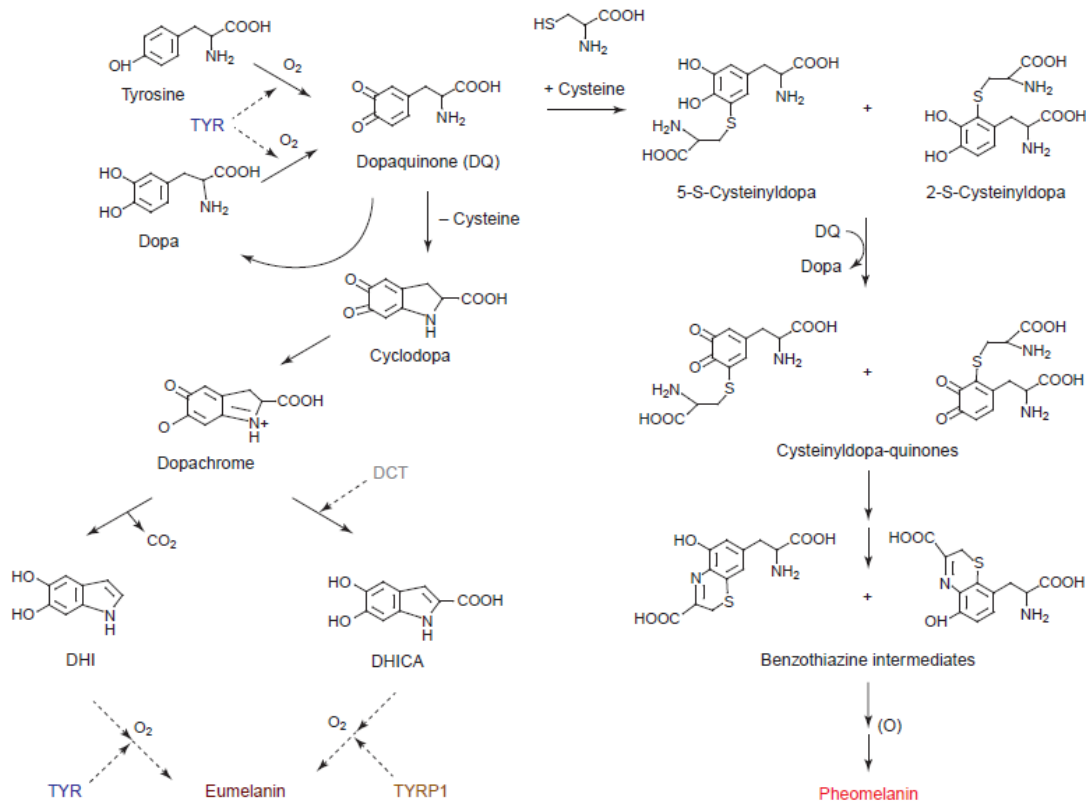


Figure 1.12. Mécanisme réactionnel permettant la production d'eumélanine et de phéomélanine dans les mélanosomes des mélanocytes (tiré de Sturm and Frudakis (2004)).

Des SNP contenus dans les gènes TYR et TYRP1 sont analysés dans le HirisPlex-S pour prédire les phénotypes pigmentaires. De plus, des SNP présents dans les gènes MC1R, MATP, KITLG et OCA2 sont analysés par ce kit (Tableau 1.1) (MedlinePlus, s.d.). Ces gènes ont tous un rôle à jouer dans la formation de la pigmentation. MC1R code pour un récepteur à la surface des mélanocytes contrôlant quel type de mélanine est produite par ceux-ci (eumélanine ou phéomélanine), MATP est probablement nécessaire à la production de mélanine en transportant des molécules dans les mélanosomes (MedlinePlus, s.d.), KITLG code pour le ligand du récepteur tyrosine-kinase (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2004) et OCA2 est nécessaire à la pigmentation normale et est probablement impliqué dans la formation de mélanine. Finalement, d'autres SNP contenus dans ce kit ont pour

l'instant un rôle inconnu (ex. le SNP rs4959270) ou encore, ont un rôle imprécis dans la formation de la pigmentation (ex. un SNP contenu dans le gène TUBB3, qui code pour la protéine β -tubuline (MedlinePlus, s.d.)) (Tableau 1.1).

Les couleurs plus foncées sont dues à la présence plus importante d'eumélanine alors que les couleurs plus pâles s'expliquent par la présence prédominante de phéomélanine. Au niveau de la peau, la mélanine produite dans les mélanocytes de la couche basale de l'épiderme est acheminée dans les kératinocytes grâce à des structures de transfert nommées mélanosomes. Ces kératinocytes migrent ensuite dans les couches supérieures de l'épiderme (Imesch *et al.*, 1997; Rees, 2003). Dans les cheveux, les mélanocytes de la racine transfèrent plutôt les mélanosomes dans des kératinocytes précorticaux immatures qui finissent par se différencier et migrer afin de former la couleur de la tige capillaire (Slominski *et al.*, 2005). Finalement, dans les yeux, les mélanosomes sont confinés dans les mélanocytes (Sturm & Frudakis, 2004).

Le nombre et le type de mélanine (ratio d'eumélanine/phéomélanine) ainsi que la forme et la distribution des mélanosomes sont majoritairement responsables de la variation colorimétrique (Parra, 2007). Pour l'œil en particulier, la pigmentation est également tributaire de l'épaisseur et de la densité de l'iris ainsi que de la présence d'autres structures. L'iris est composé de deux couches d'origine embryonnaire distincte, soit l'épithélium pigmentaire et le stroma. Chacune de ces couches possède des cellules pigmentaires contenant de la mélanine, toutefois, seul le stroma serait responsable de la couleur (Sturm & Frudakis, 2004). L'épaisseur du stroma est également un facteur, principalement pour les yeux bleus (Imesch *et al.*, 1997). D'autres structures et cellules peuvent de plus modifier la coloration, dont les macrophages (Imesch *et al.*, 1997). Bien qu'en général, la couleur des yeux apparaisse comme constante chez une même personne, il semblerait que l'iris puisse se modifier avec l'âge (Bito *et al.*, 1997) et dans le cas de certaines maladies (par exemple, le syndrome de Horner) (Imesch *et al.*, 1997).

Maintenant que la formation de la pigmentation a été abordée, il convient de s'intéresser aux études portant sur sa prédiction grâce à la génétique, plus particulièrement celle de la couleur des yeux, des cheveux et de la peau. Ces études semblent montrer que la variance phénotypique de la couleur des yeux et des cheveux

est majoritairement due aux gènes (Bräuer & Chopra, 1980). Pour ce qui est de la couleur de la peau, les effets environnementaux semblent contribuer davantage à la variance phénotypique de ce trait que pour celle des autres phénotypes. Toutefois, la génétique explique tout de même une majorité de cette variance puisque la couleur constitutive de la peau (non-exposée aux rayons UV), reste plutôt stable au cours de la vie² (Clark *et al.*, 1981; Parra, 2007). Sur ces assises, les sections suivantes s'emploient à élaborer l'historique de ces prédictions.

1.8.1 Couleur des yeux

Les recherches génétiques concernant la pigmentation humaine ont principalement débuté dans les années 1990. L'étude des albinos était alors préconisée afin de détecter des gènes mutés expliquant le changement de couleur et ainsi leur association avec la coloration des yeux, des cheveux et de la peau. De ces recherches, le gène P, aussi connu sous le nom de DN10 ou OCA2, sur le chromosome 15, a été identifié comme jouant un rôle dans l'apparition de phénotypes albinos et donc, relié à la pigmentation (Eiberg & Mohr, 1996; Lee *et al.*, 1994; Rebbeck *et al.*, 2002; Rinchik *et al.*, 1993). Ce gène code pour une protéine membranaire permettant le transport de la tyrosine, un acide aminé nécessaire à la formation de la mélanine (Rinchik *et al.*, 1993). Il est l'analogue au gène *pink-eye dilution* (p) chez la souris qui, lorsque muté, cause des défauts de pigmentation (Rinchik *et al.*, 1993). Dans les années 2000, des chercheurs ont identifié des polymorphismes liés à la couleur des yeux et situés près ou dans le gène OCA2 (Branicki, Brudnik, Kupiec, *et al.*, 2008; Duffy *et al.*, 2007; Frudakis *et al.*, 2007; Frudakis *et al.*, 2003; Sturm & Frudakis, 2004; Zhu *et al.*, 2004). De ces recherches a été produit le premier outil de prédiction pour la couleur des yeux en 2004, DNAWitness™ utilisant le système Retinome™, par DNAPrint Genomics (qui a cessé ses opérations en 2009) (Frudakis, 2016). Ce système se basait sur l'analyse de 33 SNP du gène OCA2 assemblés en diplotypes (paire diploïde d'haplotypes) afin de prédire la couleur des yeux, atteignant selon les chercheurs un taux de réussite de 96% avec des individus d'origine majoritairement européenne (Frudakis, 2016; Gannett, 2014). Cependant, les détails de ce modèle et de ce taux de réussite ne sont pas connus à cause du secret commercial et du fait que la

² Il faut cependant tenir compte que ces évaluations n'ont pas été menées dans toutes les populations et peut donc être variable d'une population à l'autre.

compagnie n'existe plus aujourd'hui. D'autres recherches ont également identifié plusieurs polymorphismes reliés aux gènes ASIP (Kanetsky *et al.*, 2002), TYR (Frudakis *et al.*, 2003; Sulem *et al.*, 2007), TYRP1 (Frudakis *et al.*, 2003), MYO5A, AIM, DCT (Frudakis *et al.*, 2003), SLC45A2 (MATP) (Graf *et al.*, 2005), SLC24A4 (Sulem *et al.*, 2007) et IRF4 (Han *et al.*, 2008) comme ayant un potentiel prédictif pour cette caractéristique physique. En 2007-2008, un SNP lié au gène HERC2 a été découvert (rs12913832) (Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008). HERC2 a été révélé comme influençant l'expression de OCA2 et le polymorphisme de ce gène est depuis considéré comme celui ayant le plus fort effet sur la couleur des yeux (Eiberg *et al.*, 2008; Kayser *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008).

Liu *et al.* (2009) ont poursuivi ces recherches afin de proposer un assemblage de 24 SNP montrés comme statistiquement reliés à la couleur des yeux, afin de permettre la prédiction des yeux bleus et bruns (Tableau 1.2). De ces 24 SNP, un noyau de six SNP (rs12913832 HERC2, rs1800407 OCA2, rs12896399 SLC24A4, rs16891982 SLC45A2, rs1393350 TYR et rs12203592 IRF4) a ensuite été utilisé pour créer le système IrisPlex (Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Bien qu'il fût à ce moment le meilleur pour la prédiction de la couleur des yeux, la prédiction de la couleur intermédiaire avait un plus faible taux de réussite (AUC de 0,73 comparativement à 0,91 et 0,93 pour la couleur bleu et brun respectivement). De plus, la population utilisée ne comportait que des habitants des Pays-Bas (n = 6 168) et la classification des phénotypes était effectuée subjectivement par un observateur (Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Afin de contrer ce dernier inconvénient, Liu *et al.* (2010) ont proposé d'utiliser une classification objective, c'est-à-dire en utilisant une classification exécutée numériquement et basée sur la teinte et la saturation de photographies, ce qui leur a permis d'identifier trois nouveaux loci contribuant à la couleur des yeux : LYST, 17q25.3 et TTC3/DSCR9.

Les développeurs d'IrisPlex ont testé leur ensemble de six SNP sur la base des critères du Groupe de travail scientifique sur les méthodes d'analyse de l'ADN (ou SWGDAM), afin d'évaluer sa validité pour une utilisation en science forensique (Walsh, Lindenbergh, *et al.*, 2011). Le SWGDAM « sert de forum pour discuter, partager et évaluer les méthodes, les protocoles, la formation et la recherche en biologie forensique afin d'améliorer les services de biologie judiciaire et de fournir des recommandations au directeur du FBI sur les normes d'assurance qualité pour

l'analyse de l'ADN en science forensique » (<https://www.swgdam.org>; ma traduction). De plus, ce système a été testé dans plusieurs populations, pays et laboratoires de police scientifique (Tableau 1.3) (Al-Rashedi *et al.*, 2020; Bulbul *et al.*, 2011; Bulbul *et al.*, 2018; Carratto *et al.*, 2021; Chaitanya *et al.*, 2014; Dembinski & Picard, 2014; Kastelic *et al.*, 2013; Marano *et al.*, 2019; Pietroni *et al.*, 2014; Pneuman *et al.*, 2012; Prestes *et al.*, 2011; Purps *et al.*, 2011; Salvorio *et al.*, 2019; Sari *et al.*, 2022; Walsh *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2014). Par contre, les résultats de ces tests sont assez variables. Par exemple, dans l'étude de Kastelic *et al.* (2013), la sensibilité obtenue est de 58,1% pour les yeux bruns alors qu'elle est de 85,0% dans l'étude de Dembinski & Picard (2014) (Tableau 1.3). Les résultats pour la couleur des yeux intermédiaires sont aussi plus faibles que pour les autres couleurs et ce, pour toutes les populations testées.

La recherche sur la couleur des yeux s'est ensuite poursuivie dans plusieurs directions, notamment l'évaluation des interactions entre les gènes (épistasie) qui affectent la prédiction (Pospiech *et al.*, 2011; Pospiech *et al.*, 2014), la recherche de nouveaux SNP pour améliorer les prédictions (Andersen *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2017; Candille *et al.*, 2012; de Araújo Lima *et al.*, 2015; Edwards, Cha, Krithika, Johnson, Cook, *et al.*, 2016; Fracasso *et al.*, 2017; Jonnalagadda *et al.*, 2019; Kukla-Bartoszek *et al.*, 2021; Meyer *et al.*, 2020; Praetorius *et al.*, 2013; Rawofi *et al.*, 2017; Shapturenko, M. *et al.*, 2019; Shapturenko, M. N. *et al.*, 2019; Simcoe *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2013), la conception de nouveaux ensembles de SNP afin de mieux prédire la couleur des yeux dans d'autres populations (Tableau 1.2) (Alghamdi *et al.*, 2019; Allwood & Harbison, 2013; Bulbul & Filoglu, 2018; Gettings *et al.*, 2014; Hart *et al.*, 2013; Kastelic & Drobic, 2012; Meyer *et al.*, 2021; Mushailov *et al.*, 2015; Pospiech *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; Spichenok *et al.*, 2011), le développement de biopuces permettant l'analyse simultanée de milliers de SNP reliés à divers phénotypes, dont celui de la couleur des yeux (Keating *et al.*, 2013) et l'évaluation de l'effet du sexe sur la prédiction (Martinez-Cadenas *et al.*, 2013; Pietroni *et al.*, 2014; Pospiech *et al.*, 2016).

Selon les études mentionnées, l'interaction entre les gènes (épistasie) affecte la prédiction des phénotypes et pourrait donc être intéressante à explorer plus en détail, même si l'ajout de ces interactions dans la prédiction augmente de peu les différentes

métriques du modèle (AUC, sensibilité, etc.) (Pospiech *et al.*, 2014). Par exemple, Pospiech *et al.* (2011) ont observé que des interactions entre les gènes *HERC2* et *OCA2* affectaient l'expression de la couleur noisette pour les yeux alors que des interactions entre *HERC2* et *SLC24A4* affectaient plutôt l'expression des yeux bleus. Des interactions synergétiques (c'est-à-dire une interaction qui dépasse l'effet escompté d'une interaction additive entre deux gènes) ont également été observées entre *HERC2* et *OCA2* ainsi que *HERC2* et *TYRP1*, qui affectent toutes les deux l'expression des yeux verts. Pour ce qui est de l'effet du sexe, les conclusions sont plus mitigées puisque certains auteurs ont observé une différence marquée entre les sexes (Martinez-Cadenas *et al.*, 2013) alors que d'autres, non (Liu *et al.*, 2010). De plus, certains auteurs ont observé que l'effet du sexe sur la couleur des yeux dépend de la population étudiée (Pietroni *et al.*, 2014).

1.8.2 Couleur des cheveux

Le second phénotype pigmentaire à avoir été étudié pour un usage en science forensique a été la couleur des cheveux. Les premiers polymorphismes découverts étaient ceux présents dans le gène *MC1R*, pour lequel les individus possédant certains allèles ont une probabilité de posséder des cheveux roux plus élevée que ceux qui ont d'autres allèles (Box *et al.*, 1997; Flanagan *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 1995). Par la suite, un protocole séquençant 12 polymorphismes de ce gène (insertion de base et mutations) a été établi afin de prédire la probabilité qu'un individu ait les cheveux de cette couleur (Grimes *et al.*, 2001). D'autres polymorphismes de ce gène influençant la pigmentation ont également été découverts un peu plus tard (Sturm *et al.*, 2003). Puis Branicki *et al.* (2007) ont proposé un ensemble de cinq SNP du gène *MC1R* afin de prédire la couleur des cheveux roux dans un contexte forensique. Des allèles de différents SNP situés dans ou près des gènes *ASIP*, *SLC45A2* et *OCA2* ont par la suite été associés aux cheveux foncés (Branicki, Brudnik, Draus-Barini, *et al.*, 2008; Shekar *et al.*, 2008; Voisey *et al.*, 2006), alors que des allèles de SNP situés dans les gènes *TYRP1* et *KITLG* ou dans des régions affectant leur expression ont plutôt été associés aux cheveux blonds (Guenther *et al.*, 2014; Kenny *et al.*, 2012). D'autres SNP contenus dans les gènes *KITLG*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *IRF4*, *HERC2*, *MC1R* et *EDNRB* ou près de ceux-ci montraient, quant à eux, une association avec le phénotype en général (Branicki *et al.*, 2009; Fracasso *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2008; Norton *et al.*,

2016; Sulem *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013)³. Branicki *et al.* (2011) ont été les premiers à proposer un jeu de 13 polymorphismes (dont 11 SNP situés dans différents gènes) afin de prédire les quatre grandes catégories de couleur de cheveux (blond, roux, brun et noir) dans un but forensique (Tableau 1.2). En se basant sur les résultats de ce dernier article, le HIrisPlex était conçu, un système pour prédire la couleur des yeux avec la possibilité d'ajouter la prédiction de la couleur des cheveux grâce à l'analyse de 24 SNP (Walsh *et al.*, 2013). Tout comme pour le système IrisPlex, HIrisPlex a été évalué en suivant les critères du SWGDAM (Walsh *et al.*, 2014) et un guide d'utilisation a ensuite été publié (Walsh & Kayser, 2016). Il a également été évalué dans quelques populations humaines autres que celles ayant servi à son développement (Carratto *et al.*, 2019; Sari *et al.*, 2022). Kastelic & Drobic (2012) ont quant à eux proposé un jeu de cinq SNP pour prédire la couleur des cheveux dans la population de Slovénie, Sochtig *et al.* (2015), un jeu de 12 SNP pour prédire la couleur des cheveux et Siewierska-Górska *et al.* (2017), un jeu de 5 SNP pour le même phénotype. Une étude s'est aussi intéressée à l'impact du changement de couleur des cheveux entre l'enfance et l'âge adulte sur la prédiction phénotypique (Kukla-Bartoszek *et al.*, 2018). Cette étude a montré que le kit HIrisPlex prédisait dans deux tiers des cas la couleur blonde de l'enfance plutôt que la couleur foncée d'un âge plus avancé. De plus, concernant le changement de couleur des cheveux, un ensemble de 13 SNP a été bâti afin de prédire les cheveux gris (Pośpiech *et al.*, 2020). Cependant, les données sur l'âge et le sexe étaient aussi incluses dans le modèle, l'âge apportait ainsi le plus d'information sur la prédiction, alors que les SNP expliquaient moins de 10% de la variation des cheveux gris.

1.8.3 Couleur de la peau

Les premières recherches sur la pigmentation de la peau ont débuté en identifiant des mutations chez les albinos (Oetting & King, 1999). Par la suite, quelques polymorphismes ayant potentiellement un lien avec ce phénotype, mais également, dans certains cas, avec des cancers de la peau, ont été découverts dans des populations

³ Une liste plus exhaustive des gènes et des polymorphismes reliés aux trois phénotypes pigmentaires est présentée dans Dabas, P., Jain, S., Khajuria, H., & Nayak, B. P. (2022). Forensic DNA phenotyping: Inferring phenotypic traits from crime scene DNA. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 88, 102351. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2022.102351>

distinctes. Parmi ces polymorphismes, notons ceux situés dans une région régulatrice, près ou directement dans les gènes AIM1 (Nakayama *et al.*, 2002), MC1R (Sturm, 2002; Sturm *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 1995), OCA2 (Lao *et al.*, 2007; Shriver *et al.*, 2003), TYR (Shriver *et al.*, 2003; Stokowski *et al.*, 2007), ASIP (Bonilla *et al.*, 2005), SLC24A5 (Crawford *et al.*, 2017; Lamason *et al.*, 2005; Stokowski *et al.*, 2007), SLC45A2 (MATP) (Fracasso *et al.*, 2017; Graf *et al.*, 2007; Stokowski *et al.*, 2007), IRF4 (Han *et al.*, 2008), HERC2 (Branicki *et al.*, 2009), OPRM1, EGFR (Quillen *et al.*, 2012), BNC2 (Visser *et al.*, 2014), entre les gènes BEND7 et PRPF18 (Hernandez-Pacheco *et al.*, 2017), MFSD12 (Adhikari *et al.*, 2019), GRM5 et finalement APBA2 (Lona-Durazo *et al.*, 2019). D'autres études ont également découvert des gènes jouant un rôle dans la pigmentation, dont TYRP1, KITLG, EGFR, DRD2, PPARD (Lao *et al.*, 2007) et DCT (Lao *et al.*, 2007; Myles *et al.*, 2007). D'un autre côté, certaines études ont trouvé des SNP associés à la propension de la peau à bronzer, localisés dans ou près de gènes reliés à la pigmentation (Nan *et al.*, 2009). Toutefois, il est possible que certains polymorphismes et gènes identifiés soient liés au degré de métissage, et non pas seulement à la couleur de la peau (Cerqueira *et al.*, 2014). De plus, certaines études ont suggéré un effet du sexe dans la pigmentation de la peau (Hernando *et al.*, 2016; Johansen *et al.*, 2016), où plus de SNP associés à une pigmentation foncée et à une bonne tolérance au soleil ont été observés chez les femmes que chez les hommes dans une population espagnole et danoise.

Spichenok *et al.* (2011) ont été les premiers à proposer un système de prédiction de la couleur de la peau dans un but forensique à partir de sept SNP situés dans ou près des gènes HERC2, OCA2, SLC45A2, SLC24A5, MC1R, ASIP et IRF4. Cependant, leurs prédictions se basaient sur une approche conservatrice (seuls les génotypes homozygotes des individus étaient utilisés). De plus, les prédictions étaient des exclusions plutôt que des inclusions, c'est-à-dire que les résultats donnés étaient, par exemple, « non-blanc » pour la couleur de la peau. Cet ensemble de SNP a tout de même été validé par Pneuman *et al.* (2012), puis un SNP supplémentaire du gène SLC24A4 a été ajouté afin d'améliorer les prédictions (Hart *et al.*, 2013). Ensuite, Maroñas *et al.* (2014) ont publié un système pour prédire ce phénotype en analysant 10 SNP. Puis, Dario *et al.* (2015) ont ajouté des SNP au IrisPlex afin d'être en mesure de prédire la couleur de la peau avec une précision de 93% en utilisant leur modèle de régression logistique binomiale, qui pouvait donner un résultat de peau pâle ou de peau

foncée seulement. Finalement, Walsh *et al.* (2017) ont proposé un assemblage de 36 SNP permettant de prédire la couleur de la peau, qui a par la suite été combiné au HIrisPlex afin de former un ensemble de SNP pouvant prédire la couleur des yeux, des cheveux et de la peau nommé HIrisPlex-S (Chaitanya *et al.*, 2018) (Tableau 1.2). Cet ensemble a par la suite été adapté pour une utilisation sur les plateformes de séquençage de seconde génération (Breslin *et al.*, 2019; Turchi *et al.*, 2019). Quelques études ont également testé cet ensemble dans différentes populations (Carratto *et al.*, 2019; Marano *et al.*, 2019; Palmal *et al.*, 2021) avec des résultats mitigés, c'est-à-dire que la performance obtenue par ces études pour chaque couleur de peau est similaire ou beaucoup plus faible que celle obtenue dans l'article original de Walsh *et al.* (2017) (Tableaux 1.2 et 1.3).

1.8.4 Kits et services commerciaux

Certains des ensembles de SNP mentionnés dans les sections précédentes ont été convertis en kits commerciaux pour un usage plus répandu dans les laboratoires forensiques. Parmi ces kits, VEROGEN a par exemple créé le Forenseq™ DNA Signature Prep Kit, composé de plus de 200 marqueurs qui incluent 27 STR sur les chromosomes autosomaux et 31 STR sur les chromosomes sexuels (chromosomes X et Y), 94 marqueurs d'identité, 22 marqueurs pour la prédiction des caractéristiques physiques et 56 marqueurs pour l'ethnicité (AIM SNP) (Terrado Ortuño & May, 2023). L'ensemble de ces marqueurs est analysé via le séquençage de nouvelle génération (NGS) puis grâce à un logiciel nommé *Universal Analysis Software* (UAS). Il a par ailleurs déjà été évalué par certains chercheurs, avec des résultats plus ou moins concluants sur sa justesse, c'est-à-dire que les prédictions faites par ce kit ne correspondent pas toujours au phénotype réel dans une proportion qui varie d'une recherche à l'autre (Frégeau, 2021; Guo *et al.*, 2017; Junker *et al.*, 2019; Salvo *et al.*, 2022). Par exemple, Junker *et al.* (2019) obtenaient une justesse de 58% pour la couleur des cheveux alors que pour Salvo *et al.* (2022), cette justesse se situait à 65% en sélectionnant la couleur avec la plus haute probabilité, mais celle-ci augmentait à 75% lorsque les lignes directrices du kit étaient suivies. Plus récemment encore, le consortium VISAGE, qui a élaboré le HIrisPlex-S et ses précédentes versions, a conçu deux outils permettant entre autres la prédiction de l'apparence : les prototypes *VISAGE Basic labtools* et *VISAGE Enhanced labtools*. Ces derniers comportent

respectivement 41 et 199 SNP pour prédire la couleur des yeux, des cheveux et de la peau pour le premier, et la couleur des yeux, des cheveux, de la peau en plus de la couleur des sourcils, la présence de taches de rousseur, la texture des cheveux ainsi que la perte de cheveux masculine pour le second (Chen *et al.*, 2023; de la Puente *et al.*, 2021; Heidegger *et al.*, 2022; Heidegger *et al.*, 2020; Kayser *et al.*, 2023; Kukla-Bartoszek *et al.*, 2019; Palencia-Madrid *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2019; Pośpiech *et al.*, 2018; Xavier, C. *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2020). Ces deux outils ont été validés pour leur utilisation en science forensique via des exercices collaboratifs entre partenaires (de la Puente *et al.*, 2021; Palencia-Madrid *et al.*, 2020; Xavier *et al.*, 2020; Xavier, Catarina *et al.*, 2022).

Pour ce qui est des services commerciaux, le plus connu est celui offert par la compagnie Parabon NanoLabs, basée aux États-Unis, qui permettrait de prédire l'apparence d'un visage complet en 3D, ainsi que l'origine biogéographique (qui n'est pas à proprement parler un phénotype) (Wiley *et al.*, 2017). Cependant, cette compagnie n'a jamais divulgué ou publié ses méthodes, empêchant toute validation scientifique indépendante de celles-ci (Wienroth, 2018).

Tableau 1.1. Résumé des SNP contenus dans le HirisPlex-S ainsi que les informations relatives à ceux-ci

SNP	Chromosome	Gène associé	Allèle de référence/Allèles alternatifs ^a	Fonction du gène associé ^b	Phénotype pigmentaire associé ^c
rs312262906 rs11547464 rs885479 rs1805007 rs1805008 rs201326893 rs1110400 rs2228479 rs1805005 rs1805006 rs3212355	16	MC1R	INDEL A/- G/A G/A/C C/T/A/G C/T C/A T/C G/A/C G/T C/A/G C/T	Encode le récepteur pour l'hormone de stimulation mélanocytaire (MSH; <i>melanocyte-stimulating hormone</i>) Contrôle la mélanogenèse	Couleur des cheveux Couleur des cheveux Couleur des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des cheveux Couleur des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des cheveux Couleur de la peau
rs1805009 rs4959270	16 6	TUBB3 LOC105374875	G/C/A C/A/G/T	Création de b-tubuline nécessaire à la formation des microtubules -	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs28777 rs16891982	5	SLC45A2 (MATP)	C/A C/G/A	Code pour une protéine de transport qui intervient dans la synthèse de mélanine	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs12821256	12	KITLG	T/C/A/G	Code pour le ligand du récepteur tyrosine-kinase	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs12203592	6	IRF4	C/T	Code pour une protéine de la famille des facteurs de transcription IRF (<i>interferon regulatory factor</i>)	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs1042602 rs1393350 rs1126809	11	TYR	C/A G/A G/A	Code pour une enzyme qui catalyse plusieurs étapes dans la conversion de la tyrosine en mélanine	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs1800407 rs1800414 rs1470608 rs1545397 rs12441727	15	OCA2	C/T T/C/A G/T/A/C A/T G/A/C	Code pour une protéine membranaire impliquée dans le transport de petites molécules, principalement la tyrosine, qui est un précurseur de la synthèse de mélanine Ce gène encode la protéine humaine analogue au gène <i>p</i> (<i>pink-eyed dilution</i>) chez la souris	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux et de la peau Couleur de la peau Couleur de la peau Couleur de la peau
rs2402130 rs17128291	14	SLC24A4	G/A/C/T A/G	Code pour un membre de la famille des transporteurs de solutés Impliqué dans le transport transmembranaire de calcium, potassium et sodium	Couleur des yeux et des cheveux Couleur de la peau
rs12896399	14	LOC105370627	G/T/A	-	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs12913832 rs6497292 rs1129038 rs1667394 rs2238289	15	HERC2	A/G A/G C/T C/T/A A/G	Code pour une protéine ubiquitine ligase	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs2378249 rs683	20 9	PIGU TYRP1	G/A/C C/A	Code pour une sous-unité de la GPI transamidase, qui attache des ancrs GPI aux protéines Code pour une enzyme mélanosomale de la famille des tyrosinases qui joue un rôle important dans la synthèse de mélanine	Couleur des cheveux Couleur des cheveux
rs3114908	16	ANKRD11	T/C/A/G	Code pour une protéine contenant un domaine répétitif de l'ankryne qui inhibe l'activation de la transcription	Couleur de la peau
rs10756819	9	BNC2	G/A/C/T	Code pour une protéine à doigt de zinc qui joue un rôle dans la saturation de la couleur de la peau	Couleur de la peau
rs1426654	15	SLC24A5	A/G/T	Code pour une protéine membranaire intracellulaire de la famille des protéines échangeuses de sodium/calcium dépendantes du potassium	Couleur des yeux, des cheveux et de la peau
rs6119471	20	ASIP	C/G	Code pour une protéine sécrétée ayant entre autres un rôle dans la pigmentation des cheveux et l'action de la mélanocortine	Couleur des cheveux et de la peau
rs6059655 rs8051733	20 16	RALY DEF8	A/G A/G	Code pour un membre de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) Rôle possible dans l'activité de liaison aux ions métalliques	Couleur des cheveux et de la peau Couleur de la peau

^aL'allèle de référence et l(es) allèle(s) alternatif(s) ont été extraits de la base de données Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022)

^bLe rôle des gènes associés a été extrait du module *Gene* de la base de données du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2004)

^cLes phénotypes pigmentaires associés à chaque SNP ont été extraits de la base de données Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022), SNPedia (<https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>) et l'outil web du HirisPlex-S (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>)

Tableau 1.2. Résumé de systèmes utilisés pour prédire la couleur des yeux, des cheveux et/ou de la peau ainsi que leur performance respective

Modèle	Type de modèle	Population étudiée	Classification de la couleur	SNP utilisés	AUC	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Couleur des yeux									
Liu <i>et al.</i> (2009)	Régression logistique multinomiale	Pays-Bas	Détermination visuelle par un ophtalmologiste; Catégorique	24	Bleu 0,91 Int 0,73 Brun 0,93	Bleu 93,4 Int 1,1 Brun 88,4	Bleu 77,1 Int 99,6 Brun 88,0	Bleu 89,8 Int 25,0 Brun 67,1	Bleu 84,4 Int 90,0 Brun 96,5
IrisPlex	Régression logistique multinomiale	40 participants d'Europe	Détermination visuelle; Catégorique	6	Bleu - Int 0,83 Noisette 0,75 Brun 0,95	Bleu - Int 75,0 Noisette 17,0 Brun 100,0	Bleu - Int 100,0 Noisette 86,0 Brun 64,0	Bleu - Int 100,0 Noisette 33,0 Brun 55,0	Bleu - Int 86,0 Noisette 71,0 Brun 100,0
Walsh, Liu, <i>et al.</i> (2011)									
Pospiech <i>et al.</i> (2012)	Réseau bayésien	638 participants de la Pologne	Classification par un dermatologiste	6	Bleu 0,783 Vert 0,533 Noisette 0,633 Brun 0,583	Bleu 80,0 Vert 0,0 Noisette 55,0 Brun 35,0	Bleu 76,7 Vert 93,3 Noisette 71,7 Brun 81,7	Bleu 53,3 Vert 0,0 Noisette 39,3 Brun 38,9	Bleu 92,0 Vert 73,7 Noisette 82,7 Brun 79,0
Snipper	Régression logistique multinomiale et réseau bayésien	416 participants d'Europe	Classification selon les critères de Liu <i>et al.</i> (2009) et Eiberg <i>et al.</i> (2008)	13 (aussi 7 et 23)	Bleu 0,999 Int 0,816 Brun 0,990	-	-	-	-
Ruiz <i>et al.</i> (2013)									
Allwood and Harbison (2013)	Arbre de classification et modélisation en partition	Nouvelle-Zélande	Détermination visuelle par un seul observateur	19	Exactitude (%) Bleu 89,0 Int 46,0 Brun 94,0				
Dembinski & Picard (2014)	Régression logistique multinomiale (MLR) et réseau bayésien	200 participants des États-Unis	Détermination objective et subjective avec 5 individus	6	MLR Bleu 0,97 Int 0,89 Brun 0,97 Bayes Bleu 0,97 Int 0,86 Brun 0,96	MLR Bleu 86,0 Int 65,0 Brun 85,0 Bayes Bleu 93,0 Int 41,0 Brun 82,0	MLR Bleu 95,0 Int 95,0 Brun 93,0 Bayes Bleu 93,0 Int 93,0 Brun 87,0	MLR Bleu 93,0 Int 73,0 Brun 89,0 Bayes Bleu 91,0 Int 54,0 Brun 80,0	MLR Bleu 90,0 Int 93,0 Brun 91,0 Bayes Bleu 95,0 Int 89,0 Brun 88,0
Couleur des yeux et de la peau									
Spichenok <i>et al.</i> (2011)	Arbre de classification	554 participants 68,4% Européens; 17,1% populations mixtes; 6,0% Africains-américains; 4,5% Asiatiques (indien); 4,0% Asiatiques (Japon et Chine)	Auto-évaluation et photographies	7	4 erreurs de prédiction sur 554 pour la couleur des yeux 2 erreurs de prédiction sur 398 pour la couleur de la peau				
Hart <i>et al.</i> (2013)	Arbre de classification	Majoritairement européen	Auto-évaluation et photographies	8	Taux d'erreur de 4,54%				

			Auto-évaluation et spectrophotomètre pour la couleur de la peau											
HirisPlex-S Walsh <i>et al.</i> (2017)	Régression logistique multinomiale	1423 participants de plusieurs pays	Classification par un	41	TP	0,74	P	99,0	P	85,0	P	95,0	P	98,0
			dermatologue avec		P	0,72	F	50,0	F	99,0	F	86,0	F	93,0
			l'échelle de Fitzpatrick;		Int	0,73	TF	92,0	TF	96,0	TF	79,0	TF	99,0
			Catégorique		F	0,87								
					TF	0,97								

AUC, aire sous la courbe ROC : reflète la performance du modèle (capacité à faire des prédictions justes), une valeur de 1 indique une performance optimale du modèle;

Sensibilité : proportion de sujets qui ont la couleur et qui sont correctement prédits comme tel par le test;

Spécificité : proportion de sujets qui n'ont pas la couleur et qui sont correctement prédits comme tel par le test;

VPP, valeur prédictive positive : proportion de sujets prédits par le test comme ayant la couleur et qui ont réellement la couleur;

VPN, valeur prédictive négative : proportion de sujets prédits par le test comme exempt de la couleur et qui sont réellement exempt de la couleur.

MLR : Régression logistique multinomiale

Int : couleur intermédiaire; TP : très pâle; P : pâle; F : foncé; TF : très foncé

Tableau 1.3. Évaluation du IrisPlex, du HirisPlex et du HirisPlex-S dans différentes populations

Système	Article ayant testé le système	Population étudiée	Couleur	AUC	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
IrisPlex (seuil de 0.7)	Kastelic <i>et al.</i> (2013)	Slovénie	Bleu	0,966	93,6	93,1	91,7	94,7
			Int	0,796	0,0	100,0	-	74,3
			Brun	0,913	58,1	89,2	69,2	83,5
	Dembinski & Picard (2014)	États-Unis	Bleu	0,970	91,0	95,0	93,0	93,0
			Int	0,840	41,0	93,0	54,0	89,0
			Brun	0,950	85,0	84,0	77,0	90,0
	Pietroni <i>et al.</i> (2014)	Italie	Bleu	-	96,0	81,0	-	-
			Int	-	0,0	100,0	-	-
			Brun	-	100,0	55,0	-	-
	Marano <i>et al.</i> (2019)	Brésil	Bleu	0,881	-	-	-	-
			Int	0,500	-	-	-	-
			Brun	0,668	-	-	-	-
Carratto <i>et al.</i> (2021)	Brésil	Bleu	0,891	90,9	85,4	44,8	98,6	
		Int	0,751	0,0	1,0	-	80,8	
		Brun	0,933	99,0	73,9	89,5	97,0	
Sari <i>et al.</i> (2022)	Turquie	Bleu	0,660	100,0	92,2	66,7	100,0	
		Int	0,590	0,0	100,0	-	74,5	
		Brun	0,880	95,6	65,5	81,3	90,5	
HirisPlex	Marano <i>et al.</i> (2019)	Brésil	Blond	0,608	-	-	-	-
			Brun	0,597	-	-	-	-
			Roux	0,542	-	-	-	-
			Noir	0,666	-	-	-	-
	Carratto <i>et al.</i> (2021)	Brésil	Blond	0,888	61,2	95,2	69,8	93,1
			Brun	0,700	78,2	60,3	70,1	69,8
			Roux	0,992	72,7	99,4	80,0	99,0
			Noir	0,841	54,7	88,9	64,4	84,2
	Sari <i>et al.</i> (2022)	Turquie	Blond	0,900	59,3	98,4	88,9	91,6
			Brun	0,890	96,9	76,9	88,7	93,0
			Roux	0,550	75,0	100,0	100,0	99,3
			Noir	0,960	95,2	98,4	90,9	99,2
HirisPlex-S	Carratto <i>et al.</i> (2019)	Brésil	TP	0,850	0,0	100,0	-	85,0
			P	0,730	18,0	88,0	33,0	77,0
			Int	0,620	56,0	55,0	48,0	62,0
			F	0,730	30,0	83,0	21,0	89,0
			TF	0,990	100,0	85,0	25,0	100,0
	Marano <i>et al.</i> (2019)	Brésil	P	0,723	-	-	-	-
			Int	0,541	-	-	-	-
			F	0,641	-	-	-	-

AUC, aire sous la courbe ROC : reflète la performance du modèle (capacité à faire des prédictions justes), une valeur de 1 indique une performance optimale du modèle;

Sensibilité : proportion de sujets qui ont la couleur et qui sont correctement prédits comme tel par le test;

Spécificité : proportion de sujets qui n'ont pas la couleur et qui sont correctement prédits comme tel par le test;

VPP, valeur prédictive positive : proportion de sujets prédits par le test comme ayant la couleur et qui ont réellement la couleur;

VPN, valeur prédictive négative : proportion de sujets prédits par le test comme exempt de la couleur et qui sont réellement exempt de la couleur.

Int : couleur intermédiaire; TP : très pâle; P : pâle; F : foncé; TF : très foncé

1.9 Objectifs et hypothèses de travail

L'objectif général de cette recherche était de déterminer si le phénotypage apporte une plus-value dans un contexte judiciaire au vu des connaissances actuelles. Quant aux objectifs spécifiques, ceux-ci étaient :

1) d'établir l'utilité du phénotypage dans un contexte judiciaire, en prenant en compte l'incertitude de prédiction et l'interprétation de cette information par les acteurs de justice québécois. En d'autres termes, répond-il au besoin opérationnel des policiers au Québec ? À notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à l'opinion policière sur le phénotypage et celle-ci a été menée en Europe auprès d'une cohorte de six policiers (Samuel & Prainsack, 2019). L'étude menée ici vise donc à établir un portrait plus global de la vision policière québécoise face à ce nouvel outil. Basée sur les conclusions de Samuel and Prainsack (2019), l'hypothèse de départ pour cette partie était que les acteurs de justice québécois amplifient l'utilité du phénotypage comparativement à sa valeur réelle.

2) d'étudier l'architecture génétique des phénotypes pour établir si la corrélation entre les génotypes et les phénotypes est suffisante pour son application en science forensique au Québec. Autrement dit, le phénotypage par l'ADN tel qu'il est présentement décrit est-il transposable au Québec. La seconde partie de l'étude menée ici vise donc à tester un kit de phénotypage dans la population québécoise. Basée sur les différentes études qui ont évalué le HIrisPlex-S (ou ses précédentes versions HIrisPlex et IrisPlex) dans leur population (ex. Kastelic *et al.* (2013), Dembinski & Picard (2014), Carratto *et al.* (2019), Carratto *et al.* (2021), Sari *et al.* (2022)), l'hypothèse pour cet objectif est que la corrélation génotype-phénotype n'est pas suffisamment bien comprise pour que les résultats obtenus par ce kit correspondent suffisamment aux phénotypes réels pour son utilisation en science forensique.

1.10 Dimensions méthodologiques

Afin de répondre à ces deux objectifs, une cohorte de 163 policiers a été interrogée pour connaître leurs connaissances et leur opinion sur le sujet via un questionnaire en

ligne. Parallèlement, la prédiction du phénotype (couleur des yeux, cheveux et peau) de 139 Québécois volontaires a été effectuée avec le HIrisPlex-S.

1.10.1 L'analyse inductive

Dans le premier volet de ce projet, des policiers ont été questionnés sur leurs connaissances et leur opinion concernant le phénotypage. Une fois leurs réponses collectées, celles-ci ont été analysées selon l'approche de l'analyse inductive. Cette dernière consiste à produire de nouvelles connaissances à partir de l'analyse d'un corpus de données brutes (Blais & Martineau, 2006), dans le cas présent, les réponses des policiers. Cette analyse permet de regrouper des thèmes présents dans les discours en catégories puis dans un modèle conceptuel général. Elle se décline en quatre grandes étapes : 1) la préparation de données, qui consiste à uniformiser le corpus selon un modèle établi; 2) la lecture attentive, approfondie et répétée du corpus afin de le maîtriser et identifier des thèmes; 3) l'identification et la description des catégories qui regroupent un ou plusieurs thèmes; 4) la révision et le raffinement des catégories ainsi que la sélection de citations qui représentent le mieux la catégorie (Blais & Martineau, 2006).

1.10.2 HIrisPlex-S

Le système HIrisPlex-S a été utilisé pour prédire des phénotypes pigmentaires grâce à l'analyse de 41 SNP distribués sur plusieurs chromosomes (Tableau 1.2). Il est l'un des outils les plus avancés sur les phénotypes pigmentaires à ce jour puisqu'il permet la prédiction simultanée de la couleur des yeux, des cheveux et de la peau grâce à trois modèles de régression logistique multinomiale (un pour chaque phénotype) et parce qu'il a également été évalué dans plusieurs populations à ce jour (Tableau 1.3). Les SNP de cet ensemble ont été analysés en utilisant le principe du séquençage par synthèse d'Illumina sur l'appareil MiSeq en s'inspirant du protocole de Breslin *et al.* (2019).

1.11 Résultats sommaires

Dans le premier article du projet, il a été révélé que les policiers, bien que ne connaissant pour la majorité que peu de détails concernant le phénotypage par l'ADN, étaient intéressés à l'utiliser et voyaient de nombreuses applications de ce nouvel outil dans leur travail. Malgré tout, certains policiers faisaient preuve d'optimisme prudent ou n'exprimaient pas d'opinion, principalement dû à leur admission de leur faible niveau de connaissances concernant le phénotypage. De plus, pour les policiers, la fiabilité d'un outil passe par l'aspect scientifique (études menées et taux d'erreur faible), l'acceptabilité à la cour et l'aspect pratique (l'outil les aide dans leur travail). Ce qui mène au deuxième article, où l'aspect scientifique a été évalué. Il a ainsi été observé que la justesse du HIrisPlex-S était faible pour certaines couleurs, plus particulièrement, la couleur intermédiaire pour les yeux ainsi que pour les cheveux blonds et bruns. De plus, moins de 40% des participants avaient leurs trois phénotypes prédits correctement par le HIrisPlex-S. L'aspect scientifique considéré par les policiers n'est donc pas rempli pour l'instant, ce qui questionne la justesse et l'utilité présente de cet outil en science forensique dans certains contextes.

CHAPITRE II

LE PHÉNOTYPAGE PAR L'ADN EN CRIMINALISTIQUE : VISION OPÉRATIONNELLE DES OFFICIERS DE POLICE QUÉBÉCOIS

Audrée GAREAU-LÉONARD^{1,2,3}, Vincent MOUSSEAU^{2,3,4}, Frank CRISPINO^{1,2,3},
Emmanuel, MILOT*^{1,2,3}

1 Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)

2 Centre international de criminologie comparée (CICC)

3 Groupe de recherche en science forensique (GRSF)

4 École de criminologie - Université de Montréal

*Auteur correspondant

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour une publication en anglais dans la revue scientifique *Forensic Science International : Synergy*, qui possède un comité de révision par les pairs.

2.1. Contribution des auteurs

En tant qu'auteure principale de cet article, j'ai été impliquée dans tous les aspects du projet et de la rédaction, soit la mise sur pied du projet, le contact avec les collaborateurs, la rédaction des ententes et des certifications éthiques, la rédaction du questionnaire, l'analyse des réponses obtenues et la rédaction de l'article. Mr Vincent Mousseau a été impliqué dans la révision des questions et des différentes versions de l'article en plus de fournir un soutien tout au long du projet. Les Dr Emmanuel Milot et Frank Crispino, en tant que directeur et co-directeur, ont été impliqués dans l'élaboration du projet ainsi que dans la révision des questions et de l'article en plus de fournir un soutien durant tout le déroulement du projet.

2.2. Résumé de l'article

Le phénotypage par l'ADN est un outil qui permet de prédire des caractéristiques physiques, ou phénotypes, à partir de l'ADN seulement. Celui-ci est destiné, dans un contexte forensique, à être utilisé au niveau investigatif afin de potentiellement fournir de nouvelles pistes d'enquête pour les policiers, là où les méthodes classiques d'analyse de l'ADN n'ont pas pu fournir d'information. Bien que plusieurs études se soient penchées sur la création et la validation d'ensembles de polymorphismes génétiques afin de prédire différents phénotypes, une seule étude s'est intéressée à l'opinion des policiers quant à ce nouvel outil (à notre connaissance), malgré qu'ils en soient les premiers utilisateurs. Afin de combler ce manque, 163 policiers québécois de la Sûreté du Québec (principalement des enquêteurs et des dirigeants de police) ont été interrogés via un questionnaire en ligne pour connaître leur niveau de connaissance et leur opinion par rapport au phénotypage et ainsi obtenir une vision plus globale de leur point de vue. Les résultats obtenus indiquent que la majorité des policiers interrogés ne sont pas familiers avec cet outil (103/163; 63%), mais ils supporteraient son utilisation si la fiabilité, définie par eux-mêmes comme étant un outil qui est vérifié scientifiquement (faible taux d'erreur), approuvé à la cour et utile à leurs enquêtes, est bonne, particulièrement pour les crimes contre la personne (79/137; 58%). Cette recherche met l'emphase sur la plus-value d'interroger les utilisateurs premiers d'un nouvel outil ou technologie durant son développement.

2.3. Forensic DNA Phenotyping: Accessing the operational view of police officers

Abstract

DNA phenotyping is a tool predicting physical characteristics from DNA to provide investigative leads. Research in the field has mainly focused on the development and validation of molecular marker panels and associated statistical models to predict phenotypes. However, the operational value of DNA phenotyping has not been thoroughly assessed by gathering the input from a representative sample of police officers, who are the targeted users of this tool. To fill this gap, 163 police officers mainly involved in major crimes investigation in Quebec (Canada), answered a questionnaire designed to better understand their knowledge and opinion regarding DNA phenotyping. Our results show that the majority of police officers are not yet familiar with DNA phenotyping (103/163; 63%), but that they would support its use if the reliability is good, especially for crimes against people (79/137; 58%). This research emphasizes the added value of questioning the users of a new tool during its development.

Keywords

Forensic biology, pigmentation trait, phenotype prediction, forensic value, police needs

Introduction

Forensic DNA phenotyping (FDP) is an emerging tool that has been the center of numerous scientific papers and attention from the forensic field in the last few years (e.g. Branicki *et al.*, 2005; Canales Serrano, 2020; Kayser & Schneider, 2009; Marano & Fridman, 2018). This tool aims to predict physical characteristics (phenotypes) of individuals solely based on the analysis of their DNA (for example, their eye, hair and skin colour or their height) (Kayser, 2015). In forensics, this tool is particularly interesting in cases where a DNA trace left at a crime scene cannot be linked to the individual who has left it. Indeed, from a scientific point of view, DNA phenotyping could be useful for narrowing down the list of persons of interest or for identifying a victim (Marano & Fridman, 2018).

However, its usefulness has not been thoroughly appraised by the targeted users, the police officers. To date, only one study has looked at DNA phenotyping at the police level and it has focused primarily on ethical, social and regulatory concerns (Samuel & Prainsack, 2019). Interestingly, this study showed that some police officers would be inclined to use tests even if validation has not been carried out, or if the tests have a low predictive value, if they nonetheless perceive their usefulness, for example if they think the tests may provide a new lead. However, the number of police officers interviewed was small ($n = 6$), limiting the scope of conclusions that can be drawn about the value of FDP from a police perspective.

The lack of information pertaining to police knowledge, needs and expectations raises certain issues, i.e.: 1) are police forces aware of DNA phenotyping and if so, what is their level of knowledge? 2) do they perceive this tool as meeting some operational need? In other words, do they see the tool as valuable for their investigations? 3) are the phenotypes being studied likely to be useful in their opinion? and 4) how will the uncertainty around phenotypic predictions be interpreted by the users, and will the usefulness of this tool decrease upon an increase in uncertainty?

This study aims to address the first three issues by collecting information from a large sample of police officers across Quebec, Canada, who are more likely to come into contact with DNA phenotyping because of their job titles and/or functions. Specifically, an online questionnaire was distributed to different categories of police officers of the *Sûreté du Québec* (the largest police force, both geographically and in terms of scope of action, in the province of Quebec) to assess their knowledge on the subject as well as their opinion regarding this new approach (uses of FDP, issues, reliability, training). The main results obtained are that most police officers in Quebec do not know, or only know the basics, of DNA phenotyping, but can still perceive an operational usefulness, particularly for crimes against people, if results are reliable.

Methods

Evaluation tool

In order to access police officers' knowledge and opinion about DNA phenotyping in a forensic context, and to uncover the foundations on which their opinion is based, an online survey was chosen to collect the data. This method is suitable for our study because it provides a broad picture of the subject of interest (Braun *et al.*, 2017). The use of an online survey also made it possible to circumvent limitations caused by public health measures during the COVID-19 pandemic. The questionnaire had three sections: the first one included socio-demographic questions about the respondent; the second included discrete-choice (yes/no, multiple-choice) and qualitative (textual) questions about their knowledge on DNA phenotyping; and the third included discrete-choice and qualitative questions about their opinion on DNA phenotyping (Supplementary Data S2.1 for the full questionnaire). The questionnaire was pretested on a small sample of police officers ($n = 14$) from the *École nationale de police du Québec (ENPQ)*⁴ to evaluate the clarity of our questions and to make modifications whenever necessary (Braun *et al.*, 2021). Their answers were not included in the final sample.

Experimental sample

In Quebec, police services are graded in 6 levels according to the population size in the municipality concerned and its geographic location, each increasing level being assigned supplemental police services, including in forensic science (*Ministère de la Sécurité Publique du Québec*, s.d.). Level 6 was targeted, which includes exclusively the *Sûreté du Québec*. This level was chosen for three reasons, 1) it investigates, or offers support in, major crimes (where DNA phenotyping seems to be mostly intended (Hopman, 2020)); 2) it plays a support role for all other levels, making it omnipresent in the province of Quebec; 3) it has more financial resources than other levels, hence fewer constraints to use state-of-the-art tools and technologies for some of its investigations. Following a presentation of the project in November 2019, the *Sûreté du Québec* agreed to collaborate by soliciting police officers involved in criminal

⁴ The *École nationale de police du Québec (ENPQ)* is the only police academy in the province of Quebec.

investigations (n° SQ-1234-2021-12). Investigators and police managers were specifically targeted, due to their decision-making role in forensic analysis, which makes them the most likely to request DNA phenotyping (as opposed to patrol officers and office workers).

The surveyable population was estimated by the *Sûreté du Québec* to be 333 police officers and crime scene examiners. For our sample, the number of respondents needed was based on the saturation criteria, which consists in analysing responses until no new data is discovered, while there is an accumulation of already acknowledged data, increasing confidence that all major components have been identified (Glaser & Strauss, 1967; Saunders *et al.*, 2018; Urquhart, 2012). Further analysis of the data would then result in no new insights and, therefore, would be of limited value to grasp the overall portrait (Glaser & Strauss, 1967; Saunders *et al.*, 2018; Urquhart, 2012). The saturation in this project was accessed through the inductive analysis of respondents' answers in the final sample.

Participation to the study was voluntary, and all relevant information was provided to enable individuals to make an informed choice. Those who wished to participate were asked to sign a consent form beforehand. This project was approved by the Human Research Ethics Committee of the *Université du Québec à Trois-Rivières* on March 9, 2020 (n° CER-20-265-07.30).

Data collection

An internet link to the online questionnaire was sent to all police hierarchical levels of interest through an internal communiqué by the *Service de la coordination des enquêtes sur les crimes majeurs*⁵ of the *Sûreté du Québec*. Willing participants were asked to complete the questionnaire in a one-time response and in an appropriate location (quiet and free from distractions). Participants were also asked not to consult any literature or other people regarding the research subject beforehand. Their answers were collected between September 2020 and November 2021. Reminders to complete the questionnaire were given on three occasions between April and October 2021.

⁵ Major Crime Investigation Coordination Department (our translation)

Data analysis and statistics

Answers to qualitative questions were analyzed using an inductive approach (Blais & Martineau, 2006). First, they were organised and written following the same template. Then, the answers were read attentively and several times until a general overview of the data started emerging from the corpus. Once completed, the researcher (AGL) performed a vertical analysis by coding the information contained in each participant's questionnaire inductively, i.e. based on the data itself. Coding qualitative data is the process used to create and assign codes to the analyzed content in order to describe it. More specifically to this study, descriptive coding, i.e. summarizing the corpus extracts using a single word that captures the general idea of the data, was used. This step was accomplished using NVivo® (version release 1.2). Subsequently, horizontal analysis was used to group the codes assigned to each participant's responses into categories to obtain a broader view of the data and identify themes and trends between all the responses obtained, thus generating a comprehensive picture of the subject matter (Miles *et al.*, 2020). At the same time, verbatim passages from the responses were linked to the established categories to explain them with concrete terms (Blais & Martineau, 2006). Quantitative descriptive analysis were also performed from an exploratory perspective by counting the occurrences of each codes. Graphs of these counts were produced using Microsoft Excel® (version 15.0.5423.1000, 2013) and R software® (version 4.0.3, 2021).

Results

Socio-demographic characteristics of respondents

The saturation criteria was more than met by the number of respondents who answered the questionnaire since an accumulation of some answers was clearly noticeable while no new information was gathered by reading additional answers. Still, each questionnaire was analysed to count the number of occurrences of certain codes.

A total of 163 police officers from the *Sûreté du Québec* participated in the survey (134 sergeants-investigators, 11 lieutenants, 3 captains, 6 crime scene examiners and 9 others). Participants took between 3 minutes and 5 hours to complete the questionnaire, with an average of 40 minutes (SD=37) depending on their knowledge on the subject

(participants with knowledge of DNA phenotyping took longer to answer the questionnaire than those without). However, it is impossible to know whether participants completed the questionnaire continuously, or whether they were interrupted and left the questionnaire open, which could explain the longer response times of some participants (who did or did not have knowledge about DNA phenotyping).

All participants were aged between 29 and 62 (mean=43 years old, SD=7) and had between 6 and 31 years of policing experience (mean=19 years, SD=6). Noteworthy, at least 42 participants were mainly involved in major crimes investigation. All participants had a junior college diploma⁶, among which 83 also had a university degree (BSc or shorter undergraduate certificate, MSc) and one participant did a post-doctorate (Table 2.1; a more detailed table is also present in Supplemental Data S2.2).

⁶ In Quebec, people wishing to become police officers generally obtain a junior college diploma in police technology (3 years) before completing their training at the ENPQ (15 weeks). However, candidates to the profession can also become police officers with a university degree or a vocational college diploma in another field (e.g., criminology or computer science) if followed by a 30-week Attestation of College Studies (ACS) in police technology and training at the ENPQ.

École nationale de police du Québec. (s.d.). *Comment devenir policier ?* Retrieved 25/06/2023 from <https://www.enpq.qc.ca/les-incontournables/comment-devenir-policier>

Éducaloi. (s.d.). *Police Officer*. Retrieved 25/06/2023 from <https://educaloi.qc.ca/en/capsules/police-officer/>.

Table 2.1. Socio-demographic characteristics of the participants ($n = 163$)

Characteristic ^a	Count (%)
Declared gender	
Male	97 (59,5)
Female	64 (39,3)
NA	2 (1,2)
Age (years old)	
29-40	44 (27,0)
40-45	40 (24,5)
45-50	44 (27,0)
50+	22 (13,5)
NA	13 (8,0)
Highest level of education completed	
Junior college (CEGEP or certificate of collegial studies) ^b	63 (38,7)
Short undergraduate programmes (certificate or university microprogram)	78 (47,9)
Master, PhD or Post-doctorate	3 (1,8)
Other (CEGEP or graduate studies with additional training at the ENPQ or elsewhere)	19 (11,7)
Provincial police job title	
Captain	3 (1,8)
Lieutenant	11 (6,7)
Sergeant-investigator	134 (82,2)
Crime scene examiners ^c	6 (3,7)
Other (e.g. polygraphist, analysts, CQEDS ^d specialist)	9 (5,5)
Policing experience (years)	
6-15	38 (23,3)
15-20	38 (23,3)
20-25	56 (34,4)
25-31	31 (19,0)
Sûreté du Québec police district	
North district	11 (6,7)
East district	28 (17,2)
South district	52 (31,9)
West district	8 (4,9)
Montreal and Laval	23 (14,1)
NA	41 (25,2)

^aChoices with no respondents were not included in the table.

^bCEGEP is a public institution of general and vocational education in Quebec between high school and higher education (i.e. junior college).

^cCrime scene examiners in Quebec typically complete general police training before specializing in the discipline.

^dCQEDS stands for *Centre québécois d'enregistrement des délinquants sexuels*

Knowledge on DNA phenotyping in a forensic context

Most respondents had little to no knowledge of DNA phenotyping. Prior to participating in this project, 103/163 (63%) had never heard about DNA phenotyping, while 36/163 (22%) knew no more than it can predict some physical traits from DNA alone. Finally, 24/163 (15%) had a somewhat greater knowledge about DNA phenotyping (e.g., company offering phenotyping services, costs, etc.; Figure 2.1).

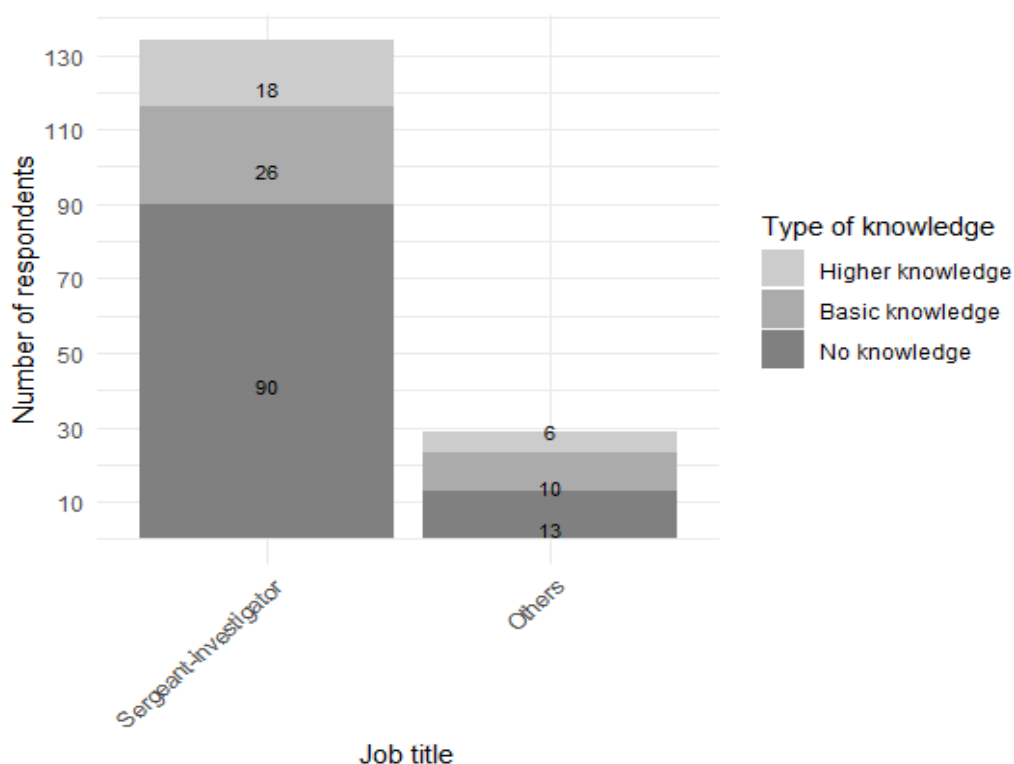


Figure 2.1. Level of respondents' knowledge about DNA phenotyping prior to this study, as a function of their job title (n=163). The different levels of knowledge were divided based on what police officers answered to the qualitative questions 1-3 from Section 2. When they only knew that DNA phenotyping consisted in predicting physical traits from DNA alone, they were classified as knowing the basis. If police officers knew that and more (e.g. company offering phenotyping services, cost, etc.), they were classified as having a more advanced knowledge. The category “Others” includes captains, lieutenants, crime scene technicians and others.

Respondents' knowledge about DNA phenotyping comes from several sources. Among them, 56 police officers had heard of DNA phenotyping prior to this study, mainly through mainstream medias (newspapers, television, radio; 24/56; 43%), training or courses (16/56; 29%), colleagues (13/56; 23%) or the Internet (12/56; 21%; Figure 2.2). A majority of them mentioned only one (42/56; 75%) or two (13/56; 23%) different sources in their answer. Across all questionnaires filled by police officers, a single company offering DNA phenotyping was mentioned, namely the USA-based Parabon NanoLabs. However, only one participant mentioned they followed a training given by this company. Note that Parabon NanoLabs was the one selected in the few

cases across Quebec for which a DNA phenotyping analysis was ever conducted (4 to our knowledge).

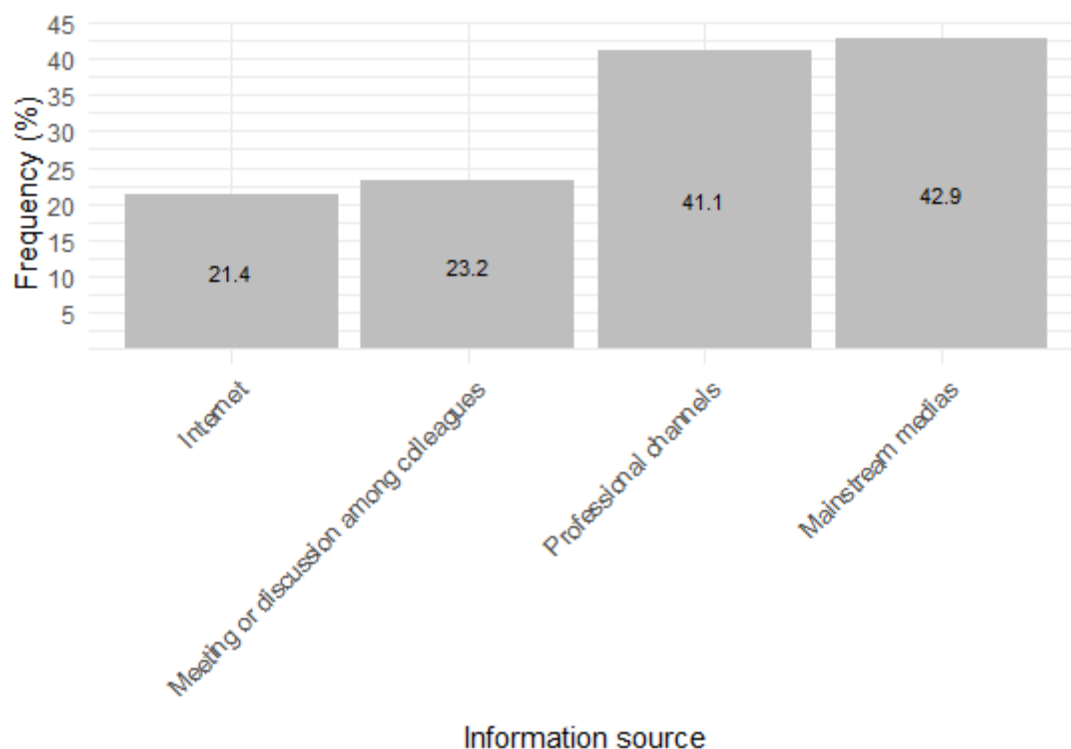


Figure 2.2. Information sources from which 56 police officers already knew something about DNA phenotyping, prior to this study (out of 163 respondents). Professional channels include training or course, congress or conference, scientific papers and forensic press review. The sum of the columns is greater than 100% because respondents could propose more than one source.

Opinion on DNA phenotyping in a forensic context

General reliability and reliability of DNA phenotyping

Scientific, legal, and practical aspects were identified as important by police officers when asked what a reliable tool or technology meant to them in general, and not specifically in relation to DNA phenotyping. Of the 132 participants who answered the questions related to this topic, many (62/132; 47%) mentioned the need for the tool or technology to be scientifically tested and validated. This aspect is well summarised in two of the responses received, one from an investigator and another from a crime scene examiner. The former wrote that a reliable tool or technology is one that “has

been tested and approved by laboratory experiments several times. Subsequently, the obtained observations are analyzed and the technology is judged reliable or not.” (Participant 4059559; our translation). The second wrote that, for them, a tool or technology is considered reliable after it had been submitted to “a well-established and respected quality control process. Several tests and studies have been done to verify the percentage of reliability and error. An exhaustive objective and neutral study on this technology.” (Participant 4036132; our translation). Some participants (36/132; 27%) specifically mentioned the need for a “low error rate” (Participant 3940372; our translation) to consider a tool or technology reliable. Also, participants emphasized the importance for the tool or technology to be recognized in the courtroom (40/132; 30%). For example, Participant 3955491 wrote that “the court is ultimately the real test” (our translation). Finally, few participants (17/132; 13%) mentioned that a reliable tool or technology is one “that leads to concrete results” (Participant 4237533; our translation).

When police officers were asked whether they thought DNA phenotyping was reliable, 76% of those who answered this question (110/145) would not comment, due to their assessment of their limited knowledge of the tool. Indeed, 97% (140/144) felt that they were not sufficiently trained on new tools and technologies and tools that use DNA, such as DNA phenotyping. Nevertheless, 23% (34/145) thought phenotyping was reliable because it is based on DNA. For example, Participant 3940543 wrote: “it uses DNA, which is reliable” (our translation), while Participant 4059696 stated that “the percentage of matches is very high [with current DNA analysis]. It must be the same logic [for DNA phenotyping] as for the DNA that we know” (our translation).

Practical utility of DNA phenotyping

Respondents see DNA phenotyping as potentially useful for various, if not all types of crimes, especially crimes against people (e.g. homicide, sexual assault, home invasion). When answers were divided by crime type, 79/137 (58%) respondents said that DNA phenotyping would be relevant in crimes against people, 24/137 (18%) answered crimes against property (e.g. breaking and entering, burglary, arson) and 7/137 (5%) answered economic crimes (e.g. fraud) because “[...] even fraudsters who have manipulated documents or computers [have left their DNA], DNA is everywhere.” (Participant 4066872, our translation). Also, 39/137 (28%) said textually they would

like to use it for major and/or violent crimes. Finally, a substantial proportion of all respondents (47/137; 34%) thought that DNA phenotyping should be used for all crimes where DNA could not be matched to someone in the traditional way (i.e. with standard STR genetic profiles used in forensic science) because they said every lead can be potentially useful (“[...] any additional information can make a difference.” (Participant 4020770, our translation)) and every crime is important (“I consider that all crimes are important so [DNA phenotyping could be] useful in any kind of investigation, especially when there are no suspects [...].” (Participant 4051035, our translation)). Interestingly, only 13 people answered they would use it for serial crimes.

Surveyed police officers mentioned several aspects of their investigations where DNA phenotyping could be useful. First, it could restrict or orientate the investigation and/or the searches for people of interest in the case (e.g. “provide evidence that will move the investigation forward [...]” (Participant 3963855; our translation), “eliminate suspects and focus on the right group of individuals” (Participant 3954560; our translation) or “allow for the refinement of the search elements corresponding to suspects [author’s note: understand it here as the author of the crime]” (Participant 3939439; our translation)) (133/138; 96%). For them, it could also help complement or confirm information in the case (e.g. “to corroborate the witnesses’ versions” (Participant 3956311; our translation) or “could even make it possible to complete and clarify the facial composite drawn up by the victim” (Participant 3959632; our translation)) (26/138; 19%). Participants also mentioned that DNA phenotyping results could help in the “development of a facial composite” (Participant 4255226; our translation) (14/138; 10%). To a lesser extent, respondents also thought DNA phenotyping could allow the “reopening of unresolved cases” (Participant 4232393; our translation) (10/138; 7%). Overall, they anticipate several benefits at the investigative level.

Physical characteristics of interest

When asked what physical characteristics police officers would find useful to obtain by DNA phenotyping (respondents could indicate more than one without any limitations), eye colour was the most common answer (78/142; 55%), followed by age (72/142; 51%) and hair colour (69/142; 49%), because some of them are “not as easy

to modify” (Participant 3974444; our translation) or they “cannot be modified” (Participants 3940543, 3968155 and 4046627, our translation), but also because they are “observable physical characteristics” [author’s note: against not directly observable characteristics such as some illnesses] (Participant 4065527; our translation) (Table 2.2). A substantial portion of respondents (52/142; 37%) answered they would like to know all physical traits through DNA phenotyping (based on answers received, we might propose for example: pigmentation traits, ethnicity, age and/or gender), mainly “to obtain a portrait of the suspect” (Participant 4066872; our translation) and because “Any information that is possible and available is welcome. [It] can enhance a composite profile. Any additional information can make a difference” (Participant 4020770, our translation). Some police officers (25/142; 18%) even said they would like to obtain medical information (e.g. “malformation or disability” (Participant 3957223; our translation), “diabetes” (Participant 3955452; our translation)) and lifestyle information (e.g., “alimentation” (Participant 3968155; our translation), “smoker, drug and alcohol consumer” (Participant 4246136; our translation)) (3/142; 2%) because it can be “easily observable or easily known from their surrounding (illnesses)” (Participant 3940600; our translation) and it can “target even more the suspect [author’s note: understand it here as the author of the crime] we are looking for” (Participant 4066002; our translation) because it is a “more specific physical characteristic” (Participant 3963708; our translation).

When police officers were asked to narrow down their preferences to the three physical characteristics they considered most important, without giving an order of importance for these three characteristics, a majority chose eye colour (60/111; 54%), followed by age (49/111; 44%) and ethnicity (40/111; 36%) (Table 2.3). These were closely followed by height (39/111; 35%) (Table 2.3).

Table 2.2. Most interesting physical characteristics to predict by DNA phenotyping from the police officers' perspective (n=142/163)

#	Physical characteristic	Number of respondents	Percentage (%) ^a
1	Eye colour	78	54.9
2	Age	72	50.7
3	Hair colour	69	48.6
4	Everything possible	52	36.7
5	Ethnicity	47	33.1
	Height	47	33.1
6	Face	36	25.4
7	Sex	34	23.9
8	Skin colour	28	19.7
9	Weight	25	17.6
	Medical information	25	17.6

^aThe sum of this column is greater than 100% because respondents could propose more than one characteristic.

Table 2.3. Physical characteristics mentioned by police officers when asked which three they considered the most interesting ones to obtain from DNA phenotyping (n=111/163)

#	Physical characteristic	Number of respondents	Frequency (%) ^a
1	<i>Eye colour</i>	60	54.1
2	<i>Age</i>	49	44.1
3	<i>Ethnicity</i>	40	36.0
4	Height	39	35.1
5	Hair colour	29	26.1
6	Sex	25	22.5
7	Weight	19	17.1
8	Medical information	19	17.1
9	Face	17	15.3
10	Skin colour	17	15.3

^aThe sum of this column is greater than 100% because respondents could propose different characteristics.

Issues related to DNA phenotyping

The results show that police officers are to some extent aware of problems that are associated with DNA phenotyping, although their knowledge about the latter is limited. Of the 118 who answered the question about phenotyping-related issues, 91 (77%) mentioned practical issues (reliability, limited usefulness in certain situations, risk of error leading to misdirection or bias during the investigation, not a proof beyond reasonable doubt⁷), 44 (37%) acknowledged legal issues (eligibility in court, can be an argument for the defense lawyers if not reliable), 30 (25%) saw social issues (ethical,

⁷ The examples in parentheses in this paragraph are categories constructed by the researcher (AGL) based on the responses of the interviewees.

human rights, racial profiling, acceptability by the population), 25 (21%) saw technical issues (accessibility, processing time, implementation problems), and 18 (15%) saw monetary issues (cost of the technique). Also, some 19 police officers stated that DNA phenotyping results should be confirmed by conventional DNA profile analysis.

Finally, the overall opinion of police officers concerning the use of DNA phenotyping in criminal investigations was mostly divided in three predominant scores, i.e. 5, 8 and 10, 10 being very favorable to its use (Figure 2.3), with a mean score of 7.8 ± 2.2 .

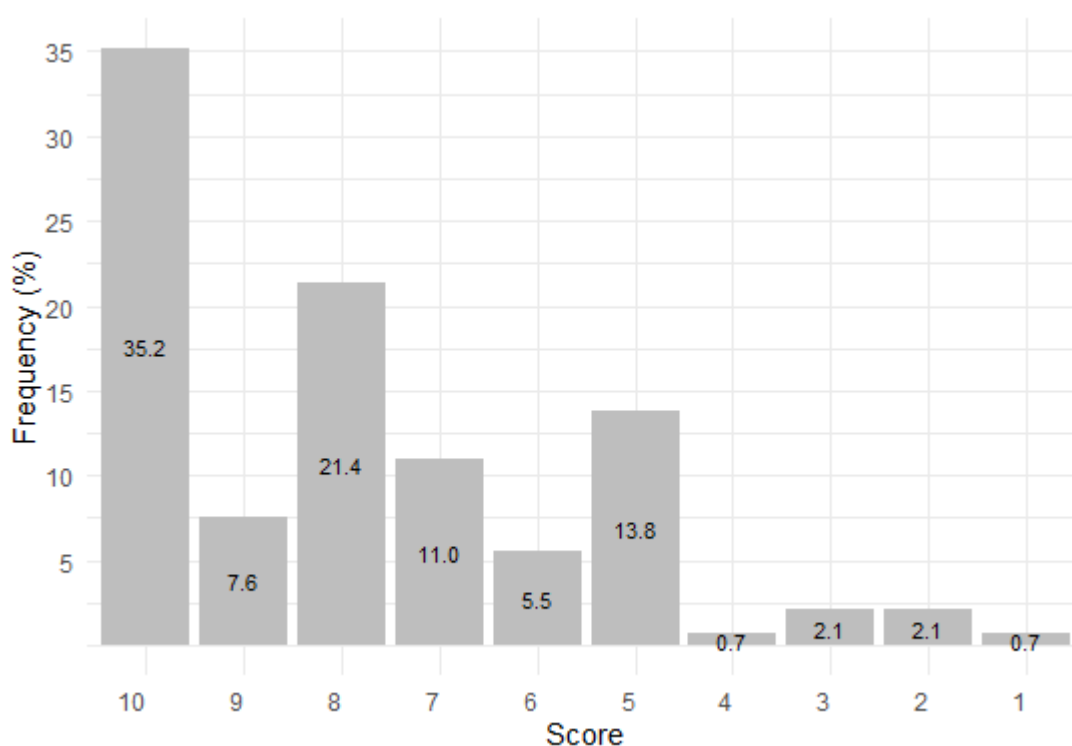


Figure 2.3. Number of responses to the question “Do you have a more unfavorable or favorable opinion regarding the use of DNA phenotyping in criminal investigations (1 being very unfavorable and 10 being very favorable)?” (n=145/163).

Discussion

Quebec police officers were questioned to assess their knowledge and opinion on DNA phenotyping, and consequently, to appraise the usefulness of this tool in a judicial context from their perspective, using an online questionnaire. This method provided a

broad picture of the subject of interest, capturing a wide diversity of perspectives and experiences (Braun *et al.*, 2017). The online survey also facilitated questioning of the study's large, diverse and dispersed population, i.e. police officers, and reduced the risk of a participant with an opposing viewpoint being perceived as a representative of their group (Braun *et al.*, 2021).

This research is the largest study to date on this issue, to our knowledge. Our results show that they see the benefits of using DNA phenotyping in their investigations, would like to use it, and have a rather favorable opinion concerning it, particularly for crimes against people. However, they believe that they lack essential training and knowledge on the subject.

Knowledge on DNA phenotyping in a forensic context

Knowledge about DNA phenotyping was assessed to understand what basis police officers had for judging the usefulness of this tool in forensic science. A majority did not know about this method, which was expected given that DNA phenotyping is relatively new. Nevertheless, more than a third of them (37%) had some knowledge about it, which is a fair proportion given that DNA phenotyping had only been used four times in Quebec at the time of the survey, to our knowledge. This may be partly explained by the fact that the majority of officers learned about phenotyping's existence through mainstream media (e.g., newspapers, television, documentary) and/or by professional channels (e.g., training, presentation by a professional at a congress or conference), rather than by using it in the context of a case. Parabon NanoLabs may have been mentioned most often by participants because this company has actively promoted its products through exhibitor stands at numerous conferences (e.g. International Symposium on Human Identification (ISHI), American Academy of Forensic Sciences (AAFS)) (International Symposium on Human Identification, 2022; Laura Burgess Marketing, 2019a), through webinars (e.g. Sexual Assault Kit Initiative (SAKI) Webinar) (SAKI Sexual Assault Kit Initiative, 2018), presentations (e.g. at the National Symposium on Sex Offender Management and Accountability) (Laura Burgess Marketing, 2019b), and by providing training. Another reason may be that some respondents used the company in one or more of their cases and/or heard about it from colleagues who have.

Opinion on DNA phenotyping in a forensic context

General reliability and reliability of DNA phenotyping

DNA phenotyping research has primarily focused on increasing the scientific reliability of predictions for physical traits (e.g.: Kidd *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Sochtig *et al.*, 2015). This aspect, as supported by respondents' answers, is important for them before considering adding the phenotyping to their investigative toolbox. On the other hand, a number of studies show that the reliability of this tool is very variable across human populations in which it has been tested (e.g.: Carratto *et al.*, 2021; Dario *et al.*, 2015; Dembinski & Picard, 2014; Kastelic *et al.*, 2013; Martinez-Cadenas *et al.*, 2013; Pietroni *et al.*, 2014). It is also clear from participants' responses that the tools used in forensic science need to be challenged in the courtroom. The question then arises as to whether DNA phenotyping also needs to be challenged in court before being applied more generally. To our knowledge, this has not been done in any trial to date in Quebec, including for the four cases in which it was used. As for the practical aspect, it is difficult to assess since DNA phenotyping has hardly been used in Quebec, and even if the tool has been used in other countries, the usefulness of the results provided by DNA phenotyping in their investigations is unclear. The three aspects to consider a tool reliable from a police perspective (scientific, legal, and practical) are therefore incomplete or missing. However, even if the acceptability in court is important to police officers, it would be worth asking how necessary it is. Indeed, DNA phenotyping might not have to be accepted in court, since it would be used primarily as an investigative tool and not as evidence (Caliebe *et al.*, 2017), the evidence being the DNA match that would be obtained via traditional STR analysis, mainly because STR profile analysis is far more discriminating and accurate than the results that could ever be obtained by DNA phenotyping (because the contribution of the environment to phenotypic variance will never be able to be estimated, among other reasons). Therefore, this acceptability would probably not be a major issue, and it would be a mistake to deprive the justice system of this tool if police attached too much importance to this aspect. For example, a homicide case in Ontario, Canada, which used, among other things, DNA phenotyping as an investigative tool, resulted in the conviction of the man suspected of being the murderer. However, even though new tools such as DNA phenotyping and genealogy played an important role in this case, the judge advised the jury not to

consider this information in determining guilt or innocence, thus confirming the use of DNA phenotyping as an investigative tool and not as evidence in court (MacDonald, 2023). This need for acceptability by the court on the part of police officers is not known, but it can be suggested that it may be because they did not consider the role of investigative tools when answering the question that sought to understand what reliability of a tool or technology in general meant to them. This may also be due to the fact that they are unfamiliar with the aims and limitations of the scientific tools and technologies used in an investigation, leaving it to the court, the final decider of an individual's guilt or innocence, to pronounce on their eligibility. This last suggestion is partly supported by the fact that participants in this study did not feel sufficiently trained in DNA tools and technologies (see next paragraph).

Regarding training in new DNA tools and technologies, our results showed that a majority of police officers thought there was a lack, even though, according to another study, they recognize the importance of knowing about DNA evidence to solve crimes (Aydogdu, 2009). This conclusion is in line with the ones drawn from other authors about different technologies such as current DNA technologies (STR) (Aydogdu, 2009; Hauhart & Menius, 2014; Lambert *et al.*, 2003; Strom *et al.*, 2009). These responses are also consistent with the fact that some participants thought phenotyping was reliable because it used DNA, revealing some misconceptions about DNA technologies. This in turn raises the concern that new tools and technologies, such as DNA phenotyping, will also not be sufficiently or adequately covered in training. With DNA phenotyping still in its infancy, it would be important to consider how this new tool should be presented and explained to police officers, and how results should be communicated to avoid misunderstandings, especially since DNA phenotyping would be used primarily as an investigative tool, as shown by the responses of the participants and the scientific literature (Caliebe *et al.*, 2017). Discussions regarding the presentation of results obtained from DNA phenotyping have already been initiated in a few scientific articles (Buchanan *et al.*, 2018; Caliebe *et al.*, 2018; Caliebe *et al.*, 2017; Staubach, 2017).

Practical utility of DNA phenotyping

Although police officers lack knowledge about DNA phenotyping and even stated that they are not sufficiently trained in new DNA tools and technologies, they are nonetheless interested in using it for a variety of purposes. They frequently mentioned crimes against people and major, serious or significant crimes, and much less crimes committed in large quantities such as breaking and entering. It then seems that police officers prioritize the importance of the crimes instead of crimes that are committed in high quantity for the type of crimes where DNA phenotyping should be used. Hopman (2020) also found that phenotyping was mostly used in severe cases, as there is an urgency to solve them as quickly as possible. However, a significant proportion of respondents (at least 42/163; 26%) were mainly involved in major crimes investigation, which may also explain this preference, meaning that a bias is presumed.

Although DNA phenotyping seems primarily intended for use in serious cases, in our opinion, it could also be used in serial crimes of any type where the perpetrator is highly prolific. This is not reflected in the responses of those questioned, since only 13 of them replied that they would use it in cases of serial crimes. This may be explained by the high proportion of respondents mainly involved in major crimes investigation, by the fact that they implicitly classify serial crimes as major crimes, or by the fact that they have not thought about this possibility.

Police officers have acknowledged many potential benefits from DNA phenotyping, but mostly to help in their investigations, more precisely in restricting and/or orienting the investigation or their searches. They would secondly use it to confirm or complement information in the case (e.g. confirm physical characteristics given by a witness or complement its description through DNA phenotyping). Those results are consistent with the goals of DNA phenotyping as seen by scientists (Kayser, 2015). However, the tool has reliability issues that could potentially provide false leads (e.g. if DNA phenotyping predicts that the person of interest has blue eyes and brown hair, it could potentially be misleading if the person has in reality brown eyes and black hair) (Scudder *et al.*, 2019). This is in part due to the genetic models used to predict phenotypes, which are very simplistic and do not incorporate all the variables affecting the observed phenotype, for example, the effect of environment. DNA phenotyping also

has many limitations, such as not being able to predict many physical traits to date or not being able to identify a person (which limits its usefulness). As mentioned by MacLean and Lamparello (2014), at best, phenotyping results can only raise reasonable doubt about a person's guilt because they only provide information on class characteristics and cannot be used for individualization. DNA phenotyping should then always be restricted to the investigative stages and supported by complementary information (Granja *et al.*, 2020; Hopman, 2020; Scudder *et al.*, 2019). Answers given by police officers seem to agree with that statement since they would use it primarily as an aid to their investigations. Few of the respondents (19) also mentioned that DNA phenotyping results should be confirmed through conventional DNA profile analysis, which supports the need for complementary information.

Physical characteristics of interest

When asked which physical traits police officers would like to obtain through DNA phenotyping, they answered characteristics that cannot be modified (or are harder to modify) (e.g., height, biogeographical origin [author's note: even though the latter is not a phenotype]), that are easily observable or can be rapidly approximated (e.g., hair and skin colour), and that can be found on facial composites obtained from witness testimonies (e.g., eye colour, height). However, there are major differences between facial composites from eyewitness accounts and those from phenotypic DNA analysis. One of them is that the latter are based on biological analysis and not on the recollection of a person who witnessed the crime, which can be a real advantage if the tool is reliable, especially considering that eyewitness testimonies are not always accurate (Wells *et al.*, 2006). DNA phenotyping also has the advantage of predicting physical characteristics unseen by the witness (e.g. hair colour if the perpetrator wore a balaclava). However, eyewitnesses have the advantage to see the person of interest and its actual appearance, including some characteristics that cannot be predicted by DNA phenotyping, such as hair length or if the perpetrator has voluntarily changed temporarily its appearance since birth (e.g. hair dye) or permanently (e.g. plastic surgery). Nevertheless, even if both have their advantages and disadvantages, some physical characteristics can always be changed by the individual after the commission of the crime (e.g., eye colour, hair colour), which can have an impact on research efforts based on witness testimonies and DNA phenotyping results. On the other hand, some

characteristics mentioned by the respondents were impossible to change by the person itself (e.g. age and height), which can be useful when searching for a person of interest since it is impossible to conceal them. Few police officers wanted to know all physical traits possible (including illnesses) through DNA phenotyping, and even some lifestyle information (e.g. smoking). It would make sense that, the more physical traits are predicted, the more complete the portrait of the person of interest will be and thus, the easier it will be to find the individual, or at least narrow down the list of persons of interest (Cole & Lynch, 2006; Samuel & Prainsack, 2019). However, this also raises ethical questions about how much of a person's physical and personal characteristics should be predicted to potentially help in a case.

Police officers wanted to obtain information on many phenotypes and characteristics (if not everything) through DNA phenotyping, namely pigmentary traits (eye, hair and skin colour), age, ethnicity, height, face, sex, weight and even medical information, but they prioritized information regarding eye colour, age, ethnicity and height. It is interesting to note that police officers responded physical characteristics that cannot be altered by the perpetrator (height, age and ethnicity), but also mentioned eye colour, which can be altered by wearing colored contact lenses. The reasons for this choice are unclear, but from the responses of some participants, it could be because they thought it was a more difficult characteristic to modify than others (e.g. hair colour). It could also be because eye colour is a physical characteristic that can be collected in some police-accessible databases, such as driver's license databases, which compile this information.

When looking at which phenotypes and characteristics have mostly been researched to date, pigmentation traits (eye, hair and skin colour), biogeographical origin, age, height and face are the most predominant in the literature. Pigmentary traits, especially eye colour, are the easiest to predict due to their greater “genetic simplicity” (one or a few genes with a major effect on the phenotype) (White & Rabago-Smith, 2011), but on the other hand, phenotypes like height and face have proven to be more difficult to predict (Liu *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2019). So even though height and face are interesting for police officers, scientists have yet to identify polymorphisms that better predict these phenotypes.

Issues related to DNA phenotyping

Samuel & Prainsack (2019) highlighted that police officers were interested in using a tool or technology, even in the absence of full validation, to potentially solve crimes. However, since practical and legal issues were mentioned by our participants as problems surrounding DNA phenotyping, our results seem to suggest that the police officers questioned would only mostly use DNA phenotyping if it can help them in their investigation and if it accepted by the court, which contradicts the study from Samuel & Prainsack (2019). The practical and legal issues mentioned by participants may also be due to the fact that they do not want to lose time because of a false lead or have their work scrutinized and criticized by the court. However, it would be interesting to know how, or even if, police officers would use DNA phenotyping if they were more aware of the tool's current limitations. The answer to this question is unknown, since DNA phenotyping is still new to them and only a few cases exist where it has been used, but it would be interesting to follow this up at a later date.

Overall, the three scores given by police officers regarding the use of DNA phenotyping in criminal investigations (5, 8 and 10, 10 being very favorable use) are consistent with three different types of respondents. Those who scored a 5 did not want to offer an opinion because they did not know enough about DNA phenotyping; those who scored a 8 were cautious in their approach, meaning they see the value of DNA phenotyping, but are also aware of problems inherent to it; and finally, those who scored a 10 were much more optimistic in their perceived utility of DNA phenotyping. The excessive optimism of some police officers could be explained by the fact that the line between what is reasonably achievable with a new tool or technology and its claimed capability is often blurred, as companies deliberately try to sell their products by suggesting great results. However, the practical scope of these tools and technologies is often far from that implied. Police forces may then acquire them in order to meet public expectations and protect their image of modernity, rather than out of a concern for efficiency (Ribaux, 2023).

Limitations of the study

As the analyses carried out in this study are exploratory, they are descriptive only. Furthermore, the qualitative method used to conduct this research has its limitations. The questionnaire was chosen because it provided a broader picture of DNA phenotyping among a wide range of police officers. However, this approach also has the disadvantage of not being able to ask for more detail on a particular topic or written sentence compared to semi-structured interviews, for example (Braun *et al.*, 2021). Furthermore, the participants in this study did not represent all police forces in the province of Quebec. Consequently, the knowledge and opinions expressed may not represent the views of other police forces in this province, the country or internationally. There is also always a risk that respondents answered what they thought the researchers wanted to hear, or responded what they think they should say based on their job title within the police (Dillman *et al.*, 2014). In addition, the coding of qualitative information is a subjective process, so it may vary between analysts and lead to slightly different conclusions (Skjott Linneberg & Korsgaard, 2019). To overcome these limitations, semi-structured interviews with police officers could be conducted in a second phase (Dillman *et al.*, 2014) in order to understand in more detail their statements or opinions, especially for participants who have not elaborated much on their answers. The same questionnaire could also be re-used to the same police forces and others when DNA phenotyping will possibly be better known and used. Also, coding could be done by multiple analysts to gain greater confidence in the conclusions drawn (Skjott Linneberg & Korsgaard, 2019).

Conclusion

DNA phenotyping is a tool developed recently that has gained interest in the forensic field to help solve cases where DNA found at a crime scene could not be linked to its source (i.e., the individual who left it). However, its usefulness has not been evaluated in depth by questioning the first users of it: police officers. The main objective of this study was therefore to evaluate the usefulness of this tool at the operational level by questioning Quebec police officers on their knowledge of DNA phenotyping and their opinion on its use. The results obtained showed that the majority of police officers did not know, or only know some basics, about DNA phenotyping.

Results also support that police officers would like to use this tool, especially to solve crimes against people. However, even if the tool is seen as useful by police officers, reliability is important to them. Furthermore, the misconceptions about the scientific tools and technologies used in an investigation, uncovered by this research, raise the question of whether specific training by professionals regarding scientific evidence would be necessary. Going further, this research reinforces the importance of understanding the needs of police officers from the experimental phase of a new tool, not only to guide researches, but also to ensure that the tool developed corresponds to an operational need. For example, in the case of DNA phenotyping, this would have made it possible to know from the outset which physical characteristics were considered more useful for police officers, allowing subsequent focus on developing them.

Acknowledgments

Our thanks go to our partners for their valuable collaboration, namely, Mr. André Deslauriers and Ms. Joanie Prince from the *École nationale de police du Québec*, and Ms. Dominique Lafrenière, Mr. Hugo Petit and Mr. Marc Lépine from the *Sûreté du Québec*. The authors would also like to thank all the police officers who took the time to complete the questionnaire. Finally, we would like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the *Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies* (FRQNT) for the funding used in this research.

References

- Aydogdu, E. (2009). *Forensic science information needs of patrol officers: The perceptions of the patrol officers, their supervisors and administrators, detectives, and crime scene technicians* <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2009PhDT.....34A>
- Blais, M., & Martineau, S. (2006). L'analyse inductive générale : description d'une démarche visant à donner un sens à des données brutes. *Recherches qualitatives*, 26(2), 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.7202/1085369ar>
- Branicki, W., Brudnik, U., & Wojas-Pelc, A. (2005). Genetic prediction of pigmentary traits in forensic studies. *Z Zagadnien Nauk Sadowych*, 64, 343-357.
- Braun, V., Clarke, V., Boulton, E., Davey, L., & McEvoy, C. (2021). The online survey as a qualitative research tool. *International Journal of Social Research Methodology*, 24(6), 641-654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/13645579.2020.1805550>
- Braun, V., Clarke, V., & Gray, D. (2017). Innovations in Qualitative Methods. In B. Gough (Ed.), *The Palgrave Handbook of Critical Social Psychology* (pp. 243-266). Palgrave Macmillan UK. https://doi.org/10.1057/978-1-137-51018-1_13
- Buchanan, N., Staubach, F., Wienroth, M., Pfaffelhuber, P., Surdu, M., Lipphardt, A., . . . Lipphardt, V. (2018). Forensic DNA phenotyping legislation cannot be based on "Ideal FDP"-A response to Caliebe, Krawczak and Kayser (2017). *Forensic Science International: Genetics*, 34, e13-e14. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.009>
- Caliebe, A., Krawczak, M., & Kayser, M. (2018). Predictive values in Forensic DNA Phenotyping are not necessarily prevalence-dependent. *Forensic Science International: Genetics*, 33, e7-e8. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.11.006>
- Caliebe, A., Walsh, S., Liu, F., Kayser, M., & Krawczak, M. (2017). Likelihood ratio and posterior odds in forensic genetics: Two sides of the same coin. *Forensic Science International: Genetics*, 28, 203-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.03.004>
- Canales Serrano, A. (2020). Forensic DNA phenotyping: A promising tool to aid forensic investigation. Current situation. *Spanish Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.remle.2020.01.002>
- Carratto, T. M. T., Marcorin, L., do Valle-Silva, G., de Oliveira, M. L. G., Donadi, E. A., Simões, A. L., . . . Mendes-Junior, C. T. (2021). Prediction of eye and hair pigmentation phenotypes using the HIrisPlex system in a Brazilian admixed population sample. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1329-1339. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02554-7>
- Cole, S., & Lynch, M. (2006). The Social and Legal Construction of Suspects. *Annual Review of Law and Social Science*, 2(1), 39-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.lawsocsci.2.081805.110001>
- Dario, P., Mourino, H., Oliveira, A. R., Lucas, I., Ribeiro, T., Porto, M. J., . . . Corte Real, F. (2015). Assessment of IrisPlex-based multiplex for eye and skin color prediction with application to a Portuguese population. *International Journal of Legal Medicine*, 129(6), 1191-1200. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1248-5>
- Dembinski, G. M., & Picard, C. J. (2014). Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 111-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.003>

- Dillman, D. A., Smyth, J. D., & Christian, L. M. (2014). *Internet, phone, mail, and mixed mode surveys: The tailored design method* (4th ed.). John Wiley & Sons Inc.
- École nationale de police du Québec. (s.d.). *Comment devenir policier ?* Retrieved 25/06/2023 from <https://www.enpq.qc.ca/les-incontournables/comment-devenir-policier>
- Éducaloi. (s.d.). *Police Officer*. Retrieved 25/06/2023 from <https://educaloi.qc.ca/en/capsules/police-officer/>
- Glaser, B. G., & Strauss, A. L. (1967). *The Discovery of Grounded Theory: Strategies for Qualitative Research*. Aldine de Gruyter. <https://books.google.ca/books?id=oLTpwQEACAAJ>
- Granja, R., Machado, H., & Queirós, F. (2020). The (De)materialization of Criminal Bodies in Forensic DNA Phenotyping. *Body & Society*, 27(1), 60-84. <https://doi.org/10.1177/1357034X20919168>
- Hauhart, R., & Menius, K. (2014). DNA Evidence: Examining Police Officers' Knowledge of Handling Procedures in a Mid-Size Department. *International Journal of Criminology and Sociology*, 3, 360-376. <https://doi.org/10.6000/1929-4409.2014.03.31>
- Hopman, R. (2020). Opening up forensic DNA phenotyping: the logics of accuracy, commonality and valuing. *New Genetics and Society*, 39(4), 424-440. <https://doi.org/10.1080/14636778.2020.1755638>
- International Symposium on Human Identification. (2022). *Meet ISHI Exhibitors: Parabon NanoLabs*. Retrieved 25/06/2023 from <https://www.ishinews.com/meet-ishi-exhibitors-parabon-nanolabs/>
- Kastelic, V., Pospiech, E., Draus-Barini, J., Branicki, W., & Drobnic, K. (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croatian Medical Journal*, 54(4), 381-386. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760663/pdf/CroatMedJ_54_0381.pdf
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
- Kayser, M., & Schneider, P. M. (2009). DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Science International: Genetics*, 3(3), 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.012>
- Kidd, K. K., Speed, W. C., Pakstis, A. J., Furtado, M. R., Fang, R., Madbouly, A., . . . Kidd, J. R. (2014). Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic Science International: Genetics*, 10, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.002>
- Lambert, E., Nerbonne, T., Watson, P. L., Buss, J., Clarke, A., Hogan, N., . . . Lambert, J. (2003). The forensic science needs of law enforcement applicants and recruits: A survey of Michigan law enforcement agencies. *Journal of Criminal Justice Education*, 14(1), 67 - 81.
- Laura Burgess Marketing. (2019a). *Parabon® NanoLabs to exhibit at the American Academy of Forensic Sciences (AAFS) 71st annual scientific meeting*. <https://lauraburgess.com/parabon-nanolabs-to-exhibit-at-the-american-academy-of-forensic-sciences-aafs-71st-annual-scientific-meeting/>
- Laura Burgess Marketing. (2019b). *Parabon® NanoLabs to present during 2019 National Symposium on Sex Offender Management and Accountability*.

- Retrieved 25/06/2023 from <https://lauraburgess.com/parabon-nanolabs-to-present-during-2019-national-symposium-on-sex-offender-management-and-accountability/>
- Liu, F., Hendriks, A. E. J., Ralf, A., Boot, A. M., Benyi, E., Sävendahl, L., . . . Kayser, M. (2014). Common DNA variants predict tall stature in Europeans. *Human Genetics*, 133(5), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1394-0>
- Liu, F., Zhong, K., Jing, X., Uitterlinden, A. G., Hendriks, A., Drop, S., & Kayser, M. (2019). Update on the predictability of tall stature from DNA markers in Europeans. *Forensic Science International: Genetics*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.05.006>
- MacDonald, D. (2023). *Trial hears details of how DNA led to arrest in Sweeney murder case*. CTV News. <https://northernontario.ctvnews.ca/trial-hears-details-of-how-dna-led-to-arrest-in-sweeney-murder-case-1.6305011>
- MacLean, C. E., & Lamparello, A. (2014). Forensic DNA phenotyping in criminal investigations and criminal courts: assessing and mitigating the dilemmas inherent in the science. *Recent Advances in DNA and Gene Sequences*, 8(2), 104-112. <http://www.eurekaselect.com/128392/article>
- Marano, L., & Fridman, C. (2018). DNA phenotyping: current application in forensic science. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 9. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/RRFMS.S164090>
- Martinez-Cadenas, C., Peña-Chilet, M., Ibarrola-Villava, M., & Ribas, G. (2013). Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model. *Forensic Science International: Genetics*, 7(4), 453-460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.03.007>
- Miles, M. B., Huberman, A. M., & Saldaña, J. (2020). *Qualitative data analysis : a methods sourcebook* (Fourth ed.). SAGE.
- Ministère de la Sécurité Publique du Québec. (s.d., 2014). *The Six Levels of Police Service According to Population Size*. Retrieved 01/02/2021 from <https://www.securitepublique.gouv.qc.ca/en/police-prevention/police-service-levels.html>
- Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R., . . . Morling, N. (2014). The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.002>
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. In (Version 4.0.3) R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ribaux, O. (2023). *De la police scientifique à la traçologie: Le renseignement par la trace*. EPFL Press.
- SAKI Sexual Assault Kit Initiative. (2018). *SAKI TTA Webinar: Emerging DNA Techniques*. Retrieved 25/06/2023 from <https://sakitta.rti.org/webinars/webinar-view.cfm?id=43>
- Samuel, G., & Prainsack, B. (2019). Forensic DNA phenotyping in Europe: views “on the ground” from those who have a professional stake in the technology. *New Genetics and Society*, 38(2), 119-141. <https://doi.org/10.1080/14636778.2018.1549984>
- Saunders, B., Sim, J., Kingstone, T., Baker, S., Waterfield, J., Bartlam, B., . . . Jinks, C. (2018). Saturation in qualitative research: exploring its conceptualization and

- operationalization. *Quality and Quantity*, 52(4), 1893-1907. <https://doi.org/10.1007/s11135-017-0574-8>
- Scudder, N., Robertson, J., Kelty, S. F., Walsh, S. J., & McNevin, D. (2019). A law enforcement intelligence framework for use in predictive DNA phenotyping. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 51(sup1), 255-258. <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1569132>
- Skjott Linneberg, M., & Korsgaard, S. (2019). Coding qualitative data: a synthesis guiding the novice. *Qualitative Research Journal*, 19(3), 259-270. <https://doi.org/10.1108/QRJ-12-2018-0012>
- Sochtig, J., Phillips, C., Maronas, O., Gomez-Tato, A., Cruz, R., Alvarez-Dios, J., . . . Lareu, M. V. (2015). Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction in Europeans. *International Journal of Legal Medicine*, 129(5), 963-975. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1226-y>
- Staubach, F. (2017). Note limitations of DNA legislation. *Nature*, 545(7652), 30-30. <https://doi.org/10.1038/545030c>
- Strom, K. J., Roper-Miller, J., Jones, S., Sikes, N., Pope, M., & Horstmann, N. (2009). The 2007 survey of law enforcement forensic evidence processing. *National Institute of Justice*. <https://nij.ojp.gov/library/publications/survey-law-enforcement-forensic-evidence-processing-2007>
- Urquhart, C. (2012). *Grounded theory for qualitative research: A practical guide*. Sage.
- Wells, G. L., Memon, A., & Penrod, S. D. (2006). Eyewitness Evidence: Improving Its Probative Value. *Psychological Science in the Public Interest*, 7(2), 45-75. <https://doi.org/10.1111/j.1529-1006.2006.00027.x>
- White, D., & Rabago-Smith, M. (2011). Genotype–phenotype associations and human eye color. *Journal of Human Genetics*, 56(1), 5-7. <https://doi.org/10.1038/jhg.2010.126>
- Xiong, Z., Dankova, G., Howe, L. J., Lee, M. K., Hysi, P. G., de Jong, M. A., . . . Kayser, M. (2019). Novel genetic loci affecting facial shape variation in humans. *eLife*, 8, e49898. <https://doi.org/10.7554/eLife.49898>

Supplemental data

S2.1. Three-part questionnaire administered to *Sûreté du Québec* police officers

*Questions are in bold and possible answers are in parentheses separated by ";". When a text must be written to answer the question, the word "Text" is placed in parentheses.

**Questions were administered in French and were translated by the lead author (AGL) for this article

Section 1. Socio-demographic information

Sex [F; M; Does not wish to answer]

Age [Number; Does not wish to answer]

Highest level of education completed [High school; DEP (vocational studies after high school); CEGEP (general and vocational education between high school and higher education); Certificate; Bachelor; Master; Doctorate; Post-Doctorate]

Training [Text; Does not wish to answer]

Provincial police job title (check all that apply) [General director or deputy general director; Captain; Lieutenant; Sergeant-Investigator (includes sergeant-investigator, sergeant and investigator); Patrol officer; Agent, on-call agent and variable hours; Crime scene examiner; Other (text)]

Division within the provincial police (check all that apply) [General direction; Major function of criminal investigations; Major function of administration; Major function of territory surveillance; Other (text)]

For which *Sûreté du Québec* police station do you work? [Text]

Years of experience within the police force [Number; Does not wish to answer]

Section 2. Information on DNA phenotyping knowledge

Phenotype refers to the observable characteristics of an individual (e.g. hair colour, height, facial features), which are shaped by their genes and environment. DNA phenotyping is the reconstruction (or prediction) of an individual's phenotype from its DNA. In other words, phenotyping consists in analyzing a trace of DNA in order to predict certain physical traits (e.g. eye colour), without having a prior physical description of the individual who left this DNA. This tool is of increasing interest to police forces since it could be used, among other things, to determine the physical

appearance of a person of interest (e.g. a suspect) from a trace of DNA found at a crime scene.

4.1 Have you ever heard of DNA phenotyping before participating in this project? [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer]

a. If yes, by what means (conference, newspaper article, internet...)? [Text; Not applicable]

b. What have you heard about phenotyping by this means (e.g., an article said that phenotyping was a tool that allowed...)? [Text; Not applicable]

4.2 Do you know any cases in which phenotyping has been used? [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer]

a. If you answered yes to the previous question, do you know why this tool was used in this case? [Text; Not applicable]

b. What was the type of crime (breaking and entering, homicide, etc.) for which phenotyping was used in this case? [Text; Not applicable]

4.3 Do you know any phenotyping kits and/or services? [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer]

a. If you answered yes to the previous question, briefly describe them (e.g., what information can be obtained from the kit you are familiar with, what is its approximate cost (hundreds, thousands of dollars), etc.). [Text; Not applicable]

4.4 Have you ever wanted to use phenotyping to determine physical characteristics of an individual from a DNA trace left at a crime scene? [Yes; No; Does not wish to answer]

a. If you answered yes to the previous question, how many times? [Text; Not applicable]

b. If you answered no to the previous question, why? [Text; Not applicable]

4.5 Have you ever made a request to obtain physical characteristics of an individual from a DNA trace left at a crime scene via phenotyping? [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer]

a. If you answered yes to the previous question, how many requests have you made? [Text; Not applicable; Does not wish to answer]

b. What physical information did you request (e.g. hair colour, ethnicity, face...)? [Text; Not applicable; Does not wish to answer]

c. If you have already made a request to obtain characteristics from a DNA trace via phenotyping, did your approach work? If not, why? [Text; Not applicable; Does not wish to answer]

Section 3. Opinion on the use of DNA phenotyping in forensics

DNA Phenotyping

4. Do you think you are sufficiently trained in new technologies based on DNA analysis such as DNA phenotyping? Explain. [Yes; No; Not enough; Do not know; Does not wish to answer] and [Text; Not applicable]

5. For what reason(s) do you think DNA phenotyping could be used in the forensic field (e.g., to provide a new investigative lead)? Explain. [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

6. In what type of cases would DNA phenotyping be useful (e.g., homicide)? In what type of cases would it not be useful? [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

7. What phenotypic information would you want to obtain from a DNA trace if tool could predict it (e.g. hair colour, facial shape, age, etc.). [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

a. Justify why you would want to obtain this information through phenotyping. [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

8. If you had to choose the three most important physical characteristics* to be determined by phenotyping in order to advance an investigation, which would you choose?

*** These characteristics are not limited to the physical characteristics already suggested by DNA phenotyping, you can write anything related to a person's physical appearance (e.g. weight, chronic illness, nearsightedness, arm length, etc.).** [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

9. In your opinion, what makes any tool reliable? [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]

- 10. Do you think DNA analysis currently used in forensics are reliable? Explain.** [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer] and [Text; Not applicable]
- 11. Do you think that DNA phenotyping is reliable? Explain.** [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer] and [Text; Not applicable]
- 12. Do you think there are any problems (issues) associated with the use of DNA phenotyping in forensics?** [Yes; No; Do not know; Does not wish to answer]
- a. If you answered yes to the previous question, describe them.** [Text; Not applicable]
- 13. Do you have a more unfavorable or favorable opinion regarding the use of DNA phenotyping in criminal investigations (1 being very unfavorable and 10 being very favorable)? Why?** [1 to 10] and [Text; Do not know; Does not wish to answer; Not applicable]
- Comments (on the questionnaire or the topic in general)** [Text]

Table S2.2. Socio-demographic characteristics of the participants (n = 163)

Characteristic ^a	Count (%)
Declared gender	
Male	97 (59,5)
Female	64 (39,3)
NA	2 (1,2)
Age (years old)	
29-30	5 (3,1)
30-35	11 (6,7)
35-40	28 (17,2)
40-45	40 (24,5)
45-50	44 (27,0)
50-55	14 (8,6)
55-60	5 (3,1)
60+	3 (1,8)
NA	13 (8,0)
Highest level of education completed	
Junior college (CEGEP or certificate of collegial studies) ^b	63 (38,7)
Short undergraduate programmes (certificate or university microprogram)	59 (36,2)
Bachelor	19 (11,7)
Master	2 (1,2)
PhD or Post-doctorate	1 (0,6)
Other (CEGEP or graduate studies with additional training at the ENPQ or elsewhere)	19 (11,7)
Provincial police job title	
Captain	3 (1,8)
Lieutenant	11 (6,7)
Sergeant-investigator	134 (82,2)
Crime scene examiners ^c	6 (3,7)
Other (e.g. polygraphist, analysts, CQEDS ^d specialist)	9 (5,5)
Policing experience (years)	
6-10	9 (5,5)
10-15	29 (17,8)
15-20	38 (23,3)
20-25	56 (34,4)
25-30	24 (14,7)
30-31	7 (4,3)
Sûreté du Québec police district	
North district	11 (6,7)
East district	28 (17,2)
South district	52 (31,9)
West district	8 (4,9)
Montreal and Laval	23 (14,1)
NA	41 (25,2)

^aChoices with no respondents were not included in the table.

^bCEGEP is a public institution of general and vocational education in Quebec, located between high school and higher education.

^cCrime scene examiners in Quebec typically complete general police training before specializing in the discipline.

^dCQEDS stands for *Centre québécois d'enregistrement des délinquants sexuels*.

CHAPITRE III

LE PHÉNOTYPAGE PAR L'ADN EN CRIMINALISTIQUE : ÉVALUATION DU HIRISPLEX-S POUR LA PRÉDICTION DE LA PIGMENTATION DANS UNE POPULATION CANADIENNE

Audrée GAREAU-LÉONARD^{1,2,3}, Frank CRISPINO^{1,2,3}, Emmanuel, MILOT*^{1,2,3}

1 Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)

2 Centre international de criminologie comparée (CICC)

3 Groupe de recherche en science forensique (GRSF)

*Auteur correspondant

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour une publication en anglais dans la revue scientifique *Forensic Science International*, qui possède un comité de révision par les pairs.

3.1. Contribution des auteurs

En tant qu'auteure principale de cet article, j'ai été impliquée dans tous les aspects du projet et de la rédaction, c'est-à-dire la mise sur pied du projet, le contact avec les collaborateurs, la rédaction des ententes et des certifications éthiques, le recrutement de participants, l'analyse des résultats obtenus et la rédaction de l'article. Les Dr Emmanuel Milot et Frank Crispino, en tant que directeur et co-directeur, ont été impliqués dans l'élaboration du projet ainsi que dans la révision de l'article en plus de fournir un soutien durant tout le déroulement du projet.

3.2. Résumé en français du deuxième article

Le phénotypage par l'ADN permet de prédire des caractéristiques physiques (phénotypes) à partir de l'analyse de certains endroits précis de l'ADN appelés SNP. Dans un contexte forensique, cet outil serait pressenti afin d'aider les enquêtes pour lesquelles la source d'une trace biologique, c'est-à-dire l'individu à l'origine de celle-

ci, reste inconnu une fois les méthodes courantes utilisées (principalement les STR). Plusieurs ensembles de SNP ont été proposés afin de prédire ces caractéristiques, majoritairement les phénotypes pigmentaires, plus particulièrement la couleur des yeux, des cheveux et de la peau. Par contre, l'essai de ceux-ci dans différentes populations a mené à des résultats mitigés, questionnant leur justesse. De plus, leur évaluation n'avait pas été effectuée dans la population québécoise au moment de l'élaboration du projet. Ainsi, un de ces ensembles, le HIrisPlex-S, a été évalué dans cette étude auprès d'un échantillon de 139 individus québécois. Les résultats montrent qu'en combinant les trois phénotypes pigmentaires, seulement 31,4% des individus étaient bien prédits, ce qui n'apparaît pas suffisant dans une optique de structuration de la preuve. Dans une optique de renseignement, la prédiction de certaines couleurs de phénotypes pourrait être envisagée (ex. yeux bruns et peau pâle) puisque leur justesse calculée est au-dessus de 85% (respectivement 85,6 et 86,4%), mais la plupart des autres couleurs ont une justesse entourant le 60% (sauf exception des couleurs peu présentes dans notre échantillon). Les recherches futures devraient donc adresser ce problème en découvrant d'autres polymorphismes génétiques pour expliquer les phénotypes, mais également, évaluer quelle proportion de la variance phénotypique est expliquée par les gènes et par l'environnement dans différentes populations pour faire de meilleures prédictions.

3.3. Forensic DNA phenotyping: Evaluation of the HIrisPlex-S panel for pigmentation prediction in a Canadian population

Abstract

Forensic DNA phenotyping is a tool for predicting physical characteristics (phenotypes) from DNA left at a crime scene, which becomes interesting when the source of that DNA (the individual who left it) is unidentified. To predict these characteristics, DNA variants called single nucleotide polymorphisms are analyzed. Panels comprising some of these polymorphisms have been proposed to predict various phenotypes, including eye, hair and skin colour. However, evaluations of this tool have yielded mixed results so far, questioning its reliability. Therefore, the purpose of this study is to evaluate one panel, the HIrisPlex-S, in an admixed North American sample of 139 individuals to assess its reliability. The results show that, when combining the three phenotypes (eye, hair and skin colour), only 31.4% of predictions were correct, which does not seem to be enough from the point of view of evidence structuring. From an intelligence perspective, the prediction of certain colours for certain phenotypes could be considered (e.g. brown eyes and pale skin) since their calculated accuracy is over 85% (85.6 and 86.4%, respectively), but most other colours have an accuracy of around 60% (with the exception of colours that were practically not present in our sample). Future researches should consider finding more genetic polymorphisms to explain phenotypes, but also assess which proportion of phenotypic variance is explained by genes and environment in different populations in order to make better predictions.

Keywords

Massively parallel sequencing, single nucleotide polymorphisms, pigimentary traits

Introduction

Short tandem repeats (STR) are regions of DNA where a distinct motif of a few nucleotides is repeated many times, this number being variable from one individual to another (Butler, 2012b). In forensic biology, standard DNA typing methods mainly use a combination of these STR to produce a genetic profile from biological traces (e.g. blood, semen) found at crime scenes. This profile is then compared to other profiles,

either collected from persons of interest (e.g., suspects, victims) or stored in an offender DNA database to help find the source (individual) who left this DNA (Butler, 2012a). Where there is no match between a trace profile and reference profiles of individuals, the former is useless, except in the expectation of a match in a trace database. However, it is possible to extract other information from this trace.

Forensic DNA phenotyping (FDP) seeks to predict the traits of unknown individuals (e.g., eye colour, stature) solely from DNA traces left on crime scenes (Kayser, 2015) to provide investigative leads. Specifically, FDP intends to establish the physical appearance of a perpetrator (Liu *et al.*, 2013) or corroborate the testimony of a witness (e.g., who saw and described the presumed offender (Kayser, 2015)). Furthermore, its use has been suggested to predict physical characteristics of unidentified decomposed bodies to help identification (Draus-Barini *et al.*, 2013; Kayser, 2015). Pigmentation traits (i.e., physical characteristics containing pigments), specifically, eye (Mengel-From *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2013; Spichenok *et al.*, 2011; Walsh, Liu, *et al.*, 2011), hair (Branicki *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2013) and skin colour (Chaitanya *et al.*, 2018; Spichenok *et al.*, 2011) have been among the most studied phenotypes and SNP panels have been developed to predict those (Chaitanya *et al.*, 2018; Chaitanya *et al.*, 2014; Keating *et al.*, 2013; Verogen, s.d.; Walsh *et al.*, 2014; Walsh, Liu, *et al.*, 2011). To date, one of the most comprehensive and developed panel is the HIrisPlex-S (HIS) (Chaitanya *et al.*, 2018), which predicts eye, hair and skin colour through the analysis of 41 SNP (Chaitanya *et al.*, 2018). This panel has been the most tested in different populations and was adapted by one company to produce their commercial kit (i.e., ForenSeq DNA Signature Prep kit from Verogen, #TG-450-1002).

Despite its promises, when tested in different populations, DNA phenotyping panels, most specifically the HIrisPlex-S (or its previous versions IrisPlex and HIrisPlex), have yielded mixed success (Alghamdi *et al.*, 2019; Carratto *et al.*, 2019; Kastelic & Drobnic, 2012; Kukla-Bartoszek *et al.*, 2018; Pietroni *et al.*, 2014; Salvoro *et al.*, 2019), putting into question the reliability of FDP. For example, in their study on the Brazilian population, Carratto *et al.* (2019) obtained correct 3-trait predictions (eye, hair, and skin colours combined) for only 19,2% of participants with the HIS panel. In fact, performance metrics for this panel vary widely across populations. For example,

with eye colour, sensitivity (i.e., the percentage of correct predictions) was 58,1% for brown eyes in a Slovenian population (Kastelic *et al.*, 2013), compared to 85,0% in an admixed population in the United States (Dembinski & Picard, 2014), while the HIS database reports a much higher percentage, i.e., 93,5% (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>). As another example, sensitivity of pale skin colour prediction was only 18,0% in a Brazilian sample (Carratto *et al.*, 2019) compared to 69,7% in the HIS database. On the other hand, the use of DNA phenotyping is starting to interest police forces. Specifically in Quebec (where this study has been conducted), DNA phenotyping as already been used four times at the time of writing this paper, to our knowledge.

It is therefore imperative to evaluate DNA phenotyping in Quebec. In this paper, we sought to evaluate the HIrisPlex-S (Chaitanya *et al.*, 2018), in a Canadian population to assess its scientific reliability for use in a forensic context. To achieve this goal, DNA from 139 individuals from Quebec was analyzed to predict three phenotypes and compare them to the actual phenotypes. The main conclusion of this study is that this panel is not suitable to be used as evidence structuring in a forensic context in its current form due to its lack of reliability. This calls into question the relevance of DNA phenotyping for forensic applications at present, given that this panel is one of the most advanced. However, in an intelligence purpose, it could be used, depending on the context.

Methods

Participant recruitment and data collection

The recruitment of 139 volunteers took place from February to December 2016 in three Quebec cities (*Trois-Rivières*, *Mauricie* region; *Sherbrooke*, *Estrie* region; *Dolbeau-Mistassini*, *Saguenay–Lac-Saint-Jean* region). The inclusion criteria were that some of the participants had to be of French-Canadian origin, while all others had to be residents of Quebec. The only exclusion criterion was that no minors be recruited. DNA samples from participants were collected using buccal swabs. Phenotypes, namely right eye colour, hair colour and skin colour of the inner forearm, were recorded on site through visual observation by the data collector and photographed in close-up using a Nikon DX3200 camera with a macro lens of 105mm under reproducible light

conditions (flashes; 5500 Kelvin) specific to each phenotypes (exposure of 1/32 for eyes; 1/64 for light hair and 1/16 for dark hair; 1/64 for pale skin and 1/32 or 1/16 for dark skin). If a participant had dyed, gray, or no hair, they were asked to choose from a hair colour chart the one that best matched their natural colour. Participants were also asked how their hair colour might have changed naturally between childhood and adulthood. Images were corrected using a colour chart on Adobe Photoshop® CS6 Extended version 13.0.1 in order to reproduce the original colours of the phenotypes and thus achieve optimum colour classification. This recruitment was approved by the Human Research Ethics Committee of the *Université du Québec à Trois-Rivières* (certificate CER-15-219-07.20).

Three observers (1 male, 2 females) classified the phenotypes captured on photos using the categories defined in the IrisPlex (Walsh, Liu, *et al.*, 2011), HIrisPlex (Walsh *et al.*, 2013) and HIrisPlex-S (Chaitanya *et al.*, 2018) protocols. Specifically, eyes were classified as blue, intermediate, or brown; hair as blond, brown, red, or black; and skin as very pale, pale, intermediate, dark, or dark-black. The three observers worked under the same conditions, i.e., the distance between the computer screen and the observer was 50 cm, the screen was at eye level, the lighting was the same intensity for each observer, and each observer's vision was corrected if necessary (e.g., by wearing their glasses). Also, for skin colour, an example of each colour was given to the observers to help them get an idea of what a "very pale" colour looks like, compared to a "pale" colour, for example. The examples presented were those given by the researchers who developed HIrisPlex-S. However, for eye colour and hair colour, no standard examples were given by the researchers, and for skin colour, only one was given for each colour, which made it impossible to calibrate our observers with control examples, i.e. tests with colours that we know are in which category according to the researchers who developed the kit. Furthermore, when they disagreed on a phenotype, for the purpose of consistency, the consensus colour was retained if two of them had made the same choice, since the disagreeing observer most often chose the adjacent colour (except for 9 participants out of 125 for skin colour) and there was no middle ground between the two. Otherwise, when all three observers disagreed, an intermediate solution was chosen. For example, if they classified the skin as very pale, pale and intermediate respectively, the pale colour was chosen.

To ensure that our sample was representative of the Quebec population, a chi-square goodness-of-fit test was performed using data from Lona-Durazo *et al.* (2022) (n=2,434; the green and hazel categories were combined to form the intermediate category). Our sample was also compared to the remainder of the Canadian population using the same test and data (n=3,210). In addition, since the HIS system was mainly developed and trained in the European population and the genetic pool of the Quebec population is mostly from European origin (Bherer *et al.*, 2011), we would expect the accuracy of phenotypic predictions to be similar to that reached for Europeans (conditional on a number of assumptions underlying the HIS system, such as limited genotype-by-environment interactions). Nevertheless, discrepancies in prediction performance could arise from allele frequencies differences between Quebec and Europe for some HIS SNP. This is because the accuracy of predictions varies across colours (e.g., intermediate eye colour less successfully predicted than blue or brown eye colours (Walsh, Liu, *et al.*, 2011)), while colour frequencies in a population depend on allelic frequencies at underlying genes. Therefore, we compared allele frequencies for the 41 SNP in our sample to European frequencies, obtained from the 1,000 Genomes Consortium dataset (Cunningham *et al.*, 2022), as it could partly explain differences in phenotype prediction performance (if any).

SNP panel for phenotyping

HirisPlex-S is a panel comprising 41 SNP (one being an insertion-deletion, INDEL) to predict three pigimentary phenotypes: eye colour, hair colour and skin colour. It is the grouping of the IrisPlex (eye colour) (Walsh, Liu, *et al.*, 2011) and the HRisPlex (eye and hair colour) (Walsh *et al.*, 2013) with the addition of a prediction model for skin colour. HRisPlex-S uses three separate multinomial logistic models (MLR) to predict the three phenotypes categorically. These logistic models provide probabilities for each colour category, the colour with the highest probability being the one predicted from SNP, provided this probability is above some user-specified threshold. The developers recommend a probability >0.7 to predict eye colour (Walsh, Liu, *et al.*, 2011). If the 0.7 threshold is not reached, then eye colour is unclassified. They also recommend to follow prediction guidelines for hair (Walsh & Kayser, 2016) and skin colour (Chaitanya *et al.*, 2018) to refine the predictions. These prediction guidelines are in the form of decisions trees that defines the colour of the phenotype

based on the value of the highest probability (e.g., 0.5 vs 0.7). Furthermore, for hair colour, hair shade serves as a second step in the decision tree to refine the predictions (Walsh & Kayser, 2016). For example, if skin colour is to be predicted and the HRISplex-S calculated that the category with the highest probability is “very pale” and that this probability is 0.56, then the prediction guideline indicates that the “prediction [is] significantly affected by second category, and will be a mix of the two highest categories (tends to represent the darker second highest category)” (Chaitanya *et al.*, 2018), which means that if the second highest probability is the category “pale”, then the prediction will be a mix between very pale and pale, with a tendency towards pale skin colour. The complete prediction guidelines can be consulted in the studies cited above.

DNA extraction, quantification and sequencing

DNA from participants was extracted and quantified by the Biology/DNA department of the *Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale* (Montreal, Canada) using the DNA IQ™ System (Promega). DNA quantification was performed by qPCR using the Investigator® Quantiplex HYres (QIAGEN). The 41 SNP of HRISplex-S were sequenced for all 139 participants at the Genome Quebec facility in Montreal (<https://genomequebec.com>), as follows. DNA libraries were prepared using a two-step PCR protocol. The first PCR amplified the regions of interest using tagged primers. Tagged primers are primers linked to a small nucleotide sequence (the tag) that will be used in the second PCR as a starting point to ligate the indexes and the sequences complementary to the flow-cell. Primer sequences and concentrations were as in Breslin *et al.* (2019), but the tags were different since custom indexes were used (FwR1: ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT, RvR2: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT). The multiplex PCR was conducted in a 25 µL total volume consisting of 12.5 µL of 2X Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN), 5.5 µL of PCR-grade water, 2.5 µL of the forward and reverse primer mixes (varying concentrations of each primers according to each region’s ease of amplification) and 2 µL of the sample containing 10 ng of DNA. A touchdown PCR program was then performed as follows: 1) 95°C for 15 min; 2) 14 cycles of 94°C for 20 sec, 64°C for 60 sec (with -0.6°C temperature decreases per each additional cycle) and 72°C for 30 sec; 3) 20 cycles of 94°C for 20 sec, 57°C for 60 sec and 72°C for 30

sec; 4) 72°C for 10 min; 5) hold at 10°C. Positive and negative controls were added to each plate. Amplification products were spot-checked on 2% agarose gels (i.e., only a few amplified samples were migrated to ensure PCR was effective). The second PCR served to ligate a unique index to each sample, as well as the adapters complementary to the Illumina flow-cell (i5 and i7). This reaction was performed in a 20 µL total volume consisting of 4 µL of Q5® reaction buffer 5X (NEB), 1 µL of DMSO (Roche), 0.40 µL of 10 mM dNTP (NEB), 0.25 µL of Q5® HiFi polymerase 2 U/µL, 11.35 µL of PCR-grade water, 2 µL of indexes at 2µM and 1 µL of the product of the first PCR, diluted 1/200. The PCR program was: 1) 98°C for 3 min; 2) 15 cycles of 98°C for 10 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec; 3) 72°C for 2 min. The amplicons from this second PCR were then migrated on a 2% agarose gel to confirm the adequate incorporation of indexes and adapters. Quantification of amplicons was done with the Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen). The library was generated by pooling equal quantities (ng) of PCR products from the different samples.

The library was cleaned using sparQ PureMag Beads (Quantabio). A quality control step was realised by quantifying the library using Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal kit (Kapa Biosystems). Average fragment size was obtained using a LabChip GX (Perkin Elmer) instrument. Libraries were then diluted to a concentration of 2 nM and denatured during 5 minutes at room temperature using 0.4 N NaOH. Then, the library was diluted again to a final concentration of 10 pM with HT1 Hybridization Buffer (Illumina). Before sequencing, 5% of the PhiX control library was added to the amplicon pool (final concentration 10 pM) and another denaturation step was performed. A 600 µL volume of the combined library and control was loaded into the MiSeq cartridge. Paired-end sequencing was completed with the MiSeq Reagent Kit v2 500 cycles (Illumina). Once the run completed, the MiSeq Reporter software provided two paired-end FASTQ files for each individual for use in downstream analyses.

Data analysis and statistics

Bioinformatics pipeline

Once FASTQ files were obtained from Genome Quebec, they were analyzed following Breslin *et al.* (2019). In brief, the quality of the sequence reads was first accessed using FastQC v.0.11.9 (Babraham Bioinformatics, s.d.). Then, adapter and primer sequences were trimmed and low-quality sequences were excluded using the PE mode of Trimmomatic v.0.39 (Bolger *et al.*, 2014). The remaining reads were aligned to the indexed reference genome hg19 (GRCh 37) using the mem algorithm of BWA v.0.7.17 (Li, 2013). The SAM files thereby obtained were then converted into BAM files, sorted and indexed using SAMtools v.1.13 (Danecek *et al.*, 2021; Li, 2011; Li *et al.*, 2009). Variant calling was performed with BCFtools v.1.13 (Danecek *et al.*, 2021) using the commands mpileup (with a depth read of 8,000 (same as Breslin *et al.* (2019)), minimum mapping quality of 55 and minimum base quality of 25 (to ensure only quality mapping and base calling is used and thus reduce the risk of incorrect base identification), call (using the multi-allelic caller for all sites $-m -M$) and query for SNP extraction. INDEL rs796296176 was detected using the Java applet VarScan v.2.3.9 (Koboldt *et al.*, 2012). Finally, SNP were also verified using the Integrative Genomics Viewer (IGV) software v.2.11.2 (Robinson *et al.*, 2011). A minimum coverage of 30X was targeted. SNP that did not reach this threshold were re-sequenced to ensure that the correct genotype was obtained. In addition, the samples were sequenced in paired-end, which doubles the amount of data and enable more accurate read alignment (Illumina, s.d.).

Statistical analysis

The genotypes at targeted SNP were uploaded into the HIrisPlex-S web tool using the R scripts provided on their website (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>). The results were returned in an Excel spreadsheet containing the genotypes entered and the probability of each colour for each phenotype, as well as other statistics such as the area under the curve (AUC) and the effect of missing SNP on the AUC. The highest given probability was chosen as the predicted colour. Interpretive guidelines given in the HIS studies (Chaitanya *et al.*, 2018; Walsh & Kayser, 2016; Walsh, Liu, *et al.*, 2011) were followed in a second phase, which consisted in the use of the recommended threshold

(eye colour) and prediction guidelines (hair and skin colour). Phenotypic predictions returned by the HIrisPlex-S web tool were then compared to the classification made by the three observers of the real trait measurements on photos.

We used the following statistics to assess the power and accuracy of HIrisPlex-S when this tool is applied to our study population. The positive predictive value (PPV) is the percentage of correct predictions among all predictions of a given colour category. For example, if 20 individuals are predicted from DNA to have blue eyes while only 15 of them actually have this colour, then $PPV_{\text{blue.eyes}} = \text{True positive} / (\text{True positive} + \text{False positive}) = 15 / (15 + 5) = 75\%$. The negative predictive value (NPV) is the percentage of correct predictions among those “not being of a given colour category” (predicted negatives). For example, if 20 individuals are predicted from DNA to not have blue eyes (i.e., intermediate or brown eyes) and 18 of them actually do not have blue eyes, then $NPV_{\text{blue.eyes}} = \text{True negative} / (\text{True negative} + \text{False negative}) = 18 / (18 + 2) = 90\%$. Sensitivity is the percentage of DNA-based predictions pointing to a given colour type, among all people observed to have this colour type in our sample. For example, if 17 individuals have blue eyes and 15 of them are predicted as such, then $\text{Sensitivity}_{\text{blue.eyes}} = \text{True positive} / (\text{True positive} + \text{False negative}) = 15 / (15 + 2) \approx 88\%$. Specificity is the percentage of correctly predicted non-colour type among the observed non-colour type. For example, if 23 individuals do not have blue eyes and 18 of them are predicted as not having blue eyes, then $\text{Specificity}_{\text{blue.eyes}} = \text{True negative} / (\text{True negative} + \text{False positive}) = 18 / (18 + 5) \approx 78\%$. Finally, accuracy is the percentage of correctly predicted colour and non-colour type among all the predictions made ($\text{Accuracy} = (\text{True positive} + \text{True negative}) / (\text{True positive} + \text{True negative} + \text{False positive} + \text{False negative})$). The above statistics were calculated separately for each of the three phenotypic traits (eye, hair and skin colour). The percentage of how many phenotypes were correctly predicted overall (all three, two, one, or none) for each participant was also calculated. To do so, Microsoft Excel® (version 15.0.5423.1000, 2013) was used. R software® (version 4.0.3, 2020) (R Development Core Team, 2009) was used to create the graphs. This project was approved by the Human Research Ethics Committee from the *Université du Québec à Trois-Rivières* (n° CER-20-268-07.23).

Results

Sample collection and phenotypic classification

A sample of 139 individuals was obtained to evaluate the HIrisPlex-S panel for phenotypic predictions of eye, hair, and skin colour. The frequency of colours for each phenotype is reported in Table 3.1. The chi-square goodness-of-fit test performed between our sample and the Quebec sample from the Lona-Durazo *et al.* (2022) study (chi-square test: 2.70, $df = 2$, $p\text{-value} < 0.05$) revealed no statistically significant difference between the two. However, comparison of our sample with the remaining Canadian sample from the same study (chi-square test: 7.08, $df = 2$, $p\text{-value} < 0.05$) did reveal a statistically significant difference. On the other hand, the allele frequencies of the 41 SNP in our sample compared with those of the European 1,000 Genomes Consortium sample did not revealed a statistically significant difference when using a chi-square goodness-of-fit test (chi-square test: 14.47, $df = 40$, $p\text{-value} < 0.05$) (Table 3.2).

Table 3.1. Subjective phenotypic classification of eye, hair and skin colour by three observers.

	Colour	Count	Frequency (%)
Eye colour ($n=139$)	Blue	42	30.2
	Intermediate	56	40.3
	Brown	41	29.5
Hair colour ($n=139$) ^a	Blond	21	15.1
	Brown	105	75.5
	Red	1	0.7
	Black	12	8.6
Skin colour ($n=125$) ^b	Very pale	17	13.6
	Pale	41	32.8
	Intermediate	53	42.4
	Dark	12	9.6
	Dark/Black	2	1.6

^aThe colour of 38 participants was approximated using a colour chart rather than being classified by three observers, as they had no hair, dyed hair or gray hair.

^bThe sample size is lower for skin colour due to missing SNP data for some participants, who were thus excluded for this phenotype in this study.

When classifying colours, the three observers did not always agree. For eye colour, one observer out of the three disagreed for 44/139 participants (32%). For all

other participants, the classification was identical for all observers. For hair colour, one observer disagreed with the others for 48/101 participants (48%)⁸, while the remainder were classified the same for all three. Finally, for skin colour, 110/125 (88%) were not classified the same for all three observers, thus, they only agreed on 12% of the participants. Specifically, for 36/125 participants (29%), none of the three observers agreed on the same colour, and for 74/125 participants (59%), one observer disagreed with the others. When one observer disagreed with the others, for all three phenotypes, it was not always the same one.

Table 3.2. Observed allele frequencies of the 41 SNP in the Quebec population sample compared to the allele frequencies of the European sample from the 1,000 Genomes Consortium.

SNP	n ^a	Reference allele	Frequency ^b	Frequency EUR ^c (n=1006)
rs312262906	139	no A insertion ^d	0.989	0.997
rs11547464	139	G	0.993	0.991
rs885479	139	G	0.957	0.930
rs1805007	139	C	0.964	0.928
rs1805008	139	C	0.971	0.938
rs201326893	139	C	1.000	1.000
rs1110400	139	T	1.000	0.992
rs2228479	139	G	0.888	0.931
rs1805005	139	G	0.874	0.888
rs1805006	139	C	0.982	0.990
rs1805009	139	G	0.982	0.992
rs28777	139	C	0.090	0.044
rs16891982	139	C	0.097	0.062
rs12821256	139	T	0.903	0.879
rs4959270	139	C	0.554	0.524
rs12203592	139	C	0.867	0.884
rs1042602	139	C	0.597	0.628
rs1800407	139	C	0.914	0.924
rs2402130	139	G	0.241	0.213
rs12913832	139	A	0.396	0.364
rs2378249	139	G	0.147	0.117
rs12896399	139	G	0.640	0.570
rs1393350	139	G	0.730	0.756
rs683	139	C	0.399	0.373

⁸There were fewer than 139 responses for hair colour because some participants had dyed hair, gray hair, or no hair. Classification of these participants was performed using a colour chart at the recruitment phase, so there was no classification of the photos by three observers.

rs3114908	139	T	0.266	0.311
rs1800414	139	T	0.996	1.000
rs10756819	139	G	0.331	0.324
rs2238289	139	A	0.777	0.801
rs17128291	139	A	0.835	0.842
rs6497292	139	A	0.896	0.910
rs1129038	139	C	0.399	0.365
rs1667394	139	C	0.284	0.244
rs1126809	139	G	0.727	0.748
rs1470608	139	G	0.770	0.831
rs1426654	139	A	0.957	0.997
rs6119471	138	C	0.996	0.999
rs1545397	139	A	0.892	0.922
rs6059655	139	A	0.065	0.042
rs12441727	139	G	0.820	0.874
rs3212355	125	C	1.000	1.000
rs8051733	139	A	0.712	0.725

^aNumber of individuals successfully genotyped

^bFrequency of the reference allele in the 139 participants from the Quebec population sample

^cFrequency of the reference allele in the European sample from the 1000 Genomes Consortium

^dThis SNP is an INDEL and the alternative allele is an adenine insertion

Data analysis and statistics

Eye colour

In the absence of a threshold, i.e., when the category with the highest probability was chosen as the predicted colour, the PPV for blue and brown are less than 70% (Table 3.3). Thus, more than 30% of individuals were predicted with blue or brown eyes even though they do not possess this colour. Similarly, the specificity for brown eye colour and accuracy for brown and intermediate eye colour were lower than 70%, respectively 57.1, 69.8, and 59.7%. None of the intermediate colours in our sample were predicted as such by the HIS panel, with or without a threshold, i.e. they were either classified as blue or brown, but never intermediate, which was the colour observed (by all three observers or by two of them). Using a threshold of 0.7, all statistics were roughly the same or better, supporting Walsh, Liu, *et al.* (2011) advises. The increase in performance with this threshold was modest to moderate. The PPV for blue and brown eye colour increased by 4.0% and 10.0%, respectively. The specificity for brown eye colour increased by 10.0% and its accuracy by 8.0%. Finally, the NPV and accuracy for intermediate eye colour increased by 7.8% each (Table 3.3).

Because sensitivity is greater than specificity for both blue and brown, this indicates a higher rate of false positives than of false negatives. This false positive rate decreases slightly when using a threshold of 0.7 for blue colour, while brown colour remains unchanged (100.0%). Although, from a normal criminal intelligence point of view, a higher false positive rate is not a problem, it is here because it predicts that people with unknown characteristics have a characteristic they do not possess (for example, they are predicted to have blue eyes when they do not), which is no better than predicting that a person does not have a characteristic when they do (e.g., they are predicted not to have blue eyes when they do). For the intermediate colour, because none of the participants were predicted as such, the sensitivity is zero and the specificity is maximal. However, the accuracy, which compiles the true positives and true negatives on the entire sample, is lower than the other colours because of the panel's inability to predict intermediate colour. The NPV is much higher than the PPV for all eye colours, which means that the HIS panel is better at predicting true negatives than positives, i.e., the model predicts non-colours better than colours.

Table 3.3. Summary statistics for each eye colour category, based on the analysis of 139 participants from a Quebec population sample. To obtain these statistics, individuals were first classified in different phenotypic categories based on their HIS genotype, without and with the 0.7 minimal probability threshold (recommended by Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Then their DNA-predicted phenotype was compared to their observed phenotype.

		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Without threshold	Blue	69.6	96.4	92.9	82.5	85.6
	Intermediate	- ^a	59.7	0.0	100.0	59.7
	Brown	49.4	100.0	100.0	57.1	69.8
Threshold of 0.7	Blue	73.6	96.9	95.1	81.6	86.3
	Intermediate	- ^a	67.5	0.0	100.0	67.5
	Brown	59.4	100.0	100.0	67.1	77.8

^aThese lines have no value, since the numerator and denominator numbers were zero.

Globally, without using the 0.7 threshold, 57.6% of eye colour predictions were correct and 42.4% incorrect. With the threshold, the percentage of correct predictions did not change greatly (55.4%), however, that of incorrect ones decreased to 28.8%.

For the remaining 15.8% of individuals, no phenotype had a probability >0.7 so they remained unclassified. Most of the incorrect predictions done without the threshold were due to participants predicted as having brown (39/59; 66.1%) or blue (17/59; 28.8%) eyes when they actually had an intermediate colour. When the threshold was used, 38/40 incorrect predictions were due to individuals whose eyes were predicted to be either brown (24/40) or blue (14/40) but were indeed of intermediate colour. The HIrisPlex-S then performs less effectively (around 60% accuracy) in predicting intermediate colour, compared with brown colour, where it performs better (around 70% accuracy), and with blue eye colour, where it performs relatively well (over 80% accuracy). Furthermore, three participants were predicted to have brown eyes when they actually had blue eyes, and two of these three participants had probabilities above the 0.7 threshold.

Hair colour

PPV for all colours except brown are less than or equal to 50.0%, meaning that 50% or more of the participants were predicted as having a hair colour they did not possess, with the exception of those with brown hair. The NPV for brown is also low (30.2%), thus, the majority of non-brown predictions (blond, red or black) (69.8%) were actually participants with brown hair. In addition, the sensitivity for blond, brown, and black is low at 42.9%, 64.8%, and 33.3%, respectively. This means that $\geq 35\%$ of participants were predicted as not having the colour in question even though it was their actual one. Specificity is also low for brown hair colour (47.1%), more than 52% were therefore predicted to have brown hair when this was not their actual hair colour. Accuracy for blond and brown is less than 70%, thus, more than 30% of the predictions for these colours were incorrect (either participants were predicted to have a blond/brown colour they did not possess, or they were predicted to have a colour other than blond/brown, when in fact they did possess a blond/brown colour). The other measures are higher (between 73.7% and 100.0%) (Table 3.4). However, because our sample did not include many red and black hairs, conclusions on these colours are limited.

Table 3.4. Summary statistics (PPV, NPV, sensitivity, specificity and accuracy) for each hair colour category, based on the analysis of 139 participants from a Quebec population sample (without the prediction guidelines of Walsh & Kayser (2016))

	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Blond	22.5	87.9	42.9	73.7	69.1
Brown	79.1	30.2	64.8	47.1	60.4
Red	20.0	100.0	100.0	97.1	97.1
Black	50.0	93.9	33.3	96.9	91.4

Without using the hair colour prediction guidelines published by Walsh & Kayser (2016), 59.0% of predictions were correct, while 41.0% were incorrect. Using the prediction guidelines, 66.2% of predictions were correct and 33.8% were incorrect for all hair colours of the 139 participants. The incorrect predictions when using the prediction guidelines were primarily for individuals with brown hair, but predicted as blond or dark blond by the HIS (26/47; 55.3%). Of these individuals, 18 had a different hair colour in childhood (blond). Incorrect predictions were also due to individuals with blond hair but predicted as dark-brown/black (7/47; 14.9%). Of these individuals, only one had a different hair colour in their childhood (black). In total, our sample contained 41 individuals (out of 139; 29.5%) who reported having a different hair colour in childhood (mainly blond hair in childhood turned brown in adulthood). Using the prediction guidelines, 20 predictions (48.8%) out of 41 were identical to the childhood colour, while 18 predictions (43.9%) corresponded to the adult colour. For the remaining three, it was impossible to establish whether the predicted colour was that of childhood or that of adulthood, as the predicted colour represented both (e.g., predicted dark blond/brown when the participant had dark blond hair in childhood and brown hair in adulthood).

Skin colour

PPV and sensitivity for all skin colours are below 52%, meaning that almost half of the participants were predicted to have a specific colour they did not have, and almost half of the participants were predicted not to have a specific colour they actually had. For example, when it came to pale skin colour, 34/125 were predicted as having pale skin when they did not have this shade, and 20/125 were predicted as not having pale

skin when they actually did. The NPV were high (more than 86%) except for pale and intermediate skin colour, which were lower (67.2 and 71.4%). This means that, for pale and intermediate colour, 32.8% and 28.6% of predictions of non-colour were in fact participants with these respective colours (e.g., predicted as not having intermediate skin colour but actually have this colour). Specificity was low for pale and intermediate skin colour (59.5 and 56.9%, respectively), meaning that $\geq 40.5\%$ of participants who did not have a specific colour were predicted as having this colour. Finally, accuracy for pale and intermediate colour was also low (56.8 and 59.2%), almost half of the colour and non-colour predictions were thus erroneous. The remaining parameters were high (between 71.4% and 100.0%) (Table 3.5). However, because our sample did not include many dark and dark-black skin colour individuals, conclusions about these colours are limited.

Table 3.5. Summary statistics (PPV, NPV, sensitivity, specificity and accuracy) for each skin colour category, based on the analysis of 125 participants from a Quebec population sample (without the prediction guidelines of Chaitanya *et al.* (2018))

	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Very pale	- ^a	86.4	0.0	100.0	86.4
Pale	38.2	71.4	51.2	59.5	56.8
Intermediate	51.6	67.2	62.3	56.9	59.2
Dark	0.0	90.2	0.0	98.2	88.8
Dark-black	25.0	99.2	50.0	97.6	96.8

^aThis line has no value, since the numerator and denominator numbers were zero.

Without using the prediction guidelines, 44.0% of predictions were correct and 56.0% of predictions were incorrect. Using the skin colour prediction guidelines published by Chaitanya *et al.* (2018), 71.8% of predictions were correct and 29.0% were incorrect for all skin colours of the 125 participants. Incorrect predictions without the prediction guidelines were primarily for individuals predicted as pale, but who had very pale (14/70; 20.0%) or intermediate (18/70; 25.8%) skin colour or individuals predicted as intermediate, but had pale skin colour (20/70; 28.6%). In contrast, when using the prediction guidelines, errors were most prevalent among individuals predicted as pale but actually having very pale skin colour (12/36; 33.3%).

As the three observers did not all have the same classification for every participant, the same tables for each phenotype were produced, retaining only those individuals for whom the three observers had the same classification (Table S3.1). For eye colour, 95 individuals were classified in the same category by all three observers (e.g. all three observers classified participant X as having brown eyes), and the statistical measures (PPV, NPV, sensitivity, specificity and accuracy) taking only these 95 into account were all higher than those in Table 3.3. However, the increase is not very substantial, except for the PPV of blue eyes. For hair colour, statistical measures are in majority higher when taking only the 91 individuals who were classified in the same category, with some being smaller. However, as for eye colour, the increase or decrease is not substantial, except for the sensitivity in black hair. Finally, for skin colour, the results are much different. Statistical measures are mostly higher when the 15 individuals classified in the same category are taken into account, but there are substantial differences for PPV and specificity for pale and intermediate skin colours, NPV for very pale, sensitivity for pale and accuracy for very pale to dark. Notably, accuracy is lower for very pale and pale skin colours, but higher for intermediate and dark skin colours. This shows that even when only the phenotypes classified in the same categories by the three observers are taken into account, predictions are not better for all skin colours or other traits.

Multi-trait phenotypic prediction

To evaluate how well HIrisPlex-S predicts multi-trait phenotypes, we counted the number of correctly predicted phenotypes for the 125 participants with no missing SNP data (i.e., prediction was possible for the three pigmentation traits; Table 3.6). Furthermore, results obtained using no threshold or guidelines and those obtained by following the HIrisPlex-S developers' recommendations were compared to observe the change in correct predictions since, for all three traits, the best models for predicting the actual phenotypes were those using the recommendations (Table 3.6).

Table 3.6. Success of multi-trait prediction for the three phenotypes (eye, hair and skin colour) based on the analysis of a sample of 125 participants from Quebec.

Numbers are given for predictions made without and with the 0.7 minimal probability threshold and prediction guidelines.

	Number of correctly predicted traits	Count	Proportion (%)
Without threshold and prediction guidelines	0	11	8.8
	1	45	36.0
	2	53	42.4
	3	16	12.8
With threshold and prediction guidelines ^a	0	2	1.9
	1	28	26.7
	2	42	40.0
	3	33	31.4
	Eye colour unclassified (below 0.7 threshold)	20	16.0

^aThe total number of participants whose three phenotypes were predicted and who did not fall below the 0.7 threshold was 105. The proportion of the number of correctly predicted traits was therefore calculated using this number as the denominator. For unclassified participants, the proportion was calculated using the 125 participants with all three phenotypes predicted as the denominator.

For the majority of individuals, one or two of the three phenotypes were correctly predicted when no threshold or prediction guidelines were used. When using the threshold and prediction guidelines, the proportion of three correctly predicted phenotypes was higher (31.4% vs. 12.8%) but nevertheless modest, since these results indicate that multi-trait prediction will be incorrect, for at least one trait, 68.6% of the time.

Discussion

Generalization of eye colour predictions to the Quebec and Canadian populations

When the distribution of eye colours in our sample was compared to that of the study of Lona-Durazo *et al.* (2022), there was no statistically significant difference. However, eye colour was self-assessed in the study of Lona-Durazo *et al.* (2022) compared to our sample, where colours were assessed by three observers. Subjective discrepancy might therefore be present. It is interesting to note that the Quebec sample of Lona-Durazo *et al.* (2022) had significantly fewer blue-eyed individuals than the other Canadian provinces, which was explained by the lower frequency of the SNP

rs12913832 G-allele (the most important SNP for the prediction of eye colour (Liu *et al.*, 2009)), probably due to the high proportion of French ancestry in the Quebec population (Bherer *et al.*, 2011). When comparing the allele frequency of the SNP rs12913832 in our sample with the one from Lona-Durazo *et al.* (2022) using a chi-square goodness-of-fit test (chi-square test: 0.23, $df = 1$, $p\text{-value} < 0.05$), there was no statistically significant difference. This supports that our sample is representative of the Quebec population in terms of eye colour distribution and allele frequency for the SNP rs12913832. In addition, a comparison between the eye colour distribution of our sample and that of the rest of the Canadian population revealed a statistically significant difference. This suggests that the results of DNA phenotyping could be different if used in Quebec compared with other provinces, given that the distribution of eye colours and the frequency of the rs12913832 SNP are dissimilar, emphasizing the need to evaluate the panel in different populations and subpopulations. In fact, fundamentals of quantitative genetics indicate that it is often misguided to use the same predictive model (or the same quantitative parameter estimates from regression) for two populations, even for traits with strong heritability (Walsh & Lynch, 2018). It also emphasizes the importance of using the correct population of interest when evaluating a genetic result, which can prove difficult in a real-life case where contextual information is missing, such as the recovery of human remains or the prediction of a perpetrator's phenotype. Indeed, if the Quebec population has a lower frequency of the SNP rs12913832 G-allele, which is related to blue eye colour, then a result giving blue colour may be more discriminating in this population than in another, becoming interesting from a genetic forensic perspective. For hair and skin colour, no data in the Canadian population was available to see if our sample was representative of this population.

Comparison of allele frequencies with the European population

When comparing the allelic frequencies obtained in our sample to those of the European sample of the 1,000 Genomes Consortium, no statistically significant difference was found. However, it was shown that the Quebec population, though mainly of European origin (more precisely of French origin), is also mixed with diverse other origins, such as Acadian, British and Amerindian (Bherer *et al.*, 2011), and was subject to many regional founder effect, i.e., a loss of genetic diversity due to the establishment in a new population of a small group of individuals (Laberge *et al.*, 2005).

Although our sample was not significantly different from the European sample in terms of allelic frequencies, a chi-square goodness-of-fit test (chi-square test: 17.11, $df = 2$, $p\text{-value} < 0.05$) performed between the eye colour distribution of our sample and the mean eye colour distribution of some European countries (Denmark, Great Britain, France, Georgia, Germany, Iceland, Netherlands, Poland, Slovenia, Ukraine) from the study of Katsara & Nothnagel (2019) revealed that the distributions were significantly different between the two. Although the eye colour distribution of European populations has been averaged and does not represent the entire European continent, it may suggest that a similar distribution of SNP allele frequencies may be responsible for different phenotypic distributions between populations. Thus, genotypic similarity does not guarantee similar phenotypic distribution. In other words, the same SNP at similar frequencies is responsible for different phenotypic distributions in distinct populations. Other aspects may therefore be involved in the creation of phenotypes. There is also the possibility that 1) the portion of the genome that is not analyzed using HiriPlex-S could contain other polymorphisms or interactions influencing the phenotypes of interest, and these vary between populations; 2) the heritability of the trait might change due to differences in environmental variance; 3) interactions between genotype and environment could be more important than thought, so that two genotypes could react differently to an environmental change; and 4) certain individual factors could influence the phenotype (e.g. age, lifestyle habits, etc.).

Observer variation in phenotype calling

Classification by three observers in this study did not yield the same results for all participants for all phenotypes, especially for skin colour, for which the observers only agreed on 12% of participants. This effect was also highlighted by Meyer *et al.* (2019) for eye colour, where 30 participants were asked to classify 442 digital photos of eyes into three categories: blue, intermediate and brown. In this study, only 38% of observers agreed over eye colour, and none of those was the intermediate colour. This is higher than in our study, where the three observers agreed on 68% of the 139 digital photos of eye colours. The reasons for this discrepancy can be numerous and difficult to pinpoint (e.g., difference in phenotypic distributions between populations, in photo quality, in observation protocols, in observer experience, etc.). Despite this, some conclusions can be drawn from both studies. The first is that eye colour classification

can be very different from one individual to another, especially for the intermediate colour, revealing the complexity of colour perception and classification into closed categories. The second is that this effect is visible even with a small group of observers. Thirdly, the more phenotypic categories there are, and the less contrasted they are (as in the case of skin colour, which has five categories), the more difficult it is for observers to agree (which is not unexpected). This raises the question of how useful can be DNA-predicted phenotypes to police investigators, or when disseminated into the public, if they are to be perceived differently by different people. It also calls into question the relevance of using the observer approach to obtain reference data on actual phenotypes in order to assess the performance of tools such as HIS. Going a step further, one might ask whether the classification of participants by an observer, which served as the basis for the development of phenotyping panels, was adequate. It therefore calls for the development of panels that use objective classification to create DNA phenotyping kits, this type of classification could then be used by researchers evaluating these kits in their populations and, ultimately, by individuals who would use it in actual criminal cases. Some papers have shown the benefits of using this type of classification, including the identification of new SNP linked to the phenotypes of interest (Andersen *et al.*, 2013; Edwards, Cha, Krithika, Johnson, Cook, *et al.*, 2016; Norton *et al.*, 2016; Wollstein *et al.*, 2017). However, subjective data cannot be disregarded, as the results of DNA phenotyping will be used by police officers and perhaps the public to attempt to find the source of biological traces recovered from the crime scene; the objective classification should therefore be correlated with the subjective classification once the kits have been validated with an objective classification. For example, models could be built using quantitative classification, but also provide examples of what a “blue colour” is to help the searches. More specifically, a range of possible shades and/or colours could be presented to police officers or the public along with appropriate warnings regarding the limitations of the results provided by the tool.

Performance and accuracy of predictions

Eye colour

Overall, the HIS panel seems to predict blue and non-blue eye colour better in our sample than intermediate and brown colours, as the accuracy is higher. As indicated in

several studies, including that of Walsh, Liu, *et al.* (2011) on the IrisPlex, the prediction of intermediate colour must be improved (Carratto *et al.*, 2021; Dario *et al.*, 2015; Dembinski & Picard, 2014; Freire-Aradas *et al.*, 2014; Kastelic *et al.*, 2013; Pneuman *et al.*, 2012; Salvoro *et al.*, 2019; Yun *et al.*, 2014), in particular, by discovering new variants or genes that can explain this colour or certain patterns of the iris (Sturm & Larsson, 2009), but also by investigating different factors that can influence eye colour, such as age, diseases or the environment (Mackey *et al.*, 2011). It has also been proposed to modify the IrisPlex model by changing the parameters and variables of the model (Purps *et al.*, 2011) and more specifically, by breaking the intermediate category into subcategories (Dembinski & Picard, 2014). However, this latter approach has not been very successful so far (Pospiech *et al.*, 2012). This is particularly important in admixed populations, as there is a higher proportion of intermediate phenotypes (Carratto *et al.*, 2021). Also, Prestes *et al.* (2011) reported that the accuracy of eye colour prediction decreases with increasing number of generations since admixture, though further research is needed to better understand the rationale behind this observation. Given that our sample is mixed and that we have information on the pedigree of the participants, it would be interesting to conduct further research to determine how many generations since admixture has occurred to potentially explain some incorrect eye colour predictions.

Using a threshold of 0.7 reduced the percentage of incorrect predictions without considerably affecting the percentage of correct predictions, thus suggesting it could help reduce the percentage of false predictions. However, it would also be worth asking to what extent this threshold improves predictions in relation to operational needs. In concrete terms, how much risk would police officers be willing to take with phenotyping predictions? Would they prefer to use a tool that provides fewer but consistently correct predictions, or would they use it if they have a certain probability of getting a good prediction? As for the reason for most of the incorrect predictions, it is largely due to the poor performance of the model in identifying the intermediate eye colour. In fact, many of the intermediate colours in our sample were eyes with a mixture of green and brown (see Figure S3.1 for examples). The three observers mostly chose to classify the latter as intermediate rather than brown.

Regarding the three participants having blue eyes, but for whom the prediction made was 'brown', it is interesting to note that they were heterozygous for the HERC2 SNP rs12913832:GA, which is normally observed in individuals with brown eyes (Andersen *et al.*, 2016). However, three other SNPs were found to modify rs12913832:A>G allele's penetrance in heterozygous individuals, by decreasing pigmentation levels, namely rs74653330:C>T, rs121918166:A>G and rs1800407:G>A (Andersen *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2016). Two of the three misclassified individuals aforementioned carried a heterozygous genotype at the latter SNP (rs1800407:GA), while the third individual was a GG homozygote (we do not have genotypic information for SNP rs74653330 and rs121918166).

Hair colour

Since PPV are lower or equal to 50% for almost all hair colours (except for brown), this means the HIS panel has difficulties in predicting true positives hair colour. However, NPV are high for all hair colours except for brown (30.2% compared to 87% and higher), the HIS panel is then better at predicting true negatives hair colour in our sample. Specificity being greater than sensitivity for both blond and black hair colour, indicates a higher rate of false negatives than false positives. For brown hair, it is the opposite. Accuracy, which compiles the true positives and true negatives on the entire sample, is lower than the other colours for blond and brown because there is a considerable amount of false positives and false negatives.

The use of the prediction guidelines slightly increased the percentage of correct predictions, but this is mainly due to the fact that the prediction guidelines includes the adjacent colour if the colour probability is lower than a certain threshold. For example, an individual predicted as "brown" without the prediction guidelines could be predicted as "dark brown/black" with the prediction guidelines if the colour probability is less than 0.7 for brown and the light probability is less than 0.8 (see Walsh & Kayser (2016) for the prediction guidelines). As for the incorrect predictions, they were mainly due to classification errors between the colour blond and brown. This is expected since our sample contained few individuals with black and red hair, but also because the distinction between blond and brown is not always clear, e.g., for individuals with light brown or dark blond hair. It is also important to note that the hair colour of 38

participants was approximated using a colour chart since they had gray, dyed, or no hair and were therefore not classified by three observers. According to Kukla-Bartoszek *et al.* (2018) study, darkening of hair colour from childhood to adulthood may influence HIS predictions by making predictions of childhood colour rather than the adult colour. In our sample, this could be partly true, since almost half of the predictions made for people with a different hair colour in childhood were predictions of the childhood colour. However, it cannot be ruled out that predictions corresponding to childhood colour are fortuitous, i.e. have nothing to do with hair colour at birth.

Skin colour

NPV, specificities and accuracies are high (more than 86%) except for pale and intermediate skin colour. This means that the HIS is better at predicting true negatives and also has a lower false positive rate for all skin colour except pale and intermediate. However, our sample had few individuals with dark and dark-black skin colours, so conclusions on these colours are limited. As for the other metrics, they are all low (less than 65%), which shows that the HIS panel is not effective in predicting pale and intermediate colour in our sample. Furthermore, when the prediction guidelines was not used, no prediction of the colour “very pale” was made even though our sample comprised 17 of them. Distinguishing between skin tones is sometimes difficult, which may have affected the classification and thus explain some of the results obtained. In addition, participants' ability to tan was not recorded during recruitment, which may have affected colour classification since the HIS uses this ability to classify skin colour (Chaitanya *et al.*, 2018).

Using the prediction guidelines, however, was very helpful in classifying individuals into the correct group. This is because, as with hair colour, predictions with lower probabilities are merged with the second highest probability colour. For example, if an individual is predicted to have pale skin with a probability of 0.5 and the second highest probability category is very pale at 0.4, the final colour will be a mixture of pale and very pale.

Multi-trait phenotypic prediction

Combining predictions from the three phenotypes yield poor results, even with the threshold and prediction guidelines. Indeed, only 31.4% of predictions were correct for all three phenotypes. However, this is better than in the study of Carratto *et al.* (2019), who only had 19.16% of their predictions that were correct for all three phenotypes. These results could be explained by the fact that the three phenotypes are predicted using three separate statistical models. Consequently, when the probabilities obtained are combined, the overall performance for all phenotypes is inferior to the one obtained when each phenotype is taken separately. More generally, it could also be due to the approach used, i.e. the classification of continuous variables (colours) into categories. It could also be that some important SNP or other genetic interactions for the prediction of these phenotypes were not included in the HIS panel, or that some HIS SNP are less informative in our population of interest, due to differences in genetic variation between our population and the reference populations used to develop HIS. Another important aspect that can explain the poor results is that the phenotypic variance is not only the result of complex interactions between genes (e.g. additive, dominant and/or epistatic effects), but also between genes and environment. In fact, genotype-by-environment interactions (GxEs) have received increasing interest in quantitative genetics as they could explain good part of the so-called “missing heritability”, a major issue in current research (Manolio *et al.*, 2009; Pawitan *et al.*, 2009; Young, 2022). Likewise, the *common variant-common disease vs. rare variant-common disease*, a major conundrum in genetics that also applies to other quantitative phenotypic traits, must be considered here (Gibson, 2012; Iyengar & Elston, 2007). The common variant-common disease hypothesis states that only a few common allelic variants are responsible for the genetic variance in disease susceptibility (or another phenotypic trait), whereas the rare variant-common disease hypothesis states that a variation in the DNA sequence of a single disease-related gene may encompass numerous possibilities (Iyengar & Elston, 2007). Specifically, we do not know the extent to which rare variants may contribute to variation in the phenotypes of interest. Neither of these two major issues, namely GxEs and the distribution of variant effect size, have been considered thoroughly in forensic DNA phenotyping. Furthermore, panels like the HIrisPlex-S do not include all the genetic variants that affect the phenotypic variance, and finding more variants could represent a considerable

challenge (Pawitan *et al.*, 2009). Taken altogether, this means that DNA phenotyping panels only predict a fraction of the total phenotypic variance.

Two main objectives of DNA phenotyping in forensic science are to reduce the list of suspects by establishing the physical characteristics of unknown people who left DNA traces on crime scenes (Liu *et al.*, 2013) and to corroborate witness testimonies (Kayser, 2015). Therefore, true-negative and true-positive predictions are necessary to exclude certain phenotypes on the one hand and to infer the probable phenotype of the individual on the other. From our data, the predictions made for the eye, hair and skin colour with the HIrisPlex-S panel are not optimal enough to be used in a context of evidence structuring in our population, confining it to be used as an investigative tool, which was already the case. However, while we do not expect it to be perfectly accurate, the phenotyping method should be sufficiently good for its operational use in criminal investigations. This also implies to reduce the risk of misleading police investigators by providing them with wrong phenotypic predictions. Furthermore, this means it would be important to make police officers aware of the limitations of this tool and how to interpret and use the results to avoid biases.

Comparison with other data/populations

Eye colour

Comparing our results to those obtained from 1,000 cross-validated tests of individuals within the database of the HIrisPlex-S (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) (Table S3.2), it can be observed that only the NPV for blue and brown eye colour, sensitivity for brown eye colour, and accuracy for intermediate eye colour are higher than the results from the HIS website. Thus, the HIS panel yields a lower rate of false negatives for brown and better identifies true negatives for blue and brown colours in our sample. However, the NPV depends on the prevalence of the phenotype being tested, eye colours in this case. Regarding the higher accuracy for intermediate eye colour in our sample, since none of our individuals were predicted to be of intermediate colour, the accuracy calculated is the ratio of true negatives to false negatives, whereas the HIS sample appears to have correctly identified some of its intermediate eye colour individuals, but also predicted false positives, which reduced the overall accuracy.

Frégeau (2022) also analyzed a Canadian population using Verogen's ForenSeq™ DNA Signature Prep/Primer Mix B kit and Universal Analysis Software (UAS) v1.3, which are based on the HIrisPlex model (eye and hair colour). Comparing our results to theirs, with a threshold of 0.7, the measures are similar for NPV and sensitivity for all colours, except for intermediate colour, as none of their intermediate predictions reached the 0.7 threshold. However, the PPV and specificity for all colours are lower in our sample, especially for brown eye colour (Table S3.2). This suggests that the HIrisPlex panel is more efficient at predicting true positives and also has a lower rate of false positives in their sample compared to ours. This could be explained by the differences in genetic variation between the two samples, as explained above, and by the classification of phenotypes, where in our sample, individuals with a mixture of green and brown were classified as intermediate, but also because in the Frégeau (2022) sample, the classification was self-reported, so a subjective discrepancy could be present.

Hair colour

Comparing our results to the ones obtained from 1000 cross-validated tests of individuals within the database of the HIrisPlex-S (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) (Table S3.3), it can be observed that almost all NPV (except the one for brown hair) are higher than the ones from the HIS sample. Also, PPV for brown colour, sensitivity for red colour and accuracy for red and black colour are higher. This means that the HIS panel better identifies true negatives in our sample, except for brown hair colour, where it better identifies true positives. Since there was only one red hair in our sample, sensitivity is 100% because the panel effectively predicted this individual without predicting false negatives. A good accuracy for red and black hair is expected because our sample contains few of these colours. Comparing our results to Frégeau (2022), our results were similar or lower except for PPV for brown colour, sensitivity for brown and red colours and specificity for black colour (Table S3.3). This means the HIrisPlex is more efficient at predicting true positives for brown hair and has a lower rate of false negatives for brown and red hair colours in our sample. The panel also has a lower rate of false positives for black hair in our sample. This could be due to the same explanations as for eye colour, but also because Frégeau (2022) sample contained more individuals with black hair and fewer with brown hair.

Skin colour

Compared to the HIS sample, the measures were all similar or lower for our sample, which may be explained by differences in genetic variation and classification (Table S3.4). This may also be because the model needs to be refined for admixed populations by including other markers, genetic components or gene-gene interactions involved in skin colour (Carratto *et al.*, 2019).

Limitations of the study

With respect to phenotype classification, some hair colours were estimated with a colour chart and the ability of the skin to tan was not recorded at the time of recruitment (*contra* Walsh *et al.* (2017), which helped define the categories used in this study). This information may be important to classify phenotypes and interpret phenotypic predictions. Furthermore, some low-concentration samples did not yield a complete genotype for all SNP for the skin colour prediction, so these samples were excluded from the results. However, incomplete DNA profiles must be taken into account when analyzing DNA samples from biological traces which are found at crime scenes, so they could be taken into consideration for future research. Finally, our sample did not include many participants for certain hair colour (red and black) and skin colour (dark and dark-black).

Conclusion

This study aimed to evaluate the ability of a DNA phenotyping panel, the HIrisPlex-S, to predict pigmentation traits (eye, hair and skin colour) in a Canadian population (province of Quebec). The results show that for all three phenotypes, HIS predictions are not sufficiently reliable to be used as evidence in a courtroom. However, they may be of interest at the investigative stage, but should be used with great caution. Further research should focus on improving the phenotyping panels by including more genetic variants that affect the phenotypes analysed, but also, assess the proportion of the phenotypic variance explained by the genes and the environment in the population of interest to evaluate the proportion of the phenotypic variance that can be predicted by these SNP panels. The current approach of classifying continuous variables into categories should also be reconsidered.

Acknowledgments

The authors would like to thank all the collaborators involved in this project, namely Ms. Diane Séguin, Magali Loyer and Christine Jolicoeur from the *Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale (LSJML)*, Ms. Julie Boudreau and Mr. Alexandre Montpetit of Genome Quebec, Ms. Jacinthe Gosselin, Ms. Alexandra Doyon, the *Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR)*, the *Université de Sherbrooke (UdeS)*, and the genealogical societies *Société d'histoire du Lac-Saint-Jean*, *Société d'histoire et de généalogie Maria-Chapdelaine*, *Société de généalogie du grand Trois-Rivières*, and *Société de généalogie du Saguenay*. The authors would also like to express their gratitude to the participants of this study. The authors would finally like to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the *Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT)*, the *Groupe de recherche en science forensique (GRSF)* and the International Centre for Comparative Criminology (ICCC) for their financial support.

References

- Alghamdi, J., Amoudi, M., Kassab, A., Al Mufarrej, M., & Al Ghamdi, S. (2019). Eye color prediction using single nucleotide polymorphisms in Saudi population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1607-1612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.011>
- Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Christoffersen, S. R., Delgado, M. C., Henriksen, S. T., . . . Morling, N. (2013). Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.003>
- Andersen, J. D., Pietroni, C., Johansen, P., Andersen, M. M., Pereira, V., Borsting, C., & Morling, N. (2016). Importance of nonsynonymous OCA2 variants in human eye color prediction. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 4(4), 420-430. <https://doi.org/10.1002/mgg3.213>
- Babraham Bioinformatics. (s.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. In <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bherer, C., Labuda, D., Roy-Gagnon, M.-H., Houde, L., Tremblay, M., & Vézina, H. (2011). Admixed ancestry and stratification of Quebec regional populations. *American Journal of Physical Anthropology*, 144(3), 432-441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajpa.21424>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Branicki, W., Liu, F., van Duijn, K., Draus-Barini, J., Pośpiech, E., Walsh, S., . . . Kayser, M. (2011). Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Human Genetics*, 129(4), 443-454. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0939-8>
- Breslin, K., Wills, B., Ralf, A., Ventayol Garcia, M., Kukla-Bartoszek, M., Pospiech, E., . . . Kayser, M. (2019). HRisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. *Forensic Science International: Genetics*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102152>
- Butler, J. M. (2012a). Sample Collection, Storage, and Characterization. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 1-27). Academic Press.
- Butler, J. M. (2012b). Short Tandem Repeat (STR) Loci and Kits. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 99-139). Academic Press.
- Carratto, T., Marcorin, L., Debortoli, G., Silva, G., Fracasso, N., Oliveira, M., . . . Mendes-Junior, C. (2019). Evaluation of the HRisPlex-S system in a Brazilian population sample. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 794-796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.180>
- Carratto, T. M. T., Marcorin, L., do Valle-Silva, G., de Oliveira, M. L. G., Donadi, E. A., Simões, A. L., . . . Mendes-Junior, C. T. (2021). Prediction of eye and hair pigmentation phenotypes using the HRisPlex system in a Brazilian admixed population sample. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1329-1339. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02554-7>
- Chaitanya, L., Breslin, K., Złoga, S., Wirken, L., Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., . . . Walsh, S. (2018). The HRisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation.

- Forensic Science International: Genetics*, 35, 123-135.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>
- Chaitanya, L., Walsh, S., Andersen, J. D., Ansell, R., Ballantyne, K., Ballard, D., . . . Kayser, M. (2014). Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.006>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M R., Armean, Irina M., . . . Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., . . . Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- Dario, P., Mourino, H., Oliveira, A. R., Lucas, I., Ribeiro, T., Porto, M. J., . . . Corte Real, F. (2015). Assessment of IrisPlex-based multiplex for eye and skin color prediction with application to a Portuguese population. *International Journal of Legal Medicine*, 129(6), 1191-1200. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1248-5>
- Dembinski, G. M., & Picard, C. J. (2014). Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 111-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.003>
- Draus-Barini, J., Walsh, S., Pośpiech, E., Kupiec, T., Głąb, H., Branicki, W., & Kayser, M. (2013). Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-3>
- Edwards, M., Cha, D., Krithika, S., Johnson, M., Cook, G., & Parra, E. J. (2016). Iris pigmentation as a quantitative trait: variation in populations of European, East Asian and South Asian ancestry and association with candidate gene polymorphisms. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(2), 141-162. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12435>
- Frégeau, C. J. (2022). A multiple predictive tool approach for phenotypic and biogeographical ancestry inferences. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 55(2), 71-99. <https://doi.org/10.1080/00085030.2021.2016206>
- Freire-Aradas, A., Ruiz, Y., Phillips, C., Maroñas, O., Söchtig, J., Tato, A. G., . . . Lareu, M. V. (2014). Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 3-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.007>
- Gibson, G. (2012). Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 135-145. <https://doi.org/10.1038/nrg3118>
- Illumina. (s.d.). *Advantages of paired-end and single-read sequencing*. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html>
- Iyengar, S. K., & Elston, R. C. (2007). The genetic basis of complex traits: rare variants or "common gene, common disease"? *Methods in Molecular Biology*, 376, 71-84. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-389-9_6
- Kastelic, V., & Drobnic, K. (2012). A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Croatian Medical Journal*, 53(5), 401-408. <https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.401>

- Kastelic, V., Pospiech, E., Draus-Barini, J., Branicki, W., & Drobnic, K. (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croatian Medical Journal*, 54(4), 381-386. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760663/pdf/CroatMedJ_54_0381.pdf
- Katsara, M.-A., & Nothnagel, M. (2019). True colors: A literature review on the spatial distribution of eye and hair pigmentation. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.01.001>
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
- Keating, B., Bansal, A. T., Walsh, S., Millman, J., Newman, J., Kidd, K., . . . Kayser, M. (2013). First all-in-one diagnostic tool for DNA intelligence: genome-wide inference of biogeographic ancestry, appearance, relatedness, and sex with the Identitas v1 Forensic Chip. *International Journal of Legal Medicine*, 127(3), 559-572. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0788-1>
- Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., . . . Wilson, R. K. (2012). VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3), 568-576. <https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>
- Kukla-Bartoszek, M., Pośpiech, E., Spólnicka, M., Karłowska-Pik, J., Strapagiel, D., Żądzińska, E., . . . Branicki, W. (2018). Investigating the impact of age-dependent hair colour darkening during childhood on DNA-based hair colour prediction with the HIrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 36, 26-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.007>
- Laberge, A. M., Michaud, J., Richter, A., Lemyre, E., Lambert, M., Brais, B., & Mitchell, G. A. (2005). Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clinical Genetics*, 68(4), 287-301. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00497.x>
- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27(21), 2987-2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv: Genomics*.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Liu, F., Wen, B., & Kayser, M. (2013). Colorful DNA polymorphisms in humans. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(6-7), 562-575. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2013.03.013>
- Lona-Durazo, F., Thakur, R., Pairo-Castineira, E., Funderburk, K., Zhang, T., Kovacs, M. A., . . . Parra, E. J. (2022). Investigating the genetic architecture of eye colour in a Canadian cohort. *iScience*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104485>
- Mackey, D. A., Wilkinson, C. H., Kearns, L. S., & Hewitt, A. W. (2011). Classification of iris colour: review and refinement of a classification schema. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 39(5), 462-471. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2010.02487.x>

- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., . . . Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747-753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
- Mengel-From, J., Børsting, C., Sanchez, J. J., Eiberg, H., & Morling, N. (2010). Human eye colour and HERC2, OCA2 and M ATP. *Forensic Science International: Genetics*, *4*(5), 323-328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.12.004>
- Meyer, O. S., Børsting, C., & Andersen, J. D. (2019). Perception of blue and brown eye colours for forensic DNA phenotyping. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *7*(1), 476-477.
- Norton, H. L., Edwards, M., Krithika, S., Johnson, M., Werren, E. A., & Parra, E. J. (2016). Quantitative assessment of skin, hair, and iris variation in a diverse sample of individuals and associated genetic variation. *American Journal of Physical Anthropology*, *160*(4), 570-581. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22861>
- Pawitan, Y., Seng, K. C., & Magnusson, P. K. (2009). How many genetic variants remain to be discovered? *PloS One*, *4*(12), e7969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007969>
- Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R., . . . Morling, N. (2014). The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Science International: Genetics*, *11*, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.002>
- Pneuman, A., Budimlija, Z. M., Caragine, T., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2012). Verification of eye and skin color predictors in various populations. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, *14*(2), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2011.12.005>
- Pospiech, E., Draus-Barini, J., Kupiec, T., Wojas-Pelc, A., & Branicki, W. (2012). Prediction of eye color from genetic data using Bayesian approach. *Journal of Forensic Sciences*, *57*(4), 880-886. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02077.x>
- Prestes, P. R., Mitchell, R. J., Daniel, R., Ballantyne, K. N., & van Oorschot, R. A. H. (2011). Evaluation of the IrisPlex system in admixed individuals. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *3*(1), 283-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.08.137>
- Purps, J., Geppert, M., Nagy, M., & Roewer, L. (2011). Evaluation of the IrisPlex eye colour prediction tool in a German population sample. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *3*(1), 202-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2011.08.101>
- R Development Core Team. (2009). A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, *29*(1), 24-26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Casares de Cal, M., Cruz, R., . . . Lareu, M. V. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Science International: Genetics*, *7*(1), 28-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.009>
- Salvoro, C., Faccinetto, C., Zucchelli, L., Porto, M., Marino, A., Occhi, G., . . . Vazza, G. (2019). Performance of four models for eye color prediction in an Italian

- population sample. *Forensic Science International: Genetics*, 40, 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.03.008>
- Spichenok, O., Budimlija, Z. M., Mitchell, A. A., Jenny, A., Kovacevic, L., Marjanovic, D., . . . Wurmbach, E. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 472-478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.005>
- Sturm, R. A., & Larsson, M. (2009). Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22(5), 544-562. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00606.x>
- Verogen. (s.d.). *ForenSeq DNA Signature Prep Kit*. <https://verogen.com/products/forenseq-dna-signature-prep-kit/>
- Walsh, B., & Lynch, M. (2018). *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Oxford University Press.
- Walsh, S., Chaitanya, L., Breslin, K., Muralidharan, C., Bronikowska, A., Pospiech, E., . . . Kayser, M. (2017). Global skin colour prediction from DNA. *Human Genetics*, 136(7), 847-863. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1808-5>
- Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., . . . Kayser, M. (2014). Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 150-161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006>
- Walsh, S., & Kayser, M. (2016). A Practical Guide to the HIrisPlex System: Simultaneous Prediction of Eye and Hair Color from DNA. *Methods in Molecular Biology*, 1420, 213-231. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_17
- Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., & Kayser, M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>
- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., . . . Kayser, M. (2013). The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 98-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>
- Wollstein, A., Walsh, S., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., . . . Kayser, M. (2017). Novel quantitative pigmentation phenotyping enhances genetic association, epistasis, and prediction of human eye colour. *Scientific Reports*, 7, 43359. <https://doi.org/10.1038/srep43359>
- Young, A. I. (2022). Discovering missing heritability in whole-genome sequencing data. *Nature Genetics*, 54(3), 224-226. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01012-3>
- Yun, L., Gu, Y., Rajeevan, H., & Kidd, K. K. (2014). Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. *International Journal of Legal Medicine*, 128(3), 447-453. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0953-1>

Supplemental data

Table S3.1. Statistics when only the three observers agreed on the phenotypes

Eye colour n=95		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Without threshold	Blue	82.9	98.1	97.1	88.3	91.6
	Intermediate	⁹	65.3	0.0	100.0	65.3
	Brown	50.0	100.0	100.0	60.3	71.6
Threshold of 0.7	Blue	85.0	100.0	100.0	86.7	92.4
	Intermediate	⁹	74.7	0.0	100.0	74.7
	Brown	64.1	100.0	100.0	74.1	82.3

Hair colour n=91 ¹⁰		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Blond		21.7	86.8	35.7	76.6	70.3
Brown		82.8	33.3	68.6	52.4	64.8
Red		25.0	100.0	100.0	96.7	96.7
Black		50.0	96.5	50.0	96.5	93.4

Skin colour n=15		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Very pale		⁹	66.7	0.0	100.0	66.7
Pale		20.0	80.0	66.7	33.3	40.0
Intermediate		80.0	70.0	57.1	87.5	73.3
Dark		⁹	100.0	⁹	100.0	100.0
Dark-black		⁹	100.0	⁹	100.0	100.0

⁹ These lines have no value, since the numerator and denominator numbers are zero.¹⁰ The number of participants in this table includes individuals classified in the same way for all three observers, but also those estimated using a colour chart.



Figure S3.1. Examples of participants classified as having intermediate eye colour but with a mixture of green and brown in their irises.

Table S3.2. Comparison of statistics obtained for eye colour from 139 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website and from the study of Frégeau (2022)

		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Without threshold	Blue	69.6	96.4	92.9	82.5	85.6
	Intermediate	- ^a	59.7	0.0	100.0	59.7
	Brown	49.4	100.0	100.0	57.1	69.8
Threshold of 0.7	Blue	73.6	96.9	95.1	81.6	86.3
	Intermediate	- ^a	67.5	0.0	100.0	67.5
	Brown	59.4	100.0	100.0	67.1	77.8
HIS ^b Without threshold	Blue	90.3	89.9	92.8	86.6	89.7
	Intermediate	8.5 ^c	91.2	0.1	99.9	50.0
	Brown	77.2	96.3	93.5	85.9	89.7
Frégeau (2022) Threshold of 0.7	Blue	82.4	97.0	95.5	89.3	- ^e
	Intermediate	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^e
	Brown	91.8	97.0	96.6	92.9	- ^e

^a These lines have no value, since the numerator and denominator numbers are zero.

^b The values presented in these lines are those reported on the HIrisPlex-S website (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>), where an analysis of 1000 cross validated tests of individuals within the database (80% for training and 20% for testing) was performed. These measures are based on the highest probability, and not the prediction guidelines, to give the final result.

^c Less than 1000 test runs were used to compute this metric due to lower numbers of this category within the database.

^d None of the participants were predicted as having intermediate eye colour with a probability >0.7

^e Data unknown

Table S3.3. Comparison of statistics obtained for hair colour from 139 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website and from the study of Frégeau (2022)

		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Without prediction guidelines	Blond	22.5	87.9	42.9	73.7	69.1
	Brown	79.1	30.2	64.8	47.1	60.4
	Red	20.0	100.0	100.0	97.1	97.1
	Black	50.0	93.9	33.3	96.9	91.4
HIS ^a Without threshold	Blond	62.9	79.4	66.5	76.7	71.6
	Brown	57.8	72.3	65.6	65.2	65.4
	Red	73.3	96.6	61.3	98.0	79.7
	Black	69.9	91.1	33.3	97.9	65.6
Frégeau (2022) Without prediction guidelines	Blond	26.7	93.9	57.1	80.7	^{-b}
	Brown	63.3	59.2	32.2	84.1	^{-b}
	Red	57.1	98.3	66.7	97.5	^{-b}
	Black	89.6	92.5	87.8	93.7	^{-b}

^aThe values presented in these lines are those reported on the HIrisPlex-S website (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>), where an analysis of 1000 cross validated tests of individuals within the database (80% for training and 20% for testing) was performed. These measures are based on the highest probability, and not the prediction guidelines, to give the final result.

^bData unknown

Table S3.4. Comparison of statistics obtained for skin colour from 125 participants in a Quebec population sample with the ones from the HIS website

		PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
Without prediction guidelines	Very pale	- ^a	86.4	0.0	100.0	86.4
	Pale	38.2	71.4	51.2	59.5	56.8
	Intermediate	51.6	67.2	62.3	56.9	59.2
	Dark	0.0	90.2	0.0	98.2	88.8
	Dark-black	25.0	99.2	50.0	97.6	96.8
HIS ^b	Very pale	40.1 ^c	93.5	7.8	99.1	53.5
Without threshold	Pale	59.9	72.3	69.7	62.8	66.2
	Intermediate	59.6	73.1	57.3	74.9	66.1
	Dark	33.8	97.5	29.5	98.0	63.7
	Dark-black	80.6	98.8	81.0	98.7	89.9

^a This line has no value, since the numerator and denominator numbers are zero.

^b The values presented in these lines are those reported on the HIrisPlex-S website (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>), where an analysis of 1000 cross validated tests of individuals within the database (80% for training and 20% for testing) was performed. These measures are based on the highest probability, and not the prediction guidelines, to give the final result.

^c Less than 1000 test runs were used to compute this metric due to lower numbers of this category within the database.

CHAPITRE IV

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lorsqu'une trace biologique contenant de l'ADN est retrouvée sur une scène de crime (ou d'investigation), ou bien lorsqu'un corps non-identifié est retrouvé, il est d'usage d'analyser cet ADN au niveau de plusieurs marqueurs STR pour tenter d'en mettre au jour le profil génétique. Ce profil est ensuite comparé à ceux contenus dans une base de données ou à celui de personnes d'intérêt ou disparues afin d'en inférer la source, c'est-à-dire l'individu potentiel à l'origine de cette trace ou l'individu pouvant correspondre au corps retrouvé. Toutefois, lorsque le profil génétique obtenu de la scène ou d'un corps ne correspond à aucun autre profil connu, l'individu ne peut être inféré avec les analyses conventionnelles (STR). Le développement d'un nouvel outil, le phénotypage par l'ADN, pourrait dans ces cas apporter un nouveau type d'information. Ce dernier a pour but de prédire des caractéristiques physiques, par exemple, la couleur des yeux et la taille, à partir de l'analyse de certains polymorphismes (SNP) localisés de l'ADN. Cet outil a principalement été utilisé jusqu'à présent afin d'établir l'apparence d'un auteur de crime (Liu *et al.*, 2013), corroborer les témoignages reçus (Kayser, 2015) ou bien aider à identifier un corps décomposé (Draus-Barini *et al.*, 2013). Plus généralement, l'apport du phénotypage se situe au niveau investigatif, c'est-à-dire pour générer ou soutenir des pistes d'enquêtes policières, tandis que les méthodes traditionnelles d'analyse de l'ADN continuent à être utilisées pour confirmer (ou infirmer) que la personne appréhendée possède le profil génétique extrait de la trace d'ADN et pour structurer la preuve afin d'éclairer la prise de décision au tribunal (MacLean & Lamparello, 2014).

4.1 Utilité du phénotypage par l'ADN en science forensique

Malgré le fait que cet outil soit destiné au travail des policiers, une seule étude, à notre connaissance, s'est intéressée à leur opinion sur celui-ci. Menée en Europe auprès de six policiers, elle rapporte quelques éléments intéressants, à savoir que

certains policiers, bien que reconnaissant l'importance de la fiabilité et de la validité (c'est-à-dire la capacité d'un test à prédire des traits observables dans une grande proportion de cas dans le monde « réel » et pas seulement en laboratoire), seraient tout de même intéressés à utiliser une nouvelle technologie ou un nouvel outil encore peu validé ou donnant des résultats pouvant ne pas correspondre aux résultats attendus, dans l'espoir d'obtenir une piste d'enquête (Samuel & Prainsack, 2019). Toutefois, le peu de policiers ayant répondu à cette étude ne permet pas d'avoir un portrait global de l'opinion policière. De plus, l'article ne spécifiait pas si cette nouvelle technologie ou ce nouvel outil seraient utilisés dans un contexte où tout a été testé au préalable, dans certains dossiers précis seulement ou bien si l'utilisation serait plus systématique. Finalement, aucune étude n'a été menée au Québec sur le sujet, il était donc impossible de savoir d'une part si les policiers, particulièrement de cette province, connaissaient le phénotypage et si oui, s'ils étaient intéressés à l'utiliser dans leurs enquêtes. C'est sur ce point que s'est concentré le premier article de ce mémoire. Dans celui-ci, les connaissances des policiers concernant le phénotypage ont été colligées, de même que leurs avis sur divers aspects de l'outil, comme la fiabilité, l'utilité opérationnelle, les caractéristiques physiques d'intérêt ainsi que les éventuels problèmes reliés à cet outil. Il a ainsi été observé que la majorité des policiers n'avaient que peu ou pas de connaissances sur le phénotypage, mais étaient tout de même intéressés à l'utiliser, principalement dans les crimes contre la personne, à condition qu'il soit fiable scientifiquement, accepté à la cour et utile à leurs enquêtes. Selon eux, les caractéristiques physiques les plus intéressantes à prédire (et non pas uniquement les phénotypes), lorsqu'ils ne désiraient pas tout obtenir, sont la couleur des yeux, l'âge, l'ethnicité et la taille. Finalement, trois catégories de policiers se sont démarquées dans l'étude, soit ceux qui étaient neutres par leur propre évaluation de leur manque de connaissances sur le sujet, ceux qui étaient optimistes mais prudents face à cet outil et ceux qui étaient sur-optimistes avec de grandes attentes par rapport à celui-ci.

D'autre part, considérant que les connaissances des policiers sur le sujet sont limitées, celles-ci mériteraient d'être bonifiées avant que l'outil ne soit utilisé plus largement, ceci afin d'éviter les problèmes potentiels reliés à une utilisation inadéquate ou liés à un manque de connaissances et de formation, particulièrement dans les cas où le potentiel du phénotypage par l'ADN est surestimé. Par exemple, les policiers

doivent être conscients que le phénotypage ne donne que des prédictions, et non pas des caractéristiques immuables, ce qui signifie que le risque d'erreur sera toujours présent et pourrait affecter leur enquête si un poids trop important est accordé à une prédiction peu fiable. Par ailleurs, puisque le phénotypage serait utile afin de prédire des caractéristiques physiques d'un auteur inconnu, comment savoir si une prédiction est bonne ? Sur ce point, il reste important d'avoir d'une part des modèles avec des taux d'erreurs qui ne soient pas exagérément élevés, mais également, que les policiers relient les informations du phénotypage aux autres éléments de l'enquête afin de déterminer si ceux-ci peuvent avoir plus de confiance ou non dans la prédiction faite. Il importe de rappeler que le phénotypage est un outil qui serait utilisé à des fins d'investigation seulement, et donc, que ses prédictions serviront à amener de nouvelles pistes, qui pourront éventuellement être fausses, d'où l'importance de corroborer avec les autres éléments d'enquête et d'utiliser les techniques d'ADN présentement utilisées (STR) pour une identification plus formelle. D'un autre côté, certains phénotypes ne sont actuellement pas prédictibles par l'ADN, et ne le seront potentiellement jamais avec suffisamment d'exactitude pour être d'une quelconque utilité dans les enquêtes policières, comme par exemple la taille (Liu *et al.*, 2019). La prédiction de certains traits, tels que des maladies, soulève également des enjeux éthiques ou légaux qui pourraient limiter ou empêcher l'utilisation à des fins forensiques (Granja & Machado, 2020; MacLean & Lamparello, 2014).

4.2 Fiabilité du phénotypage par l'ADN en science forensique

La fiabilité scientifique (justesse, taux d'erreur faible) d'un outil d'enquête est un des trois aspects importants afin que les policiers considèrent un outil ou une technologie d'enquête fiable, les deux autres étant l'aspect pratique et légal (cf § *General reliability and reliability of DNA phenotyping* du chapitre 2). Puisque la fiabilité scientifique d'un outil d'enquête est un aspect important qui ressort des réponses données par les policiers, qui, rappelons-le, sont les principaux utilisateurs à qui se destine le phénotypage, il importait alors de vérifier que les ensembles de marqueurs génétiques proposés fournissent des prédictions phénotypiques qui correspondent à la réalité (ex. yeux bleus prédits alors que l'individu possède réellement des yeux de cette couleur). C'est donc sur ce second aspect qu'a porté le deuxième article de ce mémoire. Il a ainsi été observé que les prédictions de trois

différents phénotypes (couleur des yeux, cheveux et peau), obtenues d'un des kits de prédiction les plus en usage à ce jour (HIrisPlex-S), sont très variables. Plus précisément, la couleur des yeux dite « intermédiaire », soit les couleurs situées entre le bleu et le brun (vert, noisette), n'a jamais été prédite par le HIrisPlex-S (c'est-à-dire par son modèle mathématique sous-jacent), et ce, malgré la présence de 56 individus ayant cette couleur dans notre échantillon. De plus, les yeux bruns étaient moins bien prédits que les bleus. Pour ce qui est des cheveux, dans notre échantillon, le HIrisPlex-S prédit le « brun » plus souvent que toute autre couleur (soit blond, roux ou noir), que l'individu ait réellement ou non les cheveux bruns. De plus, la majorité des erreurs de prédiction se situaient entre les couleurs blonde et brune. Finalement, les prédictions pour la peau étaient souvent erronées, surtout pour les couleurs pâle et intermédiaire, qui constituaient la majorité de notre échantillon. L'explication de ces mauvaises prédictions réside principalement dans le fait que les kits comme HIrisPlex-S se basent sur l'analyse de quelques polymorphismes génétiques sans prendre en compte, d'une part, le rôle de l'environnement et, d'autre part, celui de tous les autres polymorphismes et des interactions génétiques (dominance, épistasie) dans la construction du phénotype. De plus, chaque population possédant un pool génétique qui lui est propre, un ensemble de polymorphismes peut en théorie mener à des prédictions qui soient justes dans une population et pas dans une autre, tel que montré dans diverses recherches (ex. Alghamdi *et al.*, 2019; Carratto *et al.*, 2019; Kastelic & Drobnic, 2012; Kukla-Bartoszek *et al.*, 2018; Pietroni *et al.*, 2014; Salvorio *et al.*, 2019). Puisque les individus ayant servi à bâtir le HIrisPlex-S sont principalement d'origine européenne, il est donc possible que ce kit fournisse des résultats plus justes dans cette population plutôt que dans d'autres, ce qui pourrait également mener à un risque de discrimination envers cette population, comme cela a été montré avec certaines banques de données ADN utilisées présentement (Hepple, 2009; Murphy & Tong, 2020). Finalement, l'approche subjective pour classer les phénotypes dans les modèles de prédiction est également sujette à une grande variabilité entre les divers individus amenés à valider l'outil dans leur population. Ces trois aspects sont développés plus en détail dans les sections suivantes.

4.2.1 Apports environnemental et génétique aux phénotypes

Les phénotypes sont le résultat de l'interaction entre les gènes entre eux ainsi qu'avec l'environnement (Falconer & Mackay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Afin de prédire un phénotype, il faut alors s'intéresser dans un premier temps à l'apport de la variation génétique (ou héritabilité) et à l'apport de la variation environnementale à sa variance. Ceci est d'autant plus important que la variance due aux gènes se modifie d'une population à l'autre (Tableau 4.1). Ainsi, la proportion de la variance phénotypique qu'il sera possible de prédire seulement à partir des gènes sera plus ou moins élevée dépendamment de la population. Par exemple, dans le Tableau 4.1, la génétique explique une plus grande proportion de la variance phénotypique pour la couleur des yeux dans la population des États-Unis que celle de l'Allemagne. Ainsi, la seule analyse des gènes de la population des États-Unis pourrait potentiellement mieux prédire le trait.

Tableau 4.1. Données sur l'héritabilité de trois phénotypes (couleur des yeux, des cheveux et de la peau) dans différentes populations

Phénotype	Population	Héritabilité (%)	Référence
Couleur des yeux	Inconnue	96	Jensen (1967)
	Allemagne	89	Bräuer and Chopra (1980)
	États-Unis	98	Bito <i>et al.</i> (1997)
	Allemagne	85	Larsson <i>et al.</i> (2003)
Couleur des cheveux	Pays-Bas	73-99	Lin <i>et al.</i> (2015)
	Allemagne	72	Bräuer and Chopra (1980)
Couleur de la peau	Australie	72-83	Clark <i>et al.</i> (1981)
	États-Unis	72,2	Post and Rao (1977)
	Afrique	96	Martin <i>et al.</i> (2017)
	Pérou	55	Frisancho <i>et al.</i> (1981)

Dans un deuxième temps, il faut chercher à identifier des polymorphismes génétiques ayant un effet sur le phénotype étant donné que la part de l'environnement est difficile à mesurer expérimentalement, particulièrement pour les sujets humains, puisqu'elle comprend toutes les variables affectant la variance phénotypique totale qui ne sont pas attribuables à la génétique (ex. climat, nutrition, exposition aux rayons UV, altitude, etc.) (Falconer & Mackay, 1996; Graham, 2008). De plus, certains génotypes peuvent être plus ou moins sensibles aux influences de l'environnement, ce qui peut affecter la variance attribuable à l'environnement (Falconer & Mackay, 1996).

Prenons un exemple théorique se basant sur la littérature. Selon une étude effectuée en Allemagne (Larsson *et al.*, 2003), la variance phénotypique attribuable aux gènes (héritabilité) pour la couleur des yeux dans cette population a été calculée comme étant de 85%. Ceci veut donc dire que 85% de la variance phénotypique est expliquée par les gènes alors que 15% de cette variance serait expliquée par l'environnement (Figure 4.1a). Ensuite, prenons une étude de Liu *et al.* (2010), qui a créé un ensemble de 15 SNP en plus de considérer l'âge et le sexe afin de prédire la couleur des yeux (six de ces SNP constituent par ailleurs le IrisPlex). Selon cette étude, les 15 SNP, l'âge et le sexe pris ensemble expliquent entre 49-56% de la variance phénotypique due aux gènes pour ce trait (pour les besoins de l'exemple, la moyenne de 53% sera utilisée). Ainsi, 47% de la variance phénotypique due à la génétique reste inexpliquée (Figure 4.1b). Lorsque ces deux données sont compilées, cela signifie donc que 55% de ce qui constitue la variance phénotypique reste inconnu, soit à cause de l'environnement ou de la portion génétique qui est inexpliquée par les SNP contenus dans l'ensemble de prédiction (Figure 4.1c). Ceci met en évidence l'importance de connaître la proportion de la variance phénotypique qui est due aux gènes, mais également, la proportion de la variance due aux gènes qui est expliquée par les SNP choisis afin d'obtenir un ensemble de prédictions qui fournisse des résultats conformes aux phénotypes observés. En ce moment, les ensembles de prédiction ne tiennent pas en compte quelle proportion de la variance phénotypique est due à l'environnement et ces ensembles ne comportent pas tous les polymorphismes affectant les phénotypes d'intérêt. La proportion du phénotype réellement prédite par ces ensembles est donc inconnue.

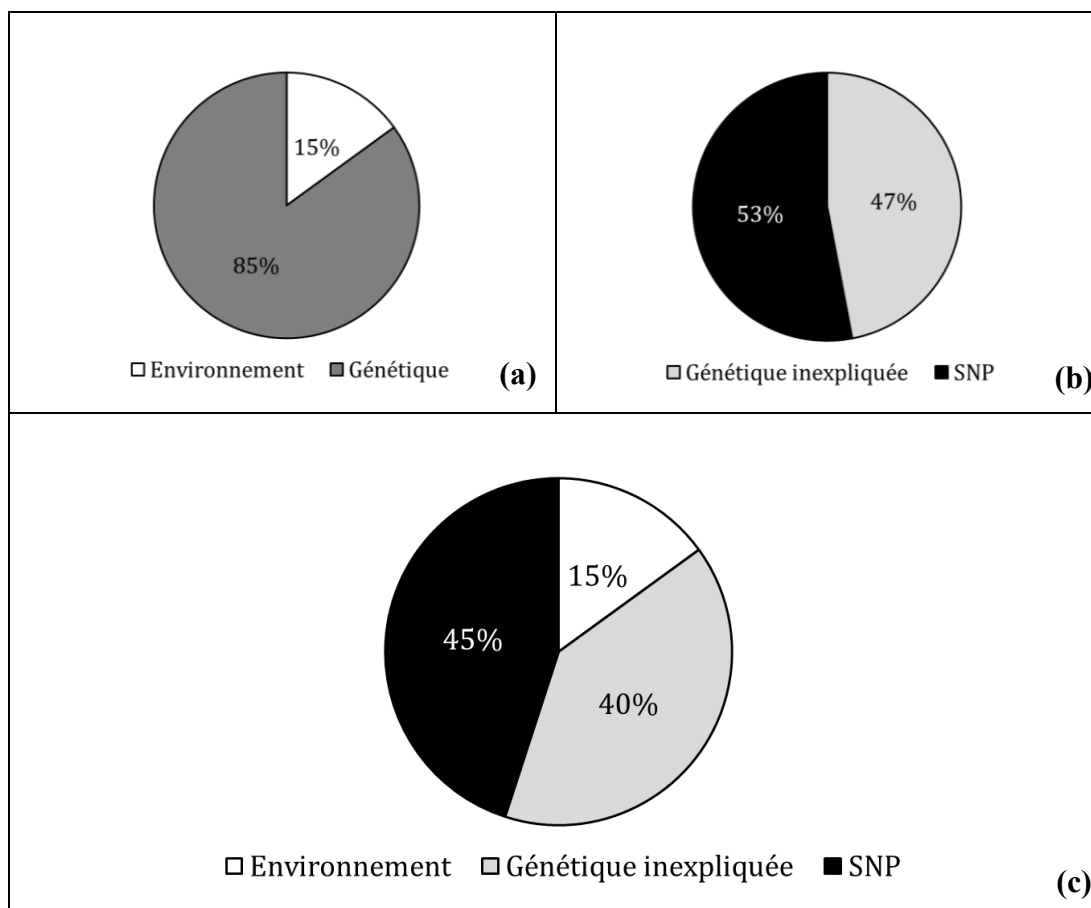


Figure 4.1. Représentation des différents aspects composant la variance phénotypique; (a) La variance phénotypique représente la totalité du diagramme. Elle peut être expliquée par deux composantes, la variance due aux gènes (85%) et celle due à l'environnement (15%); (b) La variance due aux gènes représente la totalité du diagramme. Elle peut être scindée en deux composantes, la variance due aux gènes expliquée par les SNP contenus dans un ensemble de prédiction (53%) et celle qui n'est pas expliquée par les SNP de cet ensemble (47%); (c) La variance phénotypique représente la totalité du diagramme. Elle peut être scindée en trois composantes, la variance due aux gènes qui est expliquée par les SNP de l'ensemble de prédiction (45%), celle qui n'est pas expliquée par les SNP de cet ensemble (40%) et celle due à l'environnement (15%).

Suivant ces constats, il appert que la variance phénotypique attribuable à la génétique et à l'environnement doit être calculée séparément pour chaque population, afin d'estimer le pouvoir prédictif maximal (théorique) que l'on pourrait atteindre si on connaissait et mesurait tous les polymorphismes génétiques impliqués dans la

construction du phénotype. Ceci n'a cependant pas été effectué par les chercheurs à l'origine des ensembles de SNP tel que le HIrisPlex-S. Ceux-ci ce sont plutôt basés sur certaines études qui clament que la variance phénotypique des traits étudiés est majoritairement expliquée par les gènes (en étudiant principalement des paires de jumeaux), sans aller plus en profondeur (ex. Bito *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 2015). Toutefois, bien que la méthode proposée serait la plus idéale à mettre en place, il faut aussi avoir une compréhension réaliste des limites inhérentes au phénotypage par l'ADN. Par exemple, il est déjà accepté que la fiabilité des ensembles de prédiction ne sera jamais parfaite, entre autres puisque la variance phénotypique causée par l'environnement ne pourra jamais être prédite. Ainsi, il impose de reconnaître ses limites et ses incertitudes et de n'utiliser le phénotypage que comme un outil investigatif d'ouverture de possibilité.

4.2.2 Variation génétique populationnelle

Chaque population comporte un bagage génétique qui lui est propre selon son historique, notamment ses mouvements migratoires ainsi que l'apparition de mutations (Hamilton, 2021). Chacune se distingue donc au plan génétique. Certains polymorphismes reliés à des phénotypes seront ainsi plus présents dans certaines populations que d'autres (fréquence allélique). Si ces différents polymorphismes et/ou allèles ont été peu étudiés puisque ceux-ci sont peu présents dans une population pour laquelle un kit aurait été conçu, les prédictions pourront ne pas refléter le véritable phénotype dans une autre population. Par exemple, la couleur de la peau dépend des polymorphismes et allèles présents dans chaque population et certains SNP qui sont importants pour sa prédiction dans l'une, ne le sera pas dans une autre. Concrètement, le SNP rs1426654 dans le gène SLC24A5 explique partiellement ce phénotype dans la population sud-asiatique alors que ce SNP est pratiquement fixé dans les populations asiatiques de l'est et européenne, il ne contribue donc pas à la variation de la couleur de la peau dans ces populations (Canales Serrano, 2020; Stokowski *et al.*, 2007). Un autre exemple concerne la couleur des yeux. Le SNP rs1408799 a été déterminé comme étant utile dans la prédiction de ce phénotype dans la population polonaise (Pospiech *et al.*, 2014), alors que le SNP rs916977 l'est pour la population tchèque (Zidkova *et al.*, 2013) et le SNP rs1800416 l'est seulement dans la population brésilienne (Andrade *et al.*, 2017; Tozzo *et al.*, 2021). Le mieux serait alors d'adapter

chaque ensemble de SNP à chaque population ou obtenir des données complètes sur la fréquence des allèles pour toutes les populations existantes afin de favoriser la justesse des prédictions (Terrado Ortuño & May, 2023).

4.2.3 Classification subjective des phénotypes

La perception des couleurs et des tons ainsi que leur classification mentale varient d'un individu à l'autre, notamment, selon sa génétique (Bimler & Kirkland, 2004; Paramei *et al.*, 2004), qui pourra moduler sa vision, ainsi que son environnement (ex. milieu de vie, culture) (Josserand *et al.*, 2021). Ainsi, un individu d'origine nordique pourrait désigner une peau comme étant « pâle » qu'un autre d'origine plus méridionale classifierait de « très pâle ». Ces divergences de perception pourraient jouer un rôle important lorsqu'il s'agit de repérer un individu ayant un phénotype spécifique de couleur d'yeux, de cheveux ou de peau.

D'un autre côté, la classification subjective représente un défi majeur lors de la création d'ensemble de polymorphismes pour la prédiction des phénotypes pigmentaires puisqu'elle se base sur l'opinion d'un ou de quelques individus et ne tient donc pas en compte l'hétérogénéité des perceptions ainsi que le continuum de couleurs possibles. Quelques recherches ont d'ores et déjà montré que lorsqu'une classification objective était utilisée, c'est-à-dire lorsqu'un logiciel mesurait les couleurs d'une photographie en se basant sur un espace colorimétrique donné, plus de polymorphismes reliés aux phénotypes d'intérêt étaient identifiés (Andersen *et al.*, 2013; Edwards, Cha, Krithika, Johnson, & Parra, 2016; Liu *et al.*, 2010; Norton *et al.*, 2016; Wollstein *et al.*, 2017). Une classification objective pourrait donc permettre de découvrir des polymorphismes ou des interactions génétiques expliquant une plus grande part de la variation phénotypique de couleurs, permettant du même coup d'améliorer la justesse des prédictions, jusqu'à un certain point (cf §4.3).

4.3 Apport global du phénotypage par l'ADN en science forensique et améliorations possibles

Les aspects discutés jusqu'ici soulignent la nécessité de s'interroger sur l'apport global que peut avoir le phénotypage en science forensique. D'une part, le

phénotypage intéresse les policiers de notre étude si sa fiabilité (scientifique, légale et pratique) est démontrée. Toutefois, les prédictions manquent encore de justesse pour plusieurs individus. Par exemple, dans plusieurs cas, le phénotype prédit ne correspondait pas au phénotype réel. En effet, moins de 40% des individus testés dans notre étude étaient bien prédits pour leurs trois phénotypes comparativement à 19,16% dans l'étude de Carratto *et al.* (2019). De plus, comme le souligne Tully (2007), le phénotypage est nécessairement accompagné d'une incertitude provenant de multiples facteurs, notamment l'interaction entre les gènes et l'environnement, l'habileté des criminels à déguiser certains de leurs traits (ex. couleur des cheveux) ainsi que la nature incomplète de l'information génétique utilisée dans les ensembles de prédiction tels que le HIrisPlex-S.

Un autre aspect important à considérer à propos du phénotypage par l'ADN concerne sa légalisation et les balises qui seront ou sont mises en place pour son utilisation. Certains pays ont d'ores et déjà adopté des lois encadrant l'utilisation du phénotypage dans des dossiers d'enquête courants, notamment aux Pays-Bas, en Allemagne, en Slovaquie, dans certains états des États-Unis et, tout récemment, en Suisse (Murphy, 2013; Zieger, 2022). Par exemple, la Suisse permet le recours à l'ADN pour prédire la couleur des yeux, des cheveux et de la peau (ainsi que l'origine biogéographique et l'âge, qui ne sont pas à proprement parler des phénotypes), mais pas d'autres phénotypes. Parmi les règles le régissant, mentionnons que l'ADN analysé doit être jugé comme étant pertinent, c'est-à-dire comme provenant vraisemblablement de l'auteur d'un crime grave. La manière d'interpréter et de rapporter les résultats est également normée. Par exemple, pour la couleur des cheveux, les deux prédictions les plus élevées doivent être données aux enquêteurs suisses (Castella, 2023). Cette approche est prudente et conservatrice dans un contexte où le phénotypage donne des prédictions qui sont erronées dans plusieurs cas lorsqu'une seule couleur est choisie comme résultat final. Cependant, fournir les deux prédictions les plus élevées pour chaque phénotype réduit l'intérêt d'utiliser cet outil puisque les résultats deviennent beaucoup moins discriminants, en d'autres termes, ils incluent beaucoup plus d'individus. Il revient alors aux policiers et aux autres intervenants impliqués dans la prise de décision et l'exécution de balancer les avantages et les inconvénients d'utiliser cet outil et ce, pour chaque dossier.

On peut donc se demander s'il ne serait pas mieux d'améliorer la justesse des prédictions avant d'offrir le service. Ainsi, comment diminuer l'incertitude de la prédiction des phénotypes, ou du moins, mieux la mesurer, pour que son utilisation en science forensique soit bénéfique ? Je suggérerais, dans un premier temps, de revoir complètement la méthodologie utilisée pour développer les kits de marqueurs génétiques servant à la prédiction. Il serait tout d'abord souhaitable d'estimer, pour chaque phénotype, la portion de sa variance attribuable à la génétique puis à l'environnement, et ce, séparément pour chaque population. Cette étape est incontournable puisqu'elle permettrait d'évaluer : 1) si la portion environnementale est plus importante que celle génétique, rendant donc beaucoup moins intéressante la prédiction du phénotype à partir de l'ADN seulement, et 2) quelle portion peut-on espérer pouvoir prédire à partir de l'ADN seulement, tout en conservant en tête les limites de cet outil et son rôle purement investigatif. Ne pas effectuer cette étape cruciale correspond à sciemment ignorer les principes fondamentaux de la génétique quantitative. Une fois cette dernière étape effectuée, il serait alors important d'évaluer si le phénotypage est d'un quelconque intérêt forensique dans la population ciblée. Si cet intérêt est validé, il reste à se demander s'il vaut la peine de chercher des SNP supplémentaires afin d'affiner les prédictions ou bien de ne conserver que ceux avec le plus grand effet sur le phénotype (Terrado Ortuño & May, 2023). En effet, ces derniers sont souvent les premiers découverts, mais reste-t-il pertinent de perdre temps et argent en cherchant des SNP qui ont peu d'effet sur le phénotype final ? Dans certains cas, la réponse pourrait être affirmative. Dans ces cas, il nécessite alors d'utiliser une méthode reproductible, principalement lors de la désignation des phénotypes pour chaque participant inclus, afin de bâtir les ensembles de prédiction. Pour le moment, l'élaboration de ces derniers est basée sur une classification subjective, qui peut donc varier d'une personne à l'autre. De plus, une réflexion sur l'analyse statistique des données s'impose afin de créer des modèles adaptés à la prédiction de données continues qui permettront de maximiser la justesse des prédictions.

Dans un second temps, il est primordial de mettre en place des ressources et des formations adaptées afin que les policiers utilisent le phénotypage par l'ADN de façon éclairée, en toute conscience de ses limites, possibilités réelles et objectif recherché.

4.4 Limites de la recherche

La recherche présentée dans ce mémoire comporte quelques limites qui sont décrites ci-après. Pour la première partie, soit celle questionnant l'utilité du phénotypage dans un contexte forensique, il est important de mentionner que le questionnaire en ligne utilisé limite la collecte de détails additionnels dans le cas où la réponse d'un participant est très courte ou manque de clarté, même si des espaces pour permettre le développement des réponses étaient fournis. Également, les participants de cette recherche ne représentent pas tous les corps policiers dans la province de Québec, leur connaissance et leur opinion face au phénotypage ne représente donc pas nécessairement celles d'autres corps de police québécois, canadiens ou d'autres pays. De plus, un risque inhérent à ce type de recherche est que le participant puisse toujours répondre selon ce qu'il devrait dire aux vues de son titre d'emploi (ex. si son institution a un avis favorable sur le phénotypage, il pourrait adhérer à cette vision plutôt qu'à la sienne) ou bien selon sa perception de ce que le chercheur aimerait entendre. Pour ce qui est de la deuxième partie, soit celle sur la justesse du phénotypage, une de ses limites réside dans le fait que la couleur des cheveux de certains participants a dû être estimée via une charte de couleur puisque ces derniers avaient les cheveux teints, gris ou ils étaient chauves (38/139; 27,3%). De plus, notre échantillon ne possédait pas beaucoup de participants pour certaines couleurs de cheveux (roux et noirs) et de peau (foncée et très foncée).

4.5 Perspectives de recherches futures

Au-delà des points d'intérêt mentionnés plus haut, des enjeux éthiques et légaux devront être examinés (MacLean & Lamparello, 2014). Citons en exemple le risque de prédiction de caractères sensibles, tels que la prédisposition à certaines maladies, lors de la prédiction des phénotypes (Bradbury *et al.*, 2019). Il est impératif d'établir des lois et règlements qui encadreront le phénotypage par l'ADN afin que certaines barrières éthiques ou légales ne soient pas franchies. L'acceptation de cet outil par la population pourrait également être importante. Par exemple, des voix ont déjà manifesté leur désaccord en lien avec son utilisation dans un dossier d'agression sexuelle à Edmonton, où la démarche a été qualifiée de raciste. La police avait alors dû présenter ses excuses publiquement (CBC News, 2022). Une étude récente a même

déjà montré que l'utilisation du phénotypage peut exacerber de manière involontaire des effets discriminatoires, raciaux et racistes (Bartram *et al.*, 2022). Il serait ainsi pertinent de s'interroger à quel point cette acceptation sera cruciale dans l'utilisation du phénotypage par l'ADN. En d'autres termes, une opinion défavorable de cet outil pourrait telle faire en sorte de ne pas utiliser celui-ci dans certains, voire tous les dossiers ?

Un autre questionnement soulevé par ce sujet de recherche est la manière de divulguer les résultats afin de maximiser la reconnaissance par le plus grand nombre de personnes. Lorsqu'un individu est recherché dans une population par d'autres individus via ses caractéristiques pigmentaires, nous pourrions penser que la classification subjective soit nécessaire. En effet, une personne recherchera, par exemple, des yeux bleus, et non pas des valeurs situées dans un espace colorimétrique, comme le CMYK (cyan, magenta, jaune et noir), qui peut être utilisé pour classifier objectivement la couleur d'un phénotype (Sawicki & Miziolek, 2015). Une piste de solution serait possiblement d'utiliser une classification objective et quantitative lors du développement d'ensembles de prédiction, puis d'associer aux valeurs de l'espace colorimétrique utilisé lors du développement des « couleurs-types » afin de faciliter la transition vers le public ou la police. Par exemple, une valeur CMYK de 0,15,30,0 pour la couleur de la peau serait associée à une ou des photographies de peau qui représentent ces valeurs, sans avoir à classifier cette couleur comme pâle ou autre. Seules les couleurs-types pourraient être affichées afin que chaque personne puisse observer la couleur représentée et conclure par elle-même sur la couleur recherchée selon celle qu'elle perçoit. Ceci éviterait le processus subjectif de nommer la couleur représentée et serait donc un avantage puisque, comme énoncé plus haut, la définition d'une peau pâle et d'une peau foncée varie d'une population à l'autre et d'une personne à l'autre. Autrement dit, le portrait parlé du type « yeux bleus, cheveux bruns, peau pâle » conserve une couche de subjectivité puisque c'est alors à chaque personne de se faire une idée à quoi ressemblent ces couleurs selon sa propre perception de ces dernières. La diffusion de photographies-types seraient donc la manière la plus objective et précise de divulguer les résultats.

Il importe également de mieux comprendre le lien entre les polymorphismes découverts et les phénotypes d'intérêt. En effet, le SNP découvert peut être relié à une autre caractéristique qui influence le phénotype. Par exemple, certains SNP identifiés pour prédire la couleur de la peau peuvent simplement refléter le degré de métissage d'une personne, sans être associés à des gènes ayant un effet causal sur le phénotype (Cerqueira *et al.*, 2014). Dans ce cas, il peut s'avérer difficile de savoir dans quelle mesure une prédiction devrait se rapporter au métissage ou au phénotype lui-même.

La discrimination des phénotypes ainsi que le contexte d'utilisation sont aussi des perspectives essentielles à explorer. En effet, les résultats obtenus pourront ne pas aider une enquête si le phénotype prédit est très répandu dans la population d'intérêt¹. Par exemple, si le phénotypage prédit « yeux bruns », « cheveux noirs » et « peau très foncée », cela serait peu discriminant dans une population où ces couleurs sont très majoritaires (Schneider *et al.*, 2019). Plus spécifiquement, le pouvoir discriminant, c'est-à-dire la probabilité que, en tirant deux individus au hasard dans une population d'intérêt, leur couleur soit différente pour un phénotype donné, doit être élevé pour être le plus intéressant. Bien qu'une information supplémentaire dans une enquête soit toujours d'intérêt, si elle donne un résultat commun dans la population, son utilité est réduite. De plus, puisque le phénotypage est assez coûteux présentement (prix de base d'environ 1500\$ auquel peut s'ajouter des compléments de plusieurs centaines de dollars (T. Shaw, communication personnelle, 2 février 2024)), il faut alors réfléchir à la balance coût-bénéfice pour chaque situation afin de faire le choix d'utiliser cet outil ou non. Le contexte du cas sous investigation doit donc être pris en compte. Entre autres, un résultat de phénotypage pourrait être utile à des fins de priorisation, notamment si on cherche l'auteur du crime parmi un groupe de suspects identifiés par la police et présentant des couleurs de cheveux, d'yeux et/ou de peau différente. Par exemple, si deux suspects ont les yeux bruns et un a les yeux bleus, et que le phénotypage donne une prédiction de yeux bleus, peut-être que l'individu aux yeux bleus pourrait être investigué en priorité, sans pour autant éliminer les autres individus

¹ La population d'intérêt en science forensique réfère à la population suspectable, c'est-à-dire la population dans laquelle l'auteur du crime est considéré appartenir. Elle peut être plus ou moins grande selon les informations contenues au dossier et ne se limite pas aux individus vivant dans un même pays ou une même ville. Par exemple, elle pourrait être constituée de tout individu de plus de six pieds si des caméras de surveillance ont capté son crime et la taille de l'individu.

de la liste des suspects. À l'inverse, si ces individus ont tous les mêmes caractéristiques physiques, il serait moins pertinent d'utiliser cet outil dans ce contexte (bien que dépendamment du contexte, il peut toujours s'avérer utile et intéressant, par exemple, si le phénotypage permet de rediriger une enquête vers d'autres suspects, mais ceci étant conditionnel à la justesse de la prédiction). La pré-évaluation des analyses possibles et pertinentes pour chaque cas est donc importante. De plus, la prise en compte des autres éléments de l'enquête en conjonction des résultats du phénotypage demeure essentielle.

Pour aller plus loin, il serait finalement intéressant de vérifier si le phénotypage est bel et bien utile dans des crimes réels, c'est-à-dire s'il permet effectivement d'aider dans l'enquête. Par exemple, le résultat de phénotypage obtenu dans certains dossiers a-t-il permis de faire progresser l'enquête ou, minimalement, a-t-il offert de nouvelles pistes ? Selon la présente étude, l'outil intéresse les policiers québécois mais ceux-ci ont eu très peu de contact avec celui-ci jusqu'à présent. Une analyse coût-bénéfice serait donc intéressante à faire à partir de cas criminels réels. De plus, il serait important de s'interroger sur les coûts engendrés, autant monétaire que matériel et judiciaire, par une enquête accordant trop de confiance à une prédiction phénotypique erronée. En premier lieu, cela constituerait une perte monétaire puisque l'information obtenue serait fautive. Considérant que certaines compagnies demandent présentement environ 1500\$ et plus pour obtenir la prédiction de la couleur des yeux, des cheveux, de la peau, de la présence de taches de rousseur et de l'origine biogéographique pour un seul échantillon (T. Shaw, communication personnelle, 2 février 2024), cette dépense n'est pas négligeable. En deuxième lieu, l'utilisation de cette information incorrecte pourrait possiblement mener à une mobilisation de ressources humaines inutile, à l'impossibilité de résoudre une enquête, ou même, dans le pire des cas, à l'arrestation d'une personne innocente. Une fois ces coûts mieux définis, cela permettrait d'aviser de manière éclairée les policiers quant aux risques d'utiliser cet outil et permettrait d'éviter de donner un poids excessif à ce type d'information.

4.6 Conclusion générale

L'objectif général de ce projet était de vérifier si le phénotypage tel qu'il est présenté aujourd'hui peut servir en science forensique en s'intéressant à deux aspects

principaux : le besoin opérationnel au niveau des policiers ainsi que la justesse de l'outil au niveau scientifique. Bien que notre recherche ait validé l'intérêt des policiers à utiliser cet outil, ceux-ci manquent de connaissance le concernant. De plus, la fiabilité générale d'un outil, qui passe entre autres par l'aspect scientifique selon eux (c'est-à-dire que des études scientifiques ont testé celui-ci et le taux d'erreur est faible), est importante afin de l'utiliser dans leur enquête, mais comme le deuxième aspect du projet l'indique, le phénotypage par l'ADN manque de fiabilité puisque moins de 40% des individus étaient bien prédits pour leurs trois phénotypes. De même, pris séparément, le taux de couleurs bien prédites ne s'élève qu'à 55,4%, 66,2% et 71,8% respectivement pour la couleur des yeux, des cheveux et de la peau en utilisant les seuils et guides fournis avec le HIrisPlex-S. Cet état de fait dessine un portrait du phénotypage qui comporte plusieurs lacunes et qui montre la nécessité de poursuivre les recherches sur les phénotypes et leur prédiction avant de l'utiliser plus largement dans des dossiers courants. Ces résultats renforcent également la conclusion que le phénotypage devrait seulement être utilisé dans un contexte investigatif, et non pas dans un contexte de structuration de la preuve.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adhikari, K., Mendoza-Revilla, J., Sohail, A., Fuentes-Guajardo, M., Lampert, J., Chacón-Duque, J. C., . . . Ruiz-Linares, A. (2019). A GWAS in Latin Americans highlights the convergent evolution of lighter skin pigmentation in Eurasia. *Nature Communications*, *10*(1), 358. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08147-0>
- Al-Rashedi, N. A. M., Mandal, A. M., & Alobaidi, L. A. H. (2020). Eye color prediction using the IrisPlex system: a limited pilot study in the Iraqi population. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, *10*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s41935-020-00200-8>
- Alghamdi, J., Amoudi, M., Kassab, A., Al Mufarrej, M., & Al Ghamdi, S. (2019). Eye color prediction using single nucleotide polymorphisms in Saudi population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1607-1612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.011>
- Allwood, J. S., & Harbison, S. (2013). SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Science International: Genetics*, *7*(4), 444-452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.03.005>
- Amorim, A. (2019). Nonhuman forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *7*(1), 44-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.019>
- Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Christoffersen, S. R., Delgado, M. C., Henriksen, S. T., . . . Morling, N. (2013). Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Science International: Genetics*, *7*(5), 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.003>
- Andersen, J. D., Pietroni, C., Johansen, P., Andersen, M. M., Pereira, V., Borsting, C., & Morling, N. (2016). Importance of nonsynonymous OCA2 variants in human eye color prediction. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *4*(4), 420-430. <https://doi.org/10.1002/mgg3.213>
- Andrade, E. S., Fracasso, N. C. A., Strazza Júnior, P. S., Simões, A. L., & Mendes-Junior, C. T. (2017). Associations of OCA2-HERC2 SNPs and haplotypes with human pigmentation characteristics in the Brazilian population. *Legal Medicine*, *24*, 78-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.12.003>
- Anker, R., Steinbrueck, T., & Donis-Keller, H. (1992). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Human Molecular Genetics*, *1*(2), 137. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.2.137>
- Bartram, I., Plümecke, T., & Schultz, S. (2022). Genetic Racial Profiling: Extended DNA Analyses and Entangled Processes of Discrimination. *Science & Technology Studies*, *35*(3), 44-69. <https://doi.org/doi:10.23987/sts.101384>
- Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). (2004). *Gene [Internet]*. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
- Bimler, D., & Kirkland, J. (2004). Twins and odd-ones-out: a twin study of genetic contributions to variability in personal colour space. *Clinical & Experimental Optometry*, *87*(4-5), 313-321. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2004.tb05060.x>

- Bito, L. Z., Matheny, A., Cruickshanks, K. J., Nondahl, D. M., & Carino, O. B. (1997). Eye color changes past early childhood. The Louisville Twin Study. *Archives of Ophthalmology*, 115(5), 659-663. <https://doi.org/10.1001/archophth.1997.01100150661017>
- Blais, M., & Martineau, S. (2006). L'analyse inductive générale : description d'une démarche visant à donner un sens à des données brutes. *Recherches qualitatives*, 26(2), 1-18. <https://doi.org/https://doi.org/10.7202/1085369ar>
- Bonilla, C., Boxill, L. A., Donald, S. A., Williams, T., Sylvester, N., Parra, E. J., . . . Kittles, R. A. (2005). The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans. *Human Genetics*, 116(5), 402-406. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1251-2>
- Børsting, C., & Morling, N. (2013). Single-Nucleotide Polymorphisms. In J. A. Siegel, P. J. Saukko, & M. M. Houck (Eds.), *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)* (pp. 233-238). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00042-8>
- Box, N. F., Wyeth, J. R., O'Gorman, L. E., Martin, N. G., & Sturm, R. A. (1997). Characterization of Melanocyte Stimulating Hormone Receptor Variant Alleles in Twins with Red Hair. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1891-1897. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.11.1891>
- Bradbury, C., Kottgen, A., & Staubach, F. (2019). Off-target phenotypes in forensic DNA phenotyping and biogeographic ancestry inference: A resource. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.10.010>
- Branicki, W., Brudnik, U., Draus-Barini, J., Kupiec, T., & Wojas-Pelc, A. (2008). Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation. *Journal of Human Genetics*, 53(11-12), 966-971. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0338-3>
- Branicki, W., Brudnik, U., Kupiec, T., Wolanska-Nowak, P., Szczerbinska, A., & Wojas-Pelc, A. (2008). Association of polymorphic sites in the OCA2 gene with eye colour using the tree scanning method. *Annals of Human Genetics*, 72(Pt 2), 184-192. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2007.00407.x>
- Branicki, W., Brudnik, U., Kupiec, T., Wolanska-Nowak, P., & Wojas-Pelc, A. (2007). Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *Journal of Forensic Sciences*, 52(2), 349-354. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00361.x>
- Branicki, W., Brudnik, U., & Wojas-Pelc, A. (2009). Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype. *Annals of Human Genetics*, 73(2), 160-170. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2009.00504.x>
- Branicki, W., Liu, F., van Duijn, K., Draus-Barini, J., Pośpiech, E., Walsh, S., . . . Kayser, M. (2011). Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Human Genetics*, 129(4), 443-454. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0939-8>
- Bräuer, G., & Chopra, V. P. (1980). Estimating the heritability of hair colour and eye colour. *Journal of Human Evolution*, 9(8), 625-630. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0047-2484\(80\)90094-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0047-2484(80)90094-9)
- Breslin, K., Wills, B., Ralf, A., Ventayol Garcia, M., Kukla-Bartoszek, M., Pospiech, E., . . . Kayser, M. (2019). HRisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two

- common forensically used platforms. *Forensic Science International: Genetics*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102152>
- Brown, W. M. (1981). Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 361, 119-134. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1981.tb46515.x>
- Bulbul, O., & Filoglu, G. (2018). Development of a SNP panel for predicting biogeographical ancestry and phenotype using Massively Parallel Sequencing. *ELECTROPHORESIS*, 39. <https://doi.org/10.1002/elps.201800243>
- Bulbul, O., Filoglu, G., Altuncul, H., Aradas, A. F., Ruiz, Y., Fondevila, M., . . . Schneider, P. M. (2011). A SNP multiplex for the simultaneous prediction of biogeographic ancestry and pigmentation type. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e500-e501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.10.001>
- Bulbul, O., Zorlu, T., & Filoglu, G. (2018). Prediction of human eye colour using highly informative phenotype SNPs (PISNPs). *Australian Journal of Forensic Sciences*, 1-11. <https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1484161>
- Butler, J. M. (2010). Basics of DNA Biology and Genetics. In *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp. 19-41). Academic Press.
- Butler, J. M. (2012b). Short Tandem Repeat (STR) Loci and Kits. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology* (pp. 99-139). Academic Press.
- Canales Serrano, A. (2020). Forensic DNA phenotyping: A promising tool to aid forensic investigation. Current situation. *Spanish Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.remle.2020.01.002>
- Candille, S. I., Absher, D. M., Beleza, S., Bauchet, M., McEvoy, B., Garrison, N. A., . . . Shriver, M. D. (2012). Genome-wide association studies of quantitatively measured skin, hair, and eye pigmentation in four European populations. *PloS One*, 7(10), e48294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048294>
- Carracedo, A. (2013). Forensic Genetics: History. In M. M. Houck (Ed.), *Forensic Biology*.
- Carratto, T., Marcorin, L., Debortoli, G., Silva, G., Fracasso, N., Oliveira, M., . . . Mendes-Junior, C. (2019). Evaluation of the HIrisPlex-S system in a Brazilian population sample. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 794-796. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.180>
- Carratto, T. M. T., Marcorin, L., do Valle-Silva, G., de Oliveira, M. L. G., Donadi, E. A., Simões, A. L., . . . Mendes-Junior, C. T. (2021). Prediction of eye and hair pigmentation phenotypes using the HIrisPlex system in a Brazilian admixed population sample. *International Journal of Legal Medicine*, 135(4), 1329-1339. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02554-7>
- Castella, V. (2023). Génétique forensique investigative et phénotypage en Suisse. 30ème réunion annuelle, Montreal.
- CBC News. (2022). Edmonton police issue apology for controversial use of DNA phenotyping. *CBC News*. <https://www.cbc.ca/news/canada/edmonton/edmonton-police-issue-apology-for-controversial-use-of-dna-phenotyping-1.6608457>
- Cerqueira, C. C. S. d., Hünemeier, T., Gomez-Valdés, J., Ramallo, V., Volasko-Krause, C. D., Barbosa, A. A. L., . . . for, C. (2014). Implications of the Admixture Process in Skin Color Molecular Assessment. *PloS One*, 9(5), e96886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096886>

- Chaitanya, L., Breslin, K., Z S., Wirken, L., Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., . . . Walsh, S. (2018). The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Science International: Genetics*, 35, 123-135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>
- Chaitanya, L., Pajnič, I. Z., Walsh, S., Balažic, J., Zupanc, T., & Kayser, M. (2017). Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HIrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 26, 48-57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.10.004>
- Chaitanya, L., Walsh, S., Andersen, J. D., Ansell, R., Ballantyne, K., Ballard, D., . . . Kayser, M. (2014). Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.006>
- Chambers, G., & MacAvoy, E. (2000). Microsatellites: Consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126, 455-476. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00233-9)
- Chen, Y., Hysi, P., Maj, C., Heilmann-Heimbach, S., Spector, T. D., Liu, F., & Kayser, M. (2023). Genetic prediction of male pattern baldness based on large independent datasets. *European Journal of Human Genetics*, 31(3), 321-328.
- Clark, P., Stark, A. E., Walsh, R. J., Jardine, R., & Martin, N. G. (1981). A twin study of skin reflectance. *Annals of Human Biology*, 8(6), 529-541. <https://doi.org/10.1080/03014468100005371>
- Corte-Real, F. (2004). Forensic DNA databases. *Forensic Science International*, 146 Suppl, S143-144. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.043>
- Crawford, N. G., Kelly, D. E., Hansen, M. E. B., Beltrame, M. H., Fan, S., Bowman, S. L., . . . Tishkoff, S. A. (2017). Loci associated with skin pigmentation identified in African populations. *Science*, 358(6365), eaan8433. <https://doi.org/10.1126/science.aan8433>
- Crispino, F., Ribaux, O., Houck, M., & Margot, P. (2011). Forensic science – A true science? *Australian Journal of Forensic Sciences*, 43(2-3), 157-176. <https://doi.org/10.1080/00450618.2011.555416>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M R., Armean, Irina M., . . . Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Dabas, P., Jain, S., Khajuria, H., & Nayak, B. P. (2022). Forensic DNA phenotyping: Inferring phenotypic traits from crime scene DNA. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 88, 102351. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2022.102351>
- Dario, P., Mourino, H., Oliveira, A. R., Lucas, I., Ribeiro, T., Porto, M. J., . . . Corte Real, F. (2015). Assessment of IrisPlex-based multiplex for eye and skin color prediction with application to a Portuguese population. *International Journal of Legal Medicine*, 129(6), 1191-1200. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1248-5>
- Dash, H. R., Vajpayee, K., & Agarwal, R. (2021). A Glimpse of Famous Cases in History Solved by DNA Typing. In H. R. Dash, P. Shrivastava, & J. A. Lorente (Eds.), *Handbook of DNA Profiling*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-9364-2_14-1
- de Araújo Lima, F., de Toledo Gonçalves, F., & Fridman, C. (2015). SLC24A5 and ASIP as phenotypic predictors in Brazilian population for forensic purposes.

- Legal Medicine*, 17(4), 261-266.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.03.001>
- de la Puente, M., Ruiz-Ramírez, J., Ambroa-Conde, A., Xavier, C., Pardo-Seco, J., Álvarez-Dios, J., . . . on behalf of the, V. C. (2021). Development and Evaluation of the Ancestry Informative Marker Panel of the VISAGE Basic Tool. *Genes*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/genes12081284>
- Dembinski, G. M., & Picard, C. J. (2014). Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 111-117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.003>
- Draus-Barini, J., Walsh, S., Pośpiech, E., Kupiec, T., Głab, H., Branicki, W., & Kayser, M. (2013). Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-3>
- Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Chen, W., Zhao, Z. Z., Le, L., James, M. R., . . . Sturm, R. A. (2007). A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation. *American Journal of Human Genetics*, 80(2), 241-252. <https://doi.org/10.1086/510885>
- Edwards, M., Cha, D., Krithika, S., Johnson, M., Cook, G., & Parra, E. J. (2016). Iris pigmentation as a quantitative trait: variation in populations of European, East Asian and South Asian ancestry and association with candidate gene polymorphisms. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(2), 141-162.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.12435>
- Edwards, M., Cha, D., Krithika, S., Johnson, M., & Parra, E. J. (2016). Analysis of iris surface features in populations of diverse ancestry. *Royal Society Open Science*, 3(1), 150424. <https://doi.org/10.1098/rsos.150424>
- Eiberg, H., & Mohr, J. (1996). Assignment of genes coding for brown eye colour (BEY2) and brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q. *European Journal of Human Genetics*, 4(4), 237-241. <https://doi.org/10.1159/000472205>
- Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., Kjaer, K. W., & Hansen, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Human Genetics*, 123(2), 177-187.
<https://doi.org/10.1007/s00439-007-0460-x>
- Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics* (4th ed.). Pearson.
- Flanagan, N., Healy, E., Ray, A., Philips, S., Todd, C., Jackson, I. J., . . . Rees, J. L. (2000). Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Human Molecular Genetics*, 9(17), 2531-2537.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2531>
- Fracasso, N. C. d. A., de Andrade, E. S., Wiezel, C. E. V., Andrade, C. C. F., Zanão, L. R., da Silva, M. S., . . . Mendes-Junior, C. T. (2017). Haplotypes from the SLC45A2 gene are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil. *Legal Medicine*, 25, 43-51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.12.013>
- Frégeau, C. J. (2021). Validation of the Verogen ForenSeq™ DNA Signature Prep kit/Primer Mix B for phenotypic and biogeographical ancestry predictions using the Micro MiSeq® Flow Cells. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102533. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102533>

- Frisancho, A. R., Wainwright, R., & Way, A. (1981). Heritability and components of phenotypic expression in skin reflectance of Mestizos from the Peruvian Lowlands. *American Journal of Physical Anthropology*, 55(2), 203-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajpa.1330550207>
- Frudakis, T. (2016). Phenotype. In A. Jamieson & S. Bader (Eds.), *A Guide to Forensic DNA Profiling*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470061589.fsa598>
- Frudakis, T., Terravainen, T., & Thomas, M. (2007). Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. *Human Genetics*, 122(3-4), 311-326. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0401-8>
- Frudakis, T., Thomas, M., Gaskin, Z., Venkateswarlu, K., Chandra, K. S., Ginjupalli, S., . . . Ponnuswamy, K. N. (2003). Sequences associated with human iris pigmentation. *Genetics*, 165(4), 2071-2083. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1462887/pdf/14704187.pdf>
- Gallagher, M. D., & Chen-Plotkin, A. S. (2018). The Post-GWAS Era: From Association to Function. *American Journal of Human Genetics*, 102(5), 717-730. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.04.002>
- Gannett, L. (2014). Biogeographical ancestry and race. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 47, 173-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2014.05.017>
- Gettings, K. B., Lai, R., Johnson, J. L., Peck, M. A., Hart, J. A., Gordish-Dressman, H., . . . Podini, D. S. (2014). A 50-SNP assay for biogeographic ancestry and phenotype prediction in the U.S. population. *Forensic Science International: Genetics*, 8(1), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.010>
- Gibson, G. (2012). Rare and common variants: twenty arguments. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 135-145. <https://doi.org/10.1038/nrg3118>
- Gill, P., Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318(6046), 577-579. <https://doi.org/10.1038/318577a0>
- Graf, J., Hodgson, R., & van Daal, A. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Human Mutation*, 25(3), 278-284. <https://doi.org/10.1002/humu.20143>
- Graf, J., Voisey, J., Hughes, I., & van Daal, A. (2007). Promoter polymorphisms in the MATP (SLC45A2) gene are associated with normal human skin color variation. *Human Mutation*, 28(7), 710-717. <https://doi.org/10.1002/humu.20504>
- Graham, E. A. M. (2008). DNA reviews: predicting phenotype. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 4(3), 196-199. <https://doi.org/10.1007/s12024-008-9056-6>
- Granja, R., & Machado, H. (2020). Forensic DNA phenotyping and its politics of legitimation and contestation: Views of forensic geneticists in Europe. *Social Studies of Science*, 306312720945033. <https://doi.org/10.1177/0306312720945033>
- Granja, R., Machado, H., & Queirós, F. (2020). The (De)materialization of Criminal Bodies in Forensic DNA Phenotyping. *Body & Society*, 27(1), 60-84. <https://doi.org/10.1177/1357034X20919168>
- Green, R., Elliott, J. L., Norona, W., Go, F., Nguyen, V. T., Ge, J., . . . Zhong, C. (2021). Developmental validation of VeriFiler™ Plus PCR Amplification Kit: A 6-dye multiplex assay designed for casework samples. *Forensic Science*

- International: Genetics*, 53, 102494.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102494>
- Greenspoon, S. A., Ban, J. D., Pablo, L., Crouse, C. A., Kist, F. G., Tomsey, C. S., . . . Schumm, J. W. (2004). Validation and implementation of the PowerPlex 16 BIO System STR multiplex for forensic casework. *Journal of Forensic Sciences*, 49(1), 71-80.
- Grimes, E. A., Noake, P. J., Dixon, L., & Urquhart, A. (2001). Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Science International*, 122(2-3), 124-129.
[https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00480-7](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00480-7)
- Guenther, C. A., Tasic, B., Luo, L., Bedell, M. A., & Kingsley, D. M. (2014). A molecular basis for classic blond hair color in Europeans. *Nature Genetics*, 46(7), 748-752. <https://doi.org/10.1038/ng.2991>
- Guo, F., Yu, J., Zhang, L., & Li, J. (2017). Massively parallel sequencing of forensic STRs and SNPs using the Illumina(®) ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit on the MiSeq FGx™ Forensic Genomics System. *Forensic Science International: Genetics*, 31, 135-148.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.003>
- Hamilton, M. B. (2021). *Population Genetics* (2nd ed.). Wiley.
- Han, J., Kraft, P., Nan, H., Guo, Q., Chen, C., Qureshi, A., . . . Hunter, D. J. (2008). A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genetics*, 4(5), e1000074.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000074>
- Hardy, J., & Singleton, A. (2009). Genomewide Association Studies and Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 360(17), 1759-1768.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0808700>
- Hart, K. L., Kimura, S. L., Mushailov, V., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croatian Medical Journal*, 54(3), 248-256. <https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.248>
- Heidegger, A., Pisarek, A., de la Puente, M., Niederstätter, H., Pośpiech, E., Woźniak, A., . . . Parson, W. (2022). Development and inter-laboratory validation of the VISAGE enhanced tool for age estimation from semen using quantitative DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 56, 102596.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102596>
- Heidegger, A., Xavier, C., Niederstätter, H., de la Puente, M., Pośpiech, E., Pisarek, A., . . . Parson, W. (2020). Development and optimization of the VISAGE basic prototype tool for forensic age estimation. *Forensic Science International: Genetics*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102322>
- Hepple, B. (2009). Forensic databases: implications of the cases of S and Marper. *Medicine, Science and the Law*, 49(2), 77-87.
<https://doi.org/10.1258/rsmmsl.49.2.77>
- Hernandez-Pacheco, N., Flores, C., Alonso, S., Eng, C., Mak, A. C., Hunstman, S., . . . Pino-Yanes, M. (2017). Identification of a novel locus associated with skin colour in African-admixed populations. *Scientific Reports*, 7, 44548.
<https://doi.org/10.1038/srep44548>
- Hernando, B., Ibarrola-Villava, M., Fernandez, L. P., Pena-Chilet, M., Llorca-Cardenosa, M., Oltra, S. S., . . . Ribas, G. (2016). Sex-specific genetic effects associated with pigmentation, sensitivity to sunlight, and melanoma in a population of Spanish origin. *Biology of Sex Differences*, 7, 17.
<https://doi.org/10.1186/s13293-016-0070-1>

- Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>
- Illumina. (2017). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology* https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Illumina (s.d.). *Images for general use*. Retrieved 28/05/2023 from <https://www.illumina.com/company/news-center/multimedia-images.html>
- Illumina Knowledge. (2023). *Illumina adapter portfolio*. Retrieved 28/05/2023 from https://knowledge.illumina.com/library-preparation/general/library-preparation-general-reference_material-list/000003275
- Imesch, P. D., Wallow, I. H. L., & Albert, D. M. (1997). The color of the human eye: A review of morphologic correlates and of some conditions that affect iridial pigmentation. *Survey of Ophthalmology*, 41, S117-S123. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(97\)80018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0039-6257(97)80018-5)
- Iyengar, S. K., & Elston, R. C. (2007). The genetic basis of complex traits: rare variants or "common gene, common disease"? *Methods in Molecular Biology*, 376, 71-84. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-389-9_6
- Jeffreys, A. J., Brookfield, J. F., & Semeonoff, R. (1985). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317(6040), 818-819. <https://doi.org/10.1038/317818a0>
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neumann, R., & Keyte, J. (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 10953-10971. <https://doi.org/10.1093/nar/16.23.10953>
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985a). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73. <https://doi.org/10.1038/314067a0>
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985b). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79. <https://doi.org/10.1038/316076a0>
- Jensen, A. R. (1967). Estimation of the limits of heritability of traits by comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58(1), 149-156. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.58.1.149>
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5(10), 739-751. <https://doi.org/10.1038/nrg1455>
- Johansen, P., Andersen, J. D., Madsen, L. N., Ullum, H., Glud, M., Borsting, C., . . . Morling, N. (2016). Pigmentary Markers in Danes--Associations with Quantitative Skin Colour, Nevi Count, Familial Atypical Multiple-Mole, and Melanoma Syndrome. *PLoS One*, 11(3), e0150381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150381>
- Jonnalagadda, M., Faizan, M. A., Ozarkar, S., Ashma, R., Kulkarni, S., Norton, H. L., & Parra, E. (2019). A Genome-Wide Association Study of Skin and Iris Pigmentation among Individuals of South Asian Ancestry. *Genome Biology and Evolution*, 11(4), 1066-1076. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz057>
- Josserand, M., Meeussen, E., Majid, A., & Dediu, D. (2021). Environment and culture shape both the colour lexicon and the genetics of colour perception. *Scientific Reports*, 11(1), 19095. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98550-3>
- Junker, K., Staadig, A., Sidstedt, M., Tillmar, A., & Hedman, J. (2019). Phenotype prediction accuracy – A Swedish perspective. *Forensic Science International*:

- Genetics Supplement Series*, 7(1), 384-386.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.022>
- Kanetsky, P. A., Swoyer, J., Panossian, S., Holmes, R., Guerry, D., & Rebbeck, T. R. (2002). A Polymorphism in the Agouti Signaling Protein Gene Is Associated with Human Pigmentation. *The American Journal of Human Genetics*, 70(3), 770-775. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/339076>
- Kasper, T. J., Melera, M., Gozel, P., & Brownlee, R. G. (1988). Separation and detection of DNA by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 458, 303-312. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)90574-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)90574-0)
- Kastelic, V., & Drobnic, K. (2012). A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Croatian Medical Journal*, 53(5), 401-408. <https://doi.org/10.3325/cmj.2012.53.401>
- Kastelic, V., Pospiech, E., Draus-Barini, J., Branicki, W., & Drobnic, K. (2013). Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croatian Medical Journal*, 54(4), 381-386. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760663/pdf/CroatMedJ_54_0381.pdf
- Katsara, M. A., Branicki, W., Walsh, S., Kayser, M., & Nothnagel, M. (2021). Evaluation of supervised machine-learning methods for predicting appearance traits from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102507. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102507>
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
- Kayser, M., Branicki, W., Parson, W., & Phillips, C. (2023). Recent advances in Forensic DNA Phenotyping of appearance, ancestry and age. *Forensic Science International: Genetics*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102870>
- Kayser, M., & de Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 179-192. <https://doi.org/10.1038/nrg2952>
- Kayser, M., Liu, F., Janssens, A. C., Rivadeneira, F., Lao, O., van Duijn, K., . . . van Duijn, C. M. (2008). Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 411-423. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.003>
- Keating, B., Bansal, A. T., Walsh, S., Millman, J., Newman, J., Kidd, K., . . . Kayser, M. (2013). First all-in-one diagnostic tool for DNA intelligence: genome-wide inference of biogeographic ancestry, appearance, relatedness, and sex with the Identitas v1 Forensic Chip. *International Journal of Legal Medicine*, 127(3), 559-572. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0788-1>
- Kenny, E. E., Timpson, N. J., Sikora, M., Yee, M.-C., Moreno-Estrada, A., Eng, C., . . . Myles, S. (2012). Melanesian Blond Hair Is Caused by an Amino Acid Change in TYRP1. *Science*, 336(6081), 554. <https://doi.org/10.1126/science.1217849>
- Kimpton, C. P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E. S., & Adams, M. (1993). Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applications*, 3(1), 13-22. <https://doi.org/10.1101/gr.3.1.13>

- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2008). *Concepts of Genetics* (9ème ed.). Pearson.
- Koops, B.-J., Schellekens, M. H. M., & Prinsen, M. M. (2006). Wanted : a Tall Blond Dutchman. Does the Netherlands Set the Stage in Regulating Forensic DNA Phenotyping? *Tilburg law review*, *13*, 206-227.
- Kukla-Bartoszek, M., Pośpiech, E., Spólnicka, M., Karłowska-Pik, J., Strapagiel, D., Żadzińska, E., . . . Branicki, W. (2018). Investigating the impact of age-dependent hair colour darkening during childhood on DNA-based hair colour prediction with the HIrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, *36*, 26-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.007>
- Kukla-Bartoszek, M., Pośpiech, E., Woźniak, A., Boroń, M., Karłowska-Pik, J., Teisseyre, P., . . . Branicki, W. (2019). DNA-based predictive models for the presence of freckles. *Forensic Science International: Genetics*, *42*, 252-259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.07.012>
- Kukla-Bartoszek, M., Teisseyre, P., Pośpiech, E., Karłowska-Pik, J., Zieliński, P., Woźniak, A., . . . Branicki, W. (2021). Searching for improvements in predicting human eye colour from DNA. *International Journal of Legal Medicine*, *135*(6), 2175-2187. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02645-5>
- Lamason, R. L., Mohideen, M.-A. P. K., Mest, J. R., Wong, A. C., Norton, H. L., Aros, M. C., . . . Cheng, K. C. (2005). SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. *Science*, *310*(5755), 1782-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1116238>
- Landsteiner, K. (1901). Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *46*, 1132-1134.
- Landsteiner, K., & Wiener, A. S. (1940). An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *43*(1), 223-223. <https://doi.org/10.3181/00379727-43-11151>
- Lao, O., de Gruijter, J. M., van Duijn, K., Navarro, A., & Kayser, M. (2007). Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms. *Annals of Human Genetics*, *71*(Pt 3), 354-369. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2006.00341.x>
- Larsson, M., Pedersen, N. L., & Stattin, H. (2003). Importance of genetic effects for characteristics of the human iris. *Twin Research*, *6*(3), 192-200. <https://doi.org/10.1375/136905203765693843>
- Lattes, L. (1916). Two Practical Cases of Individual Diagnosis of Human Blood. In R. E. Gaensslen (Ed.), *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry; Unit IX: Translations of Selected Contributions to the Original Literature of Medicolegal Examinations of Blood and Body Fluids*. National Institute of Justice.
- Lee, S.-T., Nicholls, R. D., Bunday, S., Laxova, R., Musarella, M., & Spritz, R. A. (1994). Mutations of the P Gene in Oculocutaneous Albinism, Ocular Albinism, and Prader-Willi Syndrome Plus Albinism. *New England Journal of Medicine*, *330*(8), 529-534. <https://doi.org/10.1056/NEJM199402243300803>
- Lin, B. D., Mbarek, H., Willemsen, G., Dolan, C. V., Fedko, I. O., Abdellaoui, A., . . . Hottenga, J.-J. (2015). Heritability and Genome-Wide Association Studies for Hair Color in a Dutch Twin Family Based Sample. *Genes*, *6*(3), 559-576. <https://www.mdpi.com/2073-4425/6/3/559>

- Liu, F., van Duijn, K., Vingerling, J. R., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Janssens, A. C. J. W., & Kayser, M. (2009). Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Current Biology*, *19*(5), R192-R193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.027>
- Liu, F., Wen, B., & Kayser, M. (2013). Colorful DNA polymorphisms in humans. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *24*(6-7), 562-575. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.03.013>
- Liu, F., Wollstein, A., Hysi, P. G., Ankra-Badu, G. A., Spector, T. D., Park, D., . . . Kayser, M. (2010). Digital Quantification of Human Eye Color Highlights Genetic Association of Three New Loci. *PLoS Genetics*, *6*(5), e1000934. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000934>
- Liu, F., Zhong, K., Jing, X., Uitterlinden, A. G., Hendriks, A., Drop, S., & Kayser, M. (2019). Update on the predictability of tall stature from DNA markers in Europeans. *Forensic Science International: Genetics*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.05.006>
- Lona-Durazo, F., Hernandez-Pacheco, N., Fan, S., Zhang, T., Choi, J., Kovacs, M. A., . . . Parra, E. J. (2019). Meta-analysis of GWA studies provides new insights on the genetic architecture of skin pigmentation in recently admixed populations. *BMC Genetics*, *20*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0765-5>
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates Incorporated.
- MacLean, C. E., & Lamparello, A. (2014). Forensic DNA phenotyping in criminal investigations and criminal courts: assessing and mitigating the dilemmas inherent in the science. *Recent Advances in DNA and Gene Sequences*, *8*(2), 104-112. <http://www.eurekaselect.com/128392/article>
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., . . . Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, *461*(7265), 747-753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
- Marano, L. A., Andersen, J. D., Goncalves, F. T., Garcia, A. L. O., & Fridman, C. (2019). Evaluation of Hirisplex-S system markers for eye, skin and hair color prediction in an admixed Brazilian population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*.
- Margot, P. (2011). La trace comme vecteur fondamental de la police scientifique. In I. Ricordel (Ed.), *L'expertise en police scientifique*. Xavier Montauban, SA.
- Maroñas, O., Phillips, C., Söchtig, J., Gomez-Tato, A., Cruz, R., Alvarez-Dios, J., . . . Lareu, M. V. (2014). Development of a forensic skin colour predictive test. *Forensic Science International: Genetics*, *13*, 34-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.017>
- Martin, A. R., Lin, M., Granka, J. M., Myrick, J. W., Liu, X., Sockell, A., . . . Henn, B. M. (2017). An Unexpectedly Complex Architecture for Skin Pigmentation in Africans. *Cell*, *171*(6), 1340-1353.e1314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.015>
- Martinez-Cadenas, C., Peña-Chilet, M., Ibarrola-Villava, M., & Ribas, G. (2013). Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model. *Forensic Science International: Genetics*, *7*(4), 453-460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.03.007>
- MedlinePlus. (s.d.). *Genes*. National Library of Medicine. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/>

- Meyer, O. S., Lunn, M. M. B., Garcia, S. L., Kjærbye, A. B., Morling, N., Børsting, C., & Andersen, J. D. (2020). Association between brown eye colour in rs12913832:GG individuals and SNPs in TYR, TYRP1, and SLC24A4. *PLoS One*, 15(9), e0239131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239131>
- Meyer, O. S., Salvo, N. M., Kjærbye, A., Kjersem, M., Andersen, M. M., Sørensen, E., . . . Andersen, J. D. (2021). Prediction of Eye Colour in Scandinavians Using the EyeColour 11 (EC11) SNP Set. *Genes (Basel)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/genes12060821>
- Moreno, L. I., & McCord, B. (2007). Separation of DNA for forensic applications using capillary electrophoresis. In J. P. Landers (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques, Third edition* (pp. 761-784). CRC Press.
- Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Smerick, J. B., & Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(3), 647-660.
- Morgan, K. (2013). *Génétique des populations*. Encyclopédie Canadienne., <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/genetique-des-populations>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263-273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Murphy, E. E. (2013). Legal and Ethical Issues in Forensic DNA Phenotyping.
- Murphy, E., & Tong, J. H. (2020). The racial composition of forensic DNA databases. *California Law Review*, 108(6), 1847-1911. <https://search.informit.org/doi/10.3316/agispt.20231108098290>
- Mushailov, V., Rodriguez, S. A., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2015). Assay Development and Validation of an 8-SNP Multiplex Test to Predict Eye and Skin Coloration. *Journal of Forensic Sciences*, 60(4), 990-1000. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12758>
- Myles, S., Somel, M., Tang, K., Kelso, J., & Stoneking, M. (2007). Identifying genes underlying skin pigmentation differences among human populations. *Human Genetics*, 120(5), 613-621. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0256-4>
- Nakayama, K., Fukamachi, S., Kimura, H., Koda, Y., Soemantri, A., & Ishida, T. (2002). Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *Journal of Human Genetics*, 47(2), 92-94. <https://doi.org/10.1007/s100380200007>
- Nan, H., Kraft, P., Qureshi, A. A., Guo, Q., Chen, C., Hankinson, S. E., . . . Han, J. (2009). Genome-wide association study of tanning phenotype in a population of European ancestry. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(9), 2250-2257. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.62>
- Norton, H. L., Edwards, M., Krithika, S., Johnson, M., Werren, E. A., & Parra, E. J. (2016). Quantitative assessment of skin, hair, and iris variation in a diverse sample of individuals and associated genetic variation. *American Journal of Physical Anthropology*, 160(4), 570-581. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22861>

- Oetting, W. S., & King, R. A. (1999). Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation*, 13(2), 99-115. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1004\(1999\)13:2<99::Aid-humu2>3.0.Co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1004(1999)13:2<99::Aid-humu2>3.0.Co;2-c)
- Palencia-Madrid, L., Xavier, C., de la Puente, M., Hohoff, C., Phillips, C., Kayser, M., & Parson, W. (2020). Evaluation of the VISAGE Basic Tool for Appearance and Ancestry Prediction Using PowerSeq Chemistry on the MiSeq FGx System. *Genes (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/genes11060708>
- Palmal, S., Adhikari, K., Mendoza-Revilla, J., Fuentes-Guajardo, M., Silva de Cerqueira, C. C., Bonfante, B., . . . Ruiz-Linares, A. (2021). Prediction of eye, hair and skin colour in Latin Americans. *Forensic Science International: Genetics*, 53, 102517. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102517>
- Paramei, G. V., Bimler, D. L., & Mislavskaja, N. O. (2004). Colour perception in twins: individual variation beyond common genetic inheritance. *Clinical & Experimental Optometry*, 87(4-5), 305-312. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2004.tb05059.x>
- Parra, E. J. (2007). Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. *American Journal of Physical Anthropology, Suppl 45*, 85-105. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20727>
- Pawitan, Y., Seng, K. C., & Magnusson, P. K. (2009). How many genetic variants remain to be discovered? *PloS One*, 4(12), e7969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007969>
- Peng, F., Zhu, G., Hysi, P. G., Eller, R. J., Chen, Y., Li, Y., . . . Kayser, M. (2019). Genome-Wide Association Studies Identify Multiple Genetic Loci Influencing Eyebrow Color Variation in Europeans. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(7), 1601-1605. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.029>
- Pierce, B. A. (2012). *L'essentiel de la génétique* (1st ed.). De Boeck
- Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R., . . . Morling, N. (2014). The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.02.002>
- Pneuman, A., Budimlija, Z. M., Caragine, T., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2012). Verification of eye and skin color predictors in various populations. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 14(2), 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2011.12.005>
- Pośpiech, E., Chen, Y., Kukla-Bartoszek, M., Breslin, K., Aliferi, A., Andersen, J. D., . . . Kayser, M. (2018). Towards broadening Forensic DNA Phenotyping beyond pigmentation: Improving the prediction of head hair shape from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 37, 241-251. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.017>
- Pospiech, E., Draus-Barini, J., Kupiec, T., Wojas-Pelc, A., & Branicki, W. (2011). Gene-gene interactions contribute to eye colour variation in humans. *Journal of Human Genetics*, 56(6), 447-455. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.38>
- Pospiech, E., Draus-Barini, J., Kupiec, T., Wojas-Pelc, A., & Branicki, W. (2012). Prediction of eye color from genetic data using Bayesian approach. *Journal of Forensic Sciences*, 57(4), 880-886. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02077.x>
- Pospiech, E., Karłowska-Pik, J., Ziemkiewicz, B., Kukla, M., Skowron, M., Wojas-Pelc, A., & Branicki, W. (2016). Further evidence for population specific

- differences in the effect of DNA markers and gender on eye colour prediction in forensics. *International Journal of Legal Medicine*, 130(4), 923-934. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1388-2>
- Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek, M., Karłowska-Pik, J., Zieliński, P., Woźniak, A., Boroń, M., . . . Branicki, W. (2020). Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC Genomics*, 21(1), 538. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06926-Y>
- Pospiech, E., Wojas-Pelc, A., Walsh, S., Liu, F., Maeda, H., Ishikawa, T., . . . Branicki, W. (2014). The common occurrence of epistasis in the determination of human pigmentation and its impact on DNA-based pigmentation phenotype prediction. *Forensic Science International: Genetics*, 11, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.012>
- Post, P. W., & Rao, D. C. (1977). Genetic and environmental determinants of skin color. *American Journal of Physical Anthropology*, 47(3), 399-402. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330470309>
- Praetorius, C., Grill, C., Stacey, S. N., Metcalf, A. M., Gorkin, D. U., Robinson, K. C., . . . Steingrimsson, E. (2013). A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. *Cell*, 155(5), 1022-1033. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.022>
- Prestes, P. R., Mitchell, R. J., Daniel, R., Ballantyne, K. N., & van Oorschot, R. A. H. (2011). Evaluation of the IrisPlex system in admixed individuals. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), 283-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.08.137>
- Purps, J., Geppert, M., Nagy, M., & Roewer, L. (2011). Evaluation of the IrisPlex eye colour prediction tool in a German population sample. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), 202-203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.08.101>
- Quillen, E. E., Bauchet, M., Bigham, A. W., Delgado-Burbano, M. E., Faust, F. X., Klimentidis, Y. C., . . . Shriver, M. D. (2012). OPRM1 and EGFR contribute to skin pigmentation differences between Indigenous Americans and Europeans. *Human Genetics*, 131(7), 1073-1080. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1135-1>
- Rawofi, L., Edwards, M., Krithika, S., Le, P., Cha, D., Yang, Z., . . . Parra, E. J. (2017). Genome-wide association study of pigmentary traits (skin and iris color) in individuals of East Asian ancestry. *PeerJ*, 5, e3951. <https://doi.org/10.7717/peerj.3951>
- Rebbeck, T. R., Kanetsky, P. A., Walker, A. H., Holmes, R., Halpern, A. C., Schuchter, L. M., . . . Guerry, D. (2002). P gene as an inherited biomarker of human eye color. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11(8), 782-784. <https://cebp.aacrjournals.org/content/cebp/11/8/782.full.pdf>
- Rees, J. L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annual Review of Genetics*, 37, 67-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143233>
- Rinchik, E. M., Bultman, S. J., Horsthemke, B., Lee, S. T., Strunk, K. M., Spritz, R. A., . . . Nicholls, R. D. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*, 361(6407), 72-76. <https://doi.org/10.1038/361072a0>
- Roewer, L. (2013). DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investigative Genetics*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-22>

- Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Casares de Cal, M., Cruz, R., . . . Lareu, M. V. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 28-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.009>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Salvo, N. M., Janssen, K., Kirsebom, M. K., Meyer, O. S., Berg, T., & Olsen, G. H. (2022). Predicting eye and hair colour in a Norwegian population using Verogen's ForenSeq™ DNA signature prep kit. *Forensic Science International: Genetics*, 56, 102620. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102620>
- Salvoro, C., Faccinotto, C., Zucchelli, L., Porto, M., Marino, A., Occhi, G., . . . Vazza, G. (2019). Performance of four models for eye color prediction in an Italian population sample. *Forensic Science International: Genetics*, 40, 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.03.008>
- Samuel, G., & Prainsack, B. (2019). Forensic DNA phenotyping in Europe: views “on the ground” from those who have a professional stake in the technology. *New Genetics and Society*, 38(2), 119-141. <https://doi.org/10.1080/14636778.2018.1549984>
- Sankar, P. (2012). Forensic DNA Phenotyping: Continuity and Change in the History of Race, Genetics, and Policing. In W. Keith, N. Alondra, & L. Catherine (Eds.), *Genetics and the Unsettled Past* (pp. 104-113). Rutgers University Press. <https://doi.org/doi:10.36019/9780813553368-009>
- Sari, I., Simsek, S., Filoglu, G., & Bulbul, O. (2022). Predicting Eye and Hair Color in a Turkish Population Using the HRisPlex System. *Genes*, 13(11), 2094. <https://www.mdpi.com/2073-4425/13/11/2094>
- Sawicki, D. J., & Miziolek, W. (2015). Human colour skin detection in CMYK colour space. *IET Image Processing*, 9(9), 751-757. <https://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/iet-ipr.2014.0859>
- Schneider, P. M., Prainsack, B., & Kayser, M. (2019). The Use of Forensic DNA Phenotyping in Predicting Appearance and Biogeographic Ancestry. *Deutsches Ärzteblatt International*, 116(51-52), 873.
- Schwartz, J. H. (2021). Evolution, systematics, and the unnatural history of mitochondrial DNA. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 32(4), 126-151. <https://doi.org/10.1080/24701394.2021.1899165>
- Shapturenko, M., Vakula, S., Kandratsiuk, A., Gudievskaya, I., Shinkevich, M., Marchenko, L., . . . Kilchevsky, A. (2019). Single nucleotide polymorphisms in HERC2 (rs12913832) and OCA2 (rs1800407) genes in relation to iris color variation of belarusian population. VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы
- Shapturenko, M. N., Vakula, S. I., Kandratsiuk, A. V., Gudievskaya, I. G., Shinkevich, M. V., Luhauniou, A. U., . . . Kilchevsky, A. V. (2019). HERC2 (rs12913832) and OCA2 (rs1800407) genes polymorphisms in relation to iris color variation in Belarusian population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1), 331-332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.127>

- Shekar, S. N., Duffy, D. L., Frudakis, T., Sturm, R. A., Zhao, Z. Z., Montgomery, G. W., & Martin, N. G. (2008). Linkage and association analysis of spectrophotometrically quantified hair color in Australian adolescents: the effect of OCA2 and HERC2. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(12), 2807-2814. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.147>
- Shriver, M. D., Parra, E. J., Dios, S., Bonilla, C., Norton, H., Jovel, C., . . . Kittles, R. A. (2003). Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Human Genetics*, 112(4), 387-399. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0896-y>
- Siewierska-Górska, A., Sitek, A., Żądzińska, E., Bartosz, G., & Strapagiel, D. (2017). Association of five SNPs with human hair colour in the Polish population. *Homo*, 68(2), 134-144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchb.2017.02.002>
- Simcoe, M., Valdes, A., Liu, F., Furlotte, N. A., Evans, D. M., Hemani, G., . . . Hysi, P. G. (2021). Genome-wide association study in almost 195,000 individuals identifies 50 previously unidentified genetic loci for eye color. *Science Advances*, 7(11), eabd1239. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd1239>
- Singh-Cundy, A., & Shin, G. (2017). *Découvrir la biologie* (2nd ed.). De Boeck.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P. M., Schallreuter, K. U., Paus, R., & Tobin, D. J. (2005). Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(1), 13-21. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23528.x>
- Sobrino, B., Brión, M., & Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154(2), 181-194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.020>
- Sochtig, J., Phillips, C., Maronas, O., Gomez-Tato, A., Cruz, R., Alvarez-Dios, J., . . . Lareu, M. V. (2015). Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction in Europeans. *International Journal of Legal Medicine*, 129(5), 963-975. <https://doi.org/10.1007/s00414-015-1226-y>
- Spichenok, O., Budimlija, Z. M., Mitchell, A. A., Jenny, A., Kovacevic, L., Marjanovic, D., . . . Wurmbach, E. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 472-478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.005>
- Stokowski, R. P., Pant, P. V., Dadd, T., Fereday, A., Hinds, D. A., Jarman, C., . . . Cox, D. R. (2007). A genomewide association study of skin pigmentation in a South Asian population. *American Journal of Human Genetics*, 81(6), 1119-1132. <https://doi.org/10.1086/522235>
- Sturm, R. A. (2002). Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Research*, 12(5), 405-416. <https://doi.org/10.1097/00008390-200209000-00001>
- Sturm, R. A., Duffy, D. L., Box, N. F., Newton, R. A., Shepherd, A. G., Chen, W., . . . Martin, N. G. (2003). Genetic association and cellular function of MC1R variant alleles in human pigmentation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 994, 348-358. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb03199.x>
- Sturm, R. A., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Leite, F. P., Stark, M. S., Hayward, N. K., . . . Montgomery, G. W. (2008). A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 424-431. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.005>

- Sturm, R. A., & Frudakis, T. N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends in Genetics*, 20(8), 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.010>
- Sturm, R. A., Teasdale, R. D., & Box, N. F. (2001). Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene*, 277(1-2), 49-62. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00694-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00694-1)
- Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., . . . Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39(12), 1443-1452. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.13>
- Sullivan, K. M., Pope, S., Gill, P., & Robertson, J. M. (1992). Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. *PCR Methods and Applications*, 2(1), 34-40. <https://doi.org/10.1101/gr.2.1.34>
- Tautz, D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS*, 67, 21-28. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8583-6_2
- Templeton, A. R. (2006). *Population Genetics and Microevolutionary Theory* (First ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Terrado Ortuño, N., & May, P. (2023). *Forensic DNA Phenotyping: a review on SNP panels, genotyping techniques, and prediction models*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2674028/v1>
- Townsend, M. (2021). *Illumina: Improving human health by unlocking the power of the genome*. <https://iai.digital/2021/illumina/>
- Tozzo, P., Politi, C., Delicati, A., Gabbin, A., & Caenazzo, L. (2021). External visible characteristics prediction through SNPs analysis in the forensic setting: a review. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 26(10), 828-850. <https://doi.org/10.52586/4991>
- Tully, G. (2007). Genotype versus phenotype: Human pigmentation. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 105-110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.005>
- Turchi, C., Onofri, V., Melchionda, F., Fattorini, P., & Tagliabracci, A. (2019). Development of a forensic DNA phenotyping panel using massive parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*.
- Twyman, R. M. (2009). Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 871-875). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00866-4>
- Uffelmann, E., Huang, Q. Q., Munung, N. S., de Vries, J., Okada, Y., Martin, A. R., . . . Posthuma, D. (2021). Genome-wide association studies. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 59. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00056-9>
- Valenzuela, R. K., Henderson, M. S., Walsh, M. H., Garrison, N. A., Kelch, J. T., Cohen-Barak, O., . . . Brilliant, M. H. (2010). Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. *Journal of Forensic Sciences*, 55(2), 315-322. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x>
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L., & Thody, A. J. (1995). Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics*, 11(3), 328-330. <https://doi.org/10.1038/ng1195-328>
- Van Laan, M. C. (2017). The genetic witness: forensic DNA phenotyping. *Journal of Emerging Forensic Sciences Research*, 2(2), 33-52.

- Van Rood, J. J., & Van Leeuwen, A. (1963). Leukocyte grouping. A method and its application. *The Journal of Clinical Investigation*, 42(9), 1382-1390.
- Visser, M., Palstra, R. J., & Kayser, M. (2014). Human skin color is influenced by an intergenic DNA polymorphism regulating transcription of the nearby BNC2 pigmentation gene. *Human Molecular Genetics*, 23(21), 5750-5762. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu289>
- Voisey, J., Gomez-Cabrera Mdel, C., Smit, D. J., Leonard, J. H., Sturm, R. A., & van Daal, A. (2006). A polymorphism in the agouti signalling protein (ASIP) is associated with decreased levels of mRNA. *Pigment Cell Research*, 19(3), 226-231. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00301.x>
- Walsh, B., & Lynch, M. (2018). *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Oxford University Press.
- Walsh, S., Chaitanya, L., Breslin, K., Muralidharan, C., Bronikowska, A., Pospiech, E., . . . Kayser, M. (2017). Global skin colour prediction from DNA. *Human Genetics*, 136(7), 847-863. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1808-5>
- Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., . . . Kayser, M. (2014). Developmental validation of the HRisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 150-161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006>
- Walsh, S., & Kayser, M. (2016). A Practical Guide to the HRisPlex System: Simultaneous Prediction of Eye and Hair Color from DNA. *Methods in Molecular Biology*, 1420, 213-231. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_17
- Walsh, S., Lindenbergh, A., Zuniga, S. B., Sijen, T., de Knijff, P., Kayser, M., & Ballantyne, K. N. (2011). Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 464-471. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.09.008>
- Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., & Kayser, M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Science International: Genetics*, 5(3), 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>
- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., . . . Kayser, M. (2013). The HRisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 98-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>
- Walsh, S., Wollstein, A., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., . . . Kayser, M. (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 330-340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.009>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure for nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.
- Westenberger, S. (2020). *Illumina Sequencing Overview: Library Prep to Data Analysis*. Ambry Genetics,. Retrieved 28/05/2023 from https://www.youtube.com/watch?v=6jf_6STEnI4
- Wiener, A. S. (1943). *Blood groups and transfusion*. Springfield, Ill., C.C Thomas.
- Wienroth, M. (2018). Socio-technical disagreements as ethical fora: Parabon NanoLab's forensic DNA Snapshot™ service at the intersection of discourses

- around robust science, technology validation, and commerce. *BioSocieties*. <https://doi.org/10.1057/s41292-018-0138-8>
- Wiley, R., Zeng, X., LaRue, B., Gill-King, H., & Budowle, B. (2017). Evaluation of the Parabon® Snapshot™ DNA Phenotyping System. <https://hdl.handle.net/20.500.12503/27721>
- Wollstein, A., Walsh, S., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., . . . Kayser, M. (2017). Novel quantitative pigmentation phenotyping enhances genetic association, epistasis, and prediction of human eye colour. *Scientific Reports*, 7, 43359. <https://doi.org/10.1038/srep43359>
- Wong, Z., Wilson, V., Patel, I., Povey, S., & Jeffreys, A. J. (1987). Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals of Human Genetics*, 51(4), 269-288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1987.tb01062.x>
- Xavier, C., de la Puente, M., Mosquera-Miguel, A., Freire-Aradas, A., Kalamara, V., Ralf, A., . . . Parson, W. (2022). Development and inter-laboratory evaluation of the VISAGE Enhanced Tool for Appearance and Ancestry inference from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102779>
- Xavier, C., de la Puente, M., Mosquera-Miguel, A., Freire-Aradas, A., Kalamara, V., Vidaki, A., . . . Parson, W. (2020). Development and validation of the VISAGE AmpliSeq basic tool to predict appearance and ancestry from DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102336>
- Xavier, C., de la Puente, M., Sidstedt, M., Junker, K., Minawi, A., Unterländer, M., . . . Parson, W. (2022). Evaluation of the VISAGE basic tool for appearance and ancestry inference using ForenSeq® chemistry on the MiSeq FGx® system. *Forensic Science International: Genetics*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102675>
- Young, A. I. (2022). Discovering missing heritability in whole-genome sequencing data. *Nature Genetics*, 54(3), 224-226. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01012-3>
- Yun, L., Gu, Y., Rajeevan, H., & Kidd, K. K. (2014). Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. *International Journal of Legal Medicine*, 128(3), 447-453. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0953-1>
- Zhang, M., Song, F., Liang, L., Nan, H., Zhang, J., Liu, H., . . . Han, J. (2013). Genome-wide association studies identify several new loci associated with pigmentation traits and skin cancer risk in European Americans. *Human Molecular Genetics*, 22(14), 2948-2959. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt142>
- Zhu, G., Evans, D. M., Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Medland, S. E., Gillespie, N. A., . . . Martin, N. G. (2004). A genome scan for eye color in 502 twin families: most variation is due to a QTL on chromosome 15q. *Twin Research*, 7(2), 197-210. <https://doi.org/10.1375/136905204323016186>
- Zidkova, A., Horinek, A., Stenzl, V., & Korabecna, M. (2013). Application of multifactor dimensionality reduction analysis and Bayesian networks for eye color and ancestry prediction for forensic purposes in the Czech Republic. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4(1), e322-e323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2013.10.164>
- Zieger, M. (2022). Forensic DNA phenotyping in Europe: How far may it go? *Journal of Law and the Biosciences*, 9(2). <https://doi.org/10.1093/jlb/lisac024>

Ziegle, J. S., Su, Y., Corcoran, K. P., Nie, L., Mayrand, P. E., Hoff, L. B., . . . Diehl, S. R. (1992). Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, *14*(4), 1026-1031.
[https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(05\)80126-0](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(05)80126-0)