

Université de Montréal

Potentiel et limites de l'approximation faciale forensique sur un crâne sec assistée
par le phénotypage d'ADN

Par

Ariane Durand-Guévin

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine
en extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (MSc)

en sciences biomédicales

Août 2023

© Ariane Durand-Guévin, 2023

Université de Montréal

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine
en extension à l'Université du Québec à Trois-Rivières

Ce mémoire intitulé

**Potentiel et limites de l'approximation faciale forensique sur un crâne sec
assistée par le phénotypage d'ADN**

Présenté par

Ariane Durand-Guévin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Syrina Al Ain

Président-rapporteur

Emmanuel Milot

Directeur de recherche

Frank Crispino

Codirecteur

Jonathan James

Membre du jury

Résumé

La reconstruction faciale permet d'approximer un visage sur la base d'un crâne, lorsque des restes humains sont retrouvés. En science forensique, elle est l'un des outils utilisés dans un but d'identification *post-mortem*. Les procédures actuelles d'approximation ne sont pas standardisées et constamment revisitées. Il est également possible d'obtenir des prédictions du phénotype d'un individu (caractères physiques apparents) à partir de son ADN, qui pourraient être ajoutées aux reconstructions pour maximiser les chances de reconnaissance. Cette recherche vise à étudier l'approximation faciale à des fins de reconnaissance et l'apport du phénotypage par l'ADN à cette pratique. Le crâne et le relevé biologique d'un donneur du laboratoire d'anatomie de l'UQTR ont été utilisés. Six praticiens ont approximé son visage à partir d'une copie de son crâne et de ses données phénotypiques et anthropologiques. Les résultats corroborent qu'il existe un manque de standardisation des méthodes et techniques, menant à différents résultats selon le praticien. Des tests de reconnaissance et de ressemblance ont été effectués à l'aide d'un échantillon de 46 participants. Malgré la variabilité des approximations, elles ont toutes été reconnues au moins une fois lors des tests de reconnaissance, soulevant la possibilité que la reconnaissance d'un visage est idiosyncratique. Les caractéristiques qui semblent influencer davantage la reconnaissance sont la forme, la taille et la position des yeux, de la bouche et du nez. Finalement, au regard des incertitudes propres à la méthode et du rôle investigatif de l'approximation faciale, il est recommandé que le phénotypage accompagne l'accompagne par écrit.

Mots-clés : Science forensique, identification *post-mortem*, approximation faciale, reconnaissance faciale, phénotypage par l'ADN, crâne sec

Abstract

Facial reconstruction is a process by which a face is approximated from a skull when human remains are found. In forensic science, it is one of the many tools used for the purpose of *post-mortem* identification. The current approximation procedures are not standardized and are always revisited. Nowadays, it is possible to obtain phenotype (apparent physical traits) predictions from an individual's DNA. These predictions could be added to facial approximations to maximize the chances of recognition. This research aims to study facial approximation for recognition purposes and the plus-value of DNA phenotyping to facial approximation. The skull and biological material from one donor of the UQTR's anatomy laboratory were used. Six practitioners approximated the donor's face using a copy of his skull, and phenotyping and anthropological data. The results corroborated the lack of standardization regarding the approximating methods and techniques, which leads to different resulting approximations depending on the practitioner. Recognition and resemblance tests were carried out with a sample of 46 participants. Despite the wide variability of the approximations, they were all recognized at least once during the recognition tests, raising the possibility that the recognition of a face is idiosyncratic. The characteristics that seemed the most important to recognition were the shape, size and position of the eyes, the mouth, and the nose. Finally, with regard to the uncertainties specific to the method and the final investigative role of facial approximation, phenotyping would benefit in feeding a spoken portrait.

Keywords : Forensic science, *post-mortem* identification, facial approximation, facial recognition, DNA phenotyping, dry skull

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Table des matières	3
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements	11
Chapitre 1 – Introduction	12
1.1. Objectifs de l'étude	15
Chapitre 2 – Revue de la littérature.....	17
2.1. L'approximation faciale	17
2.1.1. Introduction	17
2.1.2. Historique	19
2.1.3. Les méthodes.....	20
2.1.4. Les types de techniques.....	22
2.1.5. Les tables d'épaisseurs moyennes de tissus mous	24
2.1.6. Les muscles du visage	25
2.1.7. Les caractéristiques complexes	25
2.1.8. L'exactitude des approximations	26
2.1.9. Les tests de reconnaissance et de ressemblance.....	27
2.1.9.1 Les types de représentation	29
2.1.9.2 Évaluateurs familiers et non familiers.....	29
2.1.9.3 Performance des méthodes et techniques selon les tests.....	30

2.2. La reconnaissance faciale.....	31
2.2.1. Introduction	31
2.2.2. Sensibilité aux changements et aux caractéristiques.....	31
2.2.3. Facteurs ayant un impact sur la reconnaissance.....	32
2.2.3.1. La configuration et le caractère distinctif des caractéristiques	33
2.2.3.2. L'effet de population d'origine	34
2.2.3.3. L'intra-variabilité, l'inter-variabilité et la familiarité	34
2.2.4. L'importance des caractéristiques selon la familiarité.....	36
2.3. Le phénotypage par l'ADN	37
2.3.1. Introduction	37
2.3.3. HIrisPlex-S	39
2.3.4. Autres outils de prédictions faciales basées sur l'ADN	40
2.3.5. L'extraction d'ADN à partir de matériel biologique embaumé	40
Chapitre 3 – Article scientifique	43
Facial recognition of approximation using a dry skull and phenotype predictions: potential of interdisciplinary research	43
3.1. Abstract	43
3.2. Introduction	44
3.2.1. Facial approximation.....	45
3.2.2. Facial recognition.....	48
3.2.3. DNA phenotyping	51
3.2.4. The project.....	51
3.3. Material and methods.....	52
3.3.1. Simulated case.....	52
3.3.1.1. Anthropological and anthropometric profile.....	53

3.3.1.2. Skull and mandible photogrammetry and replicates	54
3.3.2. Facial approximations	55
3.3.3. Recognition and resemblance tests	56
3.3.3.1. Test 1. Recognition test.....	57
3.3.3.2. Test 2. Resemblance test	59
3.3.3.3. Analysis of tests results	60
3.4. Results	61
3.4.1. Facial approximations	61
3.4.2. Recognition and resemblance tests	63
3.4.2.1. Test 1. Recognition test.....	63
3.4.2.2. Test 2. Resemblance test	65
3.5. Discussion	66
3.5.1. Recognition test.....	67
3.5.2. Resemblance test	69
3.5.3. DNA phenotyping	70
3.5.4. Accuracy.....	71
3.6. Conclusion.....	72
3.7. Supplementary material.....	74
Chapitre 4 – Article scientifique	76
DNA extractions and phenotyping from formalin embalmed heart and thigh human tissues: comparison of methods	76
4.1. Abstract	76
4.2. Introduction	77
4.3. Materials and methods	81
4.3.1. Sample preparation and pre-extraction	81

4.3.2. DNA extraction	81
4.3.3. Quantification.....	83
4.3.4. Phenotyping assessment.....	84
4.4. Results	85
4.4.1. DNA extraction and quantification	85
4.4.2. Phenotyping assessment.....	86
4.5. Discussion	88
4.5.1. DNA extraction	88
4.5.2. DNA phenotyping	89
4.5.3. Limitations and perspectives	91
4.6. Acknowledgments	92
Chapitre 5 – Discussion.....	93
5.1. Retour sur les objectifs.....	93
5.2. Limites de la recherche	95
5.3. Pistes de recherche	96
Références bibliographiques	99

Liste des tableaux

Table 1. – Background and experience of the FA practitioners.....	61
Table 2. – Methods to produce the FAs according to each practitioner.....	62
Table 3. – Minimal, maximal, and mean scores accorded to the 6 dyads by the participants.	65
Table S4. – Techniques used by the practitioners to build and place the eyes, nose, mouth, and ears of their FA.	74
Table S5. – Answers given for a recognition according to each facial approximation, all participants combined.	75
Table 6. – PCR parameters for DNA quantification using a BIO-RAD Thermocycler CFX Connect.	84
Table 7. – Sample characteristics and DNA quantifications for human muscle tissues sampled from an embalmed donor.	85
Table 8. – DNA concentrations based on tissue type, addition of pre-extraction and extraction method for human muscle tissues sampled from an embalmed donor.....	86
Table 9. – Phenotyping predictions of the HIrisPlex-S tool of human muscle tissues sampled from an embalmed donor.	87

Liste des figures

- Figure 1. – Skull and mandible of the deceased (actual skull and mandible on the left, printed skull and mandible on the right). Technical settings of the digital camera: model Nikon™ D3200®, diaphragm aperture F/5, time exposition 1/160 second, ISO 200, 35 mm objective, focal distance of 52, maximum aperture 4.7 and flash activated. .55
- Figure 2. – The six FAs realised by the practitioners and used for the recognition tests.57
- Figure 3. – The six dyads used for the resemblance test.59
- Figure 4. – Number of recognitions received per facial approximation.64
- Figure S5. – *Ante-mortem* photography of the donor.74

Liste des sigles et abréviations

ABS : *Acrylonitrile-butadiene-styrene*

ADN : Acide désoxyribonucléique

BMI : *Body mass index*

CICC : Centre international de criminologie comparée

CT-scan : *Computed tomography scan*

DNA : *Deoxyribonucleic acid*

EVC : *Externally visible characteristics*

FA : *Facial approximation*

FDP : *Forensic DNA phenotyping*

FFPE : *Formalin-fixed paraffin-embedded*

FRQNT : Fonds de recherche du Québec, Nature et technologie

IRM : Imagerie par résonance magnétique

PCE : *Phenol-chloroform extraction*

PCR : *Polymerase chain reaction*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

STL : Stéréolithographique

STR : *Short tandem repeat*

SWGAM : *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*

TDM : Tomodensitométrie

UQTR : Université du Québec à Trois-Rivières

Hic Locus Est Ubi Mors Gaudet Succurrere Vitae

« Ici est le lieu où la mort est heureuse d'aider la vie »

– Giovanni Morgagni

Remerciements

Au terme de mon parcours universitaire, je tiens à remercier du fond du cœur tous ceux qui y ont participé et qui ont permis la réalisation de ce projet.

Frank Crispino, Emmanuel Milot et Shari Forbes, pour leur appui et leur confiance sans équivoque et ce bien avant d'avoir commencé ma maîtrise, tout au long de mon parcours au baccalauréat. Merci de m'avoir accueillie dans vos projets, me permettant d'acquérir des connaissances, d'éveiller ma curiosité intellectuelle, et de m'épanouir dans le domaine qui me passionne depuis toujours.

Le FRQNT et le CICC, pour les bourses de recherche octroyées.

Johanne Pellerin et Sophie Plante, du laboratoire d'anatomie, pour leur assistance, le partage de leurs connaissances et leur constant enthousiasme par rapport à ma recherche. Stéphane Sobczak, pour sa participation à mon apprentissage de la modélisation 3D, ainsi que Jonathan St-Arnaud et Sébastien Lagacé, pour leur temps et leur aide à l'impression 3D. Tobias Houlton, Joe Mullins, Lara Maria Herrera Drugowick, Benoît Gauthier, Érica Pflieger et Mélanie Jutras, les praticiens de l'approximation faciale, ainsi que Robert Lafontaine et Ferg Gadzala, caricaturistes, qui se sont tous portés volontaires à l'exercice et qui ont rendu le projet d'autant plus pertinent.

Finalement, à toutes mes connaissances, et plus particulièrement mon conjoint (alias KMathias Lorenzo Bisailon), qui m'ont soutenue et encouragée par leurs paroles, leurs gestes, les cafés offerts et les sucreries qui m'ont permis de rédiger par de multiples soirées. Également, à mes collègues et amis du Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale, certains avec qui j'ai rédigé à de nombreuses reprises, et qui m'ont motivée à écrire jusqu'à la toute fin.

Chapitre 1 – Introduction

La *reconstruction faciale* forensique, ou *approximation faciale*, est une méthode par laquelle un visage est reconstruit à partir d'un crâne pour créer une image qui se veut réaliste du visage « vivant » d'une personne inconnue, dans le but de pouvoir l'identifier (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison, Davy-Jow et al. 2003, , Wilkinson, Rynn et al. 2006, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Decker, Ford et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2017, Stephan, Caple et al. 2018). En science forensique, la reconstruction faciale est utilisée en dernier recours, dans le contexte où des restes humains sont trouvés et qu'aucune identification concernant l'identité de la personne n'est possible : tenter d'approximer le visage du défunt vise à stimuler le public à reconnaître la personne inconnue et lancer ou relancer une enquête, dans un but d'identification *post-mortem* (Stephan et Henneberg 2006, Evison 2009, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Parks, Richard et al. 2013, Hayes 2014, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). Une notion intimement associée à l'approximation faciale est celle de la *reconnaissance faciale*, puisqu'ultimement, on réalise une approximation en espérant susciter une reconnaissance du visage reconstruit chez un public ciblé, afin de générer des pistes d'identités du défunt (Verzé 2009, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018).

Les méthodes actuellement utilisées pour approximer un visage ne sont pas standardisées (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Hayes 2014). De plus, elles sont constamment revisitées afin de les affiner et de les comparer. Les reconstructions manuelles, généralement sculptées à la main avec de l'argile, sont très utilisées, quoique les avancées technologiques offrent l'opportunité d'obtenir des reconstructions virtuelles d'un visage de façon plus rapide.

Depuis peu, de nouveaux outils d'analyse de l'ADN offrent le potentiel de déterminer, de manière probabiliste, le phénotype qu'avait un individu de son vivant, soit des caractères physiques telles que la couleur des cheveux, de la peau et des yeux (Kayser et Schneider 2009, Kayser et de Knijff 2011, MacLean et Lamparello 2014, Laan 2017, Lippert, Sabatini et al. 2017). La validité de ces outils dits de phénotypage (aussi appelé « portrait-robot génétique ») fait encore l'objet de recherche et l'incertitude autour de leurs prédictions est encore mal comprise : les gènes contribuant aux traits complexes posent d'importants défis à cause de l'effet combiné de plusieurs loci, d'effets non-génétiques non mesurés, et d'interactions génétiques et épigénétiques inconnues (Kayser et Schneider 2009, Sero, Zaidi et al. 2019). Le visage humain en est un bon exemple : de nombreux facteurs génétiques, développementaux et environnementaux contribuent à sa construction, rendant la caractérisation de son architecture génétique difficile (Claes, Hill et al. 2014, Sero, Zaidi et al. 2019, White, Indencleef et al. 2021). Nonobstant des modifications volontaires du phénotype (teinture des cheveux, lentilles oculaires, etc.), ces caractéristiques prédites par l'ADN pourraient être ajoutées aux approximations faciales, ou utilisées pour créer différentes versions d'un même visage, et potentiellement maximiser les chances que survienne une reconnaissance faciale. Le potentiel de cette approche mixte (reconstruction faciale + phénotypage) n'a cependant pas encore été évalué. En effet, la recension de la littérature sur l'approximation et la reconnaissance faciales, effectuée pour le présent projet de recherche, n'a permis de repérer aucune étude ayant intégré le phénotypage par l'ADN d'une telle façon.

À vrai dire, peu de travaux mettent en relation les connaissances de différents domaines pouvant s'avérer pertinents pour celui de l'approximation faciale, comme la psychologie, l'art et la forensique. Pourtant, de par son rôle dans les enquêtes, l'approximation faciale a besoin de recherche interdisciplinaire (Evison 2000). Le présent projet vise donc à tirer avantage d'une

approche multidisciplinaire et à étudier l'approximation faciale à des fins de reconnaissance dans le contexte plus large de l'interprétation forensique.

Le laboratoire d'anatomie de l'UQTR dispose d'une collection de crânes secs, ainsi que de tissus embaumés provenant des mêmes donneurs, auxquels s'ajoutent des photographies de leur visage *ante-mortem*. Le matériel biologique d'un de ces donneurs fut utilisé pour le présent projet. Les marqueurs génétiques du système HirisPlex-S, développé pour obtenir des prédictions de la couleur des cheveux, des yeux et de la peau (Chaitanya, Breslin et al. 2018), ont été séquencés à partir de ce matériel biologique. À partir du phénotype prédit, d'une copie du crâne du donneur, de son sexe (homme) et de son âge approximatif, il a été demandé à plusieurs praticiens d'en reconstruire (approximer) le visage en utilisant leurs propres méthodes. Pour ce faire, le crâne a été numérisé et dupliqué à l'aide des technologies de photogrammétrie et d'impression 3D, et envoyé à chacun des praticiens. À la suite du retour de leurs approximations faciales, des photographies de celles-ci furent utilisées pour effectuer des tests de reconnaissance et de ressemblance auprès d'un échantillon de participants volontaires (autres que les praticiens ayant créé les approximations) afin de tenter de comprendre les implications cognitives associées à la reconnaissance d'un visage ainsi que les caractéristiques du visage qui y sont associées. Enfin, pour les besoins de cette étude, plusieurs méthodes d'extraction d'ADN à partir de matériel embaumé ont été testées, car très peu d'études ont abordé cette question, qui mérite davantage d'exploration à des fins d'optimisation.

Le présent mémoire se divise en cinq chapitres. Le présent chapitre introduit le contexte, la recherche et ses objectifs. Le second chapitre dresse une recension des écrits sur les trois principaux sujets en lien avec la recherche, soit l'approximation faciale, la reconnaissance faciale et le phénotypage par l'ADN. Les chapitres 3 et 4 exposent les travaux réalisés afin de répondre aux objectifs de la recherche, sous la forme de manuscrits d'articles scientifiques destinés à la

publication. Le premier porte sur l'approximation et la reconnaissance faciales tandis que le deuxième rapporte les tests d'extraction de l'ADN et de phénotypage à partir du matériel biologique embaumé (optimisation des méthodes). Finalement, le chapitre 5 est consacré à une discussion conclusive sur le projet, ses limites et les perspectives de recherche qui en découlent.

1.1. Objectifs de l'étude

Une prémisse du domaine de l'approximation faciale est que la reconnaissance d'une approximation repose en partie sur son exactitude, c'est-à-dire sa fidélité anatomique au visage *réel* de la personne à qui appartenait le crâne (Stephan et Cicolini 2008). La précision et l'exactitude d'une reconstruction sont donc des qualités privilégiées par les praticiens du domaine. En revanche, cette prémisse n'a pas été validée dans le contexte de la réalisation d'une approximation faciale à des fins de soutien à une enquête. De nombreuses questions en lien avec cette prémisse se posent et ont, jusqu'à présent, été négligées dans les études sur le sujet. Cette recherche se base donc sur une approche différente, se voulant une première exploration de nouvelles perspectives, dans le but d'identifier les pistes de recherche les plus pertinentes.

Le premier objectif consistait à effectuer une recension comparative des pratiques, de leurs potentiel et limites rapportés, et des facteurs cognitifs impliqués dans la reconnaissance visuelle et faciale humaine de façon générale. Le second objectif visait à évaluer expérimentalement les facteurs impliqués dans la reconnaissance, ainsi que la valeur ajoutée que peuvent avoir dans ce contexte les prédictions phénotypiques basées sur l'ADN. Les tests de cette phase expérimentale ont requis la participation et la collaboration de participants afin d'évaluer et commenter sur la

reconnaissance et la ressemblance de visages. Ces tests avaient pour but de tenter de répondre à différentes questions :

1. Quels sont les facteurs impliqués dans la reconnaissance visuelle d'un visage ?
2. Quels sont les facteurs impliqués dans la ressemblance visuelle ?
3. Quelles sont les caractéristiques des visages (nez, bouche, etc.) liées à notre capacité de reconnaissance d'un visage ?
4. Quelles sont les caractéristiques des visages (nez, bouche, etc.) liées à ce que nous jugeons subjectivement comme étant similaire ou « ressemblant » ?

Globalement, la recherche a questionné les prémisses scientifiques de l'approximation faciale et de son utilisation, débordant du champ analytique (anthropologie physique, génétique) pour intégrer une dimension en science cognitive (comment reconnaît-on un proche ?). Cette approche pragmatique et novatrice a des implications pour la pratique ainsi que pour l'utilisation et la perception de cet outil par le milieu opérationnel policier.

Chapitre 2 – Revue de la littérature

2.1. L’approximation faciale

2.1.1. Introduction

L’approximation faciale fait partie de ce que l’on appelle l’imagerie faciale, qui englobe plusieurs méthodes telles que la superposition de photographies, les méthodes de progression/régression de l’âge, les portraits basés sur des témoignages oculaires, la représentation faciale et les méthodes moléculaires de reconstruction du phénotype (Stephan, Caple et al. 2018). Étant donné l’étendue des méthodes d’imagerie faciale, de nombreux experts et professionnels (odontologues, portraitistes des corps policiers, anatomistes, généticiens, spécialistes de l’imagerie médicale, psychologues, etc.) contribuent au développement et à l’opérationnalisation de celles-ci (Stephan, Caple et al. 2018). Ces méthodes d’imagerie faciale, quoiqu’elles n’y soient pas traditionnellement associées, font partie de l’anthropologie physique, et se retrouvent souvent à la limite de la science et de l’art (Tyrrell, Evison et al. 1997, Parks, Richard et al. 2013, Moraes, Miamoto et al. 2014, Gupta, Gupta et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018).

L’approximation faciale est utilisée dans différents contextes, comme en archéologie, en paléontologie, mais aussi en science forensique (Snow, Gatliff et al. 1970, Verzé 2009, Moraes, Miamoto et al. 2014, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Gupta, Gupta et al. 2015). Il existe d’ailleurs plusieurs synonymes de l’expression « approximation faciale », utilisés diversement selon les domaines : reconstruction faciale (forensique), reconstitution faciale, restauration faciale, reproduction faciale, ou encore sculpture forensique (Stephan et Henneberg 2001, Stephan, Caple et al. 2018). L’approximation faciale désigne le processus de reconstruction d’un visage, sur (ou à

partir de) un crâne sec, pour recréer l'apparence d'une personne de son vivant. Elle est notamment utilisée en dernier recours dans les cas où des restes humains sont retrouvés, lorsque les analyses biométriques ou biologiques (empreintes digitales, odontologie, profil ADN) ne peuvent être effectuées ou ne sont pas concluantes, afin de diffuser l'image créée auprès du public en espérant que cela engendre une reconnaissance de l'individu et génère de nouvelles pistes d'enquête (Evison, Davy-Jow et al. 2003, Wilkinson, Rynn et al. 2006, Stephan et Devine 2009, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Decker, Ford et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). L'approximation faciale est donc utilisée quand aucune piste n'est disponible dans une enquête, afin de potentiellement la lancer ou la relancer (Stephan et Henneberg 2006, Evison 2009, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Parks, Richard et al. 2013, Hayes 2014, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018). Elle n'est pas, à proprement parler, un moyen d'identification formelle de l'inconnu à qui appartient le crâne, mais plutôt un outil utilisé par les autorités chargées de l'investigation. Lorsque des identifications sont proposées, il est du rôle des autorités responsables de les confirmer ou les infirmer par des moyens « directs » d'identification, comme la comparaison de profils ADN et dentaires (Tyrrell, Evison et al. 1997, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Parks, Richard et al. 2013, Stephan, Caple et al. 2018). L'approximation faciale n'est donc pas un outil visant l'individualisation, mais plutôt à générer des pistes pour les enquêteurs, qui se chargeront d'exclure par la suite celles ne menant pas à la bonne personne.

La reconnaissance d'une personne se base sur notre capacité à identifier les différences de caractéristiques physiques individuelles (Verzé 2009, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). Notre apparence faciale unique dépend de la variation dans des phénotypes tels que la peau (couleur, texture), les muscles du visage, les tissus adipeux ainsi que l'ossature sous-jacente (Verzé 2009, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). En revanche, la reconnaissance d'une approximation faciale

dans le cadre d'une enquête ne serait pas nécessairement et uniquement provoquée par la morphologie du visage reconstruit. Les informations circonstancielles (p. ex. ce que la personne portait lors de sa disparition : vêtements, bijoux, etc.), la description du cas qui l'accompagne (où, quand, comment), l'efficacité des médias à attirer l'attention du public, le moment où l'approximation est publiée, le public ciblé, etc., sont des facteurs qui peuvent également jouer un rôle dans la reconnaissance d'une personne par une approximation faciale, quoique le débat continue quant à la place qu'occupe l'exactitude du visage approximé dans le succès de reconnaissance (Stephan et Henneberg 2001, Stephan et Henneberg 2006, Stephan et Cicolini 2008, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Evison, Iwamura et al. 2016, Stephan, Caple et al. 2018).

2.1.2. Historique

La première recherche documentée en lien avec l'approximation faciale daterait de 1883 (Tyrrell, Evison et al. 1997, Verzé 2009, Evison, Iwamura et al. 2016). Hermann Welker effectuait des recherches sur l'épaisseur des tissus mous qui composent les visages (Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). L'anatomiste Wilhelm His aurait ensuite été le premier à faire une tentative « scientifique », en 1895, en prenant des mesures de tissus faciaux à partir d'un petit groupe de cadavres, qu'il aurait ensuite utilisées pour reconstruire un visage à partir d'un crâne (Snow, Gatliff et al. 1970, Verzé 2009, Parks, Richard et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015, Evison, Iwamura et al. 2016). En revanche, ce fut seulement au début du XXème siècle que la possibilité de reconstruire le visage d'une personne décédée à partir de son crâne fut considérée dans le domaine de la médecine légale (Verzé 2009). Le premier cas forensique rapporté date de 1916 (Verzé 2009, Stephan, Caple et al. 2018). Les avancées techniques ont par la suite ouvert d'autres portes : en 1989, Vanezis a proposé une méthode virtuelle d'approximation faciale par ordinateur (Vanezis, Blowes et al. 1989, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Evison, Iwamura et al. 2016, Stephan, Caple et al. 2018).

2.1.3. Les méthodes

Les méthodes 2D et 3D d'approximation faciale sont variées : le dessin, la superposition, la sculpture, les méthodes informatisées, etc. (Stephan et Henneberg 2001, Parks, Richard et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015). Les méthodes 3D incluent notamment la sculpture manuelle et virtuelle (informatisée) (Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Parks, Richard et al. 2013, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Gupta, Gupta et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018). Le reste de cette section présente les méthodes de sculptures. Les types, soit manuel ou informatisé, seront discutés dans la section suivante.

Il existe trois méthodes de sculpture : américaine, russe et de Manchester (cette dernière aussi appelée méthode combinée, mixte, ou encore britannique) (Stephan et Henneberg 2001, Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). La méthode américaine, introduite en 1946 par Krogman, est basée sur l'anthropométrie et sur l'épaisseur des tissus mous du visage (Krogman et McCue 1946, Verzé 2009, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). Les tissus osseux (durs) servent de base pour reconstituer les tissus mous, c'est-à-dire que des épaisseurs du matériel de reconstruction sont ajoutées sur l'os pour reconstituer la chair, sans égard à la séparation entre les tissus adipeux et les muscles (Evison, Iwamura et al. 2016). La méthode russe, quant à elle, fut introduite par Gerasimov en 1971 et est basée sur l'anatomie et la musculature du visage (Gerasimov 1971, Evison 2009, Gupta, Gupta et al. 2015, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Finalement, la méthode de Manchester, développée par Neave en 1977, est issue de la combinaison des deux méthodes précédentes (Prag et Neave 1997). Elle repose à la fois sur l'anatomie des muscles du visage et sur l'épaisseur des tissus mous (Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017).

Plus précisément, la méthode américaine implique l'utilisation de tables de référence sur l'épaisseur moyenne de tissus mous à différents endroits du visage. Ces mesures, appelées repères anthropométriques, peuvent être séparées selon l'âge, le groupe ethnique et le sexe (Verzé 2009, Evison, Iwamura et al. 2016). La méthode requiert d'abord que le crâne soit monté sur un support selon un angle particulier, puis des marqueurs de l'épaisseur de tissus mous (bâtonnets dont la longueur correspond à l'épaisseur) sont apposés sur le crâne aux repères anthropométriques choisis (Evison 2009, Verzé 2009, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Ces marqueurs vont ensuite guider l'application de matériel (argile, caoutchouc, etc.) jusqu'à l'épaisseur sélectionnée (selon la table de référence), le tout représentant les tissus mous du visage (Evison 2009).

La méthode russe est basée sur des aspects anatomiques, où le développement de la musculature du crâne et du cou sont fondamentaux (Verzé 2009, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Les différents muscles du visage sont modelés et ajoutés sur le crâne, une épaisseur à la fois (Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). Finalement, une mince épaisseur du matériel utilisé, simulant la peau du visage, recouvre le tout.

La méthode de Manchester utilise les muscles du visage et les épaisseurs de tissus mous (Verzé 2009, Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). Le crâne est d'abord monté sur un support et des marqueurs de l'épaisseur des tissus mous sont placés à chacun des repères anthropométriques, comme pour la méthode américaine (Gupta, Gupta et al. 2015). Ensuite, les muscles sont modelés et positionnés, comme pour la méthode russe. Finalement, le matériel de sculpture utilisé sera ajouté sur les muscles, simulant le reste des tissus mous, comme les tissus adipeux, jusqu'à ce que les épaisseurs marquées pour chaque repère anthropométrique soient atteintes. Cette méthode repose donc à la fois sur la méthode américaine (utilisation des tables de

l'épaisseur moyenne de tissus mous) et sur la méthode russe (utilisation des muscles). Certains soutiennent que cette méthode est la plus utilisée de nos jours, et que la distinction entre les trois méthodes ne serait plus nécessaire (Klepáček et Malá 2012, Stephan, Caple et al. 2018).

2.1.4. Les types de techniques

Dans un premier temps, lorsqu'une approximation faciale est effectuée, la méthode choisie (américaine, russe, combinée) indique si l'approximation s'effectue en utilisant les muscles du visage et/ou les épaisseurs moyennes de tissus mous. Ensuite, de nombreuses techniques existent pour reconstruire spécifiquement les caractéristiques du visage, comme le nez, les yeux, les oreilles, la mâchoire, les distances entre ces caractéristiques, leur forme, leur angle, leur position par rapport aux autres, etc. Chaque méthode se décline donc en plusieurs techniques servant à reconstituer, manuellement ou par informatique, les caractéristiques d'un visage.

Les techniques manuelles consistent à sculpter un visage, dans le monde physique, sur un crâne ou sa réplique, à l'aide d'argile ou de tout autre matériel de sculpture comme la plasticine (Vanezis, Blowes et al. 1989, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Gupta, Gupta et al. 2015). Cela demande beaucoup de temps, jusqu'à plusieurs jours, voire semaines, et une fois terminées, les approximations faciales sont difficiles à modifier (Evison 2000, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Davy-Jow, Schofield et al. 2005, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Verzé 2009). Les techniques manuelles sont donc reconnues pour être consommatrices de temps, et leur répétabilité est assez faible, c'est-à-dire que les résultats dépendent en grande partie de l'expérience et des compétences artistiques et anatomiques de la personne qui s'en charge (Vanezis, Blowes et al. 1989, Evison 1998, Evison 2000, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Verzé 2009, Claes, Vandermeulen et al. 2010). Cependant, on insiste fréquemment sur le plus grand réalisme des approximations faciales ainsi obtenues, par rapport aux résultats de techniques informatiques, qui

donnent un rendu inanimé (Stephan et Henneberg 2001, Davy-Jow, Schofield et al. 2005, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Néanmoins, les approximations virtuelles sont considérées comme plus objectives, répétables, moins dépendantes des compétences artistiques et moins coûteuses en matériel (Vanezis, Blowes et al. 1989, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Evison, Iwamura et al. 2016). Plus rapides à utiliser, les techniques informatiques permettent de produire plusieurs visages en moins de temps (Tyrrell, Evison et al. 1997, Stephan et Henneberg 2001, Davy-Jow, Schofield et al. 2005, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015). Elles peuvent notamment être utilisées dans des cas où il serait impensable de produire un nombre élevé d'approximations faciales manuelles (désastres de masse ou fosses communes) (Davy-Jow, Schofield et al. 2005).

La première étape de réalisation d'une approximation faciale informatisée consiste à numériser le crâne (Vanezis, Blowes et al. 1989, Verzé 2009). Cela peut se faire de différentes façons, en fonction de l'accessibilité aux méthodes et appareils et des coûts reliés : photogrammétrie (à partir de photos), laser 3D, tomodensitométrie (TDM ou « *CT-scan* »), imagerie par résonance magnétique (IRM), etc. (Vanezis, Blowes et al. 1989, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Klepáček et Malá 2012, Moraes, Miamoto et al. 2014, Stephan, Caple et al. 2018). Les étapes qui suivent sont les mêmes que pour les techniques matérielles, mais réalisées dans le monde virtuel, donc simplement dans un environnement de travail différent (Claes, Vandermeulen et al. 2010, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Ainsi, l'ajout sur un crâne de la musculature, des repères anthropométriques, des tissus mous, d'une texture, etc., est exécuté à l'aide de logiciels comme Geomatic Freeform® ou ZBrush® (Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Moraes, Miamoto et al. 2014, Gupta, Gupta et al. 2015).

2.1.5. Les tables d'épaisseurs moyennes de tissus mous

Les différentes approches utilisées reposent presque toutes sur les épaisseurs des tissus mous, considérées comme des guides importants pour modeler un visage (Tyrrell, Evison et al. 1997, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016, Stephan, Caple et al. 2018). Ces épaisseurs font référence à la mesure, à des endroits variés, entre la surface de la peau et la surface des tissus durs (osseux) qui se trouvent en dessous (Stephan et Simpson 2008). Il est important de savoir que la relation entre les tissus mous du visage et le crâne n'est pas totalement comprise à ce jour, puisque la relation entre le crâne et l'apparence d'un visage n'est pas directe (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison 2000). Notamment, la variance totale populationnelle d'origine génétique et non génétique et les différentes sources de variation restent méconnues. Plusieurs contributions ont été faites dans les 20 dernières années pour obtenir des données quantitatives et des procédures pour la prédiction des tissus mous, quoique la plupart restent subjectives et peu fiables scientifiquement (Stephan, Caple et al. 2018). Il existe d'ailleurs plusieurs façons d'obtenir des épaisseurs de tissus mous à partir des visages de participants ou corps donnés à la science : piqûre d'aiguille, IRM, TDM, ultrasons, pied à coulisse et radiographie (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison 2000, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Stephan et Simpson 2008, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2017). L'angle de mesure, la position de la tête, la résolution d'image, la position des marqueurs et d'autres facteurs peuvent interférer dans la collecte de données (Herrera, Strapasson et al. 2016). Même les technologies plus avancées (IRM, ultrasons) ont une erreur de mesure relativement similaire aux autres techniques (piqûre d'aiguille), indiquant qu'aucune ne se démarque nettement des autres en termes de précision (Stephan et Simpson 2008). En général, les tables d'épaisseurs sont organisées par population, sexe, âge et, parfois, selon l'indice de masse corporelle (Herrera, Tedeschi-Oliveira et

al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016). Plus de 60 études existent en lien avec l'épaisseur des tissus mous, produites à partir de diverses populations : Américains, Australiens, Belges, Brésiliens, Canadiens, Tchèques, Finlandais, Chinois, Colombiens, Égyptiens, Français, Allemands, Indiens, Slovaques, Coréens du sud, Espagnols et Turques (Stephan et Simpson 2008, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Stephan, Caple et al. 2018). Puisqu'il existe de nombreuses tables de références d'épaisseur de tissus mous, les praticiens doivent choisir la table qui convient au cas sur lequel ils travaillent (Herrera, Strapasson et al. 2016).

2.1.6. Les muscles du visage

Quoique les muscles aient des sites d'attache spécifiques sur le crâne, les mesures prises sur ceux-ci (p. ex. distance entre deux sites d'attache) ne suffisent pas à déterminer de façon précise la morphologie musculaire (forme et volume en trois dimensions) (Stephan et Devine 2009, Stephan 2010). Conséquemment, leur reconstruction implique une interprétation en partie subjective. Deux muscles qui contribuent plus fortement à la forme du visage sont le temporal et le masséter (Stephan et Devine 2009, Stephan 2010, Hayes 2014). Le masséter est l'un des plus importants de la structure anatomique, et il est qualifié comme un des meilleurs candidats pour prédire la structure et la forme du visage (Stephan 2010).

2.1.7. Les caractéristiques complexes

Les oreilles, le nez, la bouche et les yeux de la personne vivante correspondent à des orifices au niveau du crâne, ce qui rend leur reconstruction et l'estimation de leur forme, taille et position extrêmement difficile, sans compter que l'âge apporte également des changements morphologiques (Vanezis, Blowes et al. 1989, Evison 2000, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Evison, Iwamura et al. 2016). Le nez, par exemple, est une des caractéristiques

les plus difficiles puisque l'os sous-jacent n'offre que peu d'information sur son apparence antérieure (Tyrrell, Evison et al. 1997, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015). C'est pourquoi il y a eu de multiples recherches pour identifier des caractéristiques aidant à perfectionner la reconstruction du visage : position des yeux dans les orbites (Stephan 2002, Wilkinson et Mautner 2003, Stephan et Davidson 2008, Stephan, Huang et al. 2009, Guyomarc'h, Dutailly et al. 2012, Dorfling, Lockhat et al. 2018, Zednikova Mala et Veleminska 2018), projection/largeur/forme du nez (Stephan, Henneberg et al. 2003, Rynn et Wilkinson 2006, Rynn, Wilkinson et al. 2010, Mala 2013, Maltais Lapointe, Lynnerup et al. 2016, Tedeschi-Oliveira, Beaini et al. 2016, Strapasson, Herrera et al. 2017, Ridel, Demeter et al. 2018), largeur de la bouche (Stephan 2003, Stephan et Henneberg 2003, Stephan et Murphy 2008), forme et taille des lèvres et du philtrum (Wilkinson, Motwani et al. 2003, Mala et Veleminská 2016), morphologie des oreilles (Guyomarc'h et Stephan 2012), morphologie et épaisseur des tissus de la mastication (Stephan 2010), et plus encore (Stephan 2002, Stephan et Devine 2009, Hadi et Wilkinson 2016, Stephan, Caple et al. 2018). Certaines techniques proposées pour estimer la largeur et la forme de certaines caractéristiques furent par la suite invalidées (Stephan et Devine 2009, Hayes 2014, Stephan, Caple et al. 2018). À partir des faibles indices sur le crâne, les praticiens doivent en partie s'en remettre à leur expérience personnelle, compétences artistiques et intuition pour tenter de reconstruire ces caractéristiques (Snow, Gatliff et al. 1970).

2.1.8. L'exactitude des approximations

Comme mentionné en introduction, on débat toujours sur la question de savoir si le succès d'une approximation faciale repose sur l'exactitude du visage approximé. D'ailleurs, la définition d'exactitude ne fait pas l'unanimité (Stephan 2005, Parks, Richard et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015), ce concept étant mis en rapport avec différents niveaux, allant de celui anatomique (morphométrie) jusqu'à celui de l'identification (pistes générées, identité confirmée ; Stephan et

Henneberg 2006, Stephan et Cicolini 2010, Parks, Richard et al. 2013, Claes, Hill et al. 2014). Il faut souligner ici que l'examen de cas réels a démontré qu'une identification correcte pouvait être obtenue même à partir d'une reconstruction faciale de pauvre qualité sculpturale (rappelant un mannequin de vitrine) et qui ressemble peu anatomiquement au visage du défunt, voire qui évoque une personne d'ethnie différente (Stephan et Henneberg 2006, Evison, Iwamura et al. 2016). C'est pourquoi certains soutiennent que l'exactitude d'une approximation faciale doit être jugée sur son potentiel à susciter la reconnaissance du défunt par des personnes du public, ou mieux, d'aboutir à une identification confirmée. Malgré tout, tenter de reproduire un visage anatomiquement exact et précis semble souvent être l'objectif recherché dans les études sur les approximations faciales (Evison, Davy-Jow et al. 2003, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Stephan et Cicolini 2008, Verzé 2009, Claes, Vandermeulen et al. 2010, Decker, Ford et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2017).

2.1.9. Les tests de reconnaissance et de ressemblance

Si l'on souhaite évaluer l'exactitude anatomique d'une approximation faciale, il est possible d'effectuer des tests morphométriques, qui permettent une évaluation quantitative par comparaison métrique (Decker, Ford et al. 2013). Autrement, on utilise des tests de reconnaissance évaluant la probabilité qu'un visage reconstruit soit reconnu, et des tests de ressemblance évaluant la similitude entre une approximation et le visage réel *ante-mortem* de la personne (Stephan et Henneberg 2001, Stephan et Arthur 2006, Parks, Richard et al. 2013).

Un test de reconnaissance consiste à montrer la photographie d'une reconstruction faciale à un évaluateur ainsi que plusieurs photographies de visages, prises sur des personnes qui étaient vivantes (montrées en simultané ou en séquence). L'évaluateur doit indiquer s'il reconnaît, parmi ces visages photographiés, la personne que représente la reconstruction faciale (Parks, Richard et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016). Pour les tests de ressemblance, des paires de

photographies (reconstruction faciale et visage *ante-mortem* de la personne à qui appartient le crâne) sont présentées à un évaluateur, qui doit accorder un score de ressemblance selon une échelle prédéfinie (Stephan et Cicolini 2008, Herrera, Strapasson et al. 2016).

Lors des tests de reconnaissance, même lorsque le visage représenté par la reconstruction est reconnu, le taux de reconnaissance reste typiquement assez bas, indiquant que les approximations sont peu souvent reconnues (Stephan 2005, Stephan et Henneberg 2006, Stephan et Cicolini 2008, Stephan, Caple et al. 2018). Quoique les tests de reconnaissance et de ressemblance aient un objectif différent, et donc ne répondent pas à la même question, Stephan et Arthur (2006) ont évalué si les tests de reconnaissance détiennent des atouts en comparaison aux tests de ressemblance. Leurs résultats suggèrent que les tests de ressemblance ne seraient pas de très bons indicateurs de la qualité de l'approximation faciale et qu'un poids plus grand devrait être donné aux tests de reconnaissance. En effet, des approximations recevant des scores de ressemblance similaires peuvent produire des réponses de reconnaissances très différentes. Stephan et Henneberg (2006) ont démontré qu'une grande ressemblance entre une approximation faciale et la véritable personne de qui provient le crâne n'est pas nécessairement un bon indicateur des chances de reconnaissance. Enfin, Stephan et Cicolini (2008) ont trouvé que les scores de ressemblance sont peu corrélés aux résultats de tests de reconnaissance, suggérant comme piste que ces deux types de tests évaluent probablement deux variables d'une même chose (p. ex. la similarité physique telle que perçue dans deux contextes différents), ou qu'ils évaluent des choses différentes (sans pour autant les définir). Cela n'est pas nécessairement surprenant si l'on considère que les tests de ressemblance qualifient la similitude de visages et non leur susceptibilité à être reconnus (Stephan et Henneberg 2001, Stephan 2005, Stephan et Arthur 2006).

2.1.9.1 Les types de représentation

Les tests de reconnaissance peuvent être conduits de plusieurs façons : la représentation unique (*show-up*), la parade simultanée (*simultaneous line-up*) et la parade en séquence (*sequential line-up*) (Stephan et Henneberg 2006). Lors d'une représentation unique, la photographie d'une seule personne est présentée à l'évaluateur, qui doit décider s'il identifie ou non l'individu comme étant la personne représentée par la reconstruction faciale. Cette méthode est biaisée puisqu'elle suggère un (seul) choix d'identité. La parade simultanée présente un certain nombre de photographies de personnes différentes en même temps. La décision d'identifier ou non un individu se base sur les différences et similitudes entre les personnes présentées par rapport à la reconstruction faciale, c'est-à-dire que l'identification se fait en fonction de la personne qui ressemble le plus à la reconstruction (Stephan 2005, Stephan et Cicolini 2010). En utilisant une parade en séquence, où plusieurs visages sont présentés un à un à l'évaluateur, la décision se base sur les caractéristiques de la personne présentée (Stephan et Henneberg 2006). Généralement, la personne qui présente les visages tient plus d'images que le nombre à être présenté, pour éviter que l'évaluateur anticipe la fin de la séquence, et l'ordre de présentation des photos change aléatoirement pour chaque évaluateur, permettant de limiter les biais cognitifs. On a démontré que ce type de présentation résulte en une diminution du nombre de fausses identifications et est souvent favorisé (Stephan 2005, Stephan et Cicolini 2008, Stephan et Cicolini 2010).

2.1.9.2 Évaluateurs familiers et non familiers

Généralement, les tests expérimentaux font appel à des évaluateurs non familiers, c'est-à-dire qui ne connaissent pas la personne à identifier. Toutefois, dans les cas réels d'enquêtes (policières et de coroners), les identifications sont rapportées par des personnes familières avec le défunt, qui le connaissaient (Stephan 2005, Hayes 2016). Or, les mécanismes cognitifs impliqués dans la

reconnaissance seraient différents dans ces deux cas de figure (Stephan et Cicolini 2010, Hayes 2016). Dans le cas des personnes familières, les caractéristiques internes, soit celles situées dans la zone centrale du visage (yeux, nez, bouche), semblent jouer un plus grand rôle, alors que les caractéristiques externes, soit celles situées davantage en bordure du visage (ligne des cheveux, ligne de la mâchoire), semblent être plus importantes dans le cas des personnes non familières (Ellis, Shepherd et al. 1979, Hancock, Bruce et al. 2000).

2.1.9.3 Performance des méthodes et techniques selon les tests

Les mêmes méthodes (américaine, russe, combinée) et techniques de reconstruction des caractéristiques peuvent produire des résultats d'identification différents selon les crânes, ce qui rend la détermination des meilleures difficile (Stephan et Henneberg 2001). Leur efficacité peut dépendre du crâne de la personne à identifier. De plus, la question de la répétabilité des méthodes et des techniques d'approximation n'est que rarement abordée, autant par rapport à la comparaison entre différents praticiens qu'entre les reconstructions d'un même praticien (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison, Davy-Jow et al. 2003). La subjectivité et les rôles que jouent la qualité artistique et l'exactitude d'une approximation (et selon comment on la définit) demeurent mal compris (Evison, Davy-Jow et al. 2003, Evison 2009, Evison, Iwamura et al. 2016). Certaines études ont trouvé que la méthode américaine produit davantage de réponses correctes au niveau de l'identification et des scores plus élevés de ressemblance (Stephan et Henneberg 2001, Herrera, Strapasson et al. 2017).

2.2. La reconnaissance faciale

2.2.1. Introduction

La reconnaissance faciale est étudiée depuis plus de 40 ans : les visages sont riches d'enseignements pour les recherches cognitives (Fisher et Cox 1975, Ellis, Shepherd et al. 1979, Smeets, Claes et al. 2010, Claes, Hill et al. 2014, Young et Burton 2017, Oruc, Balas et al. 2019). Les humains possèdent une habilité remarquable pour reconnaître sans effort les visages des gens qu'ils connaissent (Fisher et Cox 1975, Haig 1984, Hancock, Bruce et al. 2000, Young et Burton 2017). En dépit de cette facilité, les mécanismes cognitifs qui sous-tendent la reconnaissance ne sont pas encore bien connus (Haig 1984, Abudarham et Yovel 2019). Quoique nous ayons de la facilité à reconnaître des visages familiers dans de nombreuses circonstances, par exemple sous différents éclairages ou angles de vision, et lorsqu'une personne porte des accessoires ou un déguisement (lunettes, chapeau, fausse barbe), il semble que nous ayons de la difficulté à reconnaître et associer des visages avec lesquels nous sommes peu familiers (p. ex. un visage vu une seule fois, comme cela se produit dans le cas où le témoin d'un crime entrevoit son auteur, qui lui est inconnu) (Fisher et Cox 1975, Hancock, Bruce et al. 2000, Young et Burton 2017).

Une hypothèse relative à la reconnaissance faciale veut que la façon dont nous percevons les visages familiers et non familiers soit différente (Warrington et James 1967). Une seconde hypothèse est que les différentes caractéristiques du visage (nez, yeux, bouche, front, etc.) ont un impact respectivement variable sur notre aptitude à les reconnaître (Fisher et Cox 1975).

2.2.2. Sensibilité aux changements et aux caractéristiques

Haig (1984) a procédé à une expérience consistant à modifier légèrement la position des caractéristiques originales d'un visage, et à demander à des évaluateurs familiers si l'image

représentait le visage original ou modifié. Les résultats suggèrent que nous sommes plus sensibles à certains changements : déplacement vertical de la bouche, des yeux et du nez, et diminution de l'espace interoculaire. À l'inverse, nous aurions de la difficulté à détecter les modifications comme une augmentation de la distance interoculaire ou de la largeur de la bouche. La reconnaissance ne reposerait pas seulement sur la forme ou l'apparence des caractéristiques du visage, mais aussi sur leur position les unes par rapport aux autres (Haig 1984). Selon Burt et Perret (1995), la forme et la couleur des caractéristiques auraient aussi un impact sur notre interprétation de l'âge. Également, une hypothèse soulevée par Fisher et Cox (1975) veut que la reconnaissance ne soit pas généralisable, c'est-à-dire que le processus impliqué ne serait pas le même pour tous les visages.

2.2.3. Facteurs ayant un impact sur la reconnaissance

Les photographies d'un même visage peuvent varier selon plusieurs facteurs à même d'affecter le résultat d'une comparaison : la pose, l'expression, la luminosité et l'exposition, la caméra et l'objectif utilisé (Smeets, Claes et al. 2010). Les visages sont des objets tridimensionnels complexes dont la reconnaissance par des personnes familières peut survenir peu importe leur orientation et dans des conditions variables de luminosité, de prise de vue et d'expression. On peut d'ailleurs reconnaître quelqu'un non pas seulement par son visage, mais aussi par sa tête et sa stature (reconnaître une personne de dos). Dans le cadre de ce projet, la reconnaissance faciale fait cependant strictement référence à la reconnaissance des visages. La variabilité entre des photographies d'un visage n'est pas un problème pour la reconnaissance de personnes familières, même lorsque que ces images sont sévèrement dégradées (Burton, Jenkins et al. 2011). Pour les visages non familiers, des différences dans l'orientation et l'éclairage affecteraient dramatiquement la capacité de reconnaissance de ceux-ci (Hancock, Bruce et al. 2000). Même les différences mineures, comme l'éclairage ou l'angle de prise de vue, créeraient des problèmes d'association

d'images. Pour ces raisons, les chercheurs, mais aussi les autorités, doivent avoir des règles de standardisation des photographies servant à des fins de reconnaissance, comme notamment l'interdiction de sourire sur les photos destinées aux passeports (Young et Burton 2017).

2.2.3.1. La configuration et le caractère distinctif des caractéristiques

La reconnaissance faciale n'est pas juste une affaire d'addition de traits individuels du visage (p. ex. largeur bouche + distance inter-pupillaire + ...) mais concerne aussi leur configuration physique (positionnelle, de proportion, etc.) les uns par rapport aux autres (Hancock, Bruce et al. 2000). De plus, de façon non surprenante, les caractéristiques plus atypiques, c'est-à-dire présentant des valeurs plus éloignées de la moyenne de la population, voire extrêmes, sont mieux reconnues et mémorisées (Rhodes, Brennan et al. 1987). Ce qui est plus atypique sera donc reconnu plus rapidement que ce qui est typique ou moyen (Rhodes, Brennan et al. 1987, Hancock, Bruce et al. 2000, Lee, Byatt et al. 2000). À titre d'exemple, les caricatures exagèrent préférentiellement les caractéristiques d'un visage qui sont déjà plus éloignées de la moyenne ou plus rares (Rhodes, Brennan et al. 1987, Frowd, Bruce et al. 2007). Ces caricatures s'avèrent facilement identifiables, même si (ou justement *parce que*) les dimensions du dessin ne respectent pas la réalité (Lee, Byatt et al. 2000, Frowd, Bruce et al. 2007). En effet, les caricatures accentuent les différences d'un visage en comparaison à un visage dit « moyen », et ces caricatures sont reconnues au même titre, voire mieux reconnues, que des dessins plus réalistes des visages originaux (Rhodes, Brennan et al. 1987, Hancock, Bruce et al. 2000, Lee, Byatt et al. 2000, Frowd, Bruce et al. 2007). Une hypothèse pour l'expliquer est que l'effet de caricature éloigne le visage du visage moyen ou visage typique, et facilite ainsi la reconnaissance. Elle se base sur la prémisse que les visages sont encodés en mémoire selon leurs aspects distinctifs en comparaison à une norme (Rhodes, Brennan et al. 1987). Une seconde hypothèse pour conceptualiser notre représentation mentale des visages est

appelée le « *face space* », où un certain nombre de dimensions seraient établies (inconsciemment) sur un visage, de sorte qu'il soit décrit par des points dans un espace multi-dimensionnel euclidien (Valentine 1991, Byatt et Rhodes 1998). Une troisième hypothèse veut qu'un visage soit représenté par des coordonnées cartésiennes (Valentine 1991). Un visage plus éloigné du visage moyen le rendrait plus facile à identifier (Lewis et Johnston 1998, Robert 1999).

2.2.3.2. L'effet de population d'origine

L'appréciation de ce qui est typique ou non serait dépendante de la population dans laquelle on vit. Nous reconnaissons plus facilement les visages individuels de personnes de la même ethnie/origine/ascendance que nous que ceux de personnes provenant d'autres populations (Sporer 2001). Cet effet est appelé le « *other-race effect* », qui réfère à notre capacité réduite à reconnaître les visages d'individus appartenant à des groupes ethniques moins représentés dans le « paysage facial » que nous côtoyons au quotidien (Oruc, Balas et al. 2019). Nos référents cognitifs intervenant dans la reconnaissance faciale, propres à notre expérience dans une population donnée, seraient moins efficaces dans une autre population qui nous est non familière, et dans laquelle les valeurs typiques ou atypiques des traits ne sont pas nécessairement les mêmes (Rhodes, Brennan et al. 1987).

2.2.3.3. L'intra-variabilité, l'inter-variabilité et la familiarité

Comme mentionné précédemment, la tâche d'identifier quelqu'un que nous connaissons est facile et naturelle, et cette facilité augmenterait avec le niveau de familiarité que nous avons avec le visage de la personne (Rhodes, Brennan et al. 1987, Kramer, Young et al. 2018, Oruc, Balas et al. 2019). L'exposition répétée à un visage permet à notre système cognitif de séparer les variations transitoires des caractéristiques stables du visage de la personne (Bruce 1994, Young et Burton

2017). Il semble que nous ayons vu certains visages suffisamment de fois pour ne pas être bernés par cette intra-variabilité (Longmore, Liu et al. 2008, Oruc, Balas et al. 2019). L'intra-variabilité d'une personne ou l'étendue à laquelle son apparence va différer sera perçue comme bruit de fond. Apprendre comment un visage varie en l'ayant vu dans plusieurs circonstances nous permettrait de le reconnaître dans un nouvel environnement (Burton, Kramer et al. 2016, Kramer, Young et al. 2017). Tel que mentionné plus haut, une hypothèse veut que la reconnaissance de visages opère d'une manière spécifique à chaque visage, selon ses caractéristiques stables (Oruc, Balas et al. 2019). Une explication est que la variabilité d'un visage dans différentes situations est idiosyncratique : le visage A ne variera pas de la même façon que le visage B (Young et Burton 2017). Les variations entre les images d'une même personne ou son intra-variabilité seraient donc spécifiques à ladite personne (Burton, Kramer et al. 2016). Cela expliquerait pourquoi il est assez facile d'associer deux photographies d'une même personne que l'on connaît, mais que ce ne le sera pas s'il faut associer deux photographies d'une personne que l'on ne connaît pas : nous ne savons pas dans quelle mesure la perception que l'on a du visage varie. Notre capacité de reconnaissance faciale est alors spécifique à certaines identités, et ne se généralise pas à tous les visages non familiers (Young et Burton 2017).

On parle souvent de familiarité et non familiarité, quoique cette catégorisation est en réalité beaucoup plus complexe qu'une simple dichotomie (Kramer, Young et al. 2018). On peut parler de familiarité visuelle et de familiarité personnelle (Herrera, Strapasson et al. 2016). Une familiarité personnelle fait référence à une familiarité proche, avec quelqu'un que nous connaissons bien, pas seulement au niveau de son apparence mais aussi de sa personnalité, son histoire, ses émotions, etc. (Natu et O'Toole 2011). Nous connaissons des personnes avec différents niveaux de familiarité : membres de sa famille, personnes côtoyées tous les jours sur de longues périodes,

rencontres occasionnelles au travail, etc. Il faudrait considérer davantage la familiarité comme un ensemble de cas de figure et non pas comme une simple variable dichotomique.

2.2.4. L'importance des caractéristiques selon la familiarité

La représentation que l'on se fait des visages familiers serait qualitativement différente de celle que l'on se fait des visages vus une seule fois (Ellis, Shepherd et al. 1979). En revanche, on comprend encore mal *comment* notre perception d'un visage change durant le processus de familiarisation. Abudarham et Yovel (2019) ont trouvé que certaines caractéristiques du visage contribuent davantage que d'autres à reconnaître une personne : la couleur et la forme des yeux, l'épaisseur des lèvres, l'épaisseur et la forme des sourcils, le type et la couleur des cheveux et la pilosité faciale masculine (Vanezis, Blowes et al. 1989).

Dans le cas de visages familiers, les caractéristiques internes (nez, bouche, yeux) du visage seraient plus susceptibles de mener à une reconnaissance que les caractéristiques externes (ligne des cheveux, ligne de la mâchoire) (Ellis, Shepherd et al. 1979). Une hypothèse veut que nous portions une attention aux caractéristiques internes pour comprendre leurs émotions et communiquer (Ellis, Shepherd et al. 1979). Cela mènerait à une meilleure mémorisation des caractéristiques internes, à force de côtoyer ces visages. Également, la portion supérieure du visage serait davantage sollicitée pour identifier une personne que la portion inférieure (Goldstein et Mackenberg 1966). Cependant, pour les visages vus auparavant une seule fois, la reconnaissance se ferait aussi bien par les caractéristiques internes qu'externes du visage (Ellis, Shepherd et al. 1979). L'observateur porterait davantage attention à la ligne des cheveux qu'à la mâchoire, et aux yeux qu'au nez ou à la bouche (Ellis, Shepherd et al. 1979). La forme du pourtour du visage serait aussi un paramètre très important (Hayes, Taylor et al. 2005).

2.3. Le phénotypage par l'ADN

2.3.1. Introduction

D'un point de vue génétique, les traits physiques sont généralement complexes parce qu'affectés par plusieurs gènes et facteurs environnementaux qui interagissent entre eux (Pulker, Lareu et al. 2007, Claes, Hill et al. 2014, MacLean et Lamparello 2014, Laan 2017, Lippert, Sabatini et al. 2017, Sero, Zaidi et al. 2019, White, Indencleef et al. 2021). L'identification des gènes en jeu constitue un défi de taille, à cause des effets cumulés (et pas toujours additifs) de plusieurs gènes, d'interactions génétiques et épigénétiques complexes, et d'effets non-génétiques pas toujours mesurés (Kayser et Schneider 2009, Sero, Zaidi et al. 2019). Le phénotypage par l'ADN en science forensique, approche qui se développe depuis les 15 dernières années, se base sur le principe que certains segments spécifiques sur l'ADN sont corrélés (de façon causale ou non) avec l'expression de nos traits phénotypiques (Laan 2017, Chaitanya, Breslin et al. 2018, Stephan, Caple et al. 2018, Kukla-Bartoszek, Szargut et al. 2020). Cette approche consiste à prédire des caractéristiques physiques externes (p. ex. couleur des yeux) à partir de petites quantités d'ADN retrouvées dans les traces biologiques laissées par des personnes inconnues (MacLean et Lamparello 2014, Chaitanya, Breslin et al. 2018, Breslin, Wills et al. 2019). L'objectif est de générer des pistes d'enquête ou de tenter de réduire la population d'intérêt (« suspectable ») relative à un crime, en ciblant les personnes vivantes présentant les caractéristiques spécifiques prédites par la trace d'ADN ou en excluant celles ne les ayant pas. Le phénotypage par l'ADN, parfois appelé « portrait-robot génétique », peut aussi servir à inférer l'apparence d'une personne inconnue dont les restes ont été retrouvés, ce qui rend cette approche pertinente aux cas de personnes disparues ou victimes de désastres de masse (Kayser et de Knijff 2011, Walsh, Chaitanya et al. 2013, Greytak et

Armentrout 2015, Lippert, Sabatini et al. 2017, Diepenbroek, Bayer et al. 2020, Kukla-Bartoszek, Szargut et al. 2020, Palencia-Madrid, Xavier et al. 2020).

Les études récentes se concentrent sur la sélection de marqueurs génétiques pour prédire l'apparence (Walsh, Chaitanya et al. 2017, Hernando, Ibañez et al. 2018, Hysi, Valdes et al. 2018, Pośpiech, Chen et al. 2018, Kukla-Bartoszek, Pośpiech et al. 2019, Liu, Zhong et al. 2019). Un marqueur génétique correspond à une séquence d'ADN ou un gène situé à un emplacement connu sur un chromosome. Il existe plusieurs types de marqueurs, comme les SNP (*single nucleotide polymorphisms*), qui sont des variations ponctuelles d'une paire de bases, ou encore les STR (*short tandem repeat*), qui sont des variations du nombre de répétition d'une courte séquence d'ADN (Shewale et Liu 2014). La majorité des études sur le phénotypage utilisent les marqueurs SNP ou les polymorphismes di-alléliques insertion-délétion (Budowle et van Daal 2008, Mbadiwe, Dawson et al. 2019). Les SNP sont également mieux adaptés pour les analyses où l'ADN peut être substantiellement fragmenté ou dégradé (Budowle et van Daal 2008, Mbadiwe, Dawson et al. 2019).

Le plus grand du travail sur le phénotypage s'est concentré sur la pigmentation (Budowle et van Daal 2008). Les caractéristiques prédites avec une certaine exactitude (selon les cas) sont les couleurs des yeux, des cheveux et de la peau, ainsi que l'ancestralité (Kayser et de Knijff 2011, Laan 2017). À l'inverse, la prédiction de la morphologie du visage humain est difficile d'atteinte, en raison de son architecture génétique très complexe (Claes, Hill et al. 2014, Sero, Zaidi et al. 2019, White, Indencleef et al. 2021). Il est cependant important de souligner la valeur probabiliste, et non pas déterministe, des prédictions produites : le phénotypage par l'ADN fournit la probabilité pour chacune d'un nombre de catégories envisagées (MacLean et Lamparello 2014).

2.3.3. HIrisPlex-S

Le système HIrisPlex-S est un outil en ligne qui permet de générer des probabilités de prédictions de la couleur des yeux (bleu, intermédiaire, brun), des cheveux (roux, blond, brun, noir) et de la peau (très pâle, pâle, intermédiaire, foncée, foncée à noire) à partir de l'ADN (Chaitanya, Breslin et al. 2018, Breslin, Wills et al. 2019). Cet outil a évolué depuis l'introduction d'une première version nommée IrisPlex, en 2011, qui permettait alors la prédiction seulement de la couleur des yeux, à partir de six SNP. Lui a succédé une version bonifiée, HIrisPlex, qui incluait 24 SNP pour la couleur des yeux et des cheveux (Walsh, Chaitanya et al. 2013). Finalement, la plus récente version, HIrisPlex-S, s'appuie sur 41 SNP pour les prédictions de la couleur des yeux, des cheveux et de la peau (Walsh, Chaitanya et al. 2013, Chaitanya, Breslin et al. 2018). Ces outils de phénotypage ont été validés et respectent les lignes directrices du *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM) (Walsh, Chaitanya et al. 2013). HIrisPlex-S est non seulement utile pour les cas forensiques de personnes disparues, mais aussi adapté à l'ADN ancien (Walsh, Chaitanya et al. 2013). Il permet d'obtenir des profils complets de SNPs à partir d'aussi peu que 63 picogrammes d'ADN (Chaitanya, Breslin et al. 2018).

Néanmoins, il est important de mentionner que l'apparence de certains traits change avec le temps (Kayser et Schneider 2009). La prédiction de la couleur des cheveux chez les adultes peut être erronée dû aux changements avec l'âge. Les individus ayant les cheveux blonds en bas âge vont souvent voir la couleur de leurs cheveux devenir plus foncée avec le temps, quoique la couleur prédite par leur génétique puisse demeurer le blond. La prédiction ne tient pas compte non plus du fait que les cheveux deviennent gris ou blancs en vieillissant (Kayser et Schneider 2009, Walsh, Chaitanya et al. 2013, Kukla-Bartoszek, Szargut et al. 2020).

2.3.4. Autres outils de prédictions faciales basées sur l'ADN

L'entreprise Parabon Nanolabs a développé un système permettant d'obtenir des prédictions de la couleur des yeux, des cheveux et de la peau, ainsi que des taches de rousseurs. À cela s'ajoute la prédiction de la morphologie du visage et l'estimation de l'ancestralité biogéographique (origine ethnique) (Greytak et Armentrout 2015, Laan 2017). Lippert, Sabatini et al. (2017) présentent quant à eux divers modèles, dont un pour prédire le visage et la voix. Claes, Hill et al. (2014) ont également publié des résultats préliminaires sur une méthode consistant à reproduire un visage à partir des corrélations connues entre des traits phénotypiques et l'ancestralité et le sexe biologique. Finalement, Sero, Zaidi et al. (2019) proposent une avenue complémentaire, où l'idée n'est pas de prédire des caractéristiques faciales à partir de l'ADN, mais à l'inverse de prédire des aspects de l'ADN à partir de formes 3D du visage. L'ambition et le réalisme des outils qui prétendent prédire l'apparence en trois dimensions du visage d'une personne à partir de son ADN seul sont contestés (Stephan, Caple et al. 2018). Prédire une image complète d'un visage entièrement par l'analyse ADN d'une trace biologique relève du domaine de la fiction (Kayser et Schneider 2009). Enfin, mentionnons que d'autres traits phénotypiques peuvent être prédits à partir de l'ADN avec plus ou moins de succès, incluant les taches de rousseurs, la grandeur d'une personne, la morphologie des cheveux, la perte de cheveux et la calvitie, les fossettes du menton et des joues, l'attachement du lobe d'oreille, l'indice de masse corporelle et la voix (Kayser et de Knijff 2011, Laan 2017, Lippert, Sabatini et al. 2017).

2.3.5. L'extraction d'ADN à partir de matériel biologique embaumé

Le laboratoire d'anatomie de l'Université du Québec à Trois-Rivières utilise trois méthodes d'embaumement des corps. La première est la méthode classique, à base de formol. La seconde, la méthode de Thiel, et la troisième, utilisant une solution de sels saturés à base de chlorure de sodium,

offrent l'avantage de garder les tissus plus souples, conservant ainsi davantage la texture du corps et des organes d'un vivant. La méthode la plus commune reste cependant celle de l'embaumement au formol (Giolda et Rigg 2017).

Les tissus biologiques embaumés ne sont pas fréquemment utilisés pour des analyses génétiques, puisque l'extraction d'ADN à partir de tissus embaumés au formol constitue un défi (Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Campos et Gilbert 2012, Giolda et Rigg 2017, Singh, Narayan et al. 2020). En effet, le formaldéhyde endommage l'ADN, engendre des modifications chimiques, dégrade et réduit la quantité et la qualité de l'ADN (Wheeler, Czado et al. 2017, Singh, Narayan et al. 2020). Il viendrait fixer des liaisons et engendrerait des réactions entre les groupes carbonyles du formaldéhyde et les groupes aminés des protéines (Paireder, Werner et al. 2013, Wheeler, Czado et al. 2017). La fixation de tissus par le formol crée des liaisons covalentes entre les protéines, et entre les protéines et les acides nucléiques (Paireder, Werner et al. 2013, Giolda et Rigg 2017, Singh, Narayan et al. 2020). Dépendamment de l'affinité des protéines impliquées, différents groupes réactifs peuvent se former, comme les groupes hydroxy-méthyl, les bases de Schiff et les ponts méthylènes (Singh, Narayan et al. 2020). Le formol agirait aussi comme inhibiteur de la protéinase K, utilisée comme agent de lyse cellulaire dans la majorité des protocoles d'extraction de l'ADN (Wheeler, Czado et al. 2017).

Les protocoles d'extraction standards génèrent habituellement de faibles quantités d'ADN impur et parfois très fragmenté, qui sera difficilement amplifié par PCR, notamment dû à la formation de complexes et liaisons entre l'ADN et les protéines (Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Campos et Gilbert 2012, Paireder, Werner et al. 2013, Giolda et Rigg 2017). La quantité et la qualité de l'ADN extrait à partir de tissus embaumés au formol est donc très variable et dépend du type de tissu, du temps écoulé depuis la fixation, de la méthode de fixation utilisée (pH, température, durée de

fixation) et de la procédure d'extraction utilisée (Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Giolda et Rigg 2017). Plusieurs protocoles adaptés ont été développés et comparés, visant à extraire des quantités plus élevées d'ADN amplifiable à partir de spécimens embaumés au formol (Coombs, Gough et al. 1999, Shi, Cote et al. 2002, Dedhia, Tarale et al. 2007, Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Skage et Schander 2007, Santos, Saito et al. 2008, Santos, Sá et al. 2009, Paireder, Werner et al. 2013). Les fragments d'ADN extraits de ces types de tissus excèdent rarement 200-300 paires de base dû à une fragmentation extrême, ce qui fait que seules des séquences relativement courtes peuvent être amplifiées avec succès (Lin, Kennedy et al. 2009, Okello, Zurek et al. 2010, Ludyga, Grünwald et al. 2012).

Chapitre 3 – Article scientifique

Facial recognition of approximation using a dry skull and phenotype predictions: potential of interdisciplinary research

Ariane Durand-Guévin^{1,2}, Frank Crispino^{2,3,4}, Emmanuel Milot^{2,3,4}

¹ Département d'Anatomie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

² Groupe de recherche en science forensique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

³ Département de Chimie, Biochimie et Physique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

⁴ Centre international de Criminologie Comparée, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

Corresponding author:

Emmanuel Milot, Département de Chimie, Biochimie et Physique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada. Email : emmanuel.milot@uqtr.ca

Funding:

This research was supported by the *Fonds de Recherche du Québec, Nature et technologies* (FRQNT).

Keywords:

Facial approximation, forensic facial reconstruction, DNA phenotyping, psychology, facial recognition, semiotics, recognition test, resemblance test, interdisciplinarity

3.1. Abstract

Facial approximation is an investigative tool used to produce the most probable face of an unknown person based on its skull and anthropological profile when no other means of identification were conclusive. An underlying question of facial approximation is *how* we recognize a face. Nowadays, evolving techniques, including statistical prediction of the colors of

specific facial features, based on DNA, offer new opportunities. It put forwards the potential of interdisciplinary research, combining facial approximation, facial recognition, and DNA phenotyping. The project's aims were to assess the potential and limits of facial approximation, and to better understand facial recognition through facial approximation using predicted phenotypes of hair, eyes, and skin. Six practitioners of around the world produced an approximation from the same skull and anthropological profile. The approximations were then used in recognition and resemblance tests. Results suggest that inferring the appearance of individuals does not rely on FA methods and techniques alone. Micro-information of the face, related to its internal characteristics, seemed to influence the recognition process. Finally, color predictions can indirectly be used (grey-scale) in the production of an approximation, while the predicted color categories can act as a spoken-portrait.

3.2. Introduction

Facial reconstruction is used in various contexts, such as in archeology, history, medicine, or forensic science (Snow, Gatliff et al. 1970, Verzé 2009, Moraes, Miamoto et al. 2014, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Gupta, Gupta et al. 2015). Forensic facial reconstruction, or facial approximation (FA), is generated when human remains are found, but failed to be identified through conventional practices (dental records, genetic analysis). It consists of approximating the face of a person, when he or she was alive, using his/her skull and mandible (Stephan and Henneberg 2006, Evison 2009, Stephan and Devine 2009, Verzé 2009, Decker, Ford et al. 2013, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2017). The approximation is then disseminated in the public space or shown to a relevant group of people, sometimes with other information regarding the case (clothes, tattoos, jewelry...), to ultimately call for public feedbacks to generate a list of candidates, who, if of interest, will be further investigated by authorities

through more usual forensic identifiers such as DNA or dental records. Hence, it is first and foremost, if not exclusively, an investigative tool (Tyrrell, Evison et al. 1997, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Parks, Richard et al. 2013, Stephan, Caple et al. 2018).

Few works have been done to examine the potential value of combining the knowledge of different fields, such as psychology, arts, and genetics for FA (Evison 2000). Since ultimately, by building a FA, we want to attract public attention leading to facial recognition, it seems important to first understand *how* we recognize a face. This knowledge would be valuable to the FA field to pinpoint the most important characteristics to focus on and to validate methods. On the other hand, other fields, such as psychology, may use recognition and resemblance tests data to assess recognition hypotheses. A stronger connection between fields should be attempted whatsoever. As FA relates to more than one field, it needs to be tackled with interdisciplinary research, combining FA, facial recognition, and the potential of DNA phenotyping.

3.2.1. Facial approximation

Tridimensional methods of FA include sculpture methods (manual and virtual) and virtual automated complex routines (Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Parks, Richard et al. 2013, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Gupta, Gupta et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018). There are three methods of sculpture, namely American, Russian, and Manchester methods (the later also called Combined/mixt/British) (Stephan and Henneberg 2001, Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). The American method uses facial soft tissue thickness' datasets, that can be classified in function of age, ethnicity, or biological sex (Verzé 2009, Bandyopadhyay, Basu et al. 2015, Gupta, Gupta et al. 2015, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). These datasets present tissue thicknesses at specific places on the skull called landmarks. When sculpting an approximation, clay or other material is added until it reaches the tissue thickness

marked at each landmark (Evison 2009, Verzé 2009, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). The Russian method is based on anatomical aspects, where muscles of the head and neck are fundamentals (Evison 2009, Verzé 2009, Gupta, Gupta et al. 2015, Evison, Iwamura et al. 2016, Herrera, Strapasson et al. 2017). Muscles are sculpted and added to the skull (Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). Finally, the Manchester method is a mix of both previous methods, as it uses muscles and soft tissue thickness data to sculpt details of the face (Verzé 2009, Gupta, Gupta et al. 2015, Herrera, Strapasson et al. 2017). It was reported that the Manchester method is the most used by practitioners (Klepáček and Malá 2012, Stephan, Caple et al. 2018).

Virtual sculpture methods (same steps as manual sculpture methods but done virtually) are presented as being more efficient and less time/material consuming than manual methods, yet do not seem to be used as often (Vanezis, Blowes et al. 1989, Davy-Jow, Schofield et al. 2005, Claes, Vandermeulen et al. 2006, Herrera, Tedeschi-Oliveira et al. 2013, Evison, Iwamura et al. 2016).

To estimate specific characteristics of the face, such as eyes, nose, ears and mouth, numerous techniques exist (e.g., Prokopec and Ubelaker 2002, Wilkinson and Mautner 2003, Stephan, Huang et al. 2009, Rynn, Wilkinson et al. 2010, Guyomarc'h and Stephan 2012, Zednikova Mala and Velemínska 2016). Despite the long history of these techniques, some of them are claimed as subjective, not scientifically validated or invalidated and/or based on artistic premisses (Snow, Gatliff et al. 1970, Evison 2009, Hayes 2014, Stephan, Caple et al. 2018). An issue often highlighted is the absence of detailed methods in papers and of standardization regarding the methods, soft tissue references, and techniques (Tyrrell, Evison et al. 1997, Evison, Davy-Jow et al. 2003, Hayes 2014). From the large pool of existing methods and techniques, the use of one or the other would therefore depend on the practitioner's background, formation, experience, etc.

While the goal of FA is sometimes equated to obtain a morphologically exact face of the unknown deceased (Evison, Davy-Jow et al. 2003, Verzé 2009, Claes, Vandermeulen et al. 2010), its success is unclear, as circumstantial information, case description, public's attention generated by the mediatisation of the case, or the time at which the approximation is published are relevant factors to take into account (Stephan and Henneberg 2001, Stephan and Henneberg 2006). It is thus important to define what is intended by the *success* of an approximation. It can be defined in different manners, such as (1) the approximation is similar in its morphology to the *real* face of the person, (2) it is recognized (generating a list of candidates), and (3) it results in an identification in a case (a correct recognition, later confirmed by other means by the investigating authority) (Claes, Vandermeulen et al. 2006, Stephan and Cicolini 2010, Parks, Richard et al. 2013, Claes, Hill et al. 2014). If one wants to study how an approximation is morphologically similar to a face, morphometric tests are carried out to see how the approximation fits the face (Wilkinson, Rynn et al. 2006, Decker, Ford et al. 2013). Otherwise, resemblance and recognition tests are carried out, and the number of recognitions per approximation and/or true and false positives are counted (Stephan and Henneberg 2001, Stephan and Arthur 2006, Parks, Richard et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016).

Recognition tests evaluate the ability of a face to be recognized, whereas resemblance tests evaluate similarities between two faces by direct comparison. Recognition tests implies that the picture of a FA is shown to an evaluator, and then multiple photographs of *real* faces are shown to the evaluator, who indicates if he or she recognizes the face represented by the reconstruction (Parks, Richard et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016). Different variations of the test exist, like evaluators that are familiar with the face of the deceased or non-familiar, photographs of the *real* faces shown simultaneously or in sequence, the number of photographs presented, forced

choice (the evaluator must recognize one face) or not, etc. (Stephan and Henneberg 2006, Wilkinson, Rynn et al. 2006, Parks, Richard et al. 2013, Herrera, Strapasson et al. 2016). For resemblance tests, two photographs, namely the FA and the face of the *real* person is shown side-by-side to the evaluator, who gives a score to the dyad based on a pre-defined scale (Stephan and Cicolini 2008, Herrera, Strapasson et al. 2016).

3.2.2. Facial recognition

Human faces are extremely rich in the information they vehicle and are important for cognitive studies and in psychology research (Fisher and Cox 1975, Ellis, Shepherd et al. 1979). We possess an outstanding ability to recognize easily and without effort the faces we know, under different angles and even with changes of lighting, viewpoints, and facial expressions (Fisher and Cox 1975, Haig 1984, Hancock, Bruce et al. 2000, Young and Burton 2017). Despite this ease, specific mechanisms of how we recognize a face are still unknown (Haig 1984, Abudarham and Yovel 2019). Nonetheless, faces that we know well would not give the same cognitive stimuli as the faces we have never seen or seen only once, even if it is not clear how face representation change during the process of getting familiar (Ellis, Shepherd et al. 1979, Abudarham and Yovel 2019).

For familiar faces, internal characteristics (e.g., nose, mouth, eyes) would give more relevant information than the exterior portion of the face (e.g., hair line, jaw line, ears), and the upper portion of the face would be more useful for identification than the lower portion (Goldstein and Mackenberg 1966, Ellis, Shepherd et al. 1979). A hypothesis is that we are more cautious to the internal characteristics of a face to understand someone's emotion and communicate with them, and through time (with an increasing familiarity) these are the characteristics we will better memorize (Ellis, Shepherd et al. 1979). Recognition of faces we have only seen once would be based on internal and/or external characteristics, implying that both types are important. However,

hair line gets more attention than the jaw, eyes would be more observed than the nose and mouth, and the form of the face would be very important when we are not familiar with a face (Ellis, Shepherd et al. 1979, Hayes, Rg et al. 2006).

Studies support that we might not only recognize faces from the form or appearance of their facial characteristics, but that the features should also be in a correct position, meaning that if characteristics are displaced (voluntarily) in a picture, it would impact our capacity to recognize the person (Haig 1984). An important hypothesis is that the recognition process operates in a specific manner for each face, meaning that face recognition would be idiosyncratic and not a generalizable cognitive process (Young and Burton 2017, Oruc, Balas et al. 2019). Typical characteristics would also influence recognition (Rhodes, Brennan et al. 1987). What is said to be *typical* is based on the surrounding population, and we better recognize faces of the same ethnicity, compared to other populations (Rhodes, Brennan et al. 1987, Oruc, Balas et al. 2019). Biological gender seems to play a role as well, as women not only tend to better recognize other women's faces than men but outperform men at recognizing other men's faces (Lewin and Herlitz 2002, Wright and Sladden 2003, Rehnman and Herlitz 2007). Studies have shown that seeing a face in multiple circumstances helps to learn how the face varies and to differentiate its stable characteristics from transitory variabilities (Burton, Kramer et al. 2016, Kramer, Young et al. 2017, Ritchie and Burton 2017, Young and Burton 2017). Moreover, presenting faces with an angle from frontal view (e.g., $\frac{3}{4}$ view) seems to have an advantage for recognition and memory (O'Toole, Edelman et al. 1998).

Another aspect that is said to influence facial recognition is our familiarity with a face (Rhodes, Brennan et al. 1987, Kramer, Young et al. 2018, Oruc, Balas et al. 2019). Familiarity is often enunciated as a dichotomy – whether familiar or non-familiar (Kramer, Young et al. 2018).

However, the concept is more complicated and at least, familiarity should be differentiated between visual familiarity and personal familiarity. We can think of it as an evolving image of someone that we create in our head, made from all the images, views and conditions in which we have seen this person. We therefore recognize as a function of our level of exposure to that person, constantly evolving (Rhodes, Brennan et al. 1987, Kramer, Young et al. 2018, Oruc, Balas et al. 2019). The more we see a face, the more we can subtract the variabilities depending on the punctual environment and conditions in which we see that face. However, knowing someone (being personally familiar) does not mean we are familiar with that person's face (visually familiar). Seeing someone in movement can also impact recognition, meaning that the cognitive process is not only based on a static image we have in our head. Of course, this adds to the challenge of facial recognition of a static approximation.

Cognitive assessments of resemblance and facial recognition are sometimes associated, since a face that resembles to an approximation is thought to have higher chances in generating recognitions (Stephan and Henneberg 2006). However, both are not necessarily related nor correlated. Stephan and Arthur (2006) evaluated both recognition and resemblance tests using two approximations: one made by an experimented practitioner knowing the appearance of the person, and one made by a novice that had no idea what the person looked like. Both approximations got similar resemblance scores, despite recognition results greatly varying. Since an approximation generally has less details than a *real* face and therefore might look similar to varying *real* faces, it suggests that resemblance tests are not necessarily indicators of recognition and consider similarities between faces rather than their potential to be recognized. The interest in comparing two faces that do not present the same level of details is therefore limited – two approximations (or two *real* faces) should therefore be compared, rather than one approximation and one *real* face.

3.2.3. DNA phenotyping

Human identification is an important part of DNA studies, but DNA profiles obtained through genetic analysis are relevant when comparative material or references are available: their usefulness is reduced if no match is obtained or if there is no biological material to compare (Claes, Hill et al. 2014, MacLean and Lamparello 2014, Greytak and Armentrout 2015, Sero, Zaidi et al. 2019). Multiple studies are focusing on external visible characteristics (EVCs) predictions from DNA markers (Kayser and Schneider 2009, Kayser and de Knijff 2011, MacLean and Lamparello 2014, Laan 2017, Lippert, Sabatini et al. 2017). This approach can be used to generate investigative leads by inferring the physical appearance of an unknown person and to reduce a list of potential suspects of a case in orienting research towards people presenting these specific characteristics (Claes, Hill et al. 2014, MacLean and Lamparello 2014, Greytak and Armentrout 2015, Sero, Zaidi et al. 2019, Diepenbroek, Bayer et al. 2020, Kukla-Bartoszek, Szargut et al. 2020, Palencia-Madrid, Xavier et al. 2020).

In the field of forensic DNA phenotyping (FDP), HIrisPlex-S relies on 41 punctual genetic variations to help predict, from regression models adjusted on reference population samples, the color of eyes, hair, and skin of a person (Chaitanya, Breslin et al. 2018). Once genetic analyses and data are obtained, this online tool can generate probabilities for color categories of eyes (blue, brown, intermediate), hair (red, brown, black, blond) and skin (very pale, pale, intermediate, dark, dark-to-black) (Breslin, Wills et al. 2019).

3.2.4. The project

Studying FA presents an opportunity for interdisciplinary research and to assess the state of the art in comparison to literature: do almost all practitioners used the Manchester method? Is there one

or more specific methods/techniques often privileged? Is the virtual method faster, and more (or less) used than manual sculpting method? Is FA a reproducible tool? etc. Regarding facial recognition, performing recognition tests using FAs could help test the hypotheses that (1) mechanisms of facial recognition are specific to a face, (2) some features of the face are responsible for recognition, and (3) to assess the potential value on recognition of adding to FAs predicted colors of specific facial traits (hair, skin, eyes) obtained through DNA phenotyping.

The aim of this project was therefore to evaluate the potential and limitations of FAs complemented by DNA phenotyping, and to better understand human facial recognition which reflects (unobserved) underlying cognitive factors. Multiple FAs based on the same skull and same information, but produced by different practitioners around the world, were obtained. Recognition tests, using the approximations returned, and resemblance tests were then carried out with volunteered participants. In the light of facial recognition and psychology field knowledge, both types of tests were modified from the ones currently used in the field (see *Material and methods*). Answers provided by the volunteers during these tests helped to better understand the factors implied in facial recognition, but also allowed to assess the potential impact on recognition when DNA phenotyping is used complementarily to an approximation.

3.3. Material and methods

3.3.1. Simulated case

In real-life cases, some practitioners assess the skull and mandible themselves to elaborate the profile of a deceased (age, ancestry, biological sex), but some work tightly with anthropologists, anatomists, dentists, etc. to infer the profile (Vanezis, Blowes et al. 1989, Claes, Vandermeulen et al. 2010). In this study, the anthropological work to obtain the profile of the deceased prior to the

FA was not the focus: the methods to build the approximation and the resulting approximations were. The profile was therefore elaborated for the practitioners, for them to all work with the same information. To be consistent with real-life cases, the exact information of the donor was not used but rather estimated, as what would have been done if the practitioners would have received the remains of the deceased. A deceased donor was selected based on the availability of the material required to carry out this study: skull, mandible, bones, biological tissues for genetic analyses, and an *ante-mortem* facial picture for recognition tests. The donor was a male embalmed in 2018 at the anatomy laboratory of our university. Ethical approval to conduct research on this specimen was given in 2021 by the Anatomy Teaching and Research Laboratory Ethics Sub-Committee (certificate no. SCELERA-21-01). The *ante-mortem* photography of the donor can be found in the *Supplementary Material* section (*Figure S5*).

3.3.1.1. Anthropological and anthropometric profile

The profile sent to practitioners consisted of the description of ancestry, age, biological sex and phenotypes of skin, eyes, and hair. Ancestry was estimated from morphological characteristics of the skull, pointing towards a Caucasoid-type skull: upright profile, prominent nose, long-to-round cranial shape, moderate to strong brow ridge, angular orbits, narrow nasal width, narrow inter-orbital distance, prominent nasal spine, sharp nasal aperture margins, no apparent prognathism (White and Folkens 2005, Evison 2009). Age was approximated according to the categories used in forensic archeology and anthropology: 12-20 years old, 20-35 years old, 35-50 years old and >50 years old (Haas, Buikstra et al. 1994). These broad categories are explained by the fact that it is difficult to be precise since bones and/or teeth, used to estimate the age, do not follow a constant growing pattern. With the specific mandible used in this study, the subject was estimated to be older than 50 years old. Alterations and degenerative changes observed (mandibular morphology

where tissue sagging and alveolar bone loss accompanied teeth loss, and the skull was damaged and extremely thin in multiple spots) suggested an advanced age (Priya 2017). Biological sex was estimated from morphological characteristics of the skull, pointing towards a male: the skull was robust and rugged, the supra-orbital ridges were pronounced with a sloping forehead, the glabella was well-developed, the mandible had a square shape, the orbits were more square-shaped, the mastoid processes were large and blunt, and the external occipital protuberance was pronounced (White and Folkens 2005, Evison 2009). Using scores from 1 to 5 where 1 is more feminine and 5 more masculine, the nuchal crest, mastoid processes, supra-orbital margin & ridges, and the mental eminence all scored 4 or 5 (White and Folkens 2005). Finally, phenotype predictions of eyes, hair, and skin colors were obtained with DNA using the 41 SNPs corresponding to the HIrisPlex-S model.

3.3.1.2. Skull and mandible photogrammetry and replicates

The skull and mandible were photographed over a white background. Photographs were taken from the top, bottom, and sides with 15° angles, as suggested by Moraes, Miamoto et al. (2014). The photographs were imported in the photogrammetry program *Agisoft Metashape*® and the steps to create the 3D models followed the ones suggested in the user manual. The files were exported in a stereolithographic (STL) format and scaled 1:1 with *3D Builder*®. A 3D printer Stratasys F170 (resolution 127-330 µm; precision at 177.8 µm) and beige ABS (acrylonitrile-butadiene-styrene) thermoplastic were used to print the copies of the skull. These methods were validated as being representative of the actual bones (Decker, Ford et al. 2008, Guyomarc'h, Santos et al. 2012).

Photographs of the skull and mandible of the deceased and the printed copies are shown in *Figure 1*.



Figure 1. – Skull and mandible of the deceased (actual skull and mandible on the left, printed skull and mandible on the right). Technical settings of the digital camera: model Nikon™ D3200®, diaphragm aperture F/5, time exposition 1/160 second, ISO 200, 35 mm objective, focal distance of 52, maximum aperture 4.7 and flash activated.

3.3.2. Facial approximations

Practitioners from academic and operational fields were contacted to participate in the project. The six volunteers received the deceased's estimated profile (ancestry, sex, height, age, phenotype), a copy of the skull and mandible, either under material (3D print) or virtual (*Agisoft Metashape* 3D model) form, depending on their working method. They were also asked questions aiming to gather information on the FA method and techniques used, on their background and their experience in the field. No constraints were imposed to practitioners regarding the reconstruction method and techniques to be used, thereby ensuring that the results were typical of their everyday work. Once completed, all practitioners were asked to provide front, sides and $\frac{3}{4}$ views pictures of their FA. One practitioner worked completely virtually, one combined manual and virtual work, and the four others worked completely manually, with clay.

3.3.3. Recognition and resemblance tests

Once all six FAs were received, two tests were carried out on a sample of volunteers over the course of Fall 2022. Targeted participants were adults from the local (Québec) population, the only exclusion criterion being persons who knew some prior information about the tests because they were in our professional network (e.g., research team colleagues, collaborators, etc.). Recognition and resemblance tests were approved by the Ethic Comity of Research with Human Beings at *Université du Québec à Trois-Rivières* (certificate no. CER-22-284-07.06). Signed consent was obtained from all participants, who were asked to provide information about their occupation, age, and gender. It took approximately one hour for a participant to complete the two tests. A total of 44 volunteers participated to both tests, one participant did only test 1 (recognition) and another did only test 2 (resemblance), for a total of 46 different participants for both tests combined. Their mean age was 35 years old (yo), with a range from 23 to 58 yo. A total of 15 men and 30 women participated in the first test, and 14 men and 31 women in the second test. The occupations of the participants were very diversified: lawyer, firefighter, teacher, forensic experts in multiple areas, residents in pharmacy and medicine, students, farm owner, administrative agents, etc.

Recognition and resemblance tests found in literature were adapted. Indeed, recognition tests consist of showing the approximation to an evaluator, *then* this evaluator tries to recognize the *real* face, never yet seen, amongst a pool of faces. However, this is not logical because the concept of recognition is based on the premises that one already knows the person. In our experiment, the face of the donor was shown to the participants first, *then* the approximations were shown. The resemblance test focused on facial characteristics in general and the cognitive process associated to resemblance. Therefore, instead of comparing one FA with one photograph of a face as in the literature, two photographs of faces (called dyads through the text) were shown together.

3.3.3.1. Test 1. Recognition test

The six FAs are shown in *Figure 2*. Approximations #1a and #1b are two versions of a single one, as #1b is the end point result obtained after details such as texture were added to #1a. Both were separately used in the test, yielding a total of 7 approximations. Photographies were printed with a toner printer (Xerox® VersaLink C405) on 8½ x 11” paper sheets. The colorized pictures sent by the practitioners were used – there was no attempt to standardize the pictures (e.g., black and white). The *ante-mortem* picture of the donor was also printed in its original format (~ 6½ x 5”).

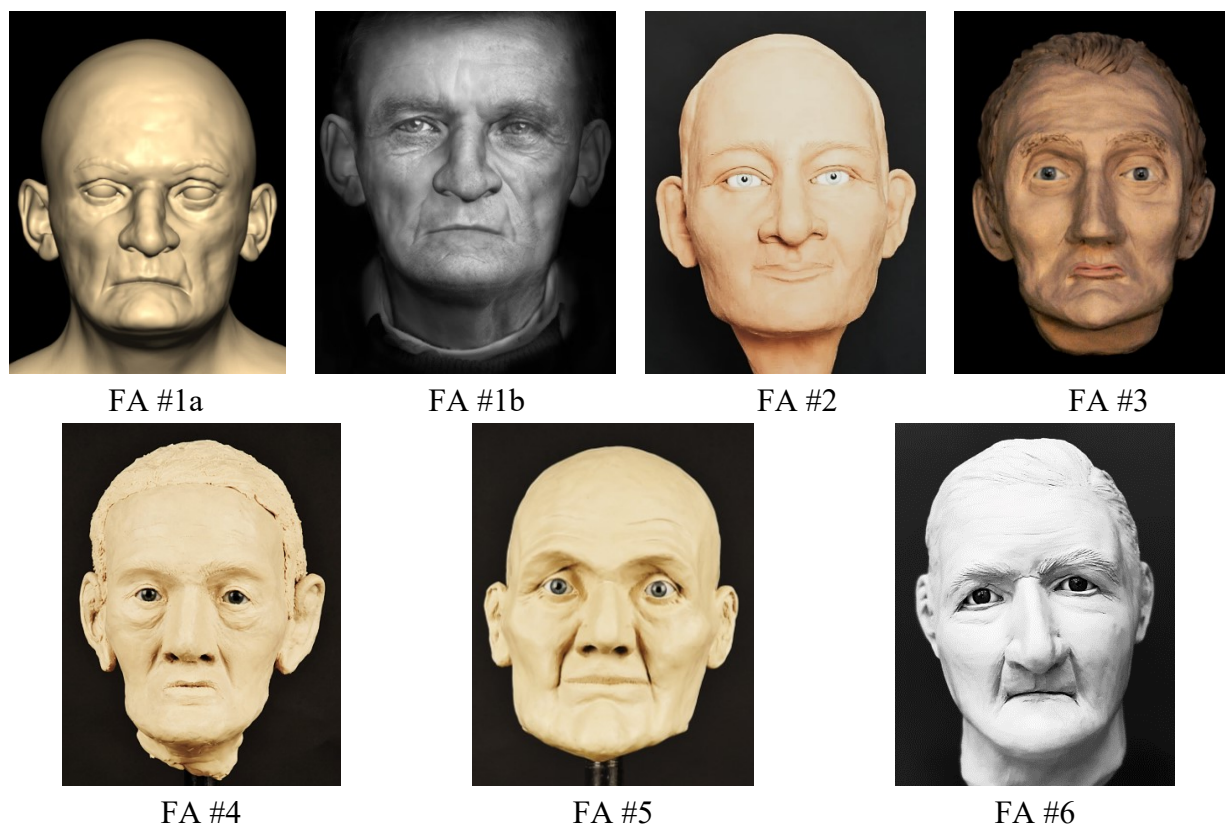


Figure 2. – The six FAs realised by the practitioners and used for the recognition tests.

Participants were not familiar with the deceased prior to the test (meaning it was the first time they saw his *real* face during the test). They were first given the *ante-mortem* pictures of the donor for a maximum of 5 minutes, to study his traits. The allowed time was a maximum, as if the participant

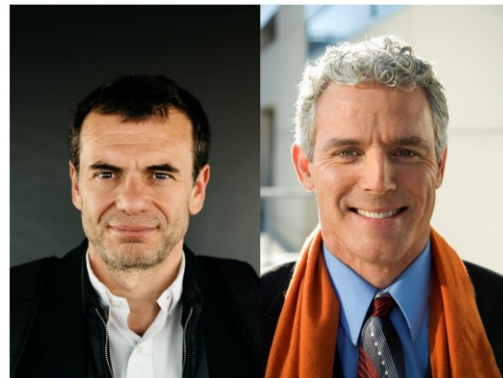
felt accustomed enough with the face of the donor before, they could start the test. In a prior study, one minute did not seem enough (Rhodes, Brennan et al. 1987). The time was set to 5 minutes so that the overall estimated time to take the test was around 30 minutes. Therefore, once they felt ready or once the 5 minutes was elapsed, the pictures of the donor were hidden and a first approximation (front, side and $\frac{3}{4}$ views shown altogether) was presented to the participant. The participant then had to say if she/he thought the approximation was of the donor (yes, recognition) or not (no, no recognition). For this test, success was for the approximation to be recognized – there was no mean of evaluating morphological accuracy nor if the recognition was accurate. When the answer was yes, the participant was asked if there were any facial characteristics that he/she could consciously identify that prompted this answer. When the answer was no, the participant was asked whether there was a facial characteristic that seemingly excluded the donor as the person to be identified. The first FA was then hidden from sight and the participant was allowed to look again at the pictures of the donor, to avoid being influenced by the previous approximation, before the second approximation was shown. FAs were shown sequentially, as showing them all at the same time would have allowed the participant to make a direct comparison and choose the most resemblant, rather than use his/her memory to recognize the face (Stephan 2005, Stephan and Cicolini 2008, Stephan and Cicolini 2010). The sequence of approximations was randomly drawn for each participant. It was not a forced choice, and participants were told that they could identify all approximations, none, or any number in between. Participants did not know how many approximations were going to be presented to them and when the test would end.

3.3.3.2. Test 2. Resemblance test

There was a total of six dyads, three of men and three of women (see *Figure 3*). The order of presentations was the same for all participants, namely dyad 1 up to dyad 6, alternating between female (#1, 3, 5) and male (#2, 4, 6).



Dyad #1



Dyad #2



Dyad #3



Dyad #4



Dyad #5



Dyad #6

Figure 3. – The six dyads used for the resemblance test.

All photographs were acquired from the database *Deposit Photos*©, with a life-long rights to use images. They were selected to present different characteristics (different ethnicities, age, pigmentations, etc.) across dyads, but similar characteristics for the two faces chosen for one dyad. This similarity was randomly and subjectively assessed by the first author. For example, for the first dyad, a search for ‘middle aged women’ was made through the database, and two pictures of blond women wearing glasses were chosen. Both photographs of a dyad were printed together in landscape format on an 8 ½ x 11” page. The participants attributed a score from 1 to 5 to each dyad, and indicated what characteristics, if any, contributed to the resemblance or disresemblance between the two members of a dyad (morphology, color of skin, eyes or hair, posture...). The scores corresponded to *1 – no resemblance, 2 – light resemblance, 3 – average resemblance, 4 – good resemblance* and *5 – great resemblance* (Stephan and Cicolini 2008).

3.3.3.3. Analysis of tests results

Results were analysed qualitatively and with basic statistics – total number of responses per approximation or score, mean, minimum, maximum. Responses were also assessed by age, sex, and occupation. Two caricaturists were consulted regarding the cognitive process when achieving a face caricature, to better understand the answers submitted by the participants for both tests. Five questions were asked to the caricaturists: What are the facial characteristics generally exaggerated? Are the characteristics always the same, or vary from face to face (face-specific)? How would they define a physical ‘distinctive’ characteristic? What is their cognitive process when a face is in front of them, to know and decide what to emphasize? From their perspective, is it realizable to produce a caricature from a single picture of a person?

3.4. Results

3.4.1. Facial approximations

There was a total of four experimented practitioners and two new to the operational field. The practitioners' profiles obtained from the questionnaire are summarized in *Table 1*. For the types of case the practitioners work on or are meant to work on, the answers varied from only research cases to research, historical, forensic and/or archeological cases. For the experimented practitioners, the number of approximations achieved for cases to the date they answered varied from 3 to more than hundreds, and for the years of experience, the answers varied from 0.5 to 23 years. Both for the experimented practitioners and for the new practitioners, half of them work with both manual and virtual methods, while the other half solely with manual methods. Their academic background was quite diversified: arts, anthropology, dentistry, biostatistics, graphic design, geomatic and cultural geography.

Table 1. – Background and experience of the FA practitioners.

Practitioner	Types of case	# FA produced	Type of method	Experience	Academic background
A	Research, historical, archeological, forensic	3	Manual	0.5 year	Art, cultural geography, geomatic
*B	Research, historical, forensic	0	Manual and virtual	1.7 year	Visual arts and graphics
C	Research, historical, archeological, forensic	> 100s	Manual and virtual	23 years	Fine art and graphic design
*D	Research	0	Manual	0 year	Visual arts
E	Research, historical, archeological, forensic	15	Manual and virtual	10 years	Forensic art, facial anthropology
F	Research	24	Manual	11 years	Dentistry, biostatistics

**Practitioners new to the operational field.*

The FAs realised by the six practitioners were previously shown in *Figure 2*. The methods applied are detailed in *Table 2*. As mentioned previously, approximations #1a and #1b are two versions of a single approximation: #1b is the end point result obtained after details such as texture were added to #1a.

Table 2. – Methods to produce the FAs according to each practitioner.

FA#	Type of method	Method	Ref. soft tissues	Duration
1a/b	Virtual	Combined (with muscles)	Stephan	≈ 21 hours
2	Material	American (without muscles)	De Greef	≈ 29 hours
3*	Material & virtual	American (without muscles)	Rhine	≈ 49 hours
4	Material	American (without muscles)	Rhine	≈ 40 hours
5*	Material	Combined (with muscles)	Rhine	≈ 35-40 hours
6	Material	Combined (with muscles)	Stephan	≈ 28 hours

**Practitioners new to the operational field.*

Each practitioner applied a varying number of techniques to reconstruct the facial characteristics. For each practitioner, up to 4 techniques were used for the eyes, mouth and ears, and up to 3 for the nose. Techniques, all practitioners combined, are listed in the *Supplementary Material* section (*Table S4*).

Finally, they were asked (1) if there was information that was not provided to them that they would have liked, and (2) if there was information that was provided to them but was not used. The answers were respectively: (1) some would have liked to have the length and texture of the hair, the weight or body mass index (BMI), the teeth or dental plate, and the geographic coordinates of where the cadaver was found instead of the ancestry; and (2) some did not use directly the color of hair and skin provided but rather exploited the information using grey tones (e.g., pale grey shade instead of blue, and dark grey shade instead of brown), and some were questioning the relevance of hair color in relation to the age.

3.4.2. Recognition and resemblance tests

The synthesis of the caricaturists' answers to the five questions they were asked are resumed below. These answers were compared to the answers submitted by the participants for both tests.

- What are the facial characteristics generally exaggerated? *If one characteristic among eyes, nose, mouth, and ears is on one or the other extreme of the 'normal distribution', in other words that there is a marked difference with the general population, it will be exaggerated.*
- Are the characteristics always the same, or vary from face to face? *It varies (face-specific).*
- How would you define a physical 'distinctive' characteristic – in other words, how do you choose which facial characteristics to exaggerate, if not the same for all faces? *Face contours are a key element for resemblance, and therefore the form of the head, the contours and the jaw are generally distinctive elements. Distinctive characteristics are harder to find when people are well proportionate (not in the extremities of the normal distribution). Characteristics that move away from the center of the normal distribution are more unique.*
- What is your cognitive process when a face is in front of you, to know and decide what to emphasize? *Visually identify the distinctive traits, physical and psychological. Start with the face contours, then the inner characteristics (eyes, nose, mouth).*
- From your perspective, is it realizable to produce a caricature from a single picture of a person, or do you have to observe the person in movement? *It is not impossible, but someone in movement is giving more information on their state of mind, temperament, and their moving position might be particular enough for someone to recognize the person simply with this.*

3.4.2.1. Test 1. Recognition test

Only 3 participants out of the 45 used the whole 5-minute period to get familiar with the face of the donor. The mean time the participants took to observe the face of the donor was 2.7 ± 0.3

minutes. In total, 51 % of participants responded with a minimum of one recognition (*yes*) while the other 49 % responded *no* to all approximations. The number of recognitions varied between 0-4 per participant.

Results show that 40 % of men responded with at least one recognition, while 57 % of women did. Results assessed by age showed that 52 % of participants aged 20-34 yo responded with at least one recognition, while 43 % of the participants aged 35-49 yo did, and 55 % of the participants aged more than 50 yo did. Results assessed by occupation showed that participants that were more used to see a diversity of faces on an everyday basis (n=17: e.g., photographer, face drawers, customer services, hospital workers) took on average 2.2 minutes to study the deceased's face and got on average 1 recognition per participant. The others (n=28: e.g., lawyers, chemists, farmer) took on average 3.1 minutes to study the deceased' face and got in average 1 recognition per participant as well. The first group took less time to study the face than the second group, while the average number of recognitions did not change (1 recognition/participant for both). FAs #1a, #1b and #5 were the most recognized approximations (*Figure 4*).

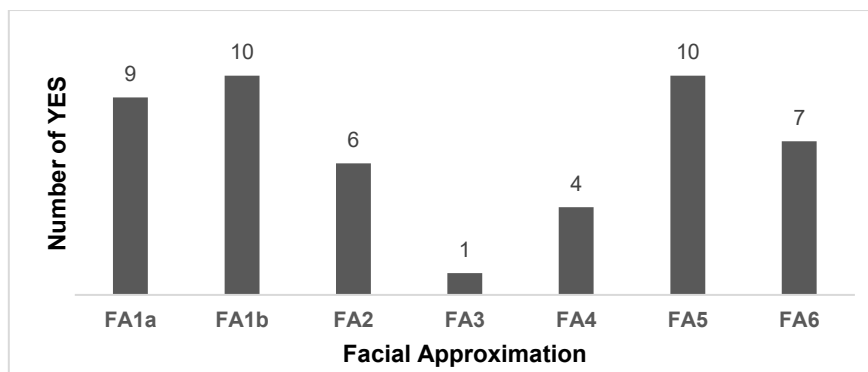


Figure 4. – Number of recognitions received per facial approximation.

For the three approximations that got the most recognitions, the features that were mentioned more often by the participants were: shape and size of the eyes and mouth for FA #1a, shape and size of the nose for FA #1b, and shape and size of the eyes for FA #5. The reasons given for a recognition

for each FA, all participants combined, are listed in the *Supplementary Material* section (*Table S5*). Reasons for a non-recognition, all FAs combined, were often due to shape and position of eyes, chin, nose, and ears.

3.4.2.2. Test 2. Resemblance test

Score 1 corresponded to *no resemblance*, 2 to *light resemblance*, 3 to *average resemblance*, 4 to *good resemblance* and 5 to *great resemblance* (Stephan and Cicolini 2008). For all dyads, the minimal score obtained was 1, and the maximal score was either 4 or 5, resulting in a mean score of approximately 2-3 for all dyads (see *Table 3*). On average, each participant gave one score of 3 for all 6 dyads.

Table 3. – Minimal, maximal, and mean scores accorded to the 6 dyads by the participants.

Scores obtained	Dyad					
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6
Minimum (all participants)	1	1	1	1	1	1
Maximum (all participants)	5	4	5	5	5	4
Mean score (all participants)	2.5	1.6	2.6	3.4	2.6	2.2
Mean score (women)	2.6	1.6	2.7	3.4	2.5	2.2
Mean score (men)	2.2	1.4	2.2	3.4	2.8	2.1

Although the scores given to a dyad varied among participants, the reasons they provided were less different. Across all six dyads, the characteristics that were described most often as being similar between the two faces of a dyad were face contours, form of the mouth, and form and color of the eyes. The characteristics that were described most often as being different were the form of the nose and chin, and the form and color of the eyes.

3.5. Discussion

The simulated case was challenging for the practitioners because of the edentulous mandible and the advanced age of the donor. The purpose was neither to evaluate the accuracy of the approximations, nor if the following recognitions were *right* or *wrong*, but rather to focus on the methods and techniques used by the practitioners and why the approximations were recognized by the participants.

A total of 22 practitioners from academic and operational fields were contacted. Eight (36 %) did not respond back, and eight (36 %) did not or could not participate for different reasons such as lack of time, project-specific (challenging since older and edentulous), or opinion ('project did not seem relevant since morphological accuracy was not evaluated', 'irrelevance of DNA phenotyping'). In general, the community did not seem particularly openminded to be challenged, as showed by the low participation. A possible reason might be that an experimented practitioner does not want his or her FA to be part of tests that could result in a high or low recognition rate, as obtaining a low recognition rate gives the impression that the approximation is not effective or successful.

Six practitioners (27 %) agreed to participate in the research, from North America (4), South America (1), and Europe (1). Out of these six practitioners, four were experimented ones, while two were novices. Answers provided by the practitioners regarding their experience and background first tell that the types of case they work on vary, as so for their academic background. This shows that there is no standardized formation or academic background to do facial approximation. The specific techniques used to build the eyes, nose, mouth, and ears also varied amongst the practitioners.

The shortest time to produce a FA was for the virtual approximation (FA #1a/b), nonetheless, the difference with the others does not seem as timesaving as implied in literature. The time to produce the FAs for the four experimented practitioners were of 21h, 28h, 29h and 40h. For the two novices, time was of 35-40h and 49h. The higher times for the novices could be explained by their less-experienced working methods. It would be interesting to compare the time necessary to produce a FA using a sculpting virtual method and an automated virtual method.

Regarding the method used by the practitioners, half ($n=2/4$ experimented and $n=1/2$ novice) used the American method, and the other half the Combined (Manchester) method. If this random sample is representative of the general population of practitioners, other methods than the Combined method might not be as little used as expected.

Out of the three most recognized FAs, #5 is one realized by a practitioner new to the operational field, which is very interesting. This suggests that the experience of a practitioner and its ability to produce an approximation is not necessarily linked to the capacity of a person to recognize someone. On the other hand, the less recognized approximation, FA #3, was also realized by a practitioner new to the field. As even a FA realized by a highly experimented practitioner does not guarantee a high recognition rate of the FA, our capacity to represent the look of individuals does not seem to solely rely on learning FA methods and techniques. This emphasizes that what makes us recognize a face depends on multiple factors, that go beyond the relation between a skull and the *ante-mortem* appearance of a person.

3.5.1. Recognition test

A hypothesis in literature is that the exposure to multiple faces affects our ability to recognize (Balas and Saville 2017). In the tests, by asking the occupation and cross analyzing the time to get

accustomed to the deceased' face and the recognition answers given, this is what we wanted to investigate. Participants that were used to see faces regularly (e.g., photographer, customer service worker, face drawers) took less time to study the face than the others, but this did not impact the recognition rates directly. This result suggests that people who are used to see faces regularly are not necessarily *better* at recognizing, but that the recognition task is *easier* for them.

All approximations were recognized at least once, indicating that the participants likely remember the face of the donor in their own yet different manner. Around half the participants recognized at least one approximation. In this case, 40% of men recognized at least one approximation, while almost 60% of women did. The result supports literature, stating that women are better at recognition than men (Lewin and Herlitz 2002, Wright and Sladden 2003, Rehnman and Herlitz 2007). For each of the three categories of age of the participants (20-34, 35-49, >50 yo), around 50 % of the participants recognized at least one approximation. In literature, older people would tend to better recognize others, explained by the fact that they would have seen more faces in their life (Hollins and Moon 2012). Herein, the rates are approximately the same regardless of the age.

For the most recognized FAs, #1a and #1b are the same approximation, but at two different stages of the virtual reconstruction. It was interesting as the answers were divided: some better liked the version with less details, as it lets space for their imagination to fill in, and therefore did not like the version with more details. On the contrary, the missing texture and color prevented others from being able to imagine the face of the donor over it. A major critique of the virtual approximation in literature is about the resulting mannequin look of virtual approximations, that does not reflect a realistic human look (Stephan and Henneberg 2001, Davy-Jow, Schofield et al. 2005, Evison, Iwamura et al. 2016). Although answers show that even this less detailed look may help some people to recognize, it was not the final state of the approximation. The final state, on the contrary,

bore even more details and texture than the manually sculpted approximations. From this, one can say that this argument of unrealistic look is no longer accurate, and that virtual approximations can present at least the same level of details and texture as a manually sculpted approximation, if not more.

Participants were asked to explain why they would recognize an approximation or why they would not recognize it. Interestingly, the reasons for a recognition varied from one approximation to the other but stayed rather the same for a specific approximation across the participants. Details of specific facial characteristics (micro-information) rather than general information of the face, like form and shape of the head for example, seems to play a bigger role in the recognition process. This relates more to the internal characteristics of the face. Shape and size of the eyes and mouth seemed more important for FA #1a, shape and size of nose for FA #1b, and finally shape and size of the eyes for FA #5. The results are very interesting in comparison to the caricaturists answers, as the identified characteristics for the approximations were the ones mentioned in the first question asked to the caricaturists: distinctive characteristics generally lie between eyes, mouth, nose, and ears. All FAs combined, a non-recognition was often due to the shape and position of eyes, chin, nose, and ears. This result supports the literature that facial features need to be in the 'correct' position (in comparison to the *real* face) for a face to be recognize (Haig 1984).

3.5.2. Resemblance test

The mean score for the dyads was around 3, the mid-score, as for other studies (Stephan and Cicolini 2008, Parks, Richard et al. 2013). When looking closer, however, this was not because participants gave mid-scores to all dyads, but rather because more extreme scores, on both sides of the scale, were given to each dyad. This means that some participants thought the two faces of a dyad were very similar, while others thought they shared nothing similar at all. Again,

participants were not only asked to give a score, but also to explain their answer and say which characteristics they thought were similar or not. Interestingly, for a dyad, the answers given were similar, even if the score varied. For example, the reasons for scores of 3, 4 or 5 could be the same. Thus, participants gave a diversity of score, but partly based on the same traits.

The face characteristics that were most often said to be similar, regardless of the dyad, were face contours, mouth, and form and color of the eyes. Again, the answers provided by the participants are in accordance with the answers of the caricaturists, that face contours and jaw are key elements for resemblance. The characteristics that were most often described as being different, regardless of the dyad, were nose, chin and form and color of the eyes. These and the previous characteristics explaining a non-recognition (recognition test) include eyes, chin, and nose. This might be because these are the characteristics to which we seem more sensitive to, regarding small changes, and therefore a wrong position or shape helps us exclude a face or judge features as different.

Both concepts of recognition and resemblance seem intimately linked but are different. The answers obtained through the recognition and resemblance tests herein supports Stephan & Cicolini (2008), suggesting both tests probably evaluate different variables.

3.5.3. DNA phenotyping

One of the questions of this research was about the potential plus-value of DNA phenotyping, and how adding predicted colors for certain facial traits might impact recognition. It is important to consider that these predictions derive from statistics, based on a specific population used to create the probabilistic model (HIrisPlex-S).

Seeing an approximation as an icon (representation of a face, in general), rather than a ‘clue’ (representation of *the* real face) is more appropriate to the interpretation of FA. The first opens the

door to possibilities (Peirce's theory of signs), which is the role of FA as an investigative tool (generating a list of potential candidates to the identity), while the second, on the opposite, restrains the possibilities (Everaert-Desmedt 1990, Peirce 1931). An issue regarding actual pigmentations methods, as highlighted by the practitioners, is that the colors are given as categories (e.g., blue, brown, and intermediate for eye color). How can one know what blue is the predicted blue? Colors were more mentioned in the resemblance tests than in recognition tests, which suggests that resemblance is more sensitive to superficial traits, like hair and eye colors, whereas recognition relies more on shape, size, and position of the facial characteristics. However, some participants mentioned during the recognition tests that the blue eyes of an approximation or the pale grey used did help, as they knew (from the live photo) the donor had blue eyes. On the opposite, some participants gave, amongst their reasons for a non-recognition, the fact that the eye color, although being the *right* color (blue like the donor), was not the *exact* color (not the same blue as illustrated in the picture of the donor). This does not mean that color predictions are not useful, as they can be used (1) in the approximation as a grey scale (pale grey for blue, dark grey for brown), and (2) as a written spoken portrait accompanying the approximation when mediatized. Both combined, this could trigger someone to alert authorities, or be the plus value that will help make up their mind. Moreover, colors could lead to exclusions, which is not negligible during an investigation. A written color allows some leeway by being specific without too much precision. Not only this aspect is applicable to DNA phenotyping, but also the approximation in its general context.

3.5.4. Accuracy

Emphasis is often put on the accuracy of an approximation for it to be recognized, even though we know we can recognize faces that are not accurate, such as caricatures. The goal of producing an approximation is to obtain a population of interest of potential candidates, that authorities will later

verify to validate/invalidate identification, which ties in with Peirce's notion of universe of possibilities, facial approximation being an icon, not an index (direct association with a singular source). An approximation is not used to identify, but rather to obtain a list of candidates. If FA was used as an identification tool, the importance given to morphological accuracy would be crucial. Anyhow, with all the unknown added uncertainties of the methods and techniques of FA, it would be impossible to ever be accurate whatsoever, at least on purpose. Nonetheless, we know in certain cases that caricatures are more easily recognized than real faces (Rhodes, Brennan et al. 1987, Lee, Byatt et al. 2000, Frowd, Bruce et al. 2007). If we have access to the unique and distinctive characteristics of a face through a dry skull, should we risk putting emphasis on such a detail, that could be non-existent?

3.6. Conclusion

In this study, multiple practitioners approximated a face based on the same skull and information. The results showed that there is indeed a great variety of methods and techniques used by the practitioners, that could in part be explained by the disparity of their background and experience. Recognitions tests showed that although recognition does not seem to be a standard cognitive process amongst individuals, it is face-specific to distinctive facial traits. The answers provided by the participants also support that a feature in a correct position is important for recognition. Recognition was often related to shape, size and position of eyes, mouth, and nose, whereas resemblance to face contours, mouth, and shape and color of the eyes.

Only ~1/3 of the practitioners that were contacted participated in the study. Although another ~1/3 did not respond back, the last ~1/3 did not participate for different reasons. Some thought the case was too challenging, but others thought that the project was not relevant since it did not evaluate the accuracy of the approximations and included DNA phenotyping. Too often, the forensic

context of FA seems to be overlooked. It is important to keep in mind the context in which FAs are made: it is a tool for investigators to generate new leads. By its investigative aspect, it does not have an individualisation objective, as most forensic tools or methods do. We want to obtain a population of interest for further identification, rather than only one individual. Even if false positives are generated, these recognitions will later be invalidated by the authorities. On the contrary, it is a tool with which we want to obtain false positives. Many practitioners are also skeptical of the use of phenotyping as an added value to approximations, but what prevents them to render both a final approximation with grey tones, and one with colors? Or simply use the provided colors for texture and details, without directly using the colors, and leave the categories as a spoken portrait accompanying the approximation?

Finally, an often-raised question is if the field of FA is art or science (Tyrrell, Evison et al. 1997, Parks, Richard et al. 2013, Gupta, Gupta et al. 2015, Stephan, Caple et al. 2018). As an investigative tool, shouldn't the door be open?

3.7. Supplementary material



Figure S5. – *Ante-mortem* photography of the donor.

Table S4. – Techniques used by the practitioners to build and place the eyes, nose, mouth, and ears of their FA.

Specific techniques			
Eyes	Nose	Mouth	Ears
- Krogman and Iscan 1986	- Krogman and Iscan 1986	- Krogman and Iscan 1986	- Gatliff 1984
- Gatliff 1984	- Lebeclinsraya	- Gatliff 1984	- Gerasimov 1955
- Gay Malin (YouTube)	- Rynn, Wilkinson and Peters 2010	- Zarins 2017	- Welcker 1883
- Taylor 2001	- Nose projection	- Gay Malin (YouTube)	- Krogman and Iscan 1986
- Gaytan E.	- Gay Malin (YouTube)	- Taylor 2001	- Guyomarc'h and Stephan 2012
- Wilkinson 2004	- Taylor 2001	- Gaytan E.	- Fedosyutkin and Nainys 1993
- Guyomarc'h, Dutailly et al. 2012	- Wilkinson 2004	- Wilkinson 2004	- Taylor 2001
- Whitnall 1921		- Broadbent et Mathews 1957	
- Fedosyutkin and Nainys 1993		- Stephan and Murphy 2008	
- Balueva and Veselovskaya 2004		- Enamel measure	
		- Photos/CT scans references	

Table S5. – Answers given for a recognition according to each facial approximation, all participants combined.

Facial Characteristics	Reasons according to each FA						
	1a	1b	2	3	4	5	6
Face contours	Shape	Shape	Shape	Shape	Shape	Shape	Shape
Forehead	Size, position	Shape, size, position	Shape	–	Shape	Size	Shape
Eyebrows	Shape	Shape, position	Shape, position	–	Shape	Shape, size	Shape
Eyes	Shape, size, position	Shape, position, color, distance between eyes	Color, distance between eyes	Size, color	Shape, position	Shape, position, color	Shape, size
Nose	Shape, size, position	Shape, size, position	Shape, size	–	Shape, size	Shape, size, position	Shape, size
Ears	Shape	Shape, size, position	Shape, size	Size	Size	Size, position	–
Mouth	Shape, size, position	Shape, size, position	Shape, size	–	Shape	Shape, size	Shape, size
Chin/jaw	Shape, position	Shape, position	Shape	–	Shape	Shape	Shape, size
Cheekbones	–	Shape, size	–	–	–	Size	Shape
Other	Aging	Aging, wrinkles, face proportions	–	–	General appearance	Wrinkles, face proportions	–

Chapitre 4 – Article scientifique

DNA extractions and phenotyping from formalin embalmed heart and thigh human tissues: comparison of methods

Ariane Durand-Guévin^{1,2}, Frank Crispino^{2,3,4}, Emmanuel Milot^{2,3,4}

¹ Département d'Anatomie, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, QC, Canada

² Groupe de recherche en science forensique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

³ Département de Chimie, Biochimie et Physique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

⁴ Centre international de Criminologie Comparée, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada

Corresponding author:

Emmanuel Milot, Département de Chimie, Biochimie et Physique, UQTR, Trois-Rivières, QC, Canada. Email : emmanuel.milot@uqtr.ca

Funding:

This research was supported by the *Fonds de Recherche du Québec, Nature et technologies* (FRQNT).

Keywords:

DNA degradation, formol, pigmentation predictions, embalming, genetic, optimization, DNA phenotyping

4.1. Abstract

Formalin embalmed tissues are sources of biological material that are potentially important for genetic and forensic studies. Their use is not widespread due to degradation, fragmentation and other modifications induced in DNA by embalming and the lack of optimized extraction methods.

Here, we compared different methods to extract DNA from formalin-embalmed material, and verified if genetic markers could be successfully typed from the resulting samples. We tested heart and thigh muscular tissues, a recently published microwave pre-extraction, and DNA IQ (Promega) as well as QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) as extraction methods. Thigh tissues combined with DNA IQ yielded the highest DNA concentrations (~ 3.5 ng/ μ L). This combination seems preferable to the others tested, all yielding < 1 ng/ μ L. The microwave pre-extraction did not improve the DNA yield. The extracted DNA was sequenced for the 41 SNPs of the HIrisPlex-S panel, which is used in forensic DNA phenotyping to predict hair, skin, and eye colour. Complete SNP profiles were obtained for two samples. Overall, thigh samples that went through the heat pre-extraction microwave step yielded better phenotyping results, whatever the extraction method. These findings provide baselines to continue to optimize DNA extraction and phenotyping for a broader use of formalin-fixed tissues in future studies.

4.2. Introduction

Several disciplines benefit from the study of human DNA and genetic analyses, whether it be for forensic and court cases, diseases, applications in medicine, paternity testing, or legal aspects (John 2005). DNA can be recovered through many types of biological fluids and material such as blood, hard tissues and soft tissues, and multiple methods of DNA extraction exist, some being optimized for a particular type of material (e.g., teeth, blood) (John 2005, Budowle and van Daal 2008). Access to human biological material is generally possible through hospitals (e.g., patients), research programme (e.g., volunteers), or from autopsies. On the other hand, thousands of people donate their body to science after they die. Their whole body – not just organs – are received by anatomy laboratories, where they are generally embalmed and used for teaching, training, and research purposes, making these places excellent resources for biological material (Santos, Sá et

al. 2009, Huijismans, Damen et al. 2010, Okello, Zurek et al. 2010). However, embalmed biological tissues are infrequently used for genetic analyses, due to DNA degradation (Giolda and Rigg 2017). Indeed, DNA extraction from formalin embalmed tissues is known to constitute a challenge, since formaldehyde damages DNA and reduces the quantity and quality of DNA that can be recovered from specimens (Farrugia, Keyser et al. 2010, Huijismans, Damen et al. 2010, Palero, Hall et al. 2010, Campos and Gilbert 2012, Wheeler, Czado et al. 2017, Singh, Narayan et al. 2020). Standard extraction protocols were shown to yield low quantities of fragmented DNA, due to the use of formalin and the subsequent formation of complexes and links with DNA and proteins (Feldman 1973, Miething, Hering et al. 2006, Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Skage and Schander 2007, Paireder, Werner et al. 2013, Giolda and Rigg 2017).

A number of protocols have been developed and tested, aiming to extract higher quantities of DNA from formalin-embalmed specimens (Ferrer, Armstrong et al. 2007, Santos, Saito et al. 2008, Santos, Sá et al. 2009, Duval, Aubin et al. 2010, Farrugia, Keyser et al. 2010, Huijismans, Damen et al. 2010, Okello, Zurek et al. 2010). Comparing protocols is thus helping to determine the best methodologies to be able to use embalmed biological material. Studies tried to improve tissue digestion by increasing the concentration of proteinase K, adding a heat treatment, and using alkaline conditions, among other techniques (Shi, Cote et al. 2002, Shi, Datar et al. 2004, Dedhia, Tarale et al. 2007, Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Skage and Schander 2007, Santos, Saito et al. 2008, Duval, Aubin et al. 2010, Campos and Gilbert 2012). In general, these studies have shown that including a heating step may facilitate DNA extraction (Tokuda, Nakamura et al. 1990, Campos and Gilbert 2012, Paireder, Werner et al. 2013, Giolda and Rigg 2017). Gilbert, Haselkorn et al. (2007) compared the effects of different pre-treatments, extractions, and post-treatments. They found that DNA yield is better with a pre-extraction incubation at high heat, silica-based

extraction, alkaline high heat extraction, long digestion, and post-reparation of DNA by Taq-polymerase. On their side, Giolda and Rigg (2017) observed a significant augmentation in the quantity and quality of extracted DNA when tissues were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), followed by an incubation of 15 minutes at 95°C. Wheeler, Czado et al. (2017) extracted DNA from various tissues and observed that bone marrow yielded the highest DNA concentrations, followed by organs and muscles, while bones and teeth yielded the lowest. Finally, Singh, Narayan et al. (2020) tested adding a microwave pre-extraction step, and recovered a higher concentration of DNA with the added microwave step compared to the other methods they tested.

This study is part of a larger project exploring the value of forensic DNA phenotyping (FDP) for forensic facial reconstruction. Facial reconstruction is a tool generally used during an investigation to try to identify an unknown person by obtaining leads regarding the possible identity of that person. Predictive analyses from DNA may help in making inferences on the physical appearance of an unknown person (e.g., for human remains, missing persons cases, mass disasters) (Budowle and van Daal 2008, Claes, Hill et al. 2014, MacLean and Lamparello 2014, Lippert, Sabatini et al. 2017, Diepenbroek, Bayer et al. 2020, Palencia-Madrid, Xavier et al. 2020). In the context of this broader project, the only available biological material was from an embalmed body, and DNA extraction and phenotyping were needed to obtain externally visible characteristics predictions, that were further used in facial reconstructions.

FDP has been studied for more than a decade and is based on specific segments of DNA that correlates with the expression of externally visible characteristics (EVCs) (e.g., pigmentation, male baldness, freckles, height, etc.) (MacLean and Lamparello 2014, Laan 2017, Chaitanya, Breslin et al. 2018, Stephan, Caple et al. 2018, Breslin, Wills et al. 2019, Kukla-Bartoszek, Szargut et al. 2020). Recently, the HIrisPlex-S online tool, based on 41 genetic variations called single

nucleotide polymorphisms (SNPs) to predict eyes, hair and skin pigmentations, has been validated in respect to the *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM) guidelines (Walsh, Chaitanya et al. 2014). Predictions are generated from the probabilities for different categories: three categories for eyes (blue, intermediate, and brown); four for hair (red, blond, brown and black with light and dark shades); and five for skin (very pale, pale, intermediate, dark and dark-to-black) (Breslin, Wills et al. 2019). Aside from the robustness and sensitivity of this panel, another advantage is that SNPs are adapted for DNA quantities down to 0.063 nanograms, and to cases where DNA is substantially fragmented and degraded (Budowle and van Daal 2008, Chaitanya, Breslin et al. 2018, Mbadiwe, Dawson et al. 2019).

As stated above, DNA extraction protocols have not yet been optimized for embalmed material. Moreover, phenotyping has never, to the authors' knowledge, been tested on such material either. This exploratory study therefore aimed to test which combination of human embalmed biological material and extraction method, from the promising protocols identified in the literature, resulted in higher concentrations of DNA and if this extracted material was suitable for phenotyping analysis. The first aim was to determine an optimal combination to extract DNA by testing (I) two types of tissue (heart and thigh), (II) a microwave pre-extraction, and (III) two extraction protocols (QIAamp DNA Mini Kit and DNA IQ). This was done to determine the impact, if any, of the tissue type, the addition of a pre-extraction step, and/or the extraction kits on the final DNA quantities. The second goal was to evaluate the suitability of such samples for DNA phenotyping using the established HIrisPlex-S model.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Sample preparation and pre-extraction

Tissue samples (n=8) were dissected in 2021 from one male cadaver embalmed in 2018 at the anatomy laboratory of the Université du Québec à Trois-Rivières, Canada (ethics certification SCELERA-21-01). An embalming method using ethanol, glycerol, formalin, Dettol, phenol, and sodium acetate was used. Four muscular heart and four muscular thigh tissue samples of ~0.06 g were prepared and kept in a phosphate-buffered saline buffer (PBS) 10X at 4°C. Each sample comprised of a few small pieces of tissue to maximize the extraction process.

Four of the eight samples, two from heart and two from thigh, went through the pre-extraction microwave step, while the other four samples did not. The tissues were heated in the microwave for two minutes at 360W followed by two minutes at 840W. Since the buffer evaporated during the heating process, PBS 10X was then added to keep samples submerged, and kept at 4°C until extraction.

4.3.2. DNA extraction

Samples were washed twice with PBS 10X before extraction, as suggested by Giolda and Rigg (2017). DNA was extracted with the DNA IQ kit (Promega Corp.) for one heart sample that went through the pre-extraction process and one that did not. The QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Corp.) was used to extract DNA from the second heart sample that went through pre-extraction and the second that did not. The same was done for the four thigh samples. An adapted in-house protocol was used for both extraction kits, as specified below. After extraction, samples were kept at -20°C until the DNA quantification step.

DNA IQ extraction. A 390 μL volume of TRIS-EDTA SDS 1% buffer and 10 μL of proteinase K were added to each sample, which was then vortexed, centrifuged (quick spin) and incubated at 56°C for two hours. After incubation, samples were centrifuged for two minutes at 14,000 RPM. A 200 μL volume of supernatant was transferred to new tubes and 400 μL of guanidine DTT 1M lysis buffer and 14 μL of resin were added. Samples were vortexed and incubated at ambient temperature for five minutes (vortexed every minute). Sample tubes were then placed on magnetic supports, the supernatant was removed, and another 100 μL of guanidine DTT 1M lysis buffer was added. Samples were vortexed and the last washing step was repeated for a total of three washes. The supernatant of the last wash was discarded as well, and the tubes were left open on their magnetic support for five minutes to let the pellet dry at ambient temperature. A 100 μL volume of elution buffer was added, and the samples were vortexed and incubated for five minutes at 67°C. Finally, the elution buffer containing DNA was transferred into new tubes, which were frozen at -20°C until further use.

QIAamp DNA Mini Kit. A 300 μL volume of PBS 1X, 200 μL of ATL buffer and 20 μL of proteinase K were added to each sample. Samples were vortexed and incubated for fifteen minutes at 56°C (vortexed every two minutes). Samples were centrifuged (quick spin) and 200 μL of anhydrous ethanol was added. Samples were vortexed, centrifuged (quick spin) and 700 μL of lysate was transferred on the columns. The samples were centrifuged twice at 8,000 RPM for one minute. The columns were placed in new tubes. A 500 μL volume of AW1 buffer was added, the samples were again centrifuged at 8,000 RPM for one minute, and the columns were placed in new tubes. A 700 μL volume of AW2 buffer was added, and the samples were centrifuged for a third time at 8,000 RPM for one minute, then at 14,000 RPM for three minutes. The columns were placed in new microtubes and 100 μL of sterile water was added. After incubation at ambient

temperature for two minutes, the samples were centrifuged twice at 10,000 RPM for one minute. The columns were removed, and the tubes containing the extracted DNA were kept at -20°C until further use.

4.3.3. Quantification

DNA concentration was quantified by qPCR with the Plexor[®]HY Promega kit. This kit is specific to human DNA and simultaneously detects the total human DNA and male DNA (Promega Corporation 2023). The system targets two regions: RNU2 gene of chromosome 17, and TSPY gene of the Y chromosome. Amplification of the first will result in the quantity of total human DNA in the sample, while the second will result in the quantity of male DNA. The system measures the reduction rate of fluorescence through the amplification cycles, proportional to the DNA quantity present in the sample. A first primer with a fluorescent tag and a modified base (iso-dC) is used. At the end of the elongation process, an iso-dG with a quencher will be selected complementary to the iso-dC, which results in the reduction of the fluorescence. Using controlled samples of known DNA concentrations, the fluorescence obtained can be transformed to DNA concentrations with a regression curve.

An adapted in-house protocol was used for quantification. Controlled samples with concentrations of 0.0032 ng/μL, 0.016 ng/μL, 0.08 ng/μL, 0.4 ng/μL, 2 ng/μL, 10 ng/μL and 50 ng/μL were prepared. A PCR solution equivalent to 18 μL for each sample was prepared using 10 μL of Plexor HY 2X Master Mix, 7 μL of PCR water, and 1 μL of Plexor HY 20X Primer/IPC Mix. The PCR solution was vortexed 10 seconds, and 18 μL was added to microtubes prepared for the eight samples, the controlled samples, and positive and negative samples. A 2 μL volume of the DNA to amplify was added to the microtubes (2 μL of TE 1X buffer for the negative control, and 2 μL of a prepared standard of 0.5 ng/μL for the positive control). Samples were kept on ice until

inserted in the thermocycler. Plexor[®]HY reactions took place in a BIO-RAD Thermocycler CFX Connect using the parameters in *Table 6*.

Table 6. – PCR parameters for DNA quantification using a BIO-RAD Thermocycler CFX Connect.

Cycles	Step	Temperature (°C)	Time
1X	Initial denaturation	95	2 min
38X	Denaturation	95	0.05 sec
	Hybridization/elongation	60	0.35 sec
1X	Fusion curve	65-95 with 0.5 increments	0.05 sec

4.3.4. Phenotyping assessment

From all the samples that yielded a minimal quantity of DNA (>0), aliquots were sent to *Génome Québec* for the sequencing of the 41 SNPs of the HIrisPlex-S panel. The resulting sequence data were transformed in RStudio[®] to the format required by the HIrisPlex-S tool (Walsh FDP Lab 2022). Allele called were entered in the online HIrisPlex-S tool to predict colors for eyes, hair, and skin.

The 41 SNPs of HIrisPlex-S and the associated alleles, genes and chromosomes can be found in Breslin (2017). No eye color prediction is provided if the HERC2 SNP rs12913832 is missing, no hair color prediction is provided if all 11 MC1R SNPs are missing, and no eye nor hair color prediction is obtained is the combination of HERC2-SLC45A2-IRF4 is missing. As for the skin color prediction, missing SLC24A5 rs1426654, and OCA2 rs1800414/MC1R rs3212355 might impact the intermediate/Dark/Dark-to-Black predictions. The system uses multinomial logistic regression models, which are trained on genotype and eyes, hair, and skin colour phenotype data, for thousands of individuals. The trained models were further tested with hundreds (thousands for eye) of individuals.

The combined probabilities of all the individual categories for eye color equals to 1, and the same goes for individual categories of hair color, hair shade and skin color. Predictions for each color category were assessed with the user manual available online (Department of Genetic Identification 2018): the highest probability determines the predicted phenotype for the eye color. The hair color prediction is determined by using the highest probability combined with a stepwise model using both the probabilities of the colors and the shades. The skin color prediction uses the highest probability, that can further be affected by the second highest probability. Both step-by-step approach and procedures to follow are illustrated in the user manual (similar to decision-trees using multiple question-to-answer steps).

4.4. Results

4.4.1. DNA extraction and quantification

Human DNA was successfully detected from seven out of eight samples, and male DNA was detected only from these seven samples. DNA concentration ranged between 0 to ~3.5 ng/uL, with 6/8 samples yielding >0.06 ng/uL (*Table 7*). Samples 3 and 4, both thigh samples extracted with DNA IQ, resulted in the highest DNA concentrations (*Table 7*).

Table 7. – Sample characteristics and DNA quantifications for human muscle tissues sampled from an embalmed donor.

Sample	Tissue type	Heat pre-treatment	Extraction technique	[DNA] (ng/μL)	DNA yield (ng)	DNA yield (ng/100mg)
1	Heart	Yes	DNA IQ	0.406	40.6	0.677
2		No		0.062	6.2	0.103
3	Thigh	Yes		3.559	355.9	5.932
4		No		3.519	351.9	5.865
5	Heart	Yes	QIAamp DNA Mini Kit	0.725	72.5	1.208
6		No		0	0	0
7	Thigh	Yes		0.221	22.1	0.368
8		No		0.002	0.2	0.003

The addition of the heat pre-extraction and the DNA IQ extraction method resulted in slightly higher DNA concentration than no pre-extraction and the QIAamp DNA Mini Kit (*Table 8*).

Table 8. – DNA concentrations based on tissue type, addition of pre-extraction and extraction method for human muscle tissues sampled from an embalmed donor.

Factors	Modalities per factor	Number of extractions with a [DNA] > 0.06 ng/μL	Mean []* (ng/μL)	Range [] (ng/μL)
Tissue type	Heart	3/4	0.298	0 - 0.725
	Thigh	3/4	1.825	0.002 - 3.559
Heat pre-treatment	Yes	4/4	1.228	0.221 - 3.559
	No	2/4	0.896	0 - 3.519
Extraction technique	DNA IQ	4/4	1.887	0.062 - 3.559
	QIAamp DNA Mini Kit	2/4	0.237	0 - 0.725

*Sample 6 was not excluded from the calculations.

4.4.2. Phenotyping assessment

The HIrisPlex-S tool was previously shown to be able to predict full 41 SNPs profile down to 0.063 ng of human DNA (Chaitanya, Breslin et al. 2018), however, it was not tested with formalin embalmed degraded DNA as was investigated in this study. All samples, except sample 6, were sequenced to find out if formalin embalmed material was suitable to obtain SNP data to predict phenotypes. Hair, eyes, and skin color predictions could be made, but only samples 3 and 7 resulted in eye, hair, and skin colors to be predicted (*Table 9*). Only sample 3 has no SNPs missing, while sample 7 has eight SNPs missing. No hair color could be predicted for samples 1, 2, 4, 5 and 8; they respectively missed six, nine, nine, eleven and nine of the 11 MC1R SNPs necessary for the hair color prediction. Globally, blue eyes, blond hair and pale/intermediate skin colors were predicted, which are consistent with the real pigmentations provided by the donor's family (blue eyes, dark blond/light brown hair, and pale skin).

Table 9. – Phenotyping predictions of the HRisPlex-S tool of human muscle tissues sampled from an embalmed donor.

Phenotypes		Probabilities*						
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 7	Sample 8
Eyes	Blue	0.981	0.945	0.970	0.951	0.912	0.970	0.001
	Intermediate	0.018	0.037	0.026	0.034	0.057	0.026	0.017
	Brown	0.001	0.018	0.004	0.015	0.031	0.004	0.982
Hair color	Blond	NA	NA	0.737	NA	NA	0.702	NA
	Brown	NA	NA	0.236	NA	NA	0.264	NA
	Red	NA	NA	0.003	NA	NA	0.010	NA
	Black	NA	NA	0.024	NA	NA	0.023	NA
Hair shade	Light	0.983	0.962	0.952	0.930	0.934	0.955	0.282
	Dark	0.017	0.038	0.048	0.070	0.066	0.045	0.717
Skin	Very pale	0.027	0.010	0.033	0.014	NA	0.043	0.015
	Pale	0.746	0.327	0.574	0.216	NA	0.589	0.364
	Intermediate	0.227	0.657	0.392	0.664	NA	0.365	0.533
	Dark	0.000	0.005	0.000	0.104	NA	0.001	0.063
	Dark to black	0.000	0.001	0.001	0.002	NA	0.001	0.024
Eye color prediction		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Brown
Hair color prediction		NA	NA	Blond	NA	NA	Blond	NA
Skin color prediction		Pale to intermediate	Intermediate	Pale to intermediate	Intermediate	NA	Pale to intermediate	Intermediate
Total number of missing SNPs		7	19	0	17	38	8	28

*The highest probabilities are shown in bold. Grey background indicates the values used for the predictions. NAs indicate that no probability could be obtained due to missing SNPs.

4.5. Discussion

4.5.1. DNA extraction

The first aim of this study was to test and suggest a potential optimal combination of tissue type, pre-extraction, and DNA extraction method to be used with formalin-fixed tissue. The mean DNA concentrations obtained were slightly higher for thigh tissue samples with the addition of the pre-extraction microwave step and with the DNA IQ extraction method. The two highest DNA concentration means, namely 1.825 ng/ μ L and 1.887 ng/ μ L, are for thigh tissue and for the DNA IQ method. It was previously highlighted that skeletal muscles were particularly suitable for DNA extraction from embalmed material (Miething, Hering et al. 2006), and this might explain why the thigh samples yielded higher DNA concentrations than the heart samples. Farrugia, Kayser et al. (2010) also noted that the extracted quantity from liver samples was greater than from heart, which could be further tested, in comparison to thigh samples.

In forensic science, \sim 1 ng of DNA can be sufficient to generate a DNA profile, and working with trace amounts in terms of nanograms and picograms is not unusual (Godbey 2014). Considering the difference between samples 3 and 4 (>3 ng/ μ L) and the other samples (all <1 ng/ μ L), we would suggest using thigh samples combined with the DNA IQ extraction method. Nonetheless, concentration of >0.06 ng/ μ L were obtained from 6 of the 8 samples, comparable to working quantities in forensic analyses. Therefore, we could probably obtain DNA profiles from most of these samples.

Our results are consistent with the claim that using proteinase K with embalmed tissues might reduce the extracted DNA quantities to less than 1-5 ng/ μ L (Giolda and Rigg 2017), since our quantities range from 0.002-3.559 ng/ μ L. Giolda and Rigg (2017) observed a significant increase

in quality and quantity when tissues were washed twice with PBS and incubated 15 minutes at 95°C, and they obtained 7.9 ng/μL for heart tissues. All our samples were washed twice with PBS, and we tested a microwave heat step instead of the 15-minute incubation. Our heart samples yielded low concentrations compared to theirs, possibly due to the different heating step but also to the type of extraction used (they used a phenol-chloroform extraction (PCE) method), or some other uncontrolled factor related to embalment.

Regarding the pre-extraction step, a previous study indicated that the use of a microwave is useful to dissolve paraffin (Sato, Sugie et al. 2001). Singh, Narayan et al. (2020) did not make such a claim when they published their method, but they did use FFPE tissues (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded). Since it increased their DNA recovery, and did not impact our results, our findings support that this step is useful when tissues are paraffin embedded.

Duval, Aubin et al. (2010) compared a PCE method to DNA IQ, and the PCE resulted in higher DNA yields. For DNA IQ, they recovered around 36.3-85.3 ng of DNA. Our range using DNA IQ is wider, extending from 6.2 to 355.9 ng of extracted DNA. Paireder, Werner et al. (2013) compared different methods, and the QIAamp DNA Mini Kit yielded concentrations of <10 ng/μL. Farrugia, Keyser et al. (2010) also tested the QIAamp DNA Mini kit and recovered an average of 5.9 μg/100mg. Also using QIAamp DNA Mini Kit, we did not recover more than 1.208 μg/100mg (0.725 ng/μL), which is less than Farrugia, Keyser et al. (2010), and consistent with Paireder, Werner et al. (2013).

4.5.2. DNA phenotyping

The second aim of the study was to test if embalmed tissues were suitable for DNA phenotyping analysis using next generation sequencing and the possibility to obtain information on

autosomal SNPs. The European Consortium VISAGE were able to genotype all SNPs down to 0.125 ng of DNA (Palencia-Madrid, Xavier et al. 2020). Diepenbroek, Bayer et al. (2020) obtained complete profiles with 0.125 ng of DNA, and Breslin, Wills et al. (2019) observed complete profiles with 0.25 ng of DNA. These previous works show that even with the lowest of our DNA concentration, we would probably get partial if not complete profiles using HIrisPlex-S. However, the extent to which the damaged DNA due to the embalming process would influence the process was not studied previously, and our results show that the two samples that yielded complete HIrisPlex-S profiles were not the two with the highest DNA yield.

Complete SNPs predictions could only be obtained with samples 3 and 7. It is interesting to note that although sample 3 has the highest DNA yield (355.9 ng), sample 7 is the fifth in line with 22.1 ng. This can indicate that the DNA degradation caused by the embalming process is not specific, and the SNPs analysis is not related to the quantity of extracted DNA. This means that the sample with the highest DNA yield will not necessarily yield the best SNPs analysis, and vice-versa.

Both sample 3 and 7 were thig samples that went through the pre-extraction heat step using the microwave, which might have helped recovering better quality DNA for SNP analysis. Most samples also led to correct partial or complete predictions; only sample 8, which has the smallest DNA yield (0.2 ng total), resulted in wrongful prediction for the eyes, and a prediction not in accordance with the others for the hair shade. This is possibly due to stochastic effects of sequencing. When looking at the genotypes for that sample, some SNPs were detected homozygote while being heterozygote for the other samples. It is therefore possible that only one allele was detected due to the low DNA quantity. Moreover, for sample 8, half the SNPs to predict eye color were missing. Also, when looking at *Table 9*, the resulting probabilities are not the same from one

sample to the other. This is explained by the different number of missing SNPs for each sample, and the input alleles (homozygote, heterozygote) variations observed from one sample to another.

4.5.3. Limitations and perspectives

A general limitation for studies like this one, as pointed out by Gilbert, Haselkorn et al. (2007) is the difficulty to compare protocols since specimens used are variable (e.g., time of preservation, type of tissue, amount of tissue used). A further limit is the number of samples used. The total of eight samples from one donor can show that DNA extraction and phenotyping is possible, and the results can be used to make further suggestions. However, such small sample sizes preclude statistical tests, notwithstanding that data are not independent since they come from the same donor.

Although literature suggests that modifying the pH with NaOH (Shi, Cote et al. 2002, Shi, Datar et al. 2004) and using a PCE are better suited methods to purify formalin-fixed tissues (Sato, Sugie et al. 2001, Cao, Hashibe et al. 2003, Shi, Datar et al. 2004, Giolda and Rigg 2017), neither was done here to avoid the use of organic solvents and chemicals. Nonetheless, this is the first study to test the potential use of formalin-fixed biological material for DNA phenotyping. Previous studies reported complete HirisPlex-S profiles from low DNA quantities and even degraded DNA, but never with fragmented and damaged DNA due to formalin embalming.

These findings lead to suggestions for subsequent research to further optimize the methods and allow a broader use of this material for genetic and forensic studies. The next steps would be to conduct tests with more donors. As pointed out by Santos, Sá et al. (2009), it could also be interesting to evaluate if the optimal initial tissue quantity they identified would yield different results than the quantity used herein. They also proposed that liver samples would result in higher

quantities of extracted DNA than heart, and future testing using donors' liver samples could be compared to the thigh tissue samples. Finally, since the microwave step seems only optimal when samples are paraffin-embedded, it would be interesting to try the 15-minute pre-extraction incubation at 95°C and see if this heat pre-step would impact the extraction process with formalin-fixed but non-paraffin-embedded tissues, and the phenotyping analysis.

To conclude, our results suggest thigh muscular formalin-fixed tissue as a better candidate than heart tissue for DNA extraction and phenotyping. Between the two extraction methods tested, DNA IQ seems better suited than QIAamp DNA Mini Kit for embalmed material. The results also suggest that the microwave pre-extraction step can be used if tissues are paraffin-embedded but may not provide advantage if the tissues are not. Finally, for the phenotyping analysis, both samples that resulted in complete profiles went through the pre-extraction step. It was found that formalin-fixed tissues are suitable for phenotyping analysis, showing it is possible to overcome the challenge presented with fragmented and damaged DNA due to the embalming process.

4.6. Acknowledgments

We would like to thank Johanne Pellerin for her assistance with the collection of human tissues, Aurée Gareau-Léonard with her help in converting the DNA sequences, and Jessie Beauchemin, without whom the days devoted to DNA extractions would not have been as pleasant.

Chapitre 5 – Discussion

L'intérêt croissant du public pour la forensique permet de sensibiliser les gens aux techniques utilisées. En revanche, la diffusion de séries de fiction ou de documentaires donne parfois l'impression que les techniques exploitées en science forensique, dont l'approximation faciale fait partie, sont infaillibles et extrêmement rapides.

Pourtant, ce domaine n'est pas exempt d'illusions et de limitations (Stephan 2003). On pourrait entre autres penser qu'il est entièrement possible de prédire les tissus mous d'un visage en se basant seulement sur un crâne, et que l'approximation résultante sera nécessairement reconnue. Pourtant, la réalité est qu'il est presque impossible de prédire exactement l'apparence des tissus mous du visage, à cause de leur complexité et du fait qu'ils n'ont pas une relation unidimensionnelle avec le crâne. Également, plusieurs des techniques utilisées pour approximer les caractéristiques individuelles n'ont pas été validées par des tests empiriques et par conséquent leur marge d'erreur est inconnue (Stephan et Henneberg 2001). L'existence même de multiples techniques pour approximer une même caractéristique indique que nos connaissances sur la relation entre le crâne et l'apparence d'un individu sont limitées, puisque toutes ces techniques ne donnent pas le même résultat. En témoigne la présente recherche, qui a permis d'obtenir six approximations faciales *différentes*, même si ces dernières étaient basées sur le même crâne et les mêmes informations.

5.1. Retour sur les objectifs

Le but de ce travail de recherche était d'étudier l'approximation faciale à des fins de reconnaissance, à partir d'un crâne sec et du phénotypage d'ADN. Le premier objectif, qui

consistait à effectuer un sommaire comparatif des pratiques et de leurs limites, ainsi qu'explorer les facteurs cognitifs impliqués dans la reconnaissance faciale, a été atteint. Le domaine de l'approximation faciale est assez complexe et extensif, impliquant un certain nombre de concepts et d'étapes. En effet, plusieurs méthodes principales existent, le type d'approximation (matérielle, virtuelle, mixte) varie, et les techniques pour reconstruire chaque caractéristique du visage sont multiples. Le tout repose idéalement sur une compréhension approfondie de l'anatomie (muscles) et de l'anthropométrie (tissus mous), combinée à une certaine dextérité artistique. L'interdisciplinarité et la complexité de cet outil implique en revanche plusieurs limites, comme mentionnées précédemment. Le tout a permis de mieux comprendre l'état actuel des connaissances des trois principaux domaines de la recherche, et de développer et adapter la méthodologie pour effectuer les tests de reconnaissance et de ressemblance afin de répondre au second objectif de la recherche.

Le second objectif consistait à explorer la potentielle valeur ajoutée en combinant les prédictions phénotypiques et l'approximation faciale, pour procéder à des tests de reconnaissance et de ressemblance. Les résultats apportent une première réponse exploratoire à certaines questions soulevées quant aux facteurs impliqués dans la reconnaissance et la ressemblance, notamment sur les caractéristiques du visage liées à notre capacité de reconnaissance et à ce que nous jugeons comme étant similaire. Les tests de reconnaissance ont démontré que la reconnaissance d'un visage semble être un processus idiosyncratique, spécifique aux traits distinctifs de chaque visage, et qui n'est pas généralisable à tous les visages. Les caractéristiques identifiées comme étant liées au processus de reconnaissance sont la forme, la taille et la position des yeux, de la bouche et du nez, alors que pour la ressemblance, ce sont les contours du visage, la bouche, et la forme et la couleur

des yeux qui sont davantage ressortis. Il semble également que la ressemblance soit associée à des traits plus superficiels et assujettis aux changements (couleur des yeux et des cheveux).

Par rapport au phénotypage, les retours des praticiens du domaine ainsi que les réponses obtenues par les évaluateurs des tests de reconnaissance ont permis de discuter de son potentiel. Pour les praticiens, les prédictions de couleurs sont utiles, mais le potentiel ne réside pas dans l'application proprement dite des couleurs aux reconstructions. Elles sont plutôt exploitées dans le rendu de la texture et les nuances de gris. Pour les évaluateurs des tests de reconnaissance, le potentiel du phénotypage résiderait, encore une fois, non pas dans l'utilisation directe des couleurs, mais dans un portrait-parlé accompagnant l'approximation. Cela permettrait de garder une certaine marge subjective, puisque les prédictions de couleur sont exprimées sous la forme de catégories et non pas selon un spectre continu de couleurs.

5.2. Limites de la recherche

Par sa nature exploratoire, une limite du projet réside dans le nombre de donneurs (1), de praticiens participants (6) et d'évaluateurs pour les tests de reconnaissance (45). Les résultats obtenus dans le cadre de la recherche peuvent néanmoins être utilisés pour proposer des pistes de recherches futures. Une expérience à long terme permettrait de reproduire le projet avec plusieurs donneurs, par exemple de genre et d'âge différents, pour tester la reproductibilité de l'approximation faciale. Ensuite, il serait intéressant d'obtenir la participation d'un plus grand nombre de praticiens, afin d'avoir un meilleur échantillonnage des méthodes et des techniques de la pratique contemporaine. Finalement, une autre avenue serait d'utiliser les technologies d'imagerie médicale pour obtenir le duplicata d'un crâne d'une personne vivante. Cela permettrait d'effectuer des tests de

reconnaissance, tel que celui utilisé dans la présente recherche, mais avec une population variée d'évaluateurs : des personnes familières personnellement, visuellement, et non familières. Cela permettrait d'acquérir un portrait global plus juste de l'impact du type d'évaluateurs sur la reconnaissance.

Dans le même sens, une autre limite de l'étude est le faible nombre d'échantillons testés ($n = 8$) pour l'extraction d'ADN à partir de matériel biologique embaumé. Plus de types de tissus, de traitements précédant l'extraction d'ADN, et de protocoles d'extraction pourraient être testés afin de continuer d'optimiser les procédures et exploiter le potentiel que représente le matériel biologique embaumé.

Malgré les limites liées à sa nature exploratoire, ce projet de recherche a permis d'enrichir les connaissances sur l'approximation faciale, la reconnaissance faciale et le phénotypage d'ADN, dans le contexte de la science forensique et du processus d'identification *post-mortem* à partir de restes humains. Les résultats permettent de faire le pont entre les praticiens de plusieurs domaines, soulignant l'interdisciplinarité de la recherche et l'importance d'une meilleure connexion entre les différentes sphères de la pratique.

5.3. Pistes de recherche

Cette recherche voulait explorer une approche différente pour identifier les pistes de recherche pertinentes. De nombreuses questions se posent, en lien avec le sujet, qui ont jusqu'à présent été négligées, et plusieurs réflexions découlent de ce projet.

Contrairement aux objectifs plus traditionnels en science forensique, qui visent une certaine individualisation, l'approximation faciale ou la reconstruction faciale forensique vise plutôt à générer de nouvelles pistes d'enquête. Par son seul et unique rôle de soutien à l'enquête, le but d'une approximation est donc d'obtenir une liste de candidats potentiels à l'identité du défunt, rejoignant la notion de l'univers des possibilités de Peirce. Ce sont par la suite les autorités qui sont responsables d'exclure celles qui ne sont pas concluantes. Nécessairement, puisqu'une seule identité peut être confirmée (est la bonne), les autres sont assurément des « faux positifs » de reconnaissance. L'approximation faciale comme icône (mode de représentation de Peirce) est donc beaucoup plus riche en information et appropriée au contexte que lorsqu'elle est considérée comme l'indice d'une seule identité. Cette compréhension fondamentale de cet outil investigatif semble absente de la majorité des travaux effectués sur le sujet, qui visent plutôt à peaufiner et revisiter constamment les méthodes et techniques utilisées, afin d'obtenir une exactitude et une précision accrues. Cette réflexion souligne par ailleurs la plus-value de la sémiotique à cette étude, interprétant le sens de l'approximation faciale dans son contexte pratique.

Comme énoncé dans l'introduction, l'exactitude d'une approximation faciale par rapport à un visage réel est une qualité souvent recherchée par les praticiens du domaine. Il est évident que notre capacité à représenter l'apparence faciale d'un individu déborde le simple apprentissage des méthodes et techniques en anthropologie physique. Les taux de reconnaissance les plus élevés, obtenus pour les approximations faciales d'un praticien expérimenté et d'un novice lors des tests de reconnaissance effectués dans le cadre de ce projet, en est un bon exemple.

Également, même si les processus cognitifs en lien avec la reconnaissance faciale ne sont pas encore établis, il semblerait qu'ils soient différents pour les visages avec lesquels nous sommes familiers, et ceux avec lesquels nous ne le sommes pas. De plus, la reconnaissance serait spécifique

au visage, donc à l'identité d'une personne, et ne serait pas généralisable à tous les visages. Ces éléments amènent d'autres points de réflexion. En diffusant une approximation faciale au grand public dans l'espoir que quelqu'un la reconnaisse, quel public est plus spécifiquement visé (les proches du défunt/de la personne recherchée, ou la population en général – ces deux possibilités impliquant visiblement des processus cognitifs différents) ? Cible-t-on le même public dans le cas de la diffusion du portrait-robot d'une personne recherchée, par exemple lors d'une enquête criminelle ? Cherche-t-on une personne en particulier, ou veut-on obtenir une liste de possibilités ?

En conclusion, ce projet soulève plusieurs nouvelles questions. Il démontre aussi le potentiel et la valeur essentielle de l'interdisciplinarité dans un contexte forensique. En questionnant les prémisses de l'approximation faciale, débordant du champ analytique et en intégrant au projet une dimension en science cognitive, cette approche souhaite ouvrir la discussion sur la valeur et l'utilisation de cet outil dans les milieux de la pratique, autant au niveau opérationnel policier que scientifique et académique.

Références bibliographiques

Abudarham, N. and G. Yovel (2019). "Same critical features are used for identification of familiarized and unfamiliar faces." Vision Research **157**: 105-111.

Balas, B. and A. Saville (2017). "Hometown size affects the processing of naturalistic face variability." Vision Research **141**: 228-236.

Balueva, T. S. and E. V. Veselovskaya (2004). "New developments in facial reconstruction." Archeology, Ethnology & Anthropology of Eurasia (4): 143–152.

Bandyopadhyay, P. S. K., M. N. Basu and M. S. Nag (2015). "FACIAL RECONSTRUCTION- A REVIEW." International Education and Research Journal **1**(5): 34-36.

Breslin, K. (2017). Forensic DNA Phenotyping and Massive Parallel Sequencing. Master of Science, Purdue University.

Breslin, K., B. Wills, A. Ralf, M. Ventayol Garcia, M. Kukla-Bartoszek, E. Pospiech, A. Freire-Aradas, C. Xavier, S. Ingold, M. de La Puente, K. J. van der Gaag, N. Herrick, C. Haas, W. Parson, C. Phillips, T. Sijen, W. Branicki, S. Walsh and M. Kayser (2019). "HIrisPlex-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**: 102152.

Broadbent, T. R. and V. L. Mathews (1957). "Artistic relationships in surface anatomy of the face: application to reconstructive surgery." Plastic and Reconstructive Surgery **20**(1): 1–17.

Bruce, V. (1994). "Stability from Variation: The Case of Face Recognition the M.D. Vernon Memorial Lecture." The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A **47**(1): 5-28.

Budowle, B. and A. van Daal (2008). "Forensically relevant SNP classes." BioTechniques **44**(5): 603-610.

Burt, D. and D. Perrett (1995). "Perception of Age in Adult Caucasian Male Faces: Computer Graphic Manipulation of Shape and Colour Information." Proceedings. Biological sciences / The Royal Society **259**: 137-143.

Burton, A. M., R. Jenkins and S. R. Schweinberger (2011). "Mental representations of familiar faces." British Journal of Psychology **102**(4): 943-958.

Burton, A. M., R. S. S. Kramer, K. L. Ritchie and R. Jenkins (2016). "Identity From Variation: Representations of Faces Derived From Multiple Instances." Cognitive Science **40**(1): 202-223.

Byatt, G. and G. Rhodes (1998). "Recognition of own-race and other-race caricatures: implications for models of face recognition." Vision Research **38**(15): 2455-2468.

Campos, P. F. and T. M. Gilbert (2012). "DNA extraction from formalin-fixed material." Methods in Molecular Biology **840**: 81-85.

Cao, W., M. Hashibe, J. Y. Rao, H. Morgenstern and Z. F. Zhang (2003). "Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells." Cancer Detection and Prevention **27**(5): 397-404.

Chaitanya, L., K. Breslin, S. Zuñiga, L. Wirken, E. Pośpiech, M. Kukla-Bartoszek, T. Sijen, P. d. Knijff, F. Liu, W. Branicki, M. Kayser and S. Walsh (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.

Claes, P., H. Hill and M. D. Shriver (2014). "Toward DNA-based facial composites: Preliminary results and validation." Forensic Science International: Genetics **13**: 208-216.

Claes, P., D. Vandermeulen, S. De Greef, G. Willems, J. G. Clement and P. Suetens (2010). "Bayesian estimation of optimal craniofacial reconstructions." Forensic Science International **201**(1-3): 146-152.

Claes, P., D. Vandermeulen, S. De Greef, G. Willems and P. Suetens (2006). "Craniofacial reconstruction using a combined statistical model of face shape and soft tissue depths: Methodology and validation." Forensic Science International **159**: S147-S158.

Coombs, N. J., A. C. Gough and J. N. Primrose (1999). "Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue." Nucleic Acids Research **27**(16): e12.

Davy-Jow, S., D. Schofield and M. Evison (2005). Forensic Facial Reconstruction using Computer Modeling Software: 183-196.

Decker, S., J. Ford, S. Davy-Jow, P. Faraut, W. Neville and D. Hilbelink (2013). "Who is this person? A comparison study of current three-dimensional facial approximation methods." Forensic Science International **229**(1): 161.e161-161.e168.

Decker, S., J. Ford, E. Hoegstrom and D. Hilbelink (2008). "Virtual anatomy: Three-dimensional computer modeling and measurement of human cranial anatomy." Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences 60th Annual Meeting.

Dedhia, P., S. Tarale, G. Dhongde, R. Khadapkar and B. Das (2007). "Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **8**(1): 55-59.

Department of Genetic Identification of Erasmus Medical Center (2018). "HirisPlex-S, HIrisPlex & IrisPlex Eye, Hair and Skin colour DNA Phenotyping webtool USER MANUAL." from <https://hirisplex.erasmusmc.nl/pdf/hirisplex.erasmusmc.nl.pdf>.

Diepenbroek, M., B. Bayer, K. Schwender, R. Schiller, J. Lim, R. Lagacé and K. Anslinger (2020). "Evaluation of the Ion AmpliSeq™ PhenoTrivium Panel: MPS-Based Assay for Ancestry and Phenotype Predictions Challenged by Casework Samples." Genes **11**(12).

Dorfling, H. F., Z. Lockhat, S. Pretorius, M. Steyn and A. C. Oetllé (2018). "Facial approximations: Characteristics of the eye in a South African sample." Forensic Science International **286**: 46-53.

Duval, K., R. A. Aubin, J. Elliott, I. Gorn-Hondermann, H. C. Birnboim, D. Jonker, R. M. Fourney and C. J. Frégeau (2010). "Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative." Forensic Science International: Genetics **4**(2): 80-88.

Ellis, H., J. Shepherd and G. Davies (1979). "Identification of Familiar and Unfamiliar Faces from Internal and External Features: Some Implications for Theories of Face Recognition." Perception **8**: 431-439.

Everaert-Desmedt, N. (1990). Le processus interprétatif : introduction à la sémiotique de Ch. S. Peirce, Liège : Mardaga.

Evison, M. (1998). "Computerised facial reconstruction using Open Inventor™. Let's Face It!" Proceedings of the 7th Meeting of the International Association for Craniofacial Identification, Melbourne: University of Melbourne.

Evison, M. (2000). "Modeling age, obesity, and ethnicity in computerized 3D facial reconstruction." Forensic Science Communications **2**.

Evison, M. (2009). Forensic anthropology and human identification from the skeleton: 84-112.

Evison, M., S. Davy-Jow, J. March and D. Schofield (2003). Computational Forensic Facial Reconstruction.

Evison, M., E. Iwamura, M. Guimarães and D. Schofield (2016). Forensic Facial Reconstruction and Its Contribution to Identification in Missing Person Cases: 427-441.

Farrugia, A., C. Keyser and B. Ludes (2010). "Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue." Forensic Science International **194**(1-3): e25-28.

Fedosytukin, B. A. and J. V. Nainys (1993). Forensic analysis of the skull. New York, Wiley-Liss.

Feldman, M. Y. (1973). Reactions of Nucleic Acids and NucleoDroteins with Formaldehyde||Translated by A. L. Pumpiansky, Moscow. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. J. N. Davidson and W. E. Cohn, Academic Press. **13**: 1-49.

Ferrer, I., J. Armstrong, S. Capellari, P. Parchi, T. Arzberger, J. Bell, H. Budka, T. Ströbel, G. Giaccone, G. Rossi, N. Bogdanovic, P. Fakai, A. Schmitt, P. Riederers, S. Al-Sarraj, R. Ravid and H. Kretschmar (2007). "Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study." Brain pathology **17**(3): 297-303.

Fisher, G. H. and R. L. Cox (1975). "Recognizing human faces." Applied Ergonomics **6**(2): 104-109.

Frowd, C., V. Bruce, D. Ross, A. McIntyre and P. Hancock (2007). "An application of caricature: How to improve the recognition of facial composites." Visual Cognition **15**(8).

Gatliff, B. P. (1984). "Facial sculpture on the skull for identification." The American Journal of Forensic Medicine and Pathology **5**(4): 327-332.

- Gerasimov, M. M. (1955). Vosstanovlenie lica po cerepu. Moskva, Akademii Nauk SSSR.
- Gerasimov, M. M. (1971). The Face Finder. New York, Hutchinson.
- Gielda, L. and S. Rigg (2017). "Extraction of amplifiable DNA from embalmed human cadaver tissue." BMC research notes **10**(1): 737-737.
- Gilbert, M. T., T. Haselkorn, M. Bunce, J. J. Sanchez, S. B. Lucas, L. D. Jewell, E. Van Marck and M. Worobey (2007). "The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?" PLoS One **2**(6): e537.
- Godbey, W. T. (2014). Chapter 15 - DNA Fingerprinting. An Introduction to Biotechnology. W. T. Godbey, Woodhead Publishing: 323-329.
- Goldstein, A. G. and E. J. Mackenberg (1966). "Recognition of human faces from isolated facial features: A developmental study." Psychonomic Science **6**(4): 149-150.
- Greytak, E. M. and S. Armentrout (2015). DNA Phenotyping: Predicting Ancestry and Physical Appearance from Forensic DNA, Parabon NanoLabs: 1-6.
- Gupta, S., V. Gupta, H. Vij, R. Vij and N. Tyagi (2015). "Forensic Facial Reconstruction: The Final Frontier." Journal of Clinical and Diagnostic Research **9**(9): ZE26-28.
- Guyomarc'h, P., B. Dutailly, C. Couture and H. Coqueugniot (2012). "Anatomical placement of the human eyeball in the orbit-validation using CT scans of living adults and prediction for facial approximation." Journal of Forensic Science **57**(5): 1271-1275.
- Guyomarc'h, P., F. Santos, B. Dutailly, P. Desbarats, B. Christophe and H. Coqueugniot (2012). "Three-dimensional computer-assisted craniometrics: A comparison of the uncertainty in measurement induced by surface reconstruction performed by two computer programs." Forensic Science International **219**: 221-227.
- Guyomarc'h, P. and C. N. Stephan (2012). "The validity of ear prediction guidelines used in facial approximation." Journal of Forensic Sciences **57**(6): 1427-1441.
- Haas, J., J. E. Buikstra, D. H. Ubelaker and D. Aftandilian (1994). "Standards for data collection from human skeletal remains : proceedings of a seminar at the Field Museum of Natural History,

organized by Jonathan Haas / volume editors, Jane E. Buikstra and Douglas H. Ubelaker, assistant editor, David Aftandilian ; contributions by D. Aftandilian [and others]."

Hadi, H. and C. Wilkinson (2016). "Estimation and reconstruction of facial creases based on skull crease morphology." Australian Journal of Forensic Sciences **50**: 1-15.

Haig, N. D. (1984). "The effect of feature displacement on face recognition." Perception **13**(5): 505-512.

Hancock, P. J. B., V. Bruce and A. M. Burton (2000). "Recognition of unfamiliar faces." Trends in Cognitive Sciences **4**(9): 330-337.

Hayes, S. (2014). "Facial approximation of 'Angel': Case specific methodological review." Forensic Science International **237**: e30-e41.

Hayes, S. (2016). "A geometric morphometric evaluation of the Belanglo 'Angel' facial approximation." Forensic Science International **268**: e1-e12.

Hayes, S., R. Taylor and A. Paterson (2006). "Forensic facial approximation: An overview of current methods used at the Victorian Institute of Forensic Medicine/Victoria Police Criminal Identification Squad." The Journal of forensic odonto-stomatology **23**: 45-50.

Hernando, B., M. V. Ibañez, J. A. Deserio-Cuesta, R. Soria-Navarro, I. Vilar-Sastre and C. Martinez-Cadenas (2018). "Genetic determinants of freckle occurrence in the Spanish population: Towards ephelides prediction from human DNA samples." Forensic Science International: Genetics **33**: 38-47.

Herrera, L., S. Tedeschi-Oliveira and R. Melani (2013). "Forensic Facial Reconstruction: Review and Analysis of Scientific Research in Brazil." Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics **2**: 365-375.

Herrera, L. M., R. A. P. Strapasson, J. V. L. da Silva and R. F. H. Melani (2016). "Forensic facial approximation assessment: can application of different average facial tissue depth data facilitate recognition and establish acceptable level of resemblance?" Forensic Science International **266**: 311-319.

Herrera, L. M., R. A. P. Strapasson, A. A. Zanin, J. V. L. da Silva and R. F. H. Melani (2017). "Comparison Among Manual Facial Approximations Conducted by Two Methodological Approaches of Face Prediction." Journal of Forensic Sciences **62**(5): 1279-1285.

Hollins, T. and H. Moon (2012). "The own-age effect in face recognition." Measuring the Mind Speed, control, and age.

Huijsmans, C. J., J. Damen, J. C. van der Linden, P. H. Savelkoul and M. H. Hermans (2010). "Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues: effect on downstream molecular applications." BMC Research Notes **3**: 239.

Hysi, P. G., A. M. Valdes, F. Liu, N. A. Furlotte, D. M. Evans, V. Bataille, A. Visconti, G. Hemani, G. McMahon, S. M. Ring, G. D. Smith, D. L. Duffy, G. Zhu, S. D. Gordon, S. E. Medland, B. D. Lin, G. Willemsen, J. Jan Hottenga, D. Vuckovic, G. Girotto, I. Gandin, C. Sala, M. P. Concas, M. Brumat, P. Gasparini, D. Toniolo, M. Cocca, A. Robino, S. Yazar, A. W. Hewitt, Y. Chen, C. Zeng, A. G. Uitterlinden, M. A. Ikram, M. A. Hamer, C. M. van Duijn, T. Nijsten, D. A. Mackey, M. Falchi, D. I. Boomsma, N. G. Martin, D. A. Hinds, M. Kayser and T. D. Spector (2018). "Genome-wide association meta-analysis of individuals of European ancestry identifies new loci explaining a substantial fraction of hair color variation and heritability." Nature Genetics **50**(5): 652-656.

John, M. B. (2005). Forensic DNA Typing : Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Amsterdam, Academic Press.

Kayser, M. and P. de Knijff (2011). "Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology." Nature Reviews Genetics **12**(3): 179-192.

Kayser, M. and P. M. Schneider (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.

Klepáček, I. and P. Z. Malá (2012). "'Bochdalek's' skull: morphology report and reconstruction of face." Forensic Science, Medicine, and Pathology **8**(4): 451-459.

Kramer, R. S., A. W. Young, M. G. Day and A. M. Burton (2017). "Robust social categorization emerges from learning the identities of very few faces." Psychological Review **124**(2): 115-129.

Kramer, R. S. S., A. W. Young and A. M. Burton (2018). "Understanding face familiarity." Cognition **172**: 46-58.

Krogman, W. M. and M. Y. Iscan (1986). The human skeleton in forensic medicine (2nd edn). Springfield, Charles C Thomas.

Krogman, W. M. and M. J. McCue (1946). "The reconstruction of the living head from the skull." FBI Law Enforcement Bulletin **15**(7): 11-18.

Kukla-Bartoszek, M., E. Pośpiech, A. Woźniak, M. Boroń, J. Karłowska-Pik, P. Teisseyre, M. Zubańska, A. Bronikowska, T. Grzybowski, R. Płoski, M. Spólnicka and W. Branicki (2019). "DNA-based predictive models for the presence of freckles." Forensic Science International: Genetics **42**: 252-259.

Kukla-Bartoszek, M., M. Szargut, E. Pośpiech, M. Diepenbroek, G. Zielińska, A. Jarosz, D. Piniewska-Róg, J. Arciszewska, S. Cytacka, M. Spólnicka, W. Branicki and A. Ossowski (2020). "The challenge of predicting human pigmentation traits in degraded bone samples with the MPS-based HIrisPlex-S system." Forensic Science International: Genetics **47**: 102301.

Laan, M. C. V. (2017). "The genetic witness: forensic DNA phenotyping." Journal of Emerging Forensic Sciences Research **2**(2): 33-52.

Lee, K., G. Byatt and G. Rhodes (2000). "Caricature effects, distinctiveness, and identification: testing the face-space framework." Psychological Science **11**(5): 379-385.

Lewin, C. and A. Herlitz (2002). "Sex differences in face recognition—Women's faces make the difference." Brain and Cognition **50**(1): 121-128.

Lewis, M. B. and R. A. Johnston (1998). "Understanding caricatures of faces." Quarterly Journal of Experimental Psychology **51**(2): 321-346.

Lin, J., S. H. Kennedy, T. Svarovsky, J. Rogers, J. W. Kemnitz, A. Xu and K. T. Zondervan (2009). "High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil." Analytical Biochemistry **395**(2): 265-267.

Lippert, C., R. Sabatini, M. Maher, E. Y. Kang, S. Lee, O. Arikan, A. Harley, A. Bernal, P. Garst, V. Lavrenko, K. Yocum, T. Wong, M. Zhu, W.-Y. Yang, C. Chang, T. Lu, C. Lee, B. Hicks, S.

Ramakrishnan and J. Venter (2017). "Identification of individuals by trait prediction using whole-genome sequencing data." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **114**(38): 10166-10171.

Liu, F., K. Zhong, X. Jing, A. G. Uitterlinden, A. E. J. Hendriks, S. L. S. Drop and M. Kayser (2019). "Update on the predictability of tall stature from DNA markers in Europeans." Forensic Science International: Genetics **42**: 8-13.

Longmore, C. A., C. H. Liu and A. W. Young (2008). "Learning faces from photographs." Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance **34**(1): 77-100.

Ludyga, N., B. Grünwald, O. Azimzadeh, S. Englert, H. Höfler, S. Tapio and M. Aubele (2012). "Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses." Virchows Archiv **460**(2): 131-140.

MacLean, C. E. and A. Lamparello (2014). "Forensic DNA phenotyping in criminal investigations and criminal courts: assessing and mitigating the dilemmas inherent in the science." Recent Advances in DNA & Gene Sequences **8 2**: 104-112.

Mala, P. and J. Velemínská (2016). "Vertical Lip Position and Thickness in Facial Reconstruction: A Validation of Commonly Used Methods for Predicting the Position and Size of Lips." Journal of Forensic Sciences **61**.

Mala, P. Z. (2013). "Pronasale position: an appraisal of two recently proposed methods for predicting nasal projection in facial reconstruction." Journal of Forensic Sciences **58**(4): 957-963.

Maltais Lapointe, G., N. Lynnerup and R. D. Hoppa (2016). "Validation of the New Interpretation of Gerasimov's Nasal Projection Method for Forensic Facial Approximation Using CT Data(.)" Journal of Forensic Sciences **61 Suppl 1**: S193-200.

Mbadiwe, S., J. M. Dawson and D. A. Adjero (2019). "FaceSNPs: Identifying Face-Related SNPs from the Human Genome." 2019 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM): 279-282.

Miething, F., S. Hering, B. Hanschke and J. Dressler (2006). "Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **54**(3): 371-374.

Moraes, C., P. Miamoto and R. Melani (2014). "Demonstration of protocol for computer-aided forensic facial reconstruction with free software and photogrammetry." Journal of Research in Dentistry **2**: 77-90.

Natu, V. and A. J. O'Toole (2011). "The neural processing of familiar and unfamiliar faces: a review and synopsis." British Journal of Psychology **102**(4): 726-747.

O'Toole, A. J., S. Edelman and H. H. Bühlhoff (1998). "Stimulus-specific effects in face recognition over changes in viewpoint." Vision Research **38**(15): 2351-2363.

Okello, J. B., J. Zurek, A. M. Devault, M. Kuch, A. L. Okwi, N. K. Sewankambo, G. S. Bimenya, D. Poinar and H. N. Poinar (2010). "Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues." Analytical Biochemistry **400**(1): 110-117.

Oruc, I., B. Balas and M. S. Landy (2019). "Face perception: A brief journey through recent discoveries and current directions." Vision Research **157**: 1-9.

Paireder, S., B. Werner, J. Bailer, W. Werther, E. Schmid, B. Patzak and M. Cichna-Markl (2013). "Comparison of protocols for DNA extraction from long-term preserved formalin fixed tissues." Analytical Biochemistry **439**(2): 152-160.

Palencia-Madrid, L., C. Xavier, M. de la Puente, C. Hohoff, C. Phillips, M. Kayser and W. Parson (2020). "Evaluation of the VISAGE Basic Tool for Appearance and Ancestry Prediction Using PowerSeq Chemistry on the MiSeq FGx System." Genes **11**(6): 708.

Palero, F., S. Hall, S. Thatje, P. F. Clark, D. Johnston and J. MacKenzie-Dodds (2010). "DNA extraction from formalin-fixed tissue: New light from the deep sea." Scientia Marina **74**(3): 465-470.

Parks, C. L., A. H. Richard and K. L. Monson (2013). "Preliminary performance assessment of computer automated facial approximations using computed tomography scans of living individuals." Forensic Science International **233**(1): 133-139.

Paysan, P., M. Lüthi, T. Albrecht, A. Lerch, B. Amberg, F. Santini and T. Vetter (2009). Face Reconstruction from Skull Shapes and Physical Attributes.

Peirce, C. S. (1931). *Collected Papers of Charles Sanders Peirce*. Cambridge, Harvard University Press.

Pośpiech, E., Y. Chen, M. Kukla-Bartoszek, K. Breslin, A. Aliferi, J. D. Andersen, D. Ballard, L. Chaitanya, A. Freire-Aradas, K. J. van der Gaag, L. Girón-Santamaría, T. E. Gross, M. Gysi, G. Huber, A. Mosquera-Miguel, C. Muralidharan, M. Skowron, Á. Carracedo, C. Haas, N. Morling, W. Parson, C. Phillips, P. M. Schneider, T. Sijen, D. Syndercombe-Court, M. Vennemann, S. Wu, S. Xu, L. Jin, S. Wang, G. Zhu, N. G. Martin, S. E. Medland, W. Branicki, S. Walsh, F. Liu and M. Kayser (2018). "Towards broadening Forensic DNA Phenotyping beyond pigmentation: Improving the prediction of head hair shape from DNA." *Forensic Science International: Genetics* **37**: 241-251.

Prag, J. and R. Neave (1997). *Making Faces: Using Forensic and Archeological Evidence*. College Station, Texas A & M University Press.

Priya, E. (2017). "Methods of Skeletal Age Estimation used by Forensic Anthropologists in Adults: A Review." *Foresic Research & Criminology International Journal* **4**.

Prokopec, M. and D. H. Ubelaker (2002). *Reconstructing the Shape of the Nose According to the Skull*.

Promega Corporation (2023). "Plexor® HY System: qPCR Assay to Determine Male and Total Human DNA Concentrations." from <https://www.promega.ca/products/forensic-dna-analysis-ce/human-specific-dna-quantitation/plexor-hy-system/?catNum=DC1001#specifications>.

Pulker, H., M. V. Lareu, C. Phillips and A. Carracedo (2007). "Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools." *Forensic Science International: Genetics* **1(2)**: 100-104.

Rehman, J. and A. Herlitz (2007). "Women remember more faces than men do." *Acta Psychologica* **124(3)**: 344-355.

Rhodes, G., S. Brennan and S. Carey (1987). "Identification and ratings of caricatures: Implications for mental representations of faces." *Cognitive Psychology* **19(4)**: 473-497.

- Ridel, A. F., F. Demeter, J. Liebenberg, E. N. L'Abbé, D. Vandermeulen and A. C. Oettlé (2018). "Skeletal dimensions as predictors for the shape of the nose in a South African sample: A cone-beam computed tomography (CBCT) study." Forensic Science International **289**: 18-26.
- Ritchie, K. L. and A. M. Burton (2017). "Learning faces from variability." Quarterly Journal of Experimental Psychology **70**(5): 897-905.
- Robert, M. B. L. (1999). "A Unified Account of the Effects of Caricaturing Faces." Visual Cognition **6**(1): 1-42.
- Rynn, C. and C. M. Wilkinson (2006). "Appraisal of traditional and recently proposed relationships between the hard and soft dimensions of the nose in profile." American Journal of Physical Anthropology **130**(3): 364-373.
- Rynn, C., C. M. Wilkinson and H. L. Peters (2010). "Prediction of nasal morphology from the skull." Forensic Science, Medicine and Pathology **6**(1): 20-34.
- Santos, M. C., C. P. Saito and S. R. Line (2008). "Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods." Pathology - Research and Practice **204**(9): 633-636.
- Santos, S., D. Sá, E. Bastos, H. Guedes-Pinto, I. Gut, F. Gärtner and R. Chaves (2009). "An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues." Research in Veterinary Science **86**(3): 421-426.
- Sato, Y., R. Sugie, B. Tsuchiya, T. Kameya, M. Natori and K. Mukai (2001). "Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues." Diagnostic Molecular Pathology **10**(4): 265-271.
- Sero, D., A. Zaidi, J. Li, J. D. White, T. B. G. Zarzar, M. L. Marazita, S. M. Weinberg, P. Suetens, D. Vandermeulen, J. K. Wagner, M. D. Shriver and P. Claes (2019). "Facial recognition from DNA using face-to-DNA classifiers." Nature Communications **10**(1): 2557.
- Shewale, J. G. and R. H. Liu (2014). Forensic DNA analysis : current practices and emerging technologies. Boca Raton, Taylor & Francis.

Shi, S. R., R. J. Cote, L. Wu, C. Liu, R. Datar, Y. Shi, D. Liu, H. Lim and C. R. Taylor (2002). "DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **50**(8): 1005-1011.

Shi, S. R., R. Datar, C. Liu, L. Wu, Z. Zhang, R. J. Cote and C. R. Taylor (2004). "DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution." Histochemistry and Cell Biology **122**(3): 211-218.

Singh, H., B. Narayan, A. B. Urs, S. Kumar Polipalli and S. Kumar (2020). "A novel approach for extracting DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue using microwave." Medical Journal Armed Forces India **76**(3): 307-311.

Skage, M. and C. Schander (2007). "DNA from formalin-fixed tissue: extraction or repair? That is the question." Marine Biology Research **3**(5): 289-295.

Smeets, D., P. Claes, D. Vandermeulen and J. G. Clement (2010). "Objective 3D face recognition: Evolution, approaches and challenges." Forensic Science International **201**(1): 125-132.

Snow, C. C., B. P. Gatliff and K. R. McWilliams (1970). "Reconstruction of facial features from the skull: an evaluation of its usefulness in forensic anthropology." American Journal of Physical Anthropology **33**(2): 221-228.

Sporer, S. L. (2001). "Recognizing faces of other ethnic groups: An integration of theories." Psychology, Public Policy, and Law **7**(1): 36-97.

Stephan, C. (2002). "Position of superciliare in relation to the lateral iris: Testing a suggested facial approximation guideline." Forensic science international **130**: 29-33.

Stephan, C. (2003). "Facial approximation: An evaluation of mouth-width determination." American journal of physical anthropology **121**: 48-57.

Stephan, C. (2005). Ceiling recognition limits of two-dimensional facial approximations constructed using averages: 199-219.

Stephan, C. (2010). "The human masseter muscle and its biological correlates: A review of published data pertinent to face prediction." Forensic science international **201**: 153-159.

Stephan, C. and J. Cicolini (2010). "The reproducibility of facial approximation accuracy results generated from photo-spread tests." Forensic science international **201**: 133-137.

Stephan, C. and M. Devine (2009). "The superficial temporal fat pad and its ramifications for temporalis muscle construction in facial approximation." Forensic science international **191**: 70-79.

Stephan, C. and M. Henneberg (2001). "Building Faces from Dry Skulls: Are They Recognized Above Chance Rates?" Journal of forensic sciences **46**: 432-440.

Stephan, C. and S. Murphy (2008). "Mouth width prediction in craniofacial identification: Cadaver tests of four recent methods, including two techniques for edentulous skulls." The Journal of forensic odonto-stomatology **26**: 2-7.

Stephan, C. N. (2002). "Facial approximation: globe projection guideline falsified by exophthalmometry literature." Journal of Forensic Sciences **47**(4): 730-735.

Stephan, C. N. (2003). "Anthropological facial 'reconstruction' – recognizing the fallacies, 'unembracing' the errors, and realizing method limits." Science & Justice **43**(4): 193-200.

Stephan, C. N. and R. S. Arthur (2006). "Assessing facial approximation accuracy: How do resemblance ratings of disparate faces compare to recognition tests?" Forensic Science International **159**: S159-S163.

Stephan, C. N., J. M. Caple, P. Guyomarc'h and P. Claes (2018). "An overview of the latest developments in facial imaging." Forensic sciences research **4**(1): 10-28.

Stephan, C. N. and J. Cicolini (2008). "Measuring the Accuracy of Facial Approximations: A Comparative Study of Resemblance Rating and Face Array Methods." Journal of Forensic Sciences **53**(1): 58-64.

Stephan, C. N. and P. L. Davidson (2008). "The placement of the human eyeball and canthi in craniofacial identification." Journal of Forensic Sciences **53**(3): 612-619.

Stephan, C. N. and M. Devine (2009). "The superficial temporal fat pad and its ramifications for temporalis muscle construction in facial approximation." Forensic Science International **191**(1): 70-79.

Stephan, C. N. and M. Henneberg (2003). "Predicting mouth width from inter-canine width--a 75% rule." Journal of Forensic Sciences **48**(4): 725-727.

Stephan, C. N. and M. Henneberg (2006). "Recognition by forensic facial approximation: Case specific examples and empirical tests." Forensic Science International **156**(2): 182-191.

Stephan, C. N., M. Henneberg and W. Sampson (2003). "Predicting nose projection and pronasale position in facial approximation: a test of published methods and proposal of new guidelines." American Journal of Physical Anthropology **122**(3): 240-250.

Stephan, C. N., A. J. Huang and P. L. Davidson (2009). "Further evidence on the anatomical placement of the human eyeball for facial approximation and craniofacial superimposition." Journal of Forensic Sciences **54**(2): 267-269.

Stephan, C. N. and E. K. Simpson (2008). "Facial Soft Tissue Depths in Craniofacial Identification (Part I): An Analytical Review of the Published Adult Data*." Journal of Forensic Sciences **53**(6): 1257-1272.

Strapasson, R. A. P., L. M. Herrera and R. F. H. Melani (2017). "Forensic Facial Reconstruction: Relationship Between the Alar Cartilage and Piriform Aperture." Journal of Forensic Sciences **62**(6): 1460-1465.

Taylor, K. T. (2001) Forensic art and illustration. Boca Raton, CRC Press.

Tedeschi-Oliveira, S. V., T. L. Beaini and R. F. H. Melani (2016). "Forensic facial reconstruction: Nasal projection in Brazilian adults." Forensic Science International **266**: 123-129.

Tokuda, Y., T. Nakamura, K. Satonaka, S. Maeda, K. Doi, S. Baba and T. Sugiyama (1990). "Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde." Journal of Clinical Pathology **43**(9): 748-751.

Tyrrell, A. J., M. P. Evison, A. T. Chamberlain and M. A. Green (1997). "Forensic three-dimensional facial reconstruction: historical review and contemporary developments." Journal of Forensic Sciences **42**(4): 653-661.

Valentine, T. (1991). "A unified account of the effects of distinctiveness, inversion, and race in face recognition." Quarterly Journal of Experimental Psychology **43**(2): 161-204.

Vanezis, P., R. W. Blowes, A. D. Linney, A. C. Tan, R. Richards and R. Neave (1989). "Application of 3-D computer graphics for facial reconstruction and comparison with sculpting techniques." Forensic Science International **42**(1-2): 69-84.

Verzé, L. (2009). "History of facial reconstruction." Acta bio-medica : Atenei Parmensis **80**: 5-12.

Walsh, S., L. Chaitanya, K. Breslin, C. Muralidharan, A. Bronikowska, E. Pospiech, J. Koller, L. Kovatsi, A. Wollstein, W. Branicki, F. Liu and M. Kayser (2017). "Global skin colour prediction from DNA." Human Genetics **136**(7): 847-863.

Walsh, S., L. Chaitanya, L. Clarisse, L. Wirken, J. Draus-Barini, K. Leda, H. Maeda, T. Ishikawa, T. Sijen, P. de Knijff, W. Branicki, F. Liu and M. Kayser (2013). "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.

Walsh FDP Lab "Categorical Eye, Hair and Skin color prediction from DNA - HRisPlex-S." Retrieved 2022, from <https://walshlab.sitehost.iu.edu/pages/tools.html>.

Warrington, E. K. and M. James (1967). "An Experimental Investigation of Facial Recognition in Patients with Unilateral Cerebral Lesions." Cortex **3**(3): 317-326.

Welcker, H. (1883). Schiller's schadel und todtenmaske, nebst mittheilungen uber schadel und todtenmaske kant's. Braunschweig: Viehweg F and Son.

Wheeler, A., N. Czado, D. Gangitano, M. Turnbough and S. Hughes-Stamm (2017). "Comparison of DNA yield and STR success rates from different tissues in embalmed bodies." International Journal of Legal Medicine **131**(1): 61-66.

White, J. D., K. Indencleef, S. Naqvi, R. J. Eller, H. Hoskens, J. Roosenboom, M. K. Lee, J. Li, J. Mohammed, S. Richmond, E. E. Quillen, H. L. Norton, E. Feingold, T. Swigut, M. L. Marazita, H. Peeters, G. Hens, J. R. Shaffer, J. Wsocka, S. Walsh, S. M. Weinberg, M. D. Shriver and P. Claes (2021). "Insights into the genetic architecture of the human face." Nature Genetics **53**(1): 45-53.

White, T. and P. Folkins (2005). "The Human Bone Manual." The Human Bone Manual.

Whitnall, S. E. (1921). The anatomy of the human orbit and accessory organs of vision. London, Oxford Medical Publications.

- Wilkinson, C. (2004). Forensic facial reconstruction. Cambridge, Cambridge University Press.
- Wilkinson, C., M. Motwani and E. Chiang (2003). "The Relationship between the Soft Tissues and the Skeletal Detail of the Mouth." Journal of Forensic Sciences **48**: 728-732.
- Wilkinson, C., C. Rynn, H. Peters, M. Taister, C. H. Kau and S. Richmond (2006). "A blind accuracy assessment of computer-modeled forensic facial reconstruction using computed tomography data from live subjects." Forensic Science, Medicine, and Pathology **2**(3): 179-187.
- Wilkinson, C. M. and S. A. Mautner (2003). "Measurement of eyeball protrusion and its application in facial reconstruction." Journal of Forensic Sciences **48**(1): 12-16.
- Wright, D. B. and B. Sladden (2003). "An own gender bias and the importance of hair in face recognition." Acta Psychologica **114**(1): 101-114.
- Young, A. W. and A. M. Burton (2017). "Recognizing Faces." Current Directions in Psychological Science **26**(3): 212-217.
- Zarins, U. (2017). Anatomy of Facial Expressions. Anatomy Next.
- Zednikova Mala, P. and J. Veleminska (2016). "Vertical Lip Position and Thickness in Facial Reconstruction: A Validation of Commonly Used Methods for Predicting the Position and Size of Lips." Journal of Forensic Sciences **61**(4): 1046-1054.
- Zednikova Mala, P. and J. Veleminska (2018). "Eyeball Position in Facial Approximation: Accuracy of Methods for Predicting Globe Positioning in Lateral View." Journal of Forensic Sciences **63**(1): 221-226.