



Université de Montréal

**Stabilité de l'acide ribonucléique pour la datation des  
fluides corporels en biologie judiciaire**

Par

Anne-Marie Simard

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en Biochimie  
option génétique moléculaire

Septembre, 2011

© Anne-Marie Simard, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Stabilité de l'acide ribonucléique pour la datation des  
fluides corporels en biologie judiciaire

Présenté par  
Anne-Marie Simard

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur

Luc DesGroseillers, directeur de recherche

Vahé Sarafian, codirecteur de recherche

Daniel Sinnett, membre du jury

## SOMMAIRE

Des recherches en sciences judiciaires ont montré récemment une possible corrélation entre le temps d'entreposage d'échantillons de fluides corporels et la dégradation de l'ARN dans ceux-ci. Le moment où une tache a été déposée sur une scène de crime peut être important pour déterminer la pertinence d'un échantillon dans une enquête.

Dans ce mémoire, nous rapportons les profils de dégradation de quatre ARN différents mesurés par RT-qPCR, soit l'ARN ribosomique 18S et les ARNm de la  $\beta$ -actine, de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase et de la cyclophiline A, obtenus de taches de sang, de salive et de sperme, entreposés à la température de la pièce ou au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  sur une période de 6 mois.

Nos résultats montrent une faible variation interindividuelle pour le sang et le sperme, mais une différence importante entre les donneurs pour la salive. De plus, le profil de dégradation est semblable pour tous les transcrits, mais diffère entre les fluides. La congélation des échantillons stabilise les ARN avant leur analyse. Finalement, la quantité d'ARN détecté est en relation avec le temps d'entreposage et pourrait être utilisée afin d'estimer l'âge des échantillons lorsque l'impact des conditions d'entreposage sur la dégradation de l'ARN sera mieux connu.

### **Mots clés :**

acide ribonucléique, fluides corporels, stabilité, dégradation, biologie judiciaire, datation, RT-qPCR, ARNr 18S, ACTB, GAPDH, PPIA

## ABSTRACT

Recent studies in forensic science have shown a possible correlation between the degradation rate of some RNA transcripts and the age of bloodstains. The time of deposition of a stain can be of major importance to determine the relevance of a sample in a forensic investigation.

In this thesis, we describe the degradation profiles of the 18S ribosomal RNA and the  $\beta$ -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and cyclophilin A mRNAs, measured by RT-qPCR and obtained from dried blood, semen and saliva stains stored at room temperature or frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  up to 6 months.

Our results showed low inter-individual variation for blood and semen stains, but a high variation was observed between donors for saliva. Moreover, degradation profile of each transcripts was similar, but differed between fluids. Freezing samples prevented RNA degradation over time. Finally, RNA quantity was in relation with the time of storage and could be used to estimate the time since deposition of a stain when the effects of various storage conditions on RNA degradation profiles will be better documented.

**Keywords :**

ribonucleic acid, body fluids, stability, degradation, age determination, forensic biology, RT-qPCR, 18S rRNA, ACTB, GAPDH, PPIA

# TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>IX</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations.....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LA BIOLOGIE JUDICIAIRE .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 PRINCIPE DE LOCARD.....	2
1.1.2 LES FLUIDES CORPORELS EN BIOLOGIE JUDICIAIRE.....	2
1.1.3 SOURCE DE LA SUBSTANCE BIOLOGIQUE.....	4
1.1.4 PERTINENCE DE LA SUBSTANCE BIOLOGIQUE.....	5
<b>1.2 TECHNIQUES DÉVELOPPÉES ET ÉTUDES RÉCENTES SUR LA DATATION DES FLUIDES CORPORELS .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 CHANGEMENTS VISUELS ET MORPHOLOGIQUES DES TACHES DE SANG.....	6
1.2.2 CHANGEMENTS CHIMIQUES DES TACHES DE SANG .....	7
1.2.3 PROBLÉMATIQUE DES TECHNIQUES DÉVELOPPÉES .....	8
1.2.4 ÉTUDES SUR LA DATATION DES FLUIDES CORPORELS AUTRES QUE LE SANG .....	9
<b>1.3 ACIDE RIBONUCLÉIQUE.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 LES DIFFÉRENTES FAMILLES D'ARN .....	14
1.3.2 STRUCTURE DE L'ARN.....	14
1.3.3 STABILITÉ DE L'ARN.....	15
<b>1.4 L'ARN EN SCIENCES JUDICIAIRES.....</b>	<b>18</b>
1.4.1 APPARITION DE L'ARN EN SCIENCES JUDICIAIRES .....	18
1.4.2 AVANTAGES DE L'UTILISATION DE L'ARN.....	18

1.4.3	IDENTIFICATION DES FLUIDES BIOLOGIQUES.....	19
1.4.4	DÉTERMINATION DE LA CAUSE ET DES CIRCONSTANCES DU DÉCÈS .....	27
1.4.5	DÉTERMINATION DU TEMPS DU DÉCÈS .....	27
1.4.6	DÉTERMINATION DE L'ÂGE DES BLESSURES.....	28
1.4.7	DATATION DES FLUIDES CORPORELS.....	29
1.5	DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE .....	30
	<b>CHAPITRE 2 ARTICLE.....</b>	<b>35</b>
2.1	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	36
2.2	ABSTRACT .....	38
2.3	INTRODUCTION.....	39
2.4	METHODS .....	41
2.5	RESULTS .....	44
2.6	DISCUSSION.....	48
2.7	ACKNOWLEDGEMENTS.....	52
2.8	REFERENCES.....	53
2.9	TABLES.....	58
2.10	LEGENDS TO FIGURES.....	59
	<b>CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>68</b>
3.1	RÉCOLTE ET ÉCHANTILLONNAGE DES DIFFÉRENTS FLUIDES.....	69
3.2	QUALITÉ ET QUANTITÉ DE L'ARN EXTRAIT .....	70
3.3	DÉMARCHE POUR L'INTERPRÉTATION DES DONNÉES.....	71
	<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION.....</b>	<b>74</b>
4.1	STABILITÉ DES TRANSCRITS.....	75

<b>4.2</b>	<b>MÉCANISME DE DÉGRADATION DES ARN DANS LES ÉCHANTILLONS SÉCHÉS .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3</b>	<b>COMBINAISON DE MARQUEURS.....</b>	<b>77</b>
<b>4.4</b>	<b>LIMITATIONS DE L'ÉTUDE.....</b>	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>STABILISATION DE L'ARN AVANT L'ANALYSE DES ÉCHANTILLONS ....</b>	<b>83</b>
<b>4.6</b>	<b>CHOIX DE LA MÉTHODE DE NORMALISATION.....</b>	<b>84</b>
<b>4.7</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>87</b>
	<b>CHAPITRE 5 ANNEXES.....</b>	<b>89</b>
	<b>LISTE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>107</b>



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résumé des différentes familles d'ARN. ....	17
Tableau II : Compilation des marqueurs spécifiques évalués pour l'identification des fluides et tissus corporels.....	25
<i>Table 1. Commercial assays used for real-time PCR detection of RNA markers. ....</i>	<i>58</i>
<i>Table 2. Detection of RNA markers is correlated with time of storage in blood stains. 58</i>	<i>58</i>
<i>Table 3. Detection of RNA markers is correlated with time of storage in semen stains. .....</i>	<i>58</i>
Tableau III : Réactifs développés commercialement utilisés pour la détection des marqueurs ARN. ....	90
Tableau IV : Description des participants à l'étude.....	91
Tableau V : Nombre d'échantillons analysés pour chaque cinétique. ....	92
Tableau VI : Intégrité et dosage de l'ARN extrait.....	93
Tableau VII : Quantité d'ARN extrait de taches de fluides biologiques dans la littérature. ....	94

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Analyses morphologiques par microscopie à force atomique de taches de sang séchées.....	11
Figure 1.2 : Effets de la température et de l'humidité sur $\lambda_{max}$ de la bande de Soret.	12
Figure 1.3 : Profils circadiens des concentrations de cortisol et de mélatonine dans la salive.....	13
Figure 1.4 : Co-extraction d'ADN et d'ARN.....	22
Figure 1.5 : Sensibilité des méthodes de profil d'ARN.....	23
Figure 1.6 : Stabilité de l'ARN selon la méthode de transcriptase inverse choisie.....	24
Figure 1.7 : Stabilité d'un ARN cible soumis à différentes conditions expérimentales.	26
Figure 1.8 : Représentation schématique des possibilités d'amplification.....	32
Figure 1.9 : Le ratio des deux amplicons de la $\beta$ -actine est en relation avec l'âge des taches.....	33
Figure 1.10 : Variation du niveau d'ARN détectable en fonction de l'âge des taches de sang.....	34
<i>Figure 1. Variation of RNA detection in blood stains over time between donors.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 2. Variation of RNA detection in semen stains over time between donors.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 3. RNA degradation profiles of all transcripts.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 4. Freezing samples prevents RNA degradation over time.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 5. Effect of time of storage on RNA detection for all markers in blood stains....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 6. Effect of time of storage on RNA detection for all markers in semen stains..</i>	<i>66</i>
<i>Figure S1. Variation of RNA detection in saliva stains over time between donors.....</i>	<i>67</i>
Figure 3.1 : Comparaison visuelle de l'efficacité de l'amplification des échantillons sur 6 mois.....	73
Figure 4.1 : La stabilité de l'ARNr 18S est différente de celle de l'ARNm de la $\beta$ -actine.....	78
Figure 4.2 : Le niveau de détection d'un ARN varie selon la longueur de l'amplicon...	79
Figure 4.3 : Procédure simplifiée de l'utilisation du RNeasy <sup>TM</sup> d'Ambion.....	85
Figure 4.4 : Sources de variation possibles dans l'expérimentation.....	86
Figure 5.1 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sang à température pièce.....	95
Figure 5.2 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sang au congélateur.....	96

Figure 5.3 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sperme à température pièce. ....	97
Figure 5.4 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sperme au congélateur. ....	98
Figure 5.5 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour la salive à température pièce. ....	99
Figure 5.6 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour la salive au congélateur. ....	100
Figure 5.7 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour le sang.....	101
Figure 5.8 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour le sperme.....	102
Figure 5.9 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour la salive. ....	103
Figure 5.10 : Profil de dégradation des différents marqueurs pour la salive.....	104
Figure 5.11 : Profils de dégradation obtenus selon la température pour le sang. ....	105
Figure 5.12 : Profils de dégradation obtenus selon la température pour le sperme. ..	106

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celcius
$\lambda_{\max}$ :	Longueur d'onde maximale
ACTB :	$\beta$ -actine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
bFGF :	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
$C_t$ :	<i>Cycle threshold</i>
EPO :	<i>Erythropoietin</i>
GAPDH :	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GGT :	<i>Gamma glutamyltransferase</i>
GOT :	<i>Glutamic oxaloacetic transaminase</i>
GPT :	<i>Glutamic pyruvic transaminase</i>
HBB :	<i>Haemoglobin <math>\beta</math></i>
HIF-1 $\alpha$ :	<i>Hypoxia-inducible factor-1-<math>\alpha</math></i>
HPLC :	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HTN3 :	<i>Histatin 3</i>
IEG :	<i>Immediate early genes</i>
IL-10 :	<i>Interleukin-10</i>
LDH :	<i>Lactate dehydrogenase</i>
miARN :	MicroARN
mL :	Millilitre
nM :	Nanomolaire
oligo-dT :	Oligonucléotides dT
PAP :	<i>Prostatic acid phosphatase</i>
pb :	Paire de bases nucléotidiques
PBGD :	<i>Porphobilinogen deaminase</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
PPIA :	<i>Peptidylpropyl isomerase A (cyclophiline A)</i>

PRM :	<i>Protamin</i>
PSA :	<i>Prostate specific antigen (or p30)</i>
RIN :	<i>RNA integrity number</i>
RT :	<i>Reverse transcription</i>
SPTB :	<i><math>\beta</math>-spectrin</i>
STATH :	<i>Statherin</i>
tPA :	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>
$\mu$ L :	<i>Microlitre</i>
UTR :	<i>Untranslated regions</i>
qPCR :	<i>Quantitative real-time PCR (PCR en temps réel)</i>
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

À ma mère,

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de recherche, les Drs Vahé Sarafian et Luc DesGroseillers. Je les remercie d'avoir partagé avec moi leur expertise, pour leur disponibilité et tout le temps qu'ils ont pu m'accorder. Vahé, merci d'avoir considéré ma candidature comme étudiante à la maîtrise au LSJML, d'avoir eu confiance en mes capacités et pour m'avoir donné l'opportunité de mener mon projet de recherche parmi vous. Luc, merci d'avoir accepté de me superviser et de m'avoir accueillie dans votre équipe, ainsi que d'avoir rendu possible mon encadrement à la fois à l'intérieur et hors du milieu universitaire.

Un merci tout spécial à tous ceux qui ont accepté de participer à mon étude, sans qui cette recherche n'aurait pas eu lieu.

Je désire également remercier toute l'équipe de la Biologie/ADN du LSJML. Ce fut un honneur pour moi d'avoir la chance de travailler parmi vous. Frédérick et Diane, pour avoir rendu l'encadrement d'une étudiante à la maîtrise possible. Jacinthe, Veronica et Martine, pour avoir été présentes dans les bons et les moins bons moments (graphiques de motivation à l'appui), tant au niveau professionnel que personnel. Tous les techniciens, pour leur soutien technique et surtout moral. Jean, Claire, Karine, Sara-Kim, Catherine, Sébastien, Olivier, Geneviève, pour les heures de discussion et votre amitié, ainsi que tous les autres... Au plaisir de me joindre à vous dans quelques années...

Un gros merci également à tous les étudiants du laboratoire du Dr Luc DesGroseillers, Véronique, Karine, Sasha, Gabriel et Mireille, avec qui ce fût un plaisir de partager mes questionnements, scientifiques ou non...

J'aimerais également remercier Cathy Provencher pour ses encouragements et ses judicieux conseils, Catherine Maltais pour les prélèvements sanguins et les heures de plaisir, le Dr Miguel Chagnon pour ses conseils statistiques, Philippe Lampron pour sa disponibilité, ainsi que l'équipe d'*Applied Biosystems*, Robert St-Laurent et Jesse Carlevaris pour leur soutien et leurs réponses à mes milliers (minimum...) de questions.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je voudrais également remercier ceux qui, au cours de mes études, ont fait une différence dans mon parcours en m'encourageant et me soutenant dans mes projets, implications et stages que je n'aurais pas pu accomplir sans eux : Somali, Sylvain, Martin, Sylvie, Céline et Éric.

Merci aux organismes subventionnaires CRSNG, FQRNT, FESP – FAECUM, ASBMB et au Département de Biochimie de l'Université de Montréal qui m'ont supporté financièrement au cours de mes études, afin que je puisse me concentrer complètement sur mon projet de recherche.

Merci aussi à mes amis qui ont su m'épauler tout au long de ce parcours : les filles du secondaire, la gang du Collège, mes compatriotes de la maîtrise, mes MD préférées, les anciens de l'Expo, mes collègues de la danse, et la liste est encore longue... merci pour tous ces moments passés en votre compagnie! C'est votre présence dans ma vie qui a su me motiver pour franchir chacune des étapes nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Finalement, je voudrais dire un merci tout spécial à ma mère, Micheline, pour son écoute et ses encouragements, mais surtout pour tout le temps qu'elle m'a accordé pour que je puisse réaliser tous mes projets.



*N'avance rien que tu ne sois capable de prouver.*

Dr Wilfrid Derome

**Chapitre 1**  
**INTRODUCTION**

## **1.1 LA BIOLOGIE JUDICIAIRE**

Les sciences judiciaires se divisent en plusieurs champs d'expertise, selon les éléments de preuves retrouvés. Pour soutenir les enquêteurs, plusieurs services sont disponibles, dont la toxicologie, la balistique, la chimie, l'analyse de documents, les incendies et explosions, la médecine légale ainsi que la biologie judiciaire.

### **1.1.1 Principe de Locard**

Nul ne peut agir avec l'intensité que suppose l'action sans laisser des marques multiples de son passage, tantôt le malfaiteur a laissé sur les lieux des marques de son activité, tantôt par une action inverse, il a emporté sur son corps ou sur ses vêtements les indices de son séjour ou de son geste. [1]

Le principe de Locard, fondamental en sciences judiciaires, indique que le suspect abandonnera sur la scène de crime des indices lui étant propres et qu'il transportera avec lui des éléments provenant de la scène lors de sa fuite [2].

Lors d'un délit, l'auteur, par sa présence, modifiera l'état original de l'endroit. Il y laissera des indices importants qui permettront peut-être solutionner le crime. [3]

Les pièces à conviction, prélevées par les intervenants sur la scène de crime, seront apportées au laboratoire où elles seront analysées, selon leur nature, par des experts en sciences judiciaires.

### **1.1.2 Les fluides corporels en biologie judiciaire**

Parmi les indices les plus fréquemment retrouvés sur les scènes de crime, les substances de nature biologique sont souvent les éléments les plus représentatifs d'une enquête [4, 5].

### 1.1.2.1 Sang

Le sang, composé de plasma et d'éléments figurés (dont les globules rouges et les globules blancs), est la substance biologique par excellence retrouvée sur les scènes de crime. Il peut s'agir, par exemple, du sang d'un criminel s'étant blessé lors de la perpétration de son crime ou encore du sang de la victime. Le sang peut donc, entre autres, provenir d'une blessure, ou il peut aussi s'agir, dans certains cas, de sang menstruel. Selon la situation, on peut le retrouver sous forme de flaques lorsque la quantité est importante, en goutte (ronde, allongée, etc.) ou en projections, par exemple tel que trouvé sur une arme à feu après un tir à bout portant.

### 1.1.2.2 Sperme

Le sperme consiste en une suspension de cellules (principalement les spermatozoïdes, mais également des cellules épithéliales et des globules blancs) retrouvée dans le liquide séminal. Il est présent principalement dans les cas de crimes à caractère sexuel, et peut être prélevé entre autres sur la victime, des vêtements, de la lingerie et des mouchoirs. Selon le cas, la présence de sperme peut consister en la preuve du crime, mais il peut également fournir des informations sur le criminel ou sur son mobile.

### 1.1.2.3 Salive

La salive est un fluide corporel retrouvé sur une très grande variété de supports. Toutefois, elle contient peu de matériel biologique et est rarement présente en grande quantité (sauf en présence d'expectorations ou crachats), ce qui rend son analyse plus difficile que pour le sang et le sperme. Tous les objets ayant été en contact avec les lèvres sont susceptibles de contenir des traces de salive. Il peut s'agir, par exemple, de mégots de cigarette, de timbres postes et d'enveloppes, de verres ou récipients et même de denrées alimentaires.

#### 1.1.2.4 Autres substances biologiques

Sont également prélevés sur une scène de crime les sécrétions vaginales, les poils et les cheveux (provenant de chapeaux, peignes, etc.), la sueur, l'urine, les ongles, etc. Les objets ayant été en contact avec les mains peuvent également être utilisés, car leur manipulation entraîne parfois un transfert de cellules de la peau sur la pièce à conviction. Bref, toutes les substances biologiques pouvant se retrouver sur le lieu d'un crime peuvent être amenées au laboratoire pour analyse.

### 1.1.3 Source de la substance biologique

Lorsque des substances biologiques ont été trouvées sur une pièce provenant d'une scène de crime, il est important de déterminer de quel type de tissu il s'agit, ainsi que de déterminer de qui provient la trace.

#### 1.1.3.1 Identification des fluides corporels

Afin de déterminer précisément la provenance de la substance corporelle retrouvée, plusieurs tests d'identification sont utilisés en routine dans les laboratoires judiciaires. Connaître précisément la nature d'un fluide peut faire une différence dans l'enquête, comme c'est le cas pour la présence de sperme dans une affaire d'agression sexuelle. Les tests indicatifs, d'orientation ou de confirmation, ainsi que les méthodes en développement pour chaque fluide ont été discutés en détail récemment par Virkler et Lednev [6].

#### 1.1.3.2 Profil génétique

Les fluides corporels retrouvés sur le lieu d'un crime seront principalement utilisés afin de générer un profil génétique d'ADN [7]. En analysant les portions variables de l'ADN entre les individus, il est possible de déterminer de qui provient l'échantillon, afin de :

- relier le suspect et la victime à une scène de crime en montrant qu'ils étaient présents sur le lieu du crime ;
- relier la victime et le suspect, en montrant qu'il y a eu contact entre eux ;
- procéder à une identification par filiation.

Cette analyse permettra donc d'identifier un suspect ou une victime (par exemple, une personne disparue), d'incriminer un suspect, ou encore de l'innocenter.

Même si l'identification du fluide a été effectuée et qu'il est possible de déterminer le contributeur à l'aide du profil génétique d'ADN, cela ne fournit pas d'information sur les circonstances dans lesquelles la trace analysée dans l'enquête a été déposée sur le lieu du crime.

#### **1.1.4 Pertinence de la substance biologique**

Afin de déterminer si le fluide analysé est pertinent dans l'enquête en cours, il faut se demander si les taches retrouvées sont liées au délit. Est-il possible que les suspects aient pu se trouver sur la scène de crime avant – ou après – que celui-ci ne se produise? Est-ce que la victime et le suspect ont pu être en contact à d'autres moments que celui du crime présumé? S'assurer de la pertinence de l'échantillon dans l'enquête est d'autant plus important lorsque le crime concerne des proches.

##### 1.1.4.1 Exemple de cas

Imaginez un couple vivant sous le même toit depuis longtemps. Après plusieurs années de vie commune, le couple se sépare et l'homme quitte le domicile familial. Quelques semaines après leur séparation, la femme est victime d'une agression sexuelle dans le salon de sa maison. L'analyse de la scène de crime met en évidence une tache de sperme sur le divan, identifiée comme provenant du mari selon son profil d'ADN. Peut-on considérer le mari comme un suspect dans l'affaire? La tache de sperme est-elle reliée à l'agression, ou était-elle présente avant même que le couple ne se sépare?

##### 1.1.4.2 Détermination du temps du crime

Présentement, il n'existe pas de technique de datation des fluides biologiques assez fiable pour son implantation dans les analyses de routine en laboratoire. En général, l'ordre des événements d'un crime sera déterminé, par exemple, à partir des témoignages des différentes personnes présentes sur la scène (suspects, victimes,

témoins), de documents concernant les personnes impliquées dans le délit ou encore, en présence d'un corps, de l'heure du décès de la victime (lorsqu'il est possible de l'estimer).

Toutefois, puisque les substances biologiques sont les indices les plus fréquemment retrouvés en sciences judiciaires, pouvoir déterminer le temps de leur déposition sur une scène de crime pourrait apporter des éléments décisifs dans plusieurs investigations. Effectivement, si le temps du crime est inconnu des enquêteurs, mais que l'on a la certitude qu'un échantillon biologique est lié au délit commis, déterminer son âge permettrait d'établir le temps du crime. À l'inverse, si le temps du crime est bien établi et qu'une substance biologique est retrouvée sur le lieu du crime, déterminer son âge permettrait de s'assurer que la tache analysée est bel et bien reliée au délit. Cette information pourrait permettre de corroborer le témoignage de certains suspects ou victimes, en plus de contribuer aux indices permettant d'incriminer ou d'innocenter certains prévenus.

## **1.2 TECHNIQUES DÉVELOPPÉES ET ÉTUDES RÉCENTES SUR LA DATATION DES FLUIDES CORPORELS**

L'importance de déterminer l'âge d'un échantillon biologique en sciences judiciaires est bien connue. De nombreuses études, analysant les modifications physiques et chimiques des échantillons dans le temps, ont été menées afin de développer des techniques de datation des taches de fluides retrouvées sur une scène de crime.

### **1.2.1 Changements visuels et morphologiques des taches de sang**

Dès 1930, Schwarzacher suggérait que la diminution de solubilité des taches de sang dans l'eau était reliée à l'âge des échantillons [8]. L'apparence visuelle des taches séchées fut également utilisée pour estimer l'intervalle écoulé depuis le dépôt des échantillons de sang [9, 10]. En effet, les changements chimiques survenant lors du séchage modifient la couleur des taches de sang, qui passent du rouge au brun-rouge. Toutefois, effectuer la datation suite à une observation visuelle de l'échantillon est peu précis, et quasi impossible après quelques jours. L'utilisation de la spectroscopie par réflectance a été suggérée pour quantifier les différentes fractions de chromophores

présents dans les taches de sang en fonction de leur dégradation dans le temps. Par contre, l'impact de la couleur du support sur lequel la tache est déposée est mal connu et pourrait fausser les résultats obtenus [11, 12]. Les modifications morphologiques des globules rouges ont également été observées par microscopie à force atomique, bien qu'aucune différence importante ne fut établie sur une période de 31 jours (voir figure 1.1 [13]).

### **1.2.2 Changements chimiques des taches de sang**

La spectrophotométrie a été utilisée à plusieurs reprises pour tenter d'obtenir un bon estimé de l'âge des taches de sang. En effet, les propriétés optiques uniques de l'hémoglobine ont permis de développer quelques méthodes de datation. Des études démontrent que l' $\alpha$ -ratio, dérivé du spectre d'absorption de l'hémoglobine, change en fonction du temps et que son taux de variation est relié aux conditions d'entreposage, en particulier la température. Ces observations se sont avérées semblables pour des taches de sang séchées [14] ou du sang en solution [15]. Récemment, un déplacement hypsochromique de la longueur d'onde de la bande de Soret de l'hémoglobine a été observé dans des échantillons de sang âgés [16]. Des corrélations significatives, dépendantes de la température et de l'humidité, ont pu être établies pour des intervalles variant de quelques minutes, heures, jours ou mois, permettant d'estimer l'âge des taches (voir figure 1.2).

L'utilisation d'un spectrophotomètre portatif pourrait également faciliter la prise de mesures directement sur la scène de crime. La dégradation dans le temps de divers constituants du sang a également été analysée par résonance paramagnétique électronique. Les premières études effectuées démontrent que l'intensité du signal obtenue pour différents constituants varie en quelques jours [17] et jusqu'à environ 120 jours [18], mais l'impact des conditions d'entreposage n'avait pas été déterminé. Une étude plus récente s'est intéressée à la dénaturation des hémoprotéines contenues dans les taches de sang et décrit une relation permettant d'estimer l'âge des taches sur une période de 432 jours, avec un taux d'erreur de 25% sur le nombre de jours réel [19]. En plus de l'importante marge d'erreur, cette méthode nécessite une quantité de sang importante (10 mg) et est faussée par les facteurs environnementaux auxquels sont soumises les taches.



La dégradation de certaines protéines et enzymes fut également évaluée comme outil de datation des taches de sang. Par exemple, sur une période de 150 jours, il est possible de détecter par immunoélectrophorèse la dégradation graduelle de protéines du sérum, en particulier la  $\beta$ -globuline et la  $\gamma$ -globuline [20]. L'analyse par HPLC de la dégradation des produits de l'hémoglobine dans des taches de sang n'a toutefois pas permis une estimation précise de l'âge des échantillons entreposés à des températures inconnues [21]. La perte relative d'activité enzymatique pourrait également être utilisée pour estimer l'âge des taches de sang. En effet, en comparant le ratio de l'activité de deux enzymes (GOT/GPT ou LDH/GOT) dans les cellules sanguines, il serait possible de déterminer l'âge de l'échantillon sans connaître la quantité initiale de la tache [22].

Vu la stabilité de la molécule d'ADN dans les échantillons judiciaires, peu d'études ont tenté d'établir une méthode d'estimation de l'âge des taches en fonction de sa dégradation. D'ailleurs, la configuration double brin de la molécule d'ADN lui confère une protection supérieure à celle d'autres types d'acides nucléiques [23]. Après un an d'entreposage à des températures et conditions d'humidité simulant des conditions climatiques normales, l'analyse de multiples amplicons par PCR n'a pas été inhibée de façon importante [24].

### **1.2.3 Problématique des techniques développées**

Aucune des méthodes suggérées précédemment n'a pu être implantée en routine dans les analyses judiciaires. Cela peut s'expliquer entre autres par le manque de précision ou de reproductibilité des techniques, ainsi que par leur manque de sensibilité. En effet, la plupart des techniques développées ont une marge d'erreur trop importante pour fournir une estimation fiable du temps écoulé depuis le dépôt de la tache dans un contexte judiciaire. De plus, les fluides biologiques retrouvés sur une scène de crime sont souvent présents en infime quantité. Lorsque la quantité d'un échantillon est très limitée, la priorité est accordée à l'analyse du profil génétique d'ADN pour identifier la source de l'échantillon. Une méthode de datation idéale devrait donc nécessiter le moins possible d'échantillon pour l'analyse, alors que la majorité des techniques proposées sont destructives et requièrent une importante quantité de fluide. De plus, la majorité des techniques présentées sont sujettes aux réactions

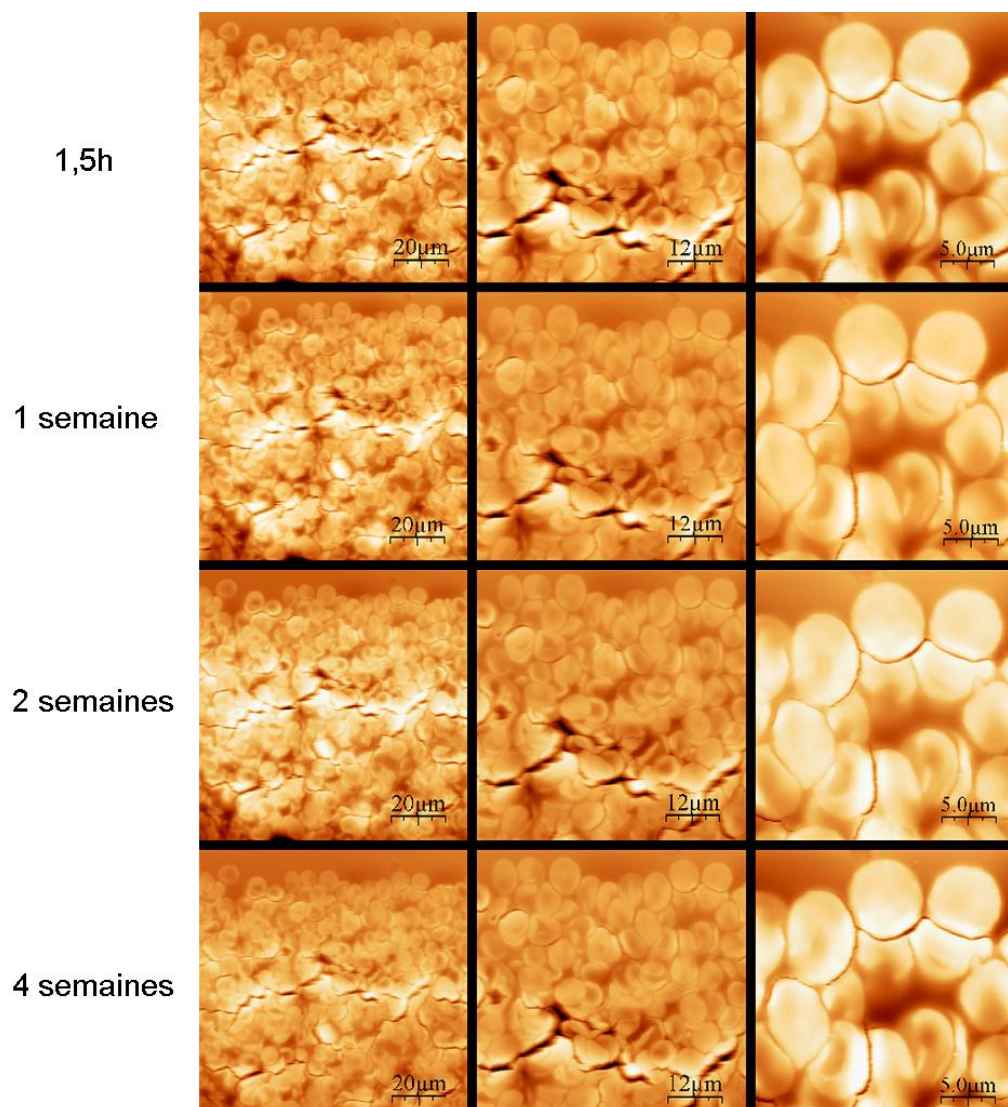
croisées avec d'autres espèces par manque de spécificité et ne peuvent être transposées à d'autres fluides biologiques que le sang.

#### **1.2.4 Études sur la datation des fluides corporels autres que le sang**

Très peu d'études décrivent des méthodes dédiées à la datation des taches de fluides corporels autres que le sang. Pourtant, plusieurs fluides biologiques tels que le sperme et la salive sont retrouvés fréquemment sur les scènes de crime [6]. Un procédé visuel permettant d'observer la diffusion progressive de l'ion chlorure dans les taches de sang et de sperme sur du papier ou du tissu fut suggéré [25]. La réduction d'AgCl fixé sur la tache crée une bordure noirâtre au contour des taches. La dimension de cette bordure augmente lorsque la tache est âgée entre 2 à 9 mois. La quantification et la mesure de l'activité enzymatique de quatre marqueurs (GGT, LDH, PAP, PSA) dans des taches de sperme de 1 mL furent également analysées en fonction du temps d'entreposage [26]. Les résultats démontrent une corrélation avec l'âge des taches lorsque les données obtenues pour chacun des marqueurs sont combinées. Cette étude suggère donc que l'utilisation de plusieurs marqueurs favorise une estimation plus fiable de l'âge des échantillons. Finalement, une étude récente a exploré la possibilité d'utiliser des marqueurs biologiques du cycle circadien pour déterminer l'heure de la journée à laquelle le dépôt du sang ou de la salive a eu lieu [27]. Les profils de concentration de la mélatonine et du cortisol, deux hormones sécrétées en fonction du rythme circadien, furent reproduits sur une période de 24h à partir d'échantillons de sang et de salive. Bien que les résultats obtenus sont intéressants pour l'estimation de l'heure de dépôt, plusieurs limitations doivent être contournées. Entre autres, les niveaux de ces hormones peuvent être influencés par l'exposition à la lumière, le stress, le décalage horaire ou encore des rythmes de vie différents (par exemple, les travailleurs de nuit). De plus, une importante variation de la quantité de protéines détectées dans la salive entre les individus rend l'analyse moins appropriée pour ce fluide (voir figure 1.3).

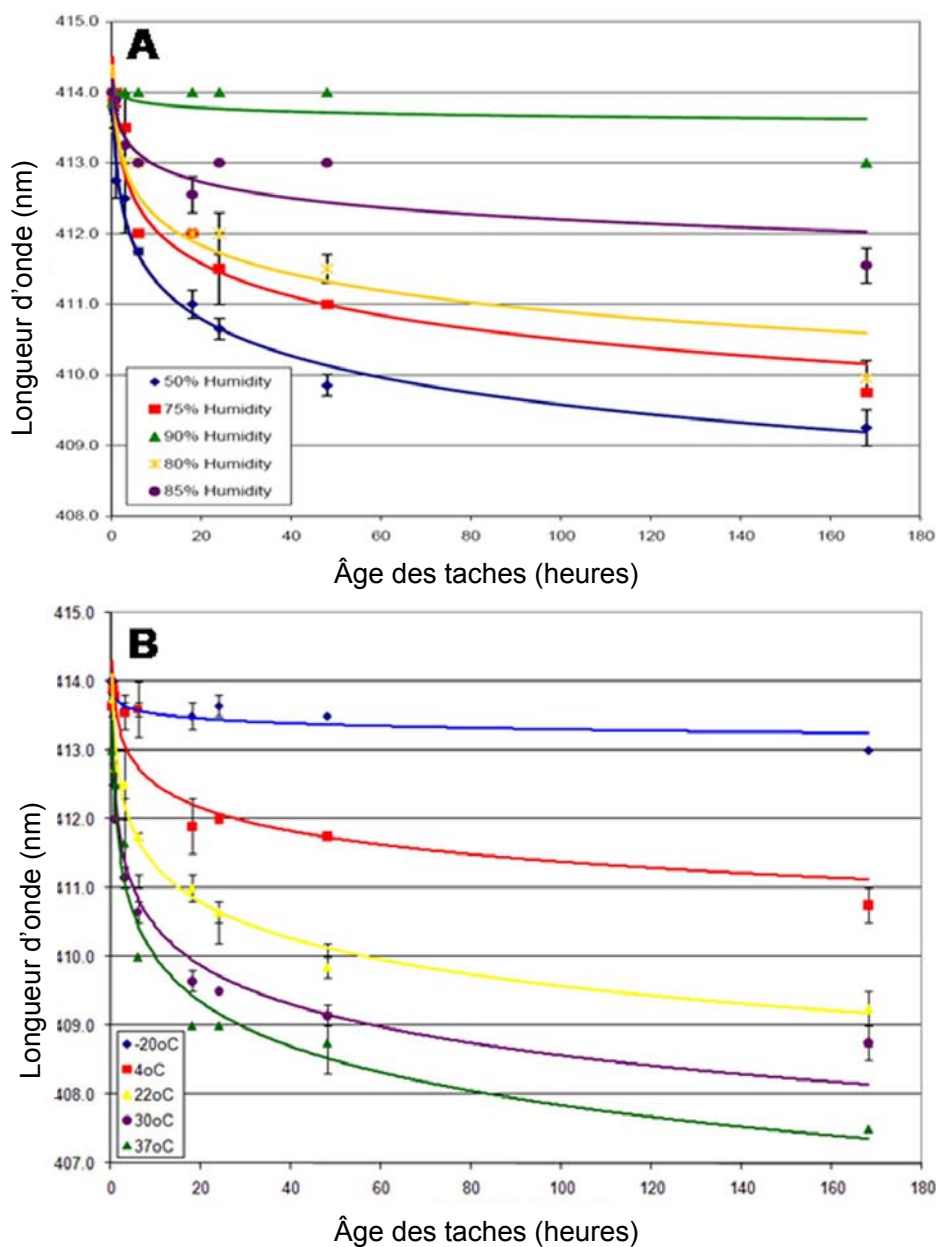
Aucune des méthodes décrites ci-dessus ne présente les caractéristiques de fiabilité et de précision nécessaires à leur utilisation dans un contexte judiciaire. Il est donc toujours nécessaire de développer de nouvelles méthodes de datation applicables aux

fluides corporels. L'analyse de l'ARN dans les échantillons biologiques pourrait permettre d'obtenir les résultats espérés.



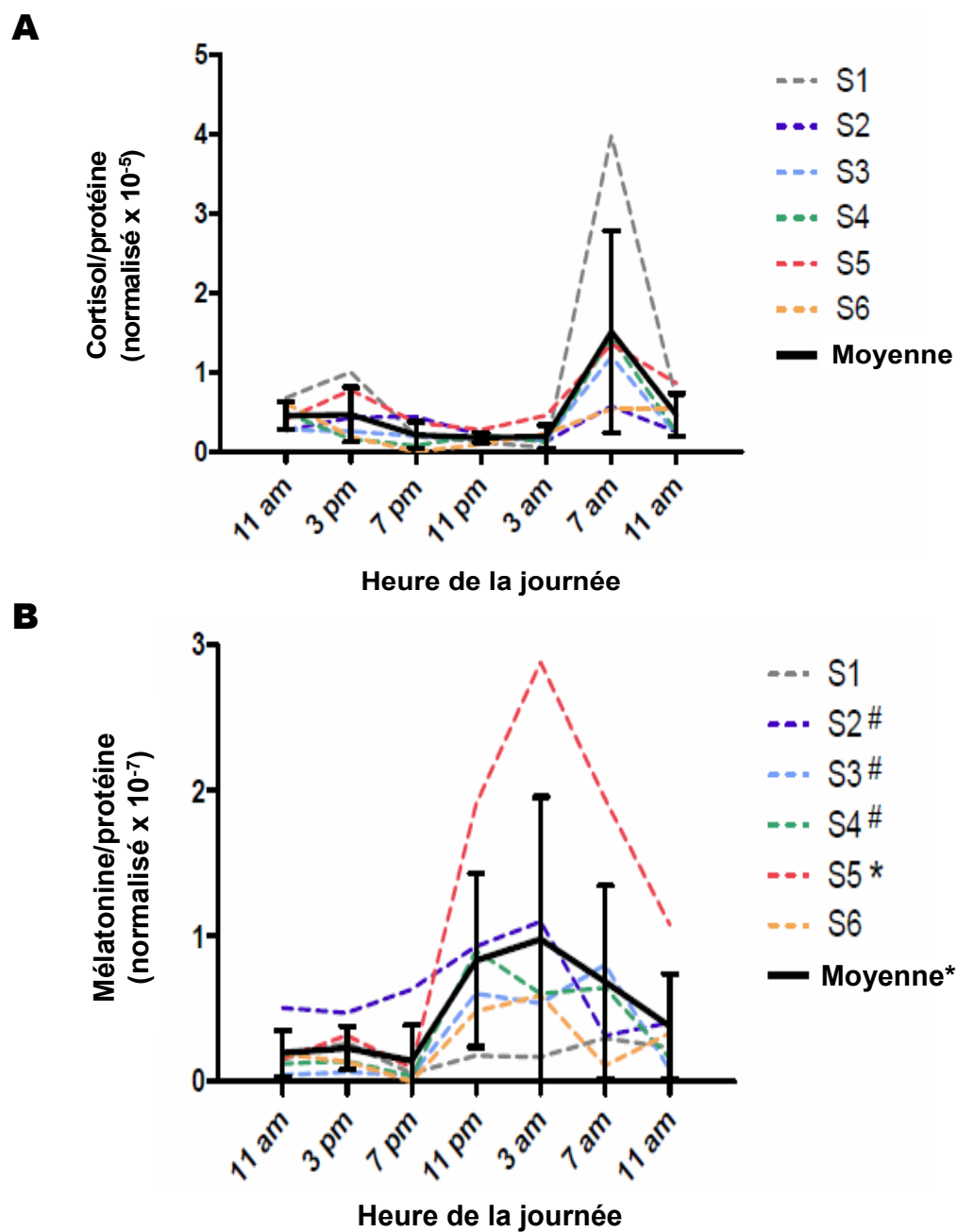
**Figure 1.1 : Analyses morphologiques par microscopie à force atomique de taches de sang séchées.**

Les colonnes représentent différents grossissements du champ analysé. Les lignes représentent les différents temps où les taches ont été analysées. La morphologie, indépendante du grossissement, ne change pas avec le temps d'entreposage (adapté de [13]).



**Figure 1.2 : Effets de la température et de l'humidité sur  $\lambda_{\max}$  de la bande de Soret.**

(A) Les taches de sang furent entreposées à 22°C, dans des conditions d'humidité variantes. Le déplacement hypsochromique de  $\lambda_{\max}$  de la bande de Soret diminue lorsque l'humidité augmente. (B) Les taches de sang furent entreposées à 50% d'humidité, à des températures changeantes. Le déplacement hypsochromique de  $\lambda_{\max}$  de la bande de Soret augmente lorsque la température augmente (adapté de [16]).



### **1.3 ACIDE RIBONUCLÉIQUE**

L'acide ribonucléique, ou ARN, est une macromolécule qui consiste en une chaîne de nucléotides pouvant atteindre une centaine à plusieurs milliers de bases azotées de longueur. Il utilise l'ADN comme gabarit pour sa synthèse et agit, de façon transitoire, comme support de l'information génétique pour la production éventuelle de protéines.

#### **1.3.1 Les différentes familles d'ARN**

L'ARN est synthétisé à partir des séquences contenues dans l'ADN par transcription. Le Tableau I résume les différentes familles d'ARN synthétisées dans les cellules. Chaque famille a une fonction spécifique, et la demi-vie des ARN en faisant partie y est souvent reliée [28]. Les ARN sont présents de façon transitoire dans la cellule, et peuvent jouer plusieurs rôles, dont agir comme support de l'information génétique, régulateur de l'expression génique, cofacteurs pour certaines enzymes ou même avoir leur activité enzymatique propre. La majorité des ARN sont impliqués dans la synthèse des protéines (ARNm, ARNr, ARNt). Les ARNm, constituant environ 3 à 5% de l'ARN total, sont envoyés aux ribosomes où ils seront utilisés comme matrice pour la synthèse des protéines. Les ribosomes sont formés de deux sous-unités, entre autres composées des ARNr. Cette famille d'ARN, formée des ARNr 28S, 18S et 5.8S, constitue la plus grande proportion de l'ARN total dans une cellule [29]. Les ARNt apportent les acides aminés au ribosome au cours de la traduction de l'ARNm pour permettre l'élongation des chaînes peptidiques des protéines.

#### **1.3.2 Structure de l'ARN**

L'ARN est principalement présent sous forme simple brin dans les cellules. En général, la chaîne de nucléotides se replie pour former une structure plus stable et plus compacte. Cela est rendu possible entre autres par la présence d'appariements entre les bases complémentaires dans la séquence d'un même brin d'ARN et la formation de liens hydrogènes dans la structure de la molécule. On parle alors de structure secondaire de l'ARN [30]. Quand la molécule d'ARN est longue, des structures plus complexes peuvent se former selon la nature des repliements, créant parfois également des structures tridimensionnelles de la molécule (ou structure tertiaire). La

complexité des liens créés va influencer la fonction de chaque ARN, comme c'est le cas, par exemple, des structures secondaires et tertiaires caractéristiques des ARNr et des ARNt, participant à la traduction des protéines dans le ribosome. L'environnement cellulaire dans lequel se trouve l'ARN a également un impact sur sa structure [31].

### 1.3.3 Stabilité de l'ARN

Les ARN sont exprimés et actifs de façon transitoire dans les cellules, afin de permettre une régulation fine de la quantité de protéines produites. La nécessité de contrôler précisément l'expression génique requiert la présence de ribonucléases et de mécanismes capables de dégrader l'ARN. Par exemple, les ARNm matures sont formés d'une région codante (traduite en protéine) encadrée par des portions non codantes (3'-UTR et 5'-UTR). Ils possèdent également une coiffe en 5' qui bloque la dégradation de l'ARN par les exonucléases et augmente leur stabilité. De plus, les ARNm possèdent une queue polyA en 3', dont la longueur varie en fonction des transcrits, qui stabilise la molécule en ralentissant sa dégradation [32]. La stabilité d'un transcrit dépend en partie de la présence de séquences particulières pouvant être liées par des protéines liant l'ARN pour inhiber ou favoriser sa dégradation. Ces éléments, aussi appelés des éléments *cis*, déterminent si l'ARN sera stabilisé ou dégradé en réponse à des stimuli particuliers. En effet, la dégradation des ARNm n'est pas aléatoire et est effectuée de façon précise par divers mécanismes.

La demi-vie des ARNm varie beaucoup selon le transcrit et est en partie reliée au rôle de la protéine qu'il code. Les ARNm codant pour des protéines ayant un rôle de maintenance dans la cellule ont des demi-vies plus longues, alors que ceux codant pour des protéines ayant une fonction ponctuelle (comme des protéines impliquées dans le cycle cellulaire) ont des demi-vies plus courtes. Des facteurs environnementaux, des facteurs de croissance et diverses cascades de signalisation peuvent également avoir une influence sur la stabilité des transcrits [33].

Lorsqu'un ARN doit être dégradé, différents mécanismes entrent en jeu dans la cellule. La dégradation de la plupart des ARN débute par une déadénylation complète ou partielle de la queue 3' polyA par des exonucléases [34]. Si la déadénylation est complète, le reste de la molécule d'ARN peut être dégradée par des exonucléases 3'-



5' [35]. Sinon, suite à la perte de la coiffe en 5', des exonucléases 5'-3' peuvent également procéder à la dégradation du transcrit. Les ARN peuvent aussi être clivés par des endonucléases, ce qui résulte en des transcrits tronqués. La stabilité de ces transcrits est donc souvent régulée par l'interaction réversible de protéines se liant sur des sites de clivage par endonucléases, offrant une protection transitoire à l'ARN. Bref, plusieurs facteurs influencent la stabilité de l'ARN dans les cellules.

Famille d'ARN	Abbréviation	Fonction principale	Demi-vie
ARN messenger	ARNm	Intermédiaire pour la traduction	Minutes à jours
ARN de transfert	ARNt	Transport des acides aminés	Jours
ARN ribosomique	ARNr	Structure ribosomique	Jours
Petit ARN nucléaire	ARNpn	Maturation et transport des ARNm	Jours
Petit ARN interférent	ARNi	Régulation de l'expression génique	Jours à semaines
MicroARN	miARN	Régulation de l'expression génique	Jours à semaines
ARN interagissant avec PIWI	piARN	Régulation de l'expression génique	Jours à semaines
ARN antisens	asARN	Régulation de l'expression génique	Jours à semaines
Riborégulateur	-	Régulation de l'expression génique	Jours à semaines
Ribozyme	-	Fonction enzymatique	Jours

### **Tableau I : Résumé des différentes familles d'ARN.**

Il existe plusieurs familles d'ARN présentes dans les cellules. Chacune d'elles a une fonction propre et une demi-vie qui en résulte (traduit de Vennemann et al. [28]).

## **1.4 L'ARN EN SCIENCES JUDICIAIRES**

De par sa nature transitoire et sa susceptibilité à la dégradation, l'acide ribonucléique a longtemps été considéré comme une molécule se détériorant rapidement, autant *in vitro* que dans les cellules après la mort. Toutefois, le développement des nouvelles technologies de biologie moléculaire a permis une analyse plus approfondie des ARN et a révélé leur potentiel inattendu en sciences judiciaires.

### **1.4.1 Apparition de l'ARN en sciences judiciaires**

En 1984, l'ARN a fait son apparition dans la recherche en sciences judiciaires lorsqu'une équipe a observé sa synthèse dans des tissus de cadavre humain sur une période de 32h post-mortem [36]. Bauer et al. ont montré en 1999 que l'ARN extrait de spécimens judiciaires entreposés depuis environ 6 mois était adéquat pour une analyse par RT-PCR [37]. Des études plus récentes ont également montré que l'ARNm extrait d'échantillons aussi vieux que 15 ans avait permis la réalisation d'une RT-PCR avec succès [38]. Ces résultats suggèrent que la stabilité des ARN diffère dans les échantillons judiciaires lorsque comparé aux cellules vivantes, permettant son analyse dans les tissus post-mortem ou les taches de fluides séchées, par exemple. Depuis la parution de ces études, qui ont contribué à créer un grand intérêt pour l'ARN, plusieurs recherches ont été menées pour documenter la stabilité de celui-ci dans les échantillons de type judiciaire et son utilisation dans le domaine médico-légal.

### **1.4.2 Avantages de l'utilisation de l'ARN**

Plusieurs échantillons biologiques provenant d'enquêtes judiciaires sont en quantité très limitée et seul l'ADN peut en être extrait. Il est donc nécessaire de développer des tests non destructifs permettant leur analyse complète, tout en conservant l'ADN nécessaire à la génération du profil génétique. L'utilisation de l'ARN permet l'extraction simultanée avec l'ADN sans perte supplémentaire de matériel, puisque les méthodes d'extraction d'acides nucléiques sont compatibles. D'ailleurs, quelques études démontrent qu'il est possible d'optimiser les techniques d'extraction actuelles afin d'incorporer l'isolation de l'ARN sans influencer de façon importante l'efficacité de l'extraction d'ADN (voir figure 1.4) [39-41].

Contrairement aux différentes analyses physiques ou chimiques discutées précédemment, l'utilisation de l'ARN permet d'analyser de faibles quantités d'échantillons (voir figure 1.5). En effet, contrairement à l'ADN, des milliers de copies du même ARN sont présentes dans une cellule. La sensibilité de l'amplification par RT-qPCR d'un spécimen permet même d'obtenir des résultats à partir d'aussi peu que 0.001  $\mu$ L de fluide [41, 42]. La possibilité d'effectuer les réactions en multiplex diminue également la quantité d'échantillon nécessaire. De plus, la majorité des laboratoires judiciaires possède déjà l'équipement pour procéder à la RT-qPCR, puisqu'un appareil de qPCR est utilisé pour doser l'ADN génomique. L'amplification de différents ARN dans un échantillon permet en plus d'obtenir une spécificité propre à certains types de cellules, tissus ou espèces. Cela est rendu possible en ciblant des ARN exprimés de façon différentielle entre les types cellulaires ou en amplifiant une portion de l'ARN qui est distincte entre les espèces. En effet, lorsque les cellules ont terminé leur différenciation, elles expriment un profil particulier de gènes, caractérisé par la présence d'ARNm spécifiques. Les cellules expriment également une certaine quantité de gènes ubiquitaires nécessaires au bon fonctionnement de toutes les cellules [43], tels que l'ARNr 18S [44], l'ACTB [45], la GAPDH [46] et la PPIA [47]. L'analyse de ces ARN pourrait donc être transposée à plusieurs fluides biologiques. Finalement, de nombreuses espèces d'ARN sont exprimées dans les cellules, offrant un vaste choix de cibles à analyser dans les échantillons biologiques, pour lesquelles la stabilité et la rapidité de dégradation sont propres [48].

### **1.4.3 Identification des fluides biologiques**

Le profil génétique établi à partir de l'ADN extrait des taches de fluides biologiques sur les scènes de crimes permet d'identifier la source des contributeurs, mais ne donne pas d'information sur le type de fluide présent. Les méthodes conventionnelles d'identification des fluides corporels en biologie judiciaire sont principalement basées sur la sérologie. L'identification devient d'autant plus difficile lorsque plusieurs fluides sont mélangés ou qu'ils proviennent de plusieurs individus. Il faut donc choisir quel test effectuer en fonction de ce qui est possiblement présent dans l'échantillon [6]. De plus, les tests courants ne peuvent différencier, par exemple, le sang menstruel et le sang provenant d'une blessure, ce qui peut avoir une importance cruciale dans une cause d'agression sexuelle.

La détection d'ARNm spécifiques à chaque fluide ou tissu pourrait permettre de remplacer les méthodes d'identification actuelles. Les techniques de RT-PCR ont dû être optimisées pour faciliter l'analyse d'échantillons types en sciences judiciaires, souvent partiellement dégradés. Par exemple, l'utilisation d'amorces oligo-dT se fixant à la queue poly-A des ARNm lors de la transcriptase inverse fut remplacée par l'emploi d'amorces aléatoires, qui permettent le démarrage de la RT sur toute la molécule d'ARN, peu importe son niveau de dégradation. Ainsi, comme le montre la figure 1.6, la détection de l'ARN de l'ACTB a été rendue possible sur une période d'au moins 9 mois lorsque des amorces aléatoires sont utilisées alors qu'une perte d'amplification par PCR après 4 semaines est observée avec l'utilisation d'oligo-dT pour la création de la banque d'ADNc [49].

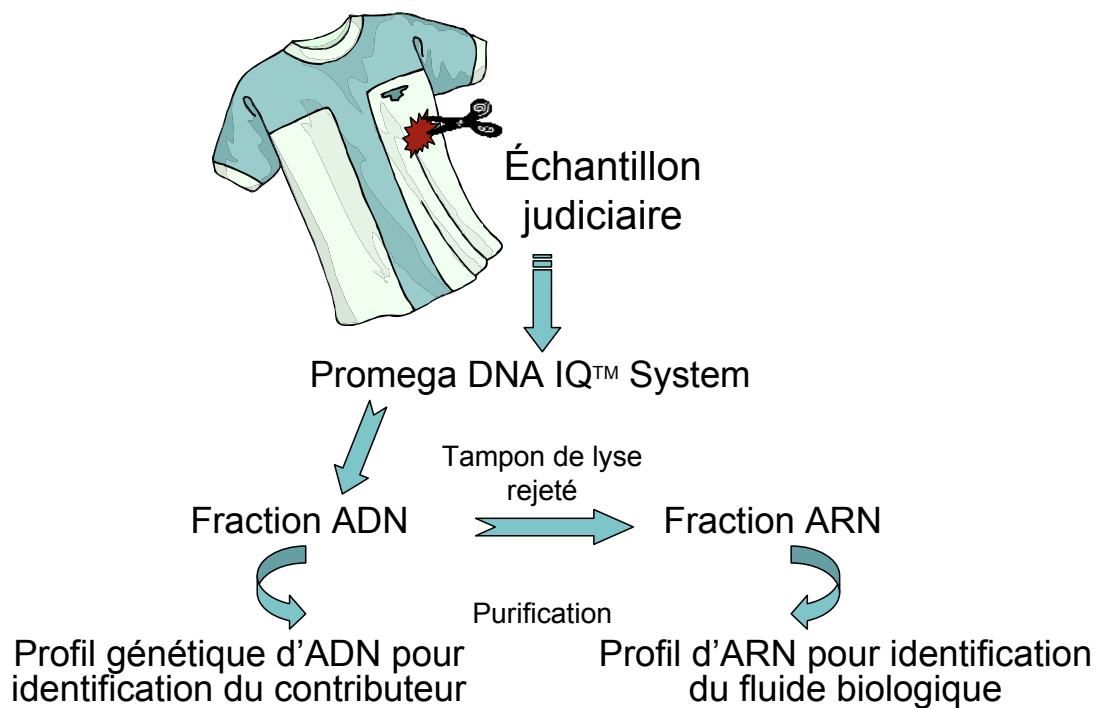
La grande sensibilité des techniques de RT-PCR et de RT-qPCR, ainsi que la possibilité d'analyser les échantillons en multiplex, a rapidement permis l'optimisation de réactions pour l'identification de plusieurs fluides [50]. Entre autres, une réaction triplex peut amplifier deux ARNm spécifiques du fluide que l'on veut détecter ainsi qu'un gène de référence, présent dans tous les fluides. Les limites de détection de telles réactions démontrent leur pertinence dans le domaine judiciaire : 1 pg d'ARN total pour le sperme, 2 ng d'ARN total pour la salive et 150 pg d'ARN total pour le sang [51].

Le Tableau II présente les marqueurs étudiés qui sont considérés spécifiques aux différents fluides ainsi que quelques gènes de référence utilisés pour normaliser les données de l'expression génique. D'autres études décrivent également l'essai de certains marqueurs qui se sont avérés non spécifiques et n'ont donc pas été retenus pour des investigations ultérieures [48, 52, 53].

Une fois les marqueurs intéressants identifiés, il faut évaluer l'impact du temps d'entreposage sur la qualité des résultats obtenus [48, 53], documenter l'effet de différentes conditions environnementales sur l'échantillon (température, humidité, lumière, pluie, etc.) (voir figure 1.7) [54], déterminer l'influence des différents supports sur lesquels les spécimens biologiques sont récupérés [42] et optimiser les multiplex spécifiques à l'identification des fluides choisis [55].

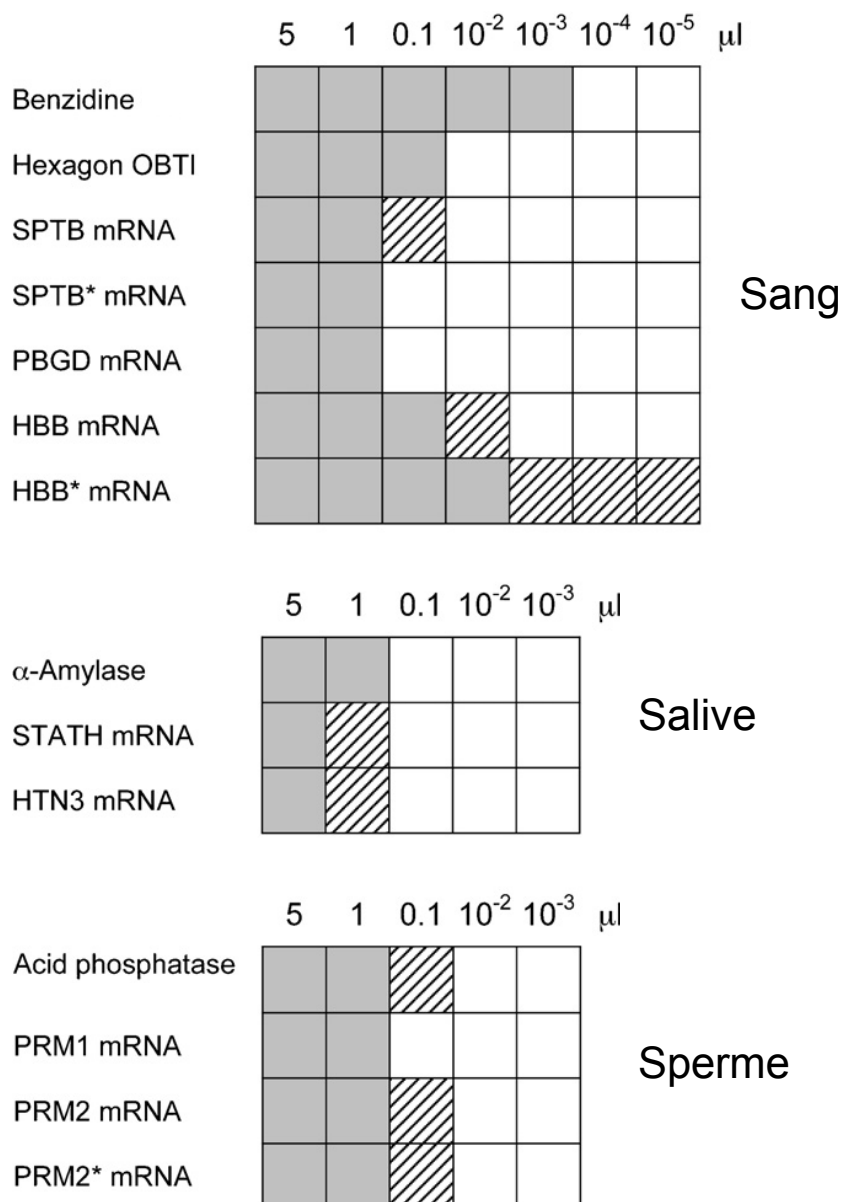
Récemment, l'*European DNA Profiling Group* (EDNAP) a évalué la robustesse et la reproductibilité, puis comparé la sensibilité de profils ARN établis à partir de taches de sang pour consolider l'identification de ce fluide [41]. Un total de 16 laboratoires judiciaires ont analysé, avec leur propre méthodologie, des taches de sang préparées par un même groupe de recherche. La sensibilité des marqueurs ARN à l'étude s'est avérée semblable à celle des tests d'orientation pour l'identification du sang utilisés en routine, mais on croit qu'un dosage de l'ARN entre les laboratoires permettrait de mieux normaliser les résultats obtenus. Une seconde collaboration supporte également le potentiel de l'utilisation des profils ARN, compatibles avec les méthodes d'extraction d'ADN actuelles [56].

Malgré la faisabilité du profil d'ARN sur des échantillons âgés, la détection des marqueurs partiellement dégradés ou compromis est difficile lorsque les spécimens judiciaires sont soumis à des conditions environnementales extrêmes. Quelques études proposent donc l'utilisation des miARN, de petits ARN d'environ 20 à 25 bases de longueur et exprimés de façon tissu spécifique. Ces miARN, moins sujets à la dégradation, permettraient la génération de patrons d'expression de plusieurs miARN pour développer un profil caractéristique de chaque fluide [57]. Une surexpression forte de plusieurs miARN a d'ailleurs été observée dans des échantillons de sang veineux ou de sperme, sans perte de détection importante même après un an d'entreposage [58]. L'utilisation de l'ARN ou des miARN est en bonne voie de devenir une alternative intéressante aux tests d'identification actuels.



**Figure 1.4 : Co-extraction d'ADN et d'ARN.**

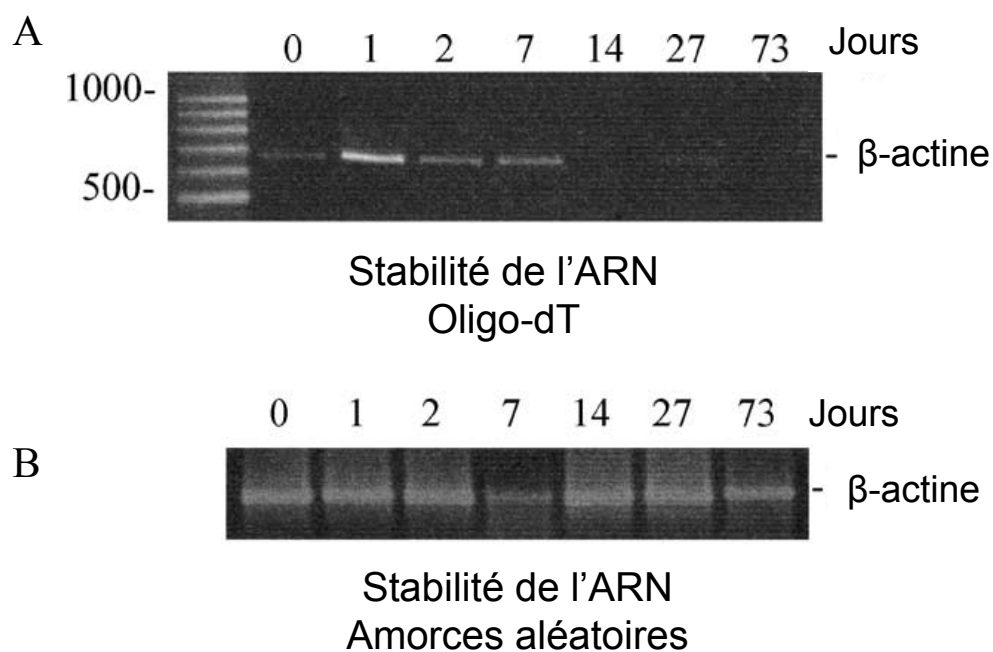
Schéma simplifié de la procédure générale d'extraction de l'ADN par la méthode Promega DNA IQ™ combinée à l'isolation d'ARN avec le Zymo Research Mini RNA Isolation Kit™ II [40].



**Figure 1.5 : Sensibilité des méthodes de profil d'ARN.**

Les tests d'identification conventionnels pour le sang, la salive et le sperme ont été comparés à la méthode d'identification par l'ARN par RT-PCR semi-quantitatif et RT-qPCR (\*). Les carrés gris représentent 3 résultats positifs sur 3 expériences, les carrés hachurés 1 ou 2 résultats positifs sur 3 expériences et les carrés blancs 3 résultats négatifs sur 3 expériences (adapté de [42]).





**Figure 1.6 : Stabilité de l'ARN selon la méthode de transcriptase inverse choisie.**

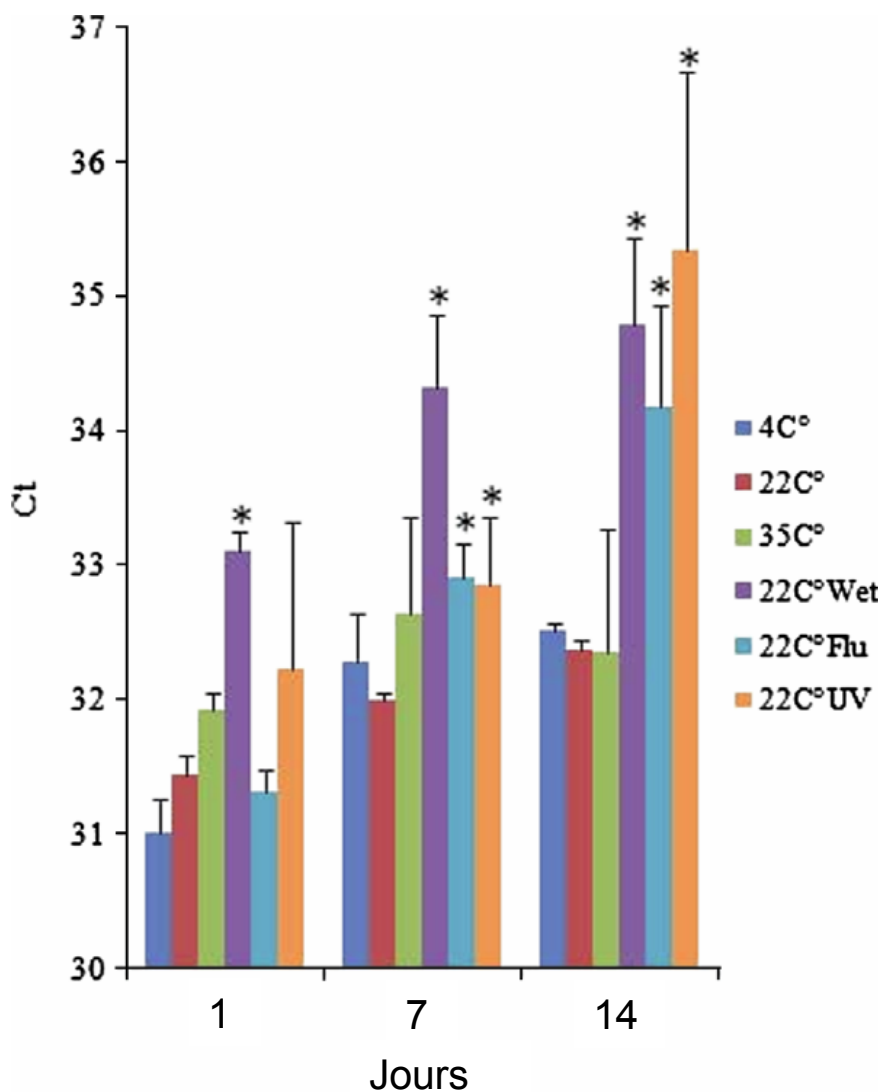
Des amorces d'oligo-dT (A) ou des amorces aléatoires (B) ont été utilisées dans la réaction de RT pour la création d'une banque d'ADNc à partir d'ARN total extrait de taches de sang de 50  $\mu$ L d'âges différents. Les résultats du gène de référence de l'ACTB sont illustrés (adapté de [49]).

---

<p><b>Sang</b></p> <p>ALAS2 (<i>d-aminolevulinate synthase</i>) [51]</p> <p>ANK1 (<i>ankyrin 1</i>) [55]</p> <p>AQP9 (<i>aquaporin 9</i>) [55]</p> <p>CD3G (<i>gamma polypeptide</i>) [59]</p> <p>GYPA (<i>glycophorin A</i>) [40, 60]</p> <p>HBA (<i>haemoglobin-alpha locus 1</i>) [50]</p> <p>HBB (<i>haemoglobin beta</i>) [42, 55, 59]</p> <p>PBGD (<i>porphobilinogen deaminase</i>) [42, 54, 55, 61]</p> <p>SPTB (<i>beta-spectrin</i>) [42, 51, 54, 55, 61]</p>	<p>TMG4 (<i>transglutaminase 4</i>) [59]</p>
<p><b>Salive</b></p> <p>HTN3 (<i>histatin 3</i>) [40, 42, 49, 51, 61]</p> <p>PRB1 (<i>salivary proline rich protein 1</i>) [49]</p> <p>PRB2 (<i>salivary proline rich protein 2</i>) [49]</p> <p>PRB3 (<i>salivary proline rich protein 3</i>) [49]</p> <p>STATH (<i>statherin</i>) [40, 42, 49, 51, 54, 59, 61]</p>	<p><b>Sécrétions vaginales</b></p> <p>DEFB1 (<i>defensin beta-1</i>) [42, 59, 61]</p> <p>MUC4 (<i>mucin 4</i>) [42, 54, 59]</p>
<p><b>Sperme</b></p> <p>PRM1 (<i>protamin 1</i>) [42, 51, 61]</p> <p>PRM 2 (<i>protamin 2</i>) [40, 42, 51, 61]</p> <p>PSA (<i>prostate specific antigen</i>) [50]</p> <p>SEMG1 (<i>semenogelin 1</i>) [59]</p>	<p><b>Sang menstruel</b></p> <p>ER (<i>estrogen receptor</i>) [52]</p> <p>MMP-7 (<i>matrix metalloproteinases 7</i>) [42, 51, 52, 61, 62]</p> <p>MMP-10 (<i>matrix metalloproteinases 10</i>) [51, 52]</p> <p>MMP-11 (<i>matrix metalloproteinases 11</i>) [42, 52, 60]</p> <p>PR (<i>prostaglandin receptor</i>) [52]</p>
	<p><b>Sueur</b></p> <p>DCD (<i>dermcidin</i>) [63]</p>
	<p><b>Urine</b></p> <p>THP (<i>Tamm-Horsfall Protein</i>) [64]</p>
	<p><b>Peau</b></p> <p>CDSN (<i>corneodesmosin</i>) [65]</p> <p>KOR (<i>loricrin</i>) [65]</p> <p>KRT9 (<i>keratin 9</i>) [65]</p>
	<p><b>Gènes de référence</b></p> <p>18S (<i>ribosomal RNA 18S</i>) [42]</p> <p>ACTB (<i>beta-actin</i>) [49, 65]</p> <p>GAPDH (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)</p> <p>S15 (<i>ribosomal protein S15</i>) [49]</p> <p>TEF (<i>thyrotrophic embryonic factor</i>) [40]</p>

---

**Tableau II : Compilation des marqueurs spécifiques évalués pour l'identification des fluides et tissus corporels**



**Figure 1.7 : Stabilité d'un ARN cible soumis à différentes conditions expérimentales.**

Des taches de 30  $\mu$ L de salive (n=3) furent entreposées à diverses températures, niveaux d'humidité (*Wet*) et luminosité (lampe fluorescente (*Flu*) ou ultraviolets (*UV*)). La différence de détection de l'HTN3 entre les conditions est comparée sur une période de deux semaines et est reportée en fonction du  $C_t$  obtenu par l'analyse de qPCR (\* $p < 0.01$ ). Une valeur de  $C_t$  croissante représente une diminution de la détection de l'ARN cible. (adapté de [59]).

#### **1.4.4 Détermination de la cause et des circonstances du décès**

Connaître précisément les circonstances et la cause du décès d'une personne dans une investigation est primordial. La pathologie moléculaire pourrait utiliser l'analyse de l'expression de différents ARNm en réponse au traumatisme pour déterminer les causes physiques du décès. En 1994, Phang et al. démontraient qu'il était possible d'extraire de l'ARN intact de plusieurs tissus après le décès [66]. Par la suite, Zhao et al. ont examiné plusieurs dossiers d'autopsie et évalué la possibilité d'utiliser les ARN du HIF-1 $\alpha$ , de l'EPO et du VEGF pour étudier la pathophysiologie rénale de la mort [67]. Ils ont observé une corrélation intéressante et conclu que le VEGF pourrait être particulièrement utile comme marqueur d'une mort par collapsus circulatoire aigu [68]. Une autre étude suggère l'utilisation des IEG dans les cas d'asphyxie. Ces ARNm sont activés de façon rapide et transitoire suite à une variété de stimuli cellulaires et pourraient agir comme indicateurs d'un diagnostic de strangulation et de pendaison [69]. Récemment, la dégradation de l'ARN dans le tissu cardiaque après le décès a également été examinée et pourrait être utilisée pour déterminer les causes du décès dues à certaines maladies cardiovasculaires [70].

#### **1.4.5 Détermination du temps du décès**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour estimer le temps du décès lors d'enquêtes judiciaires. Entre autres, les changements physiques post-mortem comme les rigidités cadavériques, la température du corps, le degré de putréfaction ou la croissance d'insectes sur le cadavre peuvent être de bons indices de l'intervalle post-mortem. Toutefois, ces estimations sont influencées par des facteurs extérieurs et environnementaux qui sont incontrôlables. Certains procédés chimiques et thermiques entraînant la dégradation des ARN peuvent avoir lieu immédiatement après la mort, ce qui rendrait plausible leur analyse pour la détermination du temps du décès. D'ailleurs, certaines études démontrent une relation entre la dégradation de quelques ARN dans les tissus et la période d'entreposage des cadavres [71]. L'analyse de 5 gènes de références par RT-qPCR sur une période de 15 à 118h après le décès a permis de déterminer que la quantité d'ARN détectée est variable en fonction du tissu étudié et du temps d'entreposage du corps [72]. Une étude a même analysé l'expression génique de molécules impliquées dans l'horloge biologique cellulaire périphérique

dans quelques organes, en émettant l'hypothèse que ce cycle s'arrête lors du décès, permettant d'estimer l'heure de celui-ci selon les niveaux d'expression de plusieurs gènes [73]. Toutefois, les résultats suggèrent que l'estimation de l'heure du décès devrait être basée sur une combinaison de plusieurs paramètres pour diminuer l'incertitude sur le temps déterminé. En effet, l'ampleur de la dégradation de l'ARN observée semble être influencée majoritairement par l'impact des conditions environnementales et d'entreposage, plutôt qu'avec l'intervalle post-mortem [74].

#### **1.4.6 Détermination de l'âge des blessures**

La détermination de l'âge des blessures est également d'une grande importance en pathologie judiciaire. Il est important, lors de l'autopsie, de pouvoir établir si les blessures infligées à la victime sont reliées au temps du crime, si elles sont survenues avant le décès ou suite à celui-ci. L'analyse de l'expression de certains ARN en réponse à des blessures établit une relation avec le temps écoulé depuis le traumatisme. Par exemple, l'expression temporelle des ARNm de cytokines proinflammatoires dans des blessures par incisions chez la souris est similaire pour tous les ARN ciblés [75]. De plus, la dynamique de l'expression du bFGF pourrait être un marqueur utile pour déterminer l'âge des blessures des organes dérivés de l'ectoderme (comme la peau et le cerveau) [76]. L'observation d'ecchymoses constitue une part importante des autopsies, et l'âge de celles-ci peut s'avérer crucial par exemple dans des dossiers d'abus infantiles. Une étude démontre que l'expression du tPA est dépendante du temps et qu'elle concorde avec les caractéristiques histologiques utilisées pour estimer l'âge des ecchymoses [77]. Finalement, le profil d'expression de l'IL-10 suite à une fracture dans les ostéocytes, les ostéoblastes et les macrophages, combiné à l'expression d'autres cytokines et l'observation de changements microscopiques et macroscopiques, serait très informatif pour évaluer l'âge de la fracture [78]. Ceci pourrait être particulièrement important dans les cas de traumatismes contondants.

### 1.4.7 Datation des fluides corporels

Au moment d'établir le projet de recherche, seulement deux études publiées traitaient de l'utilisation de l'ARN pour la détermination de l'âge des fluides en biologie judiciaire, toutes deux basées sur l'analyse des taches de sang.

En 2003, Bauer et al. [38] ont publié la première étude suggérant l'utilisation de l'ARN comme indicateur de l'âge des taches de sang. Ils ont analysé, par RT-PCR suivi d'une électrophorèse capillaire, la détection de deux amplicons de localisation différente sur le même ARNm. Puisque la queue polyA à l'extrémité 3' des ARNm offre une certaine protection contre la dégradation dans le temps, ils ont émis l'hypothèse que l'extrémité 5' des ARNm serait dégradée plus rapidement dans leurs échantillons. L'amplicon localisé plus près de l'extrémité 5' serait donc détecté sur une moins grande période de temps que l'amplicon localisé en 3', entraînant une variation du ratio d'expression des deux amplicons (voir figure 1.8). Ce ratio pourrait donc être utilisé comme indicateur du niveau de dégradation des ARNm analysés.

Les résultats obtenus sont semblables pour les deux ARNm choisis, soit la  $\beta$ -actine et la cyclophiline. Le changement observé pour la valeur du ratio des deux amplicons est dépendant de l'âge, comme le montre la figure 1.9A. Toutefois, il n'est possible de différencier les dates analysées qu'après une période d'entreposage de 4 ans ou plus, ce qui n'est pas suffisant pour être utilisable dans des analyses de routine (voir figure 1.9B). Les auteurs ont donc suggéré que la fragmentation de l'ARN dans les taches séchées se faisait de façon non linéaire et complexe, et que la variation résultante était significative uniquement après de grands intervalles de temps d'entreposage. De plus, l'utilisation du RT-qPCR pour de futures études est suggérée pour augmenter la sensibilité lors d'analyses quantitatives de l'ARN.

En 2005, Anderson et al. [79] ont analysé, par RT-qPCR, le ratio de l'expression relative d'ARN provenant de deux familles distinctes dans des taches de sang sur une période de 150 jours. Ils ont mesuré la quantité d'ARNm de la  $\beta$ -actine et la quantité d'ARNr 18S détectable dans des taches de sang provenant de 8 donneurs (4 hommes et 4 femmes). La valeur du ratio mesurée, indépendante de la quantité de départ dans l'échantillon, varie dans le temps de façon linéaire dans des conditions contrôlées

(25°C, 50% d'humidité), comme le montre la figure 1.10. En effet, ils ont observé une perte de signal moins importante pour l'ARNr 18S que pour l'ARNm de la  $\beta$ -actine. En fonction de ces résultats, les auteurs suggèrent que la présence de l'ARNr 18S dans le ribosome pourrait prévenir sa dégradation par les nucléases, contrairement aux ARNm qui ne sont en général pas constamment protégés par des complexes protéiques dans la cellule.

Ces deux études, considérées comme des études « preuves de concept », illustrent la possibilité d'utiliser l'ARN comme outil de datation des taches de sang en biologie judiciaire.

## **1.5 DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE**

En nous basant sur l'hypothèse selon laquelle des ARN de familles différentes se dégradent à un rythme différent dans les taches de sang séchées [79], nous avons analysé par RT-qPCR la dégradation d'un ARNr et de différents ARNm dans des échantillons typiques en biologie judiciaire. Puisque la grande majorité des études publiées ciblent la datation des taches de sang, nous avons inclus dans notre étude les trois fluides les plus fréquemment retrouvés sur les scènes de crime, soit le sang, le sperme et la salive. Lors de l'établissement du projet de recherche, il s'agissait, à notre connaissance, de la seule étude analysant la dégradation de l'ARN dans des fluides autres que le sang à des fins de datation.

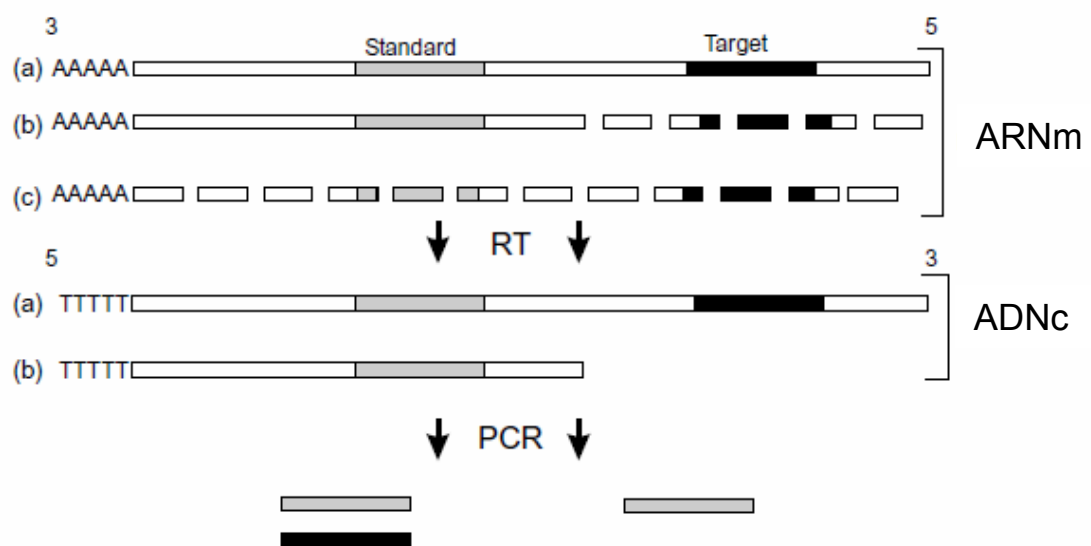
De nombreuses espèces d'ARN sont présentes dans les échantillons et la vitesse de dégradation peut varier selon l'ARN spécifique étudié. Puisqu'il est possible de détecter un nombre important de transcrits différents dans les spécimens à l'étude, nous avons choisis des ARN ayant déjà été détectés dans tous les fluides testés pour que la méthode soit transposable aux trois fluides. Il s'agit de l'ARNr 18S, retrouvé dans la sous-unité 40S des ribosomes, l'ARNm de la GAPDH, important pour le métabolisme cellulaire et la glycolyse, l'ARNm de l'ACTB, ayant entre autres un rôle dans la structure et l'intégrité cellulaire, ainsi que l'ARNm de la PPIA, impliqué dans la signalisation cellulaire et le métabolisme des protéines.

Afin de simuler un vieillissement naturel des échantillons, nous avons mesuré sur une période d'environ 6 mois la quantité d'ARN détectable par RT-qPCR dans des conditions standards d'entreposage (température pièce, sans contrôle particulier de l'humidité ambiante). De plus, puisque les échantillons provenant d'enquêtes sont rarement analysés immédiatement à leur arrivée au laboratoire, nous avons comparé la quantité d'ARN détectable dans des échantillons congelés à celle obtenue pour les échantillons entreposés à température pièce. À notre connaissance, il s'agit de la seule étude qui adresse la question du délai d'analyse et la possibilité de congeler les échantillons avant d'en extraire l'ARN.

Les objectifs de ce mémoire se résument comme suit :

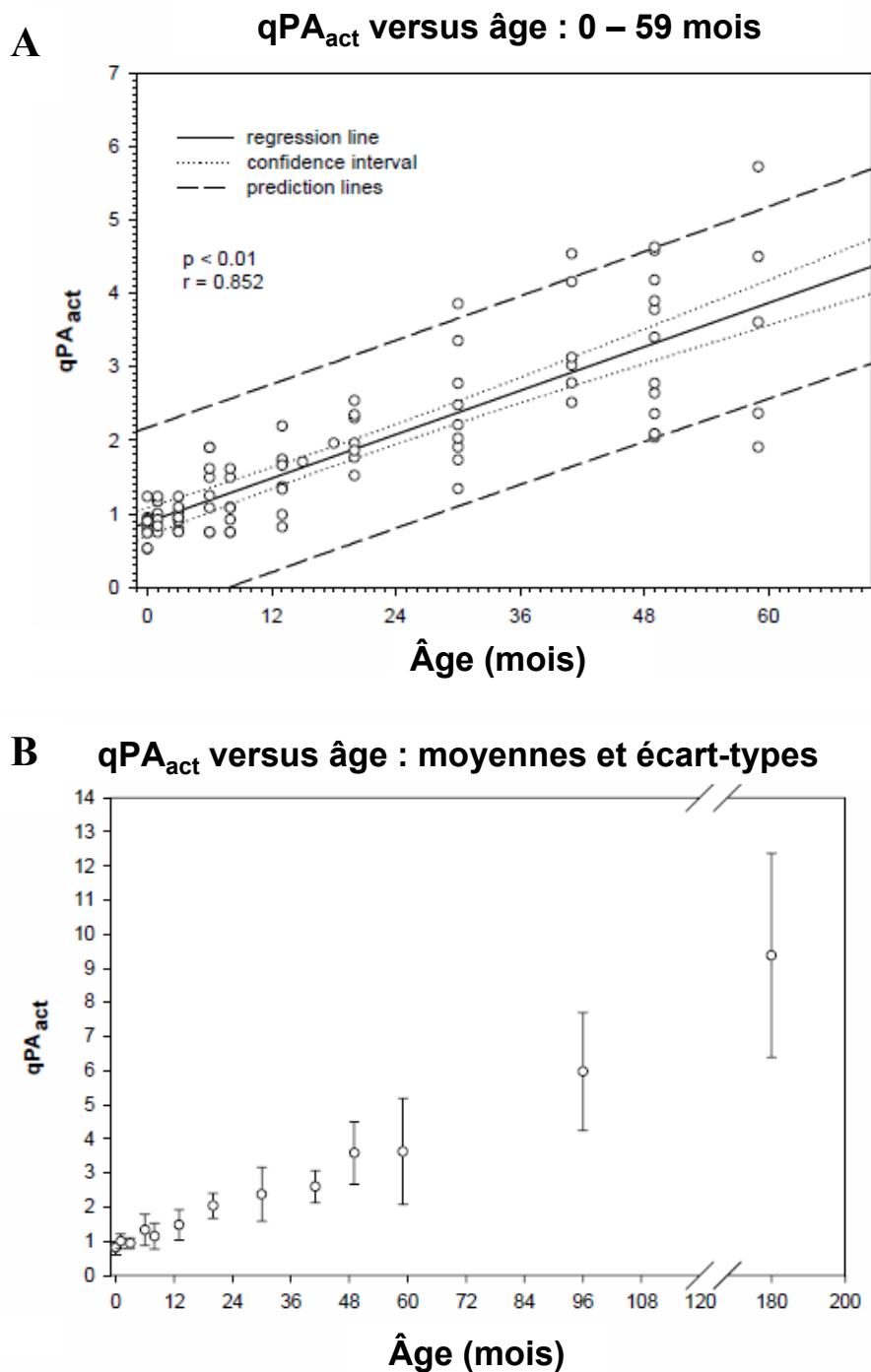
- Analyser la différence de dégradation entre l'ARNr 18S et 3 ARNm dans les fluides les plus fréquemment retrouvés en sciences judiciaires, soit le sang, le sperme et la salive;
- Déterminer s'il existe une corrélation entre la dégradation de différents ARNm et ARNr dans le temps afin de déterminer l'âge des spécimens;
- Documenter la stabilité des ARN dans différentes conditions d'entreposage.





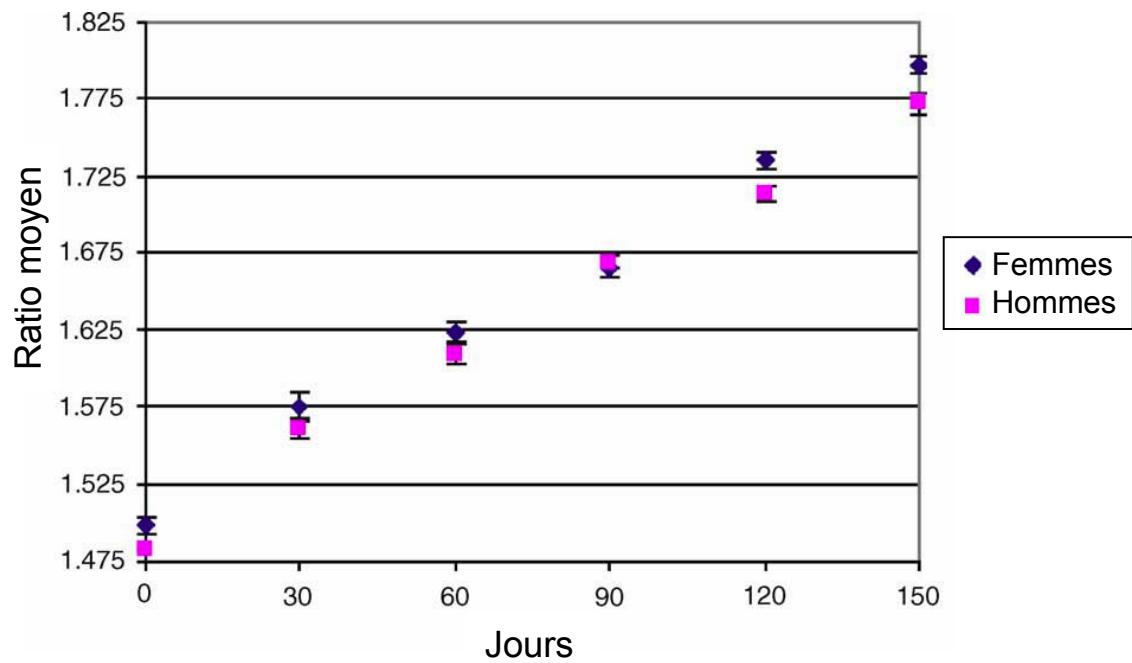
**Figure 1.8 : Représentation schématique des possibilités d'amplification.**

Trois exemples d'ARNm de qualité différente pouvant être présents dans les échantillons : intact (a), partiellement dégradé (b) ou complètement dégradé (c). Les ADNc et les amplicons correspondants sont également illustrés (adapté de [38]).



**Figure 1.9 : Le ratio des deux amplicons de la  $\beta$ -actine est en relation avec l'âge des taches.**

(A) Les résultats obtenus sur une période de 59 mois, avec les intervalles de confiance et les bandes de prédiction de 95%. (B) Les résultats obtenus (moyenne et écart-type) à partir d'échantillons âgés de 0 à 180 mois (adapté de [38]).



**Figure 1.10 : Variation du niveau d'ARN détectable en fonction de l'âge des taches de sang.**

Les données représentent le ratio de l'expression relative de la  $\beta$ -actine et de l'ARNr 18S mesuré par RT-qPCR. Le modèle correspondant aux données est significativement dépendant des jours d'entreposage et possède un  $R^2$  ajusté de 78.2% (adapté de [79]).

**Chapitre 2**  
**ARTICLE**

## **2.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS**

Sous la direction des Drs Vahé Sarafian et Luc DesGroseillers, j'ai (Anne-Marie Simard) rédigé le protocole de recherche, le sommaire exécutif du projet ainsi que le formulaire de consentement nécessaires à l'approbation éthique du projet et obtenu le consentement du Comité d'éthique de la recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal. J'ai établi le projet de recherche, effectué le recrutement des participants pour l'étude et organisé les récoltes d'échantillons. J'ai également optimisé et validé les protocoles pour l'analyse par RT-qPCR en duplex de faibles quantités d'ARN à partir d'échantillons types en biologie judiciaire dans la section de Recherche et Développement du département de Biologie/ADN du Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale de Montréal. Finalement, j'ai effectué les expériences de RT-qPCR, analysé et interprété les données biologiques obtenues.

**Assessment of RNA stability for age determination of body fluid stains\***

Anne-Marie Simard<sup>a,b</sup>, Luc DesGroseillers<sup>a</sup>, Vahé Sarafian<sup>b</sup>

a. Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville,  
Montréal, H3C 3J7, Canada

b. Département de Biologie/ADN, Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine  
légale, 1701, rue Parthenais, 12e étage, Montréal, H2K 3S7, Canada

To whom correspondence should be addressed :

**Vahé Sarafian**

Département de Biologie/ADN

Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale

1701, rue Parthenais, 12e étage

Montréal (Québec)

H2K 3S7

CANADA

Phone : 1 (514) 873-3301 #61542

Fax : 1 (514) 873-4847

*\*Manuscrit en préparation au moment du dépôt du mémoire*

## 2.2 ABSTRACT

The time of deposition of a stain can be of major importance to determine the relevance of a sample in a forensic investigation. We assessed the possibility of using RNA transcript detection by duplex real-time PCR (RT-qPCR) during a six months interval to determine the age of the most common body fluid stains encountered in forensic biology. Targets included are the ribosomal 18S RNA and the human  $\beta$ -actin, GAPDH and cyclophilin A mRNAs. Our results show that the rate of RNA decay is similar for all markers tested in each type of tissue. For blood and semen, RNA degradation profiles of each target are correlated with time of storage ( $R^2 > 0.93$  and  $R^2 > 0.78$ , respectively). Moreover, the degradation rate of each target differs depending on the nature of the stain. Although our attempts to exploit differential decay rates of rRNA and mRNA targets were unsuccessful due to insufficient stability differences between transcripts, we suggest that the degradation profiles of RNAs may be useful to estimate the age of a sample as an exclusionary test. To our knowledge, this is the first study to investigate RNA stability in dried blood, semen and saliva stains concurrently for age determination of body fluid stains in forensic biology. We also assessed the impact of freezing at  $-80^\circ\text{C}$  on sample integrity to determine if stains can be analyzed some time after collection without loss of relevant information.

**Key words** : forensic, RNA, age, blood, semen, saliva

## 2.3 INTRODUCTION

Body fluids such as blood, saliva or semen are frequently found on crime scenes. DNA profiles obtained from such biological stains are used to establish links between the suspect, the victim and the crime scene. However, DNA analysis provides no information as to the age of a stain or to the time of occurrence of a crime. Knowing the time since deposition of a stain at a crime scene could help determine its relevance and the time when the crime occurred.

Several studies report a variety of tools for age determination of bloodstains in forensic science. Methods developed predicated on differences in solubility of the stains [1], colour changes following chemical processes in ageing stains [2-5], morphological differences of blood spots observed in high-resolution imaging [6], analysis of protein degradation [7, 8], haemoglobin absorption spectra [9-11] and other blood constituents [12-14] over time. Most of these methods are sample consuming, cannot resolve time differences of less than months and give an age estimate with an important error range. Furthermore, they are not species specific and cannot be used for more than one tissue. These drawbacks have until now prevented their usage in routine analyses and none of these techniques has yet obtained acceptance across the forensic community.

Few attempts have been made so far to estimate the age of other frequently encountered body fluid stains, such as semen and saliva. Quantification and enzymatic activity of four biochemical markers showed a correlation with the age of semen stains [15]. In contrast, while estimation of trace deposition time with circadian biomarkers was reported for blood stains, it was ineffective in saliva stains due to high variability within the samples [16].

Recent advances in molecular biology have revealed the unsuspected potential of RNA analysis in forensic science. Successful RT-PCR analysis of 15 years-old RNA samples extracted from human blood revealed the hitherto unsuspected long-term stability of RNA [17]. Since then, numerous studies have been conducted to document RNA stability in forensic samples and its eventual use in areas such as RNA profiling for body fluids identification [18-23], molecular determination of the causes [24-27] and



time of death [28, 29] and age determination of wounds [30, 31] and body fluid stains [17, 32].

Techniques such as multiplex real-time PCR allow development of precise and sensitive human-specific assays. Moreover, detection of ubiquitous RNAs such as 18S ribosomal RNA (18S rRNA) [32] and  $\beta$ -actin (ACTB) [32, 33], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [20, 33] and cyclophilin A (PPIA) [17, 29] mRNAs is possible within several fluids. It is thought that each RNA species could have a specific stability and decay rate [34].

As a first attempt to determine the age of biological stains with RNA degradation, detection levels of two sequences of different localisation on the same RNA transcript were compared over time [17]. However, with the suggested endpoint PCR method, significant differences between time points were not observed in storage intervals of less than 4 years. A second study showed that the relative ratio of ACTB mRNA over 18S rRNA, measured by RT-qPCR, changes linearly with increased time of storage, suggesting the possibility of using ratios of different RNA species to determine the age of a bloodstain [32].

Based on this assumption, we conducted a similar study to document the stability of four RNA targets (18S rRNA, ACTB, GAPDH and PPIA) in blood, semen and saliva stains in order to enable the determination of the time since deposition of these body fluids. In addition, since forensic evidence removed from a crime scene is often stored for some time before laboratory analysis, we examined the effect on RNA stability of freezing the samples ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) for extended periods prior to their analysis.

We report here the RNA degradation profiles of each marker obtained from naturally aged stains over a period of 6 months, measured by real-time PCR quantification after reverse transcriptase of RNA (RT-qPCR), and their possible usefulness to estimate the age of a sample.

## 2.4 METHODS

### Sample collection and preparation

Fifteen volunteers (aged between 25 and 60), under informed consent, provided blood, semen and/or saliva samples. Blood was collected from 7 individuals (3 men, 4 women) by venipuncture without anticoagulant. Semen was provided in plastic cups by 5 men. Saliva was collected with a Pasteur pipette from 10 subjects (3 men, 7 women), who were asked not to drink, eat or smoke at least 1h prior to collection. For all fluids, fresh 30  $\mu$ L aliquots were placed onto clean cotton cloth (S233, Serological Research Institute, Richmond, CA, USA) immediately upon collection (or after storage at 4°C for a maximum of 10h for semen samples) and dried overnight under the hood before freezing (-80°C) or storage at room temperature ( $20,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ) in a dark, dust-free environment, without special humidity control for up to 6 months. First RNA extractions from stains were performed immediately upon sample reception (semen, day 0) or after drying overnight (saliva and blood, day 1). For each RNA isolation an entire stain was used. Our protocols were approved by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine of University of Montreal (CERFM 2009-10#374).

### RNA isolation

RNA isolations were performed over a period of approximately 6 months. Three stains were extracted from each individual at the indicated time points for blood and semen samples at room temperature. For samples stored at -80°C, two stains by donor were extracted for those fluids. For saliva, two stains from each individual were extracted at each time point at room temperature and -80°C.

Total RNA was extracted from each sample using the RNeasy Mini Kit (74106, QIAGEN, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions, including some optional steps and with minor modifications. Optional steps included on-column DNase digestion with an RNase-free DNase set (79254, QIAGEN) according to the manufacturer's protocol, optional centrifugation to eliminate any possible carryover of RPE buffer and a second elution using the first eluate to increase final RNA concentration. Minor modifications to the protocol are as follows : stains were cut into small pieces and soaked in 350  $\mu$ L RLT buffer for 1h at 4°C before extraction, as described by Zubakov et al [34], cotton cloth were transferred to a DNA IQ Spin Basket

(v1221, Promega, Madison, WI, USA) and centrifuged for 5 min at 17 000 RCF, columns were left open on the bench for 5 min before elution to ensure optimal ethanol evaporation and finally, RNA was eluted with 30  $\mu$ L of 42°C pre-heated RNase-free water left 2 min on the spin column membrane before centrifugation. A clean cotton cloth was used in each independent extraction as a negative control. RNA samples were immediately reverse transcribed or stored at -80°C for a maximum of one week before processing.

### **Reverse transcription**

cDNA synthesis was performed in a total volume of 23  $\mu$ L, using the High capacity RNA-to-cDNA Master Mix (4390712, Applied Biosystems, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's protocols. For saliva samples, 14  $\mu$ L of total RNA was added to the reaction, while 9  $\mu$ L of total RNA was used for blood and semen samples. A no-enzyme sample was run with every assay to control for genomic DNA contamination. cDNAs were immediately used for real-time PCR quantification (qPCR) or stored at -80°C for a maximum of one week before processing.

### **Relative RNA quantification**

Real-time PCR data were analyzed by the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method [35]. The stability of each target was assessed by comparing relative expressions of specific RNAs of each individual at every time point using  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct time x} - \text{Ct time 0}$ . Relative expressions were obtained for each donor as a mean of 3 individual stains for blood and semen and 2 individual stains for saliva, for each time point.

### **Real-time PCR**

Real-time PCR was performed using three different duplex sets, consisting of TaqMan® human endogenous control assays 18S and PPIA, 18S and GAPDH, and 18S and ACTB (all from Applied Biosystems). Detailed information on the assays used is given in Table 1. To validate our real-time PCR analysis with the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method, the efficiency of each amplification reaction in each duplex was assessed by a dilution series from our own fresh experimental stains of blood and semen samples, to ensure that calculated efficiency was as close as possible from future time course samples. The efficiency (within 90-100%) and linear range ( $R^2 > 0.997$ ) of each real-time assay was established from those calibration curves. Efficiency between duplex amplification

reactions was  $\pm 5\%$  to ensure reliable quantification and comparison of 18S rRNA with mRNA. A set threshold was identified for each component of each duplex [36], and kept constant between all assays, depending on the fluid analyzed. However, saliva samples were not concentrated enough to obtain reliable dilution series for calibration curves. Thus, semen determined ranges and thresholds were used for saliva analysis.

Blood and semen cDNAs were diluted 5 or 10-fold respectively, prior to qPCR. The ABI 7500 Sequence Detection System with SDS software v.2.0 was used for real-time PCR analysis. Total assay volume was 20  $\mu\text{L}$  and contained 10  $\mu\text{L}$  of TaqMan® Gene Expression Master Mix (4369542, Applied Biosystems), 1  $\mu\text{L}$  of primer (150 nM of each primer) and probe (250 nM) mix for 18S (VIC™ dye), 1  $\mu\text{L}$  of primer (900 nM of each primer) and probe (250 nM) mix for mRNA target (FAM™ dye), 2  $\mu\text{L}$  of cDNA and 6  $\mu\text{L}$  of water. Samples were run on default conditions for 45 cycles. Fluorescence levels obtained for each sample were normalized with a passive reference dye (ROX™) to control for pipetting error or evaporation. All cDNA samples were assayed in triplicate. Samples from the same time points were assayed on the same run. A different 96-well plate was used for each duplex. Clean cotton RNA isolation samples and no-enzyme controls were processed through all steps of the analysis. Interplate variation was monitored with three dilutions of the same cDNA positive controls. Negative controls (water) were also included on each plate.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with PRISM software version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistically significance was accepted when  $p < 0.05$ .

## 2.5 RESULTS

In order to assess the stability of RNA markers for body fluid stains age determination purposes, we collected blood, semen and saliva samples from a total of 15 volunteers. Samples were spotted on cotton cloth and stored for increasing periods of time for up to 6 months. At each time point, RNA was purified, reverse transcribed and the remaining amount was measured by quantitative real-time PCR. Four RNA transcripts were selected in this study to determine the best markers for age estimation. As discussed below, amplification of RNA isolated from blood and semen samples was acceptable at each time point. In contrast, amplification of RNA isolated from saliva was often out of range as determined with the calibration curves, probably due to low level of RNA in these samples which were excluded from further analyses. In general, results were highly reproducible, however, because of the low number of stains assessed for each individual at each time point, intra-donor variation could not be determined statistically. Nevertheless, visual graph analysis was performed and low variation was observed (data not shown).

### **Inter-donor variation**

As a first step toward the validation of a technique for age determination, we asked whether the results are reproducible between individuals. Statistical analysis was used as an indication of the variation between donors, however, given the small size of the population in this study, more investigation is required to confirm these observations. Relative expression was obtained from each donor for the four RNA markers in each fluid and inter-donor variability of RNA degradation profiles over 6 months was assessed by one-way ANOVA and linear regression. One-way ANOVAs compared the mean RNA quantity detected over time between individuals. Slopes of the linear regression curves gave indication of inter-donor variability.

### *Blood*

Blood RNA degradation profiles over time were similar between different donors for all markers examined. As seen in Figure 1, RNA detection curves over time for each donor are superposed. Indeed, no significant differences between donors were observed for blood samples for any RNA marker (one-way ANOVA  $p = 0.9$  and linear regression  $p = 0.9$ ). Moreover, slopes of all degradation profiles were significantly non-

zero ( $p < 0.03$ ), suggesting that RNA quantity in blood stains decreases with time of storage for all donors.

### *Semen*

Inter-individual variation of semen samples (Figure 2) was not statistically different for any RNA assessed (one-way ANOVA  $p > 0.5$ ). Linear regression showed that slopes of all degradation profiles from each donor were different from zero ( $p < 0.004$ ) and similar between individuals ( $p > 0.2$ ).

### *Saliva*

Distinct degradation profiles from saliva samples were difficult to obtain. First, because of low RNA detection in those samples, many results were out of the standard curve range determined for qPCR analysis. Moreover, higher variation between qPCR replicates was observed due to high Ct values. Samples for which replicate variation was higher than the one determined acceptable for our assays or out of standard curve range were excluded from further analysis, reducing sample size (particularly for GAPDH and PPIA RNA). Remaining data was subjected to statistical analysis. For each RNA marker, statistically significant inter-donor variability was observed either by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) or by linear regression (slopes from some individuals were not significantly different from zero ( $p > 0.05$ )). Results for saliva samples are shown in supplemental data Figure S1. Due to those high variations, we concluded that analysis of those RNAs is not appropriate for age determination of saliva stains, and this fluid was not further investigated.

Altogether, our results indicate that little variation is observed from one individual to the other for blood and semen stains, suggesting that the data is reproducible and could be representative of a larger sample size.

### **Stability of the different transcripts**

In order to compare the degradation profiles of the four RNA transcripts, we calculated the amounts of each RNA at each time point for each individual and plotted the mean of all donors for a single marker (Figure 3). Interestingly, for a single fluid, the profiles were similar for the four transcripts analyzed. In our experimental conditions, the 18S rRNA showed a degradation profile similar to those of mRNAs. Therefore, it is not

possible to establish a good correlation between relative mRNA/18S rRNA ratios and time of storage. The relative expression ratio between different types of RNA (mRNA to 18S rRNA) was determined by  $2^{-\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct \text{ mRNA} - Ct \text{ 18S rRNA}$ . Our results show that PPIA is the more stable of the markers analyzed. However, attempts to correlate ratio of PPIA to another transcript with time of storage were unsuccessful because of the low variation in relative expression obtained between the targets chosen in this study (data not shown).

Specific RNA degradation profiles over time were observed in blood and semen samples. In both cases, a first phase of rapid degradation of all transcripts is followed by a plateau, where degradation of the remaining RNA is slower (Figure 3). In order to compare if the RNA quantity detected at a specific time point was discernable from others, we performed a repeated measures one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. It showed that the remaining RNA from all donors can only be divided in groups of time points. For blood samples, stains aged more than 14 days could be discriminated from younger stains ( $p < 0.05$ ). For semen samples, stains aged between 0 and 29 days could be discriminated from stains older than 56 days ( $p < 0.05$ ).

### **Effect of temperature on degradation profiles**

Considering that it would be unrealistic to expect immediate analysis of actual crime scene samples, it would be useful to ascertain whether freezing samples at  $-80^{\circ}\text{C}$  for various lengths of time affects their analyzable RNA content. To determine if RNA degradation is prevented and therefore if stains can be preserved for future analyses, a small set of blood and semen stains were frozen for different time periods. RNA degradation profiles of all markers in these samples were compared to those obtained from stains stored at room temperature (Figure 4). While blood and semen stains kept at room temperature gave their typical RNA degradation profiles, the quantity of RNA detected over time was higher in frozen samples. Indeed, after 6 months of storage, 64-91% of starting RNA was still detected for blood and 61-85% for semen depending on the markers tested. Thus, this suggest that overall, freezing samples prevents RNA degradation over time.

**Relative expression over time**

To evaluate if the degradation profiles obtained for blood and semen in Figure 3 were predictable, we determined the best-fit line to describe the RNA decay in our samples. The correlation between duration of storage and RNA quantity in biological stains was observed using a two-phase exponential decay function for blood and a one-phase exponential decay function for semen samples. Even if more than one degradation phase can be observed in semen degradation profiles (Figure 3), we couldn't fit a well defined two-phase exponential decay on our actual data. However, as seen in Figures 5 and 6 and Tables 2 and 3, individual target RNA degradation profiles correlate with time of storage for blood ( $R^2 > 0.93$  for all data sets) and semen ( $R^2 > 0.78$  for all data sets). As we expected that all the RNA will be degraded and will no longer be detectable at one point, we set the Plateau = 0 while determining the best-fit line for the degradation profiles.



## 2.6 DISCUSSION

In this study, we attempted to determine the time since deposition of biological stains (blood, semen and saliva) on cotton cloth by monitoring the degradation patterns of selected RNA markers. By coupling a slow degrading rRNA transcript with faster decaying mRNA species, we expected to observe mRNA/rRNA ratios which decreased with time in a predictable pattern. The utilization of a ratio of markers eliminated the need to measure the quantity of starting material which is very variable and difficult to determine in forensic samples.

Based on previous studies [32, 37], our initial assumption was that 18S rRNA is more stable than mRNAs. Our results showed, however, that all tested RNAs, including the 18S rRNA, had a similar decay rate within each type of tissue. These observations preclude the use of ratios of different RNA species to determine the age of a blood or semen stain in our experimental conditions. This is in contrast to previous studies that showed a change in  $\beta$ -actin to 18S rRNA ratio over time in blood stains [32, 37] and hair follicles [38]. Although there are some minor differences in our storage conditions and those reported in these studies, it is difficult to explain exactly why we did not observe similar results. Anderson et al. [32] described the ratio of the Ct values of  $\beta$ -actin to 18S rRNA measured with RT-qPCR without assessing more precisely the extent of degradation of each RNA. Moreover, because of the logarithmic scale of the Ct values measurements, a conversion to linear data through  $2^{-\Delta Ct}$  must be performed before any statistical analysis, which was not the case and precludes a precise comparison with our data. In the other study conducted by the same group [37], the  $2^{-\Delta Ct}$  calculation was performed prior to analysing the data. However, the few information available for comparison is the mean  $2^{-\Delta Ct}$  of  $\beta$ -actin versus 18S rRNA measured only 5 times over a period of 120 days. Once again, no data is shown to document the degradation kinetics of each marker, and no further explanation is provided to compare the extent of degradation of each RNA nor the variation over time of the ratio between their two independent experiments. Finally, Hampson and al. [38] described the detection level of each species along with the relative expression ratio of both RNA and this allowed them to observe that 18S rRNA is not constantly stable and began to degrade in hair follicles after 45 days. However, precise comparison of data between two tissue types is difficult because RNA degradation rates might differ.

Despite the fact that our initial hypothesis was not confirmed, useful information can still be obtained from RNA decay rates, even though measurements at single time points do not help predict time of deposition. Indeed, detectable quantity of individual RNA markers correlates with time of storage for blood ( $R^2 > 0.93$  for all data sets) and semen ( $R^2 > 0.78$  for all data sets). By making 2 or 3 measurements of the remaining RNA on a given stain at appropriate time intervals after sample collection from a crime scene, it could be possible to determine a range of days during which the stain could have been deposited, without prior knowledge of the initial concentration of the stain. For example, if the second measurement is significantly lower than the first one, a blood stain is probably less than 14 days old. However, if the second measurement is close to the first one, then the stain was probably older than 14 days. Although the RNA decay rate in semen is not as steep as the one observed in blood, our data suggest that a semen stain older than 56 days could be discriminated from a younger stain, even though more data are necessary to improve the fit to a two-phase decay curve.

One important criterion for using a technique to estimate the age of a sample is the reproducibility of the data. Interestingly, our results indicate not only that the decay of RNAs in different stains was similar for a single donor, but it is also similar among different individuals for blood and semen samples. Therefore, the decay rate observed in our small sample population might be extrapolated to a larger population. When performing RNA stability analyses for estimating the age of a blood stain, Anderson et al. [37] showed that, depending on the amplicon pair analyzed, interpersonal variations accounted for 1.36-4.25% of the total variance between their population samples. Even if we cannot calculate it precisely with our low sample size, the differences between donors do not seem to significantly influence the age effect on blood stains. The small variations observed for semen data sets might be due to sampling errors caused by the lack of sample homogeneity related to the viscosity of the fluid. As semen is not an homogeneous mixture and components produced by several glands are not mixed before ejaculation [39], many stains aliquoted from the same ejaculate might have different component concentrations, affecting the intra- and inter-donor variability. This highlights the importance of finding an efficient normalization method to correct for variations in initial quantities of samples, for example by measuring a single RNA over a fixed interval of time or a ratio of two markers.

Low RNA detection coupled with high variation was observed in saliva samples. Housekeeping gene RNAs have been found to be less abundant than specific salivary mRNA transcripts in saliva stains [20, 27], probably because of the low metabolism of desquamated epithelial cells found in this fluid [40]. For this study, we chose to assess RNA markers found in the 3 body fluids analyzed. However, the measurement of specific transcripts like STATH and HTN3, secreted by the salivary glands [41], might help obtain more consistent results for saliva. The inter-individual variation of saliva samples and the lack of firm correlation of RNA degradation over time might be explained by the highly variable composition of this fluid. A lot of factors can influence salivary flow, stimulation and composition, causing great inter-individual and cell type secretion variability [42]. Moreover, RNA degradation in saliva appears to be random and mostly performed by endonucleases, which are present in different quantities between individuals and dependent on the presence of the microorganisms producing them [40, 43]. The results obtained in the scope of this study do not allow age determination of saliva stains by RNA analysis.

The decay of all RNA analyzed was similar between targets, but differed between blood and semen samples. Indeed, the RNA degradation of the analyzed markers was faster in blood samples than in semen. This might be due to the different composition of the fluids (reviewed in [44]). As the composition of semen is known to create stable conditions for the survival of spermatozoa in the acidic vaginal environment [39], it might also provide an environment where RNA is more stable even in dried stains.

To our knowledge, this is the first study to address the possibility to freeze stains prior to RNA analysis. Overall, RNA degradation was prevented over time with storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , suggesting the possibility of freezing samples prior to their analysis. However, the effect of the freezing/thawing cycle on the results needs further investigation. For instance, the RNA degradation profiles seem less affected by time following storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , however, this provides no information as to the extent or rate of degradation after thawing.

On the whole, our results suggest the possibility of using RNA degradation for age estimation of blood and semen stains as an exclusionary test, as also observed by Anderson et al. [37]. Excluding a sample from the investigation because the estimated

time of deposition of the stain does not match with the actual time of the crime would allow investigators to concentrate on evidence related to the crime scene. On the other hand, if the stain was known to be associated to the crime, its analysis could help determine an interval during which the offense was committed.

Identification of more stable RNA targets could improve the predictive power of the analysis by allowing determination of a ratio of distinct stability markers. For example, the utilization of microRNAs, which have been suggested for identification of degraded body fluid samples [45, 46], might be assessed as targets less prone to degradation over time [47]. Utilization of different-sized amplicons of the same RNA is also promising, because it reduces the error from intra- and inter-donor RNA expression variability [37].

In conclusion, we showed that RNA analysis by RT-qPCR is a promising avenue to estimate the age of blood and semen samples. Of course, this is a proof-of-concept study and samples analyzed do not represent real crime scene situations. Indeed, the effects of various storage conditions (temperature, humidity, light, etc.) on RNA degradation profiles still need to be documented exhaustively. Future studies need to examine the applicability of RNA assays and the mechanisms of individual RNA degradation in dried stains must be investigated in order to suggest a consistent RNA-based age determination method. A combination of many parameters, such as multiple RNA assays and other techniques could allow a more precise estimation of time since deposition of a stain in a crime scene.

## **2.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all volunteers for providing body fluid samples and Catherine Maltais for blood collection. This work was supported by the Laboratoire de sciences judiciaires et de médecine légale of Montréal and by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to LDG. Research support was also supplied as scholarships from NSERC and Le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) to A-MS.

## 2.8 REFERENCES

1. Schwarzacher, Determination of the age of bloodstains, *American Journal of Police Sciences* 1. (1930).
2. R.H. Bremmer, A. Nadort, T.G. van Leeuwen, M.J.C. van Gemert, M.C.G. Aalders, Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy, *Forensic Science International*. 206 (2011) 166-71.
3. S. Smith, K. Simpson, *Taylor's principles and practice of medical jurisprudence*, eleventh ed. J. and A. Churchill LTD, London, 1956.
4. J. Gainster, E. Rentoul, *Medical jurisprudence and toxicology*, twelfth ed. E. and S. Livingstone LTD, Edinburgh, 1966.
5. A. Fiori, *Detection and Identification of Bloodstains: Methods of Forensic Science*. Interscience, New York, London, 1962.
6. S. Strasser, A. Zink, G. Kada, P. Hinterdorfer, O. Peschel, W.M. Heckl, et al., Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy, *Forensic Sci Int.* 170 (2007) 8-14.
7. J. Andrasko, The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis, *J Forensic Sci.* 42 (1997) 601-7.
8. K. Rajamannar, Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis, *J Forensic Sci.* 22 (1977) 159-64.
9. S.S. Kind, D. Patterson, G.W. Owen, Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method, *Forensic Sci.* 1 (1972) 27-54.
10. S.S. Kind, M. Watson, The estimation of blood stain age from the spectrophotometric properties of ammoniacal blood stain extracts, *Forensic Sci.* 2 (1973) 325-32.
11. E.K. Hanson, J. Ballantyne, A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains, *PLoS One.* 5 (2010) e12830, doi:10.1371/journal.pone.0012830.

12. H. Sakurai, K. Tsuchiya, Y. Fujita, K. Okada, Dating of human blood by electron spin resonance spectroscopy, *Naturwissenschaften*. 76 (1989) 24-5.
13. Y. Fujita, K. Tsuchiya, S. Abe, Y. Takiguchi, S. Kubo, H. Sakurai, Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors, *Forensic Sci Int*. 152 (2005) 39-43.
14. T. Miki, A. Kai, M. Ikeya, Electron spin resonance of bloodstains and its application to the estimation of time after bleeding, *Forensic Sci Int*. 35 (1987) 149-58.
15. A. Jimenez-Verdejo, E. Osuna, E. Garcia-Olivares, A. Luna, Study of the enzymatic activity of GGT, LDH, PAP and PSA in semen stains: application to age calculation, *Forensic Sci Int*. 68 (1994) 7-15.
16. K. Ackermann, K.N. Ballantyne, M. Kayser, Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction, *Int J Legal Med*. 124 (2010) 387-95.
17. M. Bauer, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains?, *Forensic Sci Int*. 138 (2003) 94-103.
18. J. Juusola, J. Ballantyne, Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, *Forensic Sci Int*. 152 (2005) 1-12.
19. C. Nussbaumer, E. Gharehbaghi-Schnell, I. Korschineck, Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Sci Int*. 157 (2006) 181-6.
20. C. Haas, B. Klessner, C. Maake, W. Bar, A. Kratzer, mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Sci Int Genet*. 3 (2009) 80-8.
21. J. Juusola, J. Ballantyne, mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *J Forensic Sci*. 52 (2007) 1252-62.

22. K. Sakurada, H. Ikegaya, H. Fukushima, T. Akutsu, K. Watanabe, M. Yoshino, Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen, *Leg Med (Tokyo)*. 11 (2009) 125-8.
23. M. Visser, D. Zubakov, K.N. Ballantyne, M. Kayser, mRNA-based skin identification for forensic applications, *Int J Legal Med*. 125 (2011) 253-63.
24. M. Heinrich, K. Matt, S. Lutz-Bonengel, U. Schmidt, Successful RNA extraction from various human postmortem tissues, *Int J Legal Med*. 121 (2007) 136-42.
25. S. Partemi, P.M. Berne, M. Batlle, A. Berruezo, L. Mont, H. Riuró, et al., Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology, *Forensic Science International*. 203 (2010) 99-105.
26. H. Maeda, B.-I. Zhu, T. Ishikawa, T. Michiue, Forensic molecular pathology of violent deaths, *Forensic Science International*. 203 (2010) 83-92.
27. R.I. Fleming, S. Harbison, The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids, *Forensic Sci Int Genet*. 4 (2010) 244-56.
28. M. Bauer, I. Gramlich, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval--a pilot study, *Leg Med (Tokyo)*. 5 (2003) 220-7.
29. M. Heinrich, S. Lutz-Bonengel, K. Matt, U. Schmidt, Real-time PCR detection of five different "endogenous control gene" transcripts in forensic autopsy material, *Forensic Sci Int Genet*. 1 (2007) 163-9.
30. Y. Sato, T. Ohshima, The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II), *Int J Legal Med*. 113 (2000) 140-5.
31. M. Takamiya, K. Saigusa, R. Kumagai, N. Nakayashiki, Y. Aoki, Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation, *Int J Legal Med*. 119 (2005) 16-21.



32. S. Anderson, B. Howard, G.R. Hobbs, C.P. Bishop, A method for determining the age of a bloodstain, *Forensic Sci Int.* 148 (2005) 37-45.
33. J. Juusola, J. Ballantyne, Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification, *Forensic Sci Int.* 135 (2003) 85-96.
34. D. Zubakov, E. Hanekamp, M. Kokshoorn, W. van Ijcken, M. Kayser, Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples, *Int J Legal Med.* 122 (2008) 135-42.
35. K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method, *Methods.* 25 (2001) 402-8.
36. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System, Relative Standard Curve and Comparative Ct Experiments, PN 4387783 Rev. B. Applied Biosystems, 2007.
37. S.E. Anderson, G.R. Hobbs, C.P. Bishop, Multivariate analysis for estimating the age of a bloodstain, *J Forensic Sci.* 56 (2011) 186-93.
38. C. Hampson, J. Louhelainen, S. McColl, An RNA expression method for aging forensic hair samples, *J Forensic Sci.* 56 (2011) 359-65.
39. D.H. Owen, D.F. Katz, A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant, *J Androl.* 26 (2005) 459-69.
40. N.J. Park, Y. Li, T. Yu, B.M. Brinkman, D.T. Wong, Characterization of RNA in saliva, *Clinical Chemistry.* 52 (2006) 988-94.
41. L.C. Schenkels, E.C. Veerman, A.V. Nieuw Amerongen, Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids, *Crit Rev Oral Biol Med.* 6 (1995) 161-75.
42. S.P. Humphrey, R.T. Williamson, A review of saliva: normal composition, flow, and function, *J Prosthet Dent.* 85 (2001) 162-9.

43. N.J. Park, X. Zhou, T. Yu, B.M. Brinkman, B.G. Zimmermann, V. Palanisamy, et al., Characterization of salivary RNA by cDNA library analysis, *Archives of Oral Biology*. 52 (2007) 30-5.
44. K. Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci Int*. 188 (2009) 1-17.
45. E.K. Hanson, H. Lubenow, J. Ballantyne, Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Anal Biochem*. 387 (2009) 303-14.
46. D. Zubakov, A.W. Boersma, Y. Choi, P.F. van Kuijk, E.A. Wiemer, M. Kayser, MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation, *Int J Legal Med*. 124 (2010) 217-26.
47. W.C. Li, K.J. Ma, P. Zhang, H.J. Wang, Y.W. Shen, Y.Q. Zhou, et al., [Estimation of postmortem interval using microRNA and 18S rRNA degradation in rat cardiac muscle], *Fa Yi Xue Za Zhi*. 26 (2010) 413-7.

## 2.9 TABLES

**Table 1. Commercial assays used for real-time PCR detection of RNA markers.**

Symbol	Name	RNA type	Amplicon length	Assay ID (ABI)
18S	Eukaryotic 18S rRNA	rRNA	187	Hs99999901_s1
ACTB	Beta actin	mRNA	171	Hs99999903_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	mRNA	122	Hs99999905_m1
PPIA	Peptidylpropyl isomerase A (cyclophilin A)	mRNA	98	Hs99999904_m1

Primer and probe combination sequences from Applied Biosystems pre-developed assays are not available.

**Table 2. Detection of RNA markers is correlated with time of storage in blood stains.**

Blood	Two-phase exponential decay		
	Plateau	R <sup>2</sup>	Y = Plateau + SpanFast*e <sup>(-Kfast*X)</sup> + SpanSlow*e <sup>(-Kslow*X)</sup>
<b>18S rRNA</b>	0,0	0.9837	Y = 0.85e <sup>(-0.17x)</sup> + 0.29e <sup>(-0.008x)</sup>
<b>ACTB</b>		0.9797	Y = 0.98e <sup>(-0.21x)</sup> + 0.24e <sup>(-0.01x)</sup>
<b>GAPDH</b>		0.9672	Y = 0.85e <sup>(-0.17x)</sup> + 0.32e <sup>(-0.008x)</sup>
<b>PPIA</b>		0.9388	Y = 0.80e <sup>(-0.11x)</sup> + 0.38e <sup>(-0.005x)</sup>

SpanFast = (Y0-Plateau)\*PercentFast\*0.01 = 0.8477

SplanSlow = (Y0-Plateau)\*(100-PercentFast)\*0.01 = 0.2873

**Table 3. Detection of RNA markers is correlated with time of storage in semen stains.**

Semen	One-phase exponential decay		
	Plateau	R <sup>2</sup>	Y = (Y0-Plateau)*e <sup>(-K*X)</sup> + Plateau
<b>18S rRNA</b>	0,0	0.8172	Y = 0.93e <sup>(-0.02x)</sup>
<b>ACTB</b>		0.8163	Y = 0.96e <sup>(-0.02x)</sup>
<b>GAPDH</b>		0.8670	Y = 0.94e <sup>(-0.01x)</sup>
<b>PPIA</b>		0.7845	Y = 0.97e <sup>(-0.01x)</sup>

## 2.10 LEGENDS TO FIGURES

### **Figure 1. Variation of RNA detection in blood stains over time between donors.**

Relative quantity of 18S rRNA (A), ACTB (B), GAPDH (C) and PPIA (D) remaining was obtained from sets of dried blood stains from 7 donors (D1 to D7) and stored at room temperature. Each value is the average of triplicate samples.

### **Figure 2. Variation of RNA detection in semen stains over time between donors.**

Relative quantity of 18S rRNA (A), ACTB (B), GAPDH (C) and PPIA (D) remaining was obtained from sets of dried semen stains from 5 donors (D1 to D5) and stored at room temperature. Each value is the average of triplicate samples.

### **Figure 3. RNA degradation profiles of all transcripts.**

The solid lines represent the degradation profiles of each transcript over time in blood (A) and semen (B) samples stored at room temperature for increasing time periods. Each value is the mean ( $\pm$  SD) of RNA values from several donors for blood (n=7) and semen (n=5) samples.

### **Figure 4. Freezing samples prevents RNA degradation over time.**

Relative quantity of RNA obtained from different sets of dried blood and semen samples stored either at room temperature (20°C) or at -80°C for increasing time periods. The solid lines represent the mean ( $\pm$  SD) of RNA values from 3 individuals (average of duplicate samples). Dashed lines are data taken from Figure 3.

### **Figure 5. Effect of time of storage on RNA detection for all markers in blood stains.**

The correlation between duration of storage and 18S rRNA (A), ACTB (B), GAPDH (C) and PPIA (D) quantity detected in blood stains stored at room temperature was observed using a two-phase exponential decay function (thick solid). Plots represent the respective mean ( $\pm$  SD) value from all donors (n=7), 95% prediction bands

(dashed) and 95% confidence bands (thin solid). Function equations and parameters are detailed in Table 2.

**Figure 6. Effect of time of storage on RNA detection for all markers in semen stains.**

The correlation between duration of storage and 18S rRNA (A), ACTB (B), GAPDH (C) and PPIA (D) quantity detected in semen stains stored at room temperature was observed using a one-phase exponential decay function (thick solid). Plots represent the respective mean ( $\pm$  SD) value from all donors (n=5), 95% prediction bands (dashed) and 95% confidence bands (thin solid). Function equations and parameters are detailed in Table 3.

**Figure S1. Variation of RNA detection in saliva stains over time between donors.**

Relative quantity of 18S rRNA (A), ACTB (B), GAPDH (C) and PPIA (D) remaining was obtained from sets of dried saliva stains from 10 donors (D1 to D10) and stored at room temperature. Each value is the average of duplicate samples. Statistically significant differences between subjects were observed either by one-way ANOVA ( $p > 0.05$ ) or by linear regression (slopes from some individuals were not different from zero ( $p > 0.05$ )).

Figure 1

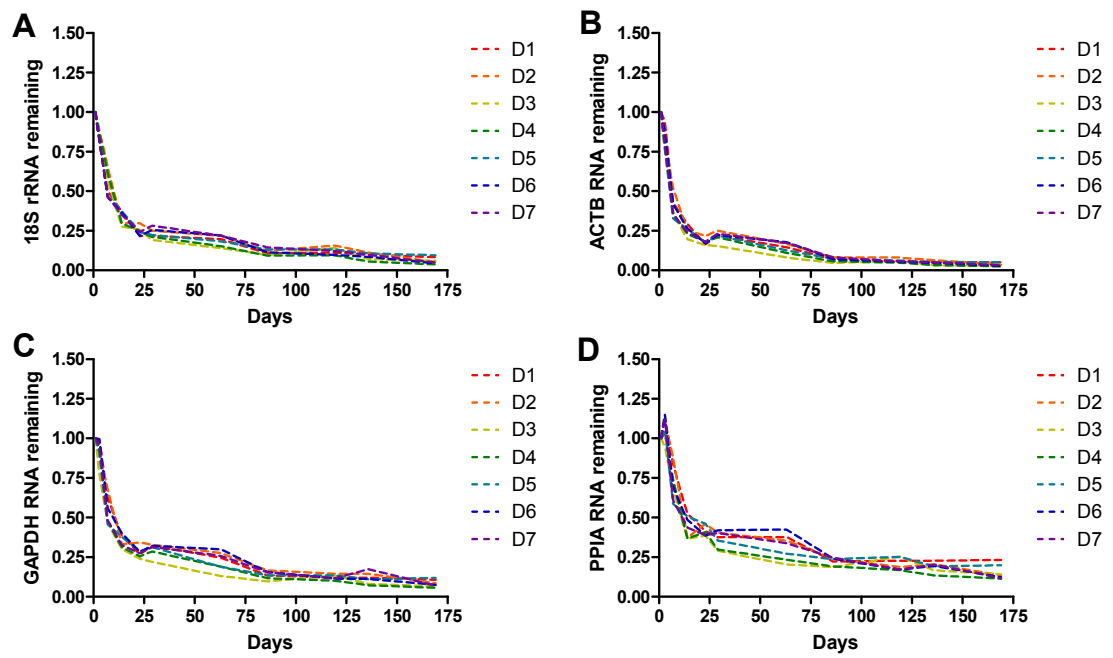


Figure 2

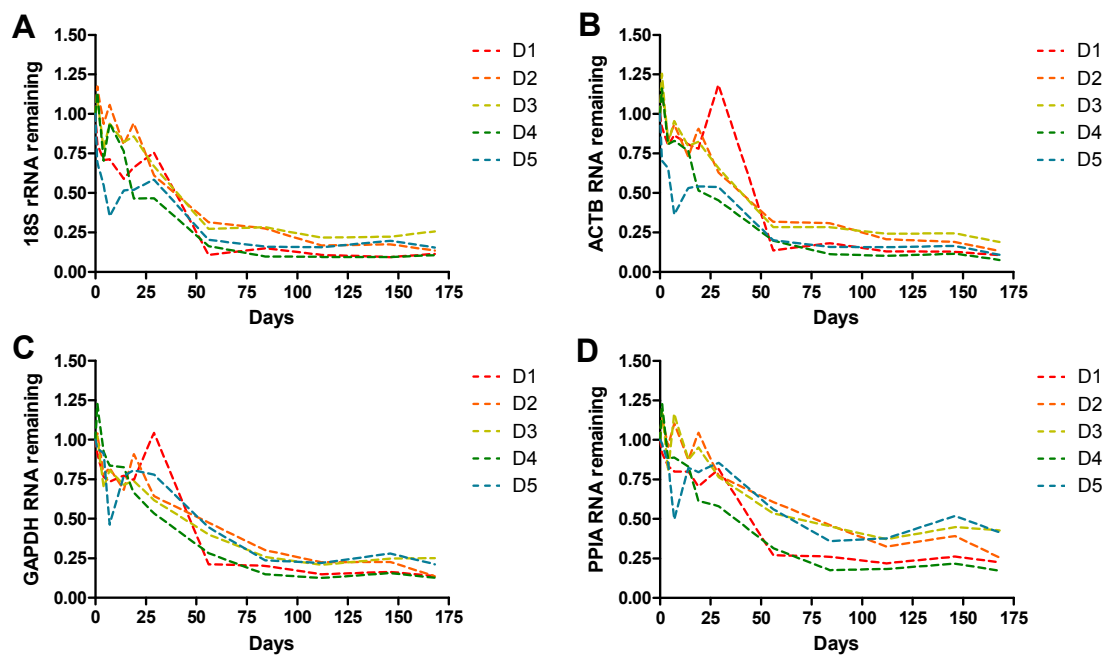


Figure 3

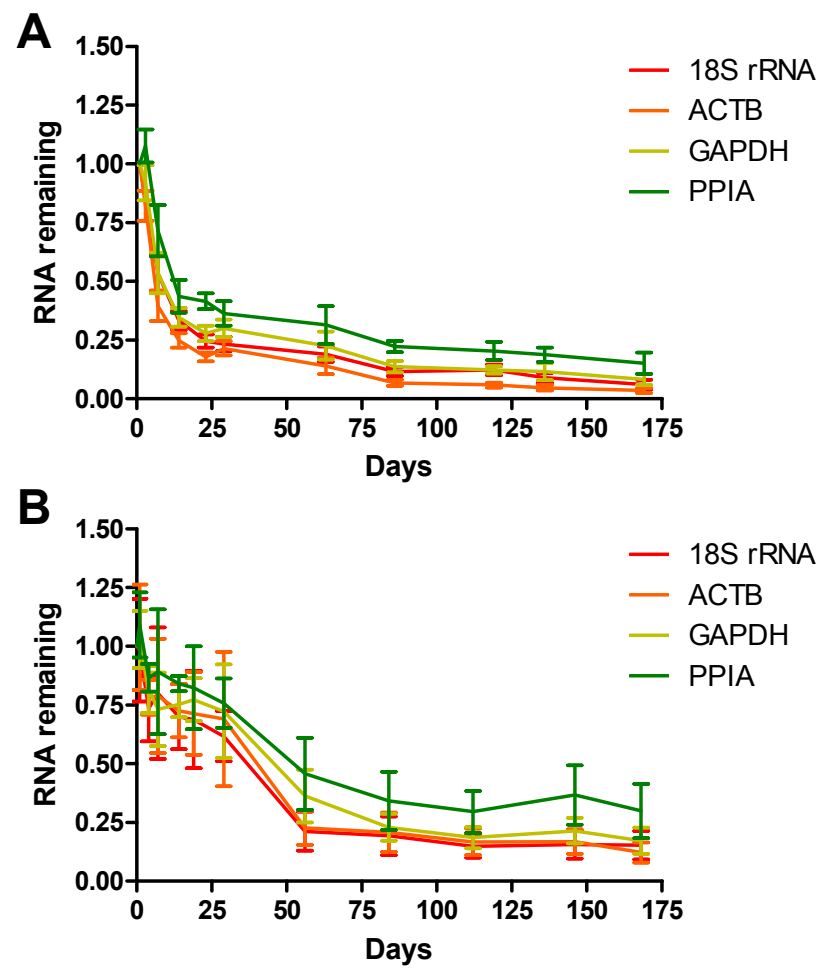




Figure 4

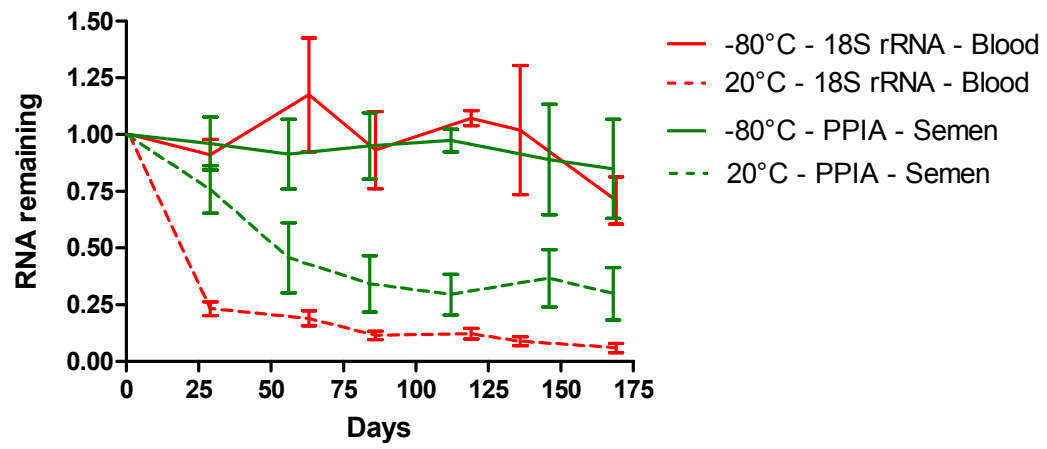


Figure 5

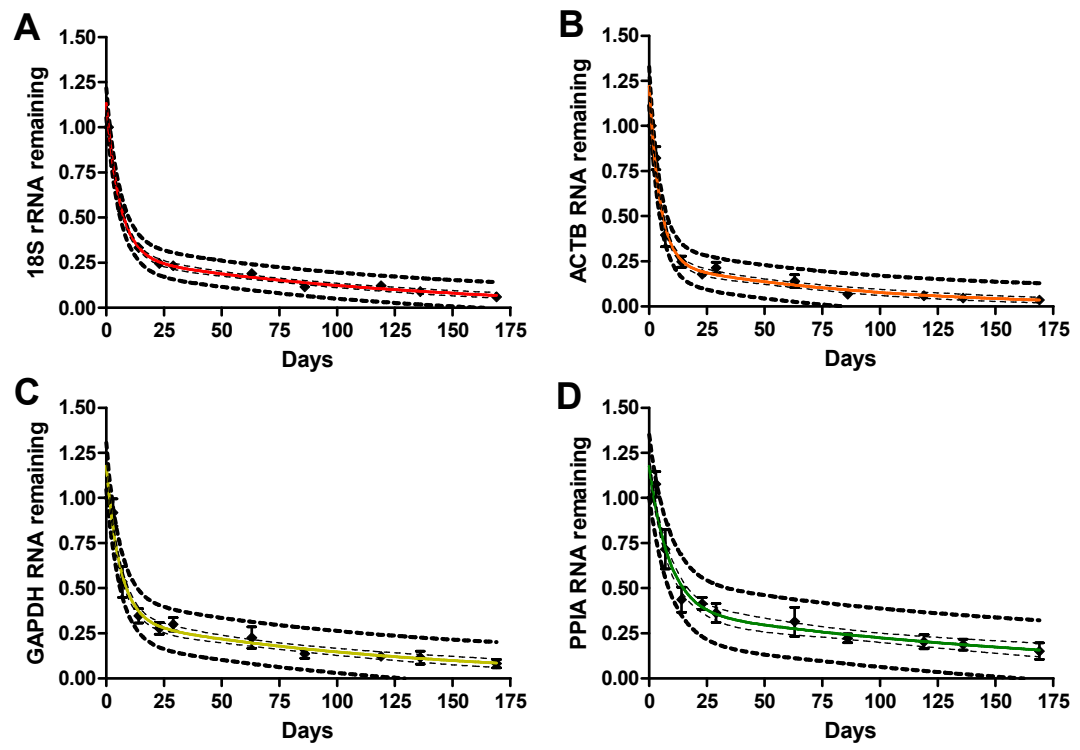


Figure 6

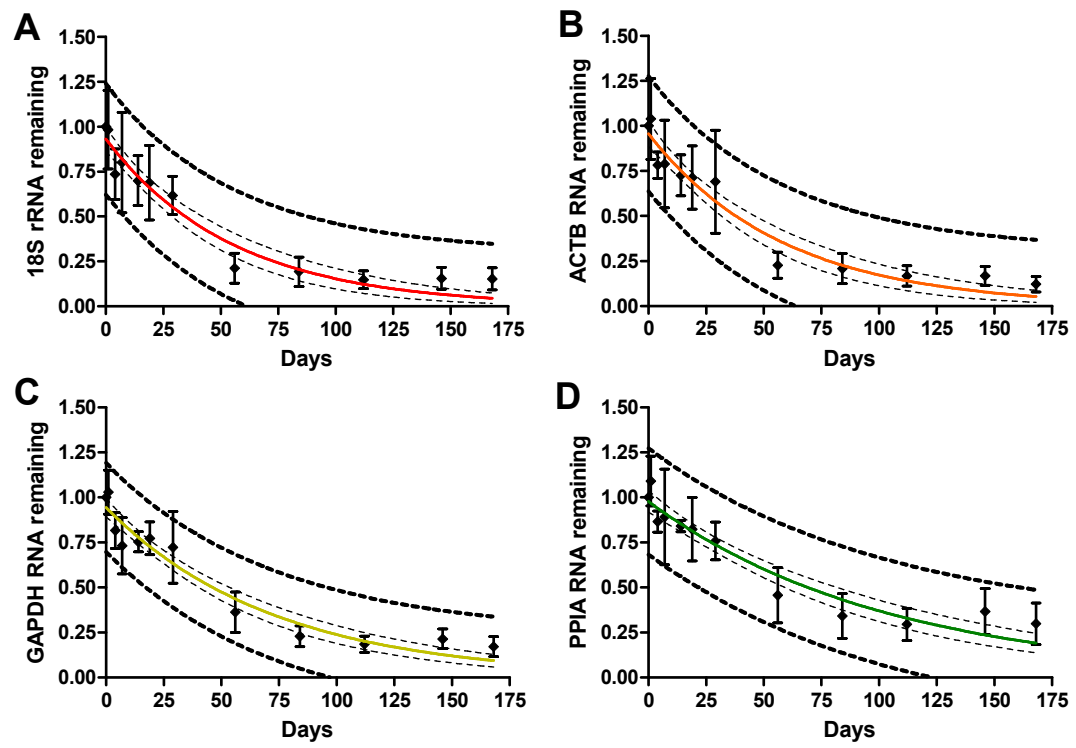
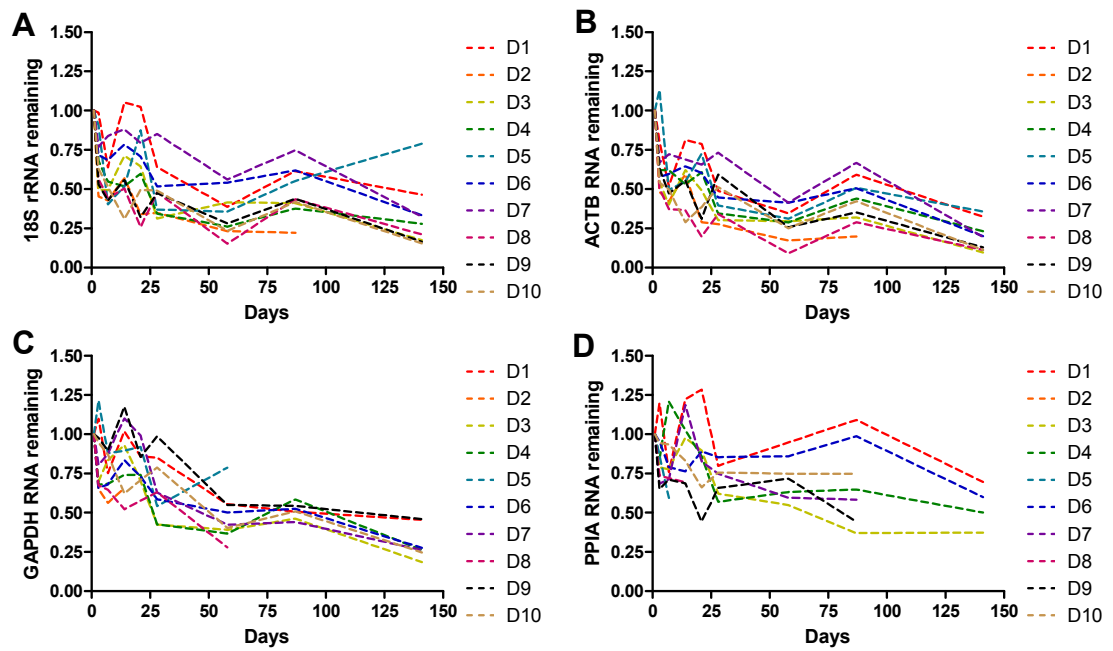


Figure S1



**Chapitre 3**  
**MÉTHODOLOGIE**

### 3.1 RÉCOLTE ET ÉCHANTILLONNAGE DES DIFFÉRENTS FLUIDES

Chaque donneur a signé un formulaire de consentement avant leur participation à l'étude. Les détails du nombre et des caractéristiques des participants ayant donné des échantillons pour chaque fluide sont résumés dans le Tableau IV.

Pour la récolte de salive, les participants furent priés de ne pas manger, boire ou fumer pendant au moins 1h avant la récolte de l'échantillon. La salive a été récoltée à l'aide d'une pipette et déposée dans un tube placé sur la glace. La salive a été aliquotée immédiatement sur des carrés de tissu en coton propre et séchée pendant 24h sous une hotte avant d'être entreposée à la température pièce ou congelée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Puisque la récolte de salive a eu lieu la même journée pour tous les participants, la première extraction d'ARN fut effectuée après 24h de séchage, soit au jour 1, afin de faciliter la manipulation des échantillons.

Le sang fut récolté par ponction veineuse dans des tubes sans anticoagulant. Le sang a été aliquoté immédiatement sur des carrés de tissu en coton propre et séché pendant 24h sous une hotte avant d'être entreposé à la température pièce ou congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Puisque les ponctions veineuses ont eu lieu la même journée pour tous les participants, la première extraction d'ARN fut effectuée après 24h de séchage, soit au jour 1, afin de faciliter la manipulation des échantillons.

Le sperme fut récolté dans des contenants stériles et conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant un maximum de 10h avant d'être aliquoté sur des carrés de tissu en coton propre. Les échantillons furent séchés pendant 24h sous une hotte avant d'être entreposés à la température pièce ou congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Puisque les échantillons furent récoltés par les participants à leur domicile et traités dès leur réception au laboratoire tôt le même jour, la première extraction d'ARN fut effectuée immédiatement après l'aliquotage des échantillons, soit au jour 0.

Certains donneurs de sperme étaient vasectomisés, mais les résultats obtenus n'indiquent pas de différence notable avec les profils de dégradation des donneurs non vasectomisés. En effet, les spermatozoïdes ne constituent qu'environ 1-5% du volume total du sperme éjaculé [80], et ne contiennent que très peu d'ARN [81]. Aucune

distinction n'a donc été faite entre les donneurs vasectomisés ou non dans l'analyse des résultats.

Le nombre de taches analysées à chaque date et pour chaque fluide est détaillé en annexe dans le Tableau V.

### **3.2 QUALITÉ ET QUANTITÉ DE L'ARN EXTRAIT**

Afin de documenter la quantité et la qualité de l'ARN extrait de taches de fluide frais, quelques échantillons furent analysés sur un Agilent 2100 BioAnalyzer à (Agilent, Santa Clara, CA). Cet appareil permet la séparation des acides nucléiques dans un procédé automatisé, réduisant l'erreur introduite par la manipulation des échantillons. Il s'agit d'une méthode de dosage sensible et nécessitant un faible volume d'échantillon (1  $\mu$ L). De plus, la présence de contaminants résiduels suite à l'extraction, tels que de l'ADN génomique et du phénol, affecte peu les résultats, contrairement aux autres méthodes de dosage usuelles. C'est également la seule méthode actuelle de dosage de l'ARN qui est combinée à l'estimation de l'intégrité des ARNm et de l'ARN total dans l'échantillon [82]. L'extraction de l'ARN de plusieurs taches provenant du même individu fut effectuée immédiatement après la préparation des taches, puis les échantillons furent analysés sur picopuces en moins de 24h. Le tableau IV représente les résultats du dosage et indique l'intégrité moyenne des échantillons pour chaque fluide. La quantité d'ARN extrait de chaque fluide fut comparée aux quantités décrites par d'autres études (voir Tableau VI). Nos résultats sont comparables aux quantités recueillies à l'aide de méthodes d'extraction semblables. Toutefois, une grande variation, due au manque de normalisation des protocoles, est observée entre les différents laboratoires. Malgré la faible quantité d'ARN recueilli dans nos échantillons, l'utilisation de la RT-qPCR permet de détecter leur présence dans tous les échantillons testés, soulignant la grande sensibilité de cette technique.

La qualité de l'ARN recueilli fut estimée avec le RIN. Cette mesure correspond, sur une échelle de 1 à 10, à l'intégrité de l'ARN eucaryote total (10 assigné aux ARN intacts, 1 assigné aux ARN très dégradés) [83]. En général, un RIN supérieur à 7,0 est considéré comme étant de très bonne intégrité et peut être utilisé pour des analyses subséquentes, comme le RT-qPCR [84]. Les échantillons d'ARN extraits avec notre

protocole à partir de taches fraîchement préparées sont d'excellente intégrité (RIN moyen > 8,0). Puisque le nombre de taches analysées est important, le dosage et l'intégrité des ARN extraits n'ont pas été évalués pour tous les échantillons. Étant donné que la dégradation de toutes les espèces d'ARN est attendue dans nos échantillons, il est à considérer que l'intégrité des ARN analysés après une longue période d'entreposage soit inférieure à celle observée pour les taches fraîches. Il a été recommandé d'utiliser des ARN ayant un RIN supérieur à 5,0 pour obtenir une quantification par RT-qPCR fiable [84]. Cette même étude a également démontré que la baisse d'intégrité de l'ARN avait un impact important sur la valeur du  $C_t$  obtenu, mais que l'efficacité de la réaction de la RT-qPCR était minimalement affectée. L'élévation des valeurs de  $C_t$  observées pour nos échantillons en fonction du temps devrait donc être reliée à la dégradation de nos échantillons plutôt qu'à une perte d'efficacité de nos réactions. D'ailleurs, tel qu'illustré à la figure 3.1, les courbes d'amplification de l'ARNr 18S pour tous nos échantillons, âgés de 0 à 6 mois, ont une forme presque identique – ou parallèle –, ce qui suggère que l'efficacité des réactions est similaire peu importe l'âge de l'échantillon testé [85].

### 3.3 DÉMARCHE POUR L'INTERPRÉTATION DES DONNÉES

Afin de déterminer les profils de dégradation qui seraient intéressants à conserver dans le but d'effectuer la datation des fluides, nous avons tracé un graphique représentant les résultats provenant de chaque individu, pour l'expression relative de chacun des ARN testés (ARNr 18S, ACTB, GAPDH, PPIA), ainsi que pour le ratio de l'expression relative des ARNm/ARNr (ACTB/18S, GAPDH/18S, PPIA/18S), pour chaque température analysée et ce, pour le sang, le sperme et la salive.

Tout d'abord, cela nous a permis d'observer la variabilité entre les échantillons provenant d'un même individu. Puisque le nombre de taches pour chaque date analysée est faible (2 ou 3 taches par individu), la méthode graphique reste la meilleure pour analyser la variation intra-individuelle. Effectivement, l'échantillonnage est trop petit pour permettre une analyse statistique fiable. Règle générale, la variation observée entre les taches provenant d'un même donneur est faible, et ce, peu importe la température d'entreposage. Quelques exemples de résultats obtenus sont

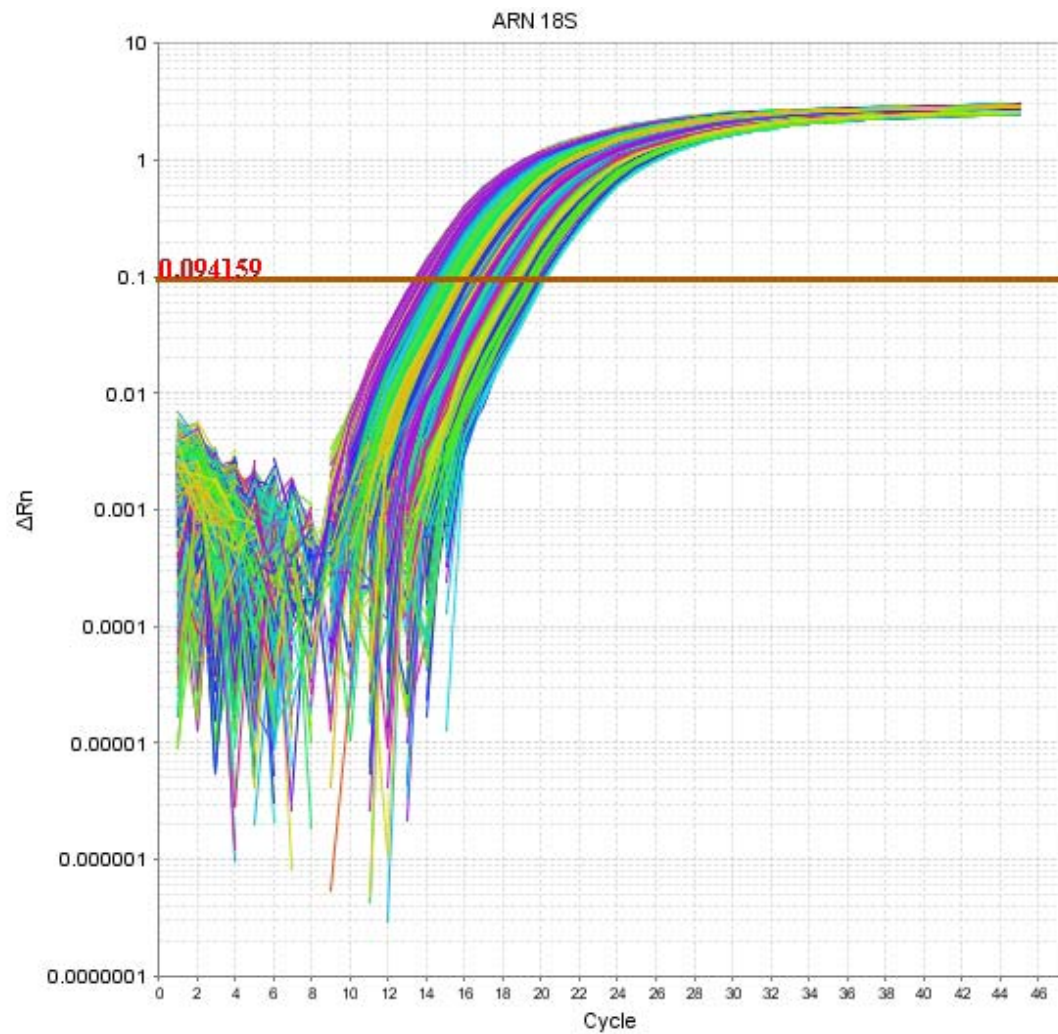


disponibles en annexe à la figure 5.1 et la figure 5.2 pour le sang, à la figure 5.3 et la figure 5.4 pour le sperme, ainsi qu'à la figure 5.5 et la figure 5.6 pour la salive.

Ensuite, nous avons ciblé les cinétiques qui semblaient être décrites par une équation, qui pourrait être utilisée comme référence pour estimer l'âge des spécimens. Pour que la datation des échantillons soit possible, les cinétiques retenues devaient aussi montrer que la quantité d'ARN détectable varie en fonction du temps. De plus, nous recherchions une faible variation entre les tendances générales des courbes entre les individus, puisque cette caractéristique est essentielle pour assurer une estimation fiable de l'âge des échantillons. À cette étape, pour chaque fluide, nous avons observé les courbes obtenues pour le profil de dégradation de chaque ARN, ainsi que les ratios d'expression relative des ARNm sur l'ARNr 18S, pour tous les individus analysés.

Nous avons constaté que la différence de stabilité entre les ARN analysés était trop faible pour que le ratio ARNm/ARNr 18S soit significatif. Ces résultats sont discutés au chapitre 2, mais les graphiques représentant le changement des ratios de l'expression relative pour chaque duplex sont disponibles en annexe à la figure 5.7 pour le sang, à la figure 5.8 pour le sperme, ainsi qu'à la figure 5.9 pour la salive. On constate que la valeur du ratio ne s'élève que très rarement au-dessus de 2.0, ce qui au point de vue de l'expression génique ne représente pas un changement important. Les profils de dégradation des marqueurs seuls pour la salive sont également disponibles en annexe à la figure 5.10. On constate que plusieurs données ont dû être retirées des courbes, puisque la quantité d'ARN détecté dans les échantillons était trop faible.

La même démarche a été suivie pour analyser les échantillons entreposés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les courbes obtenues ont été comparées à celles obtenues à température pièce. Les résultats sont disponibles en annexe à la figure 5.11 pour le sang et à la figure 5.12 pour le sperme. Ces résultats sont discutés plus en détail au chapitre 2.



**Figure 3.1 : Comparaison visuelle de l'efficacité de l'amplification des échantillons sur 6 mois.**

Les courbes d'amplification de l'ARNr 18S extrait à partir de taches de sang âgées sont similaires à celles des échantillons frais, suggérant une efficacité semblable des réactions.

**Chapitre 4**  
**DISCUSSION**

#### 4.1 STABILITÉ DES TRANSCRITS

L'hypothèse de départ, basée sur une observation d'Anderson et al. [79], était que la différence de stabilité entre deux types d'ARN (ARNr et ARNm) permettrait d'estimer l'âge d'un échantillon de fluide corporel. En effet, l'ARNr 18S serait moins sujet à la dégradation que certains ARNm [86], et la variation du ratio de leur expression relative dans des taches de sang serait en relation avec leur âge. Ces observations sont basées sur l'analyse d'échantillons entreposés dans des conditions contrôlées (25°C, 50% d'humidité) sur une courte [87] ou une longue période [79, 88].

Il a été suggéré que les différences structurales, comme la taille et la conformation d'un ARN, peuvent influencer sa stabilité. De plus, la protection environnementale dans la cellule pourrait avoir un impact sur la sensibilité à la dégradation de certains types d'ARN. En effet, les ARNr font partie d'un complexe de protéines ribosomiques qui pourrait protéger les molécules d'ARNr de la dégradation, alors que les ARNm sont souvent considérés plus libres dans la cellule [79, 88] (voir Figure 4.1). Toutefois, de nombreuses études révèlent que les ARNm sont associés, dès la transcription, à des protéines liant l'ARN, de façon transitoire ou permanente [33]. D'autre part, l'ARNr 28S, qui se retrouve également dans les ribosomes, est moins stable que l'ARNr 18S. Cette instabilité pourrait être liée à sa taille (environ 5 kb, versus 2 kb pour l'ARNr 18S), à la présence d'éléments structuraux entraînant une coupure de la molécule en ARN plus courts [89] ou encore à la susceptibilité accrue de certains liens phosphodiester à l'hydrolyse thermique [90]. De plus, différents ARNm peuvent avoir des stabilités distinctes [48]. Puisque les transcrits analysés dans notre étude ont des profils de dégradation semblables, et ce, peu importe le type d'ARN à l'étude, nos résultats suggèrent que les caractéristiques structurales propres au transcrit analysé auraient plus d'influence sur sa stabilité que la protection environnementale. D'ailleurs, on ignore pour le moment si l'intégrité des complexes cellulaires est maintenue suite au séchage des taches.

Les séquences d'ADNc amplifiées à partir des 4 ARN analysés dans cette étude sont de longueurs semblables, soit de 98 à 187 pb. S'il existe un lien entre la taille de l'ARN et sa stabilité, la taille de nos amplicons ne devrait pas avoir un impact important sur la stabilité mesurée des marqueurs. Effectivement, lorsque la longueur des amplicons

choisis varie (par exemple, 301 pb versus 89 pb ou 501 pb versus 171 pb [88]), on observe que le signal obtenu par RT-qPCR diminue plus rapidement lorsque la séquence amplifiée est de taille relativement plus grande. Cela suggère que les ARN sont dégradés dans le temps et que les portions d'ARN intactes sont de plus en plus courtes avec l'âge (voir figure 4.2). Les études subséquentes devraient utiliser des réactifs permettant de connaître en détail la séquence des amorces et des amplicons afin de déterminer si la nature des sites d'hybridation et la localisation de la portion amplifiée a un impact sur sa détection. Le tableau III contient les informations limitées disponibles auprès du commerçant quant à la localisation et la séquence des amplicons analysés dans cette étude.

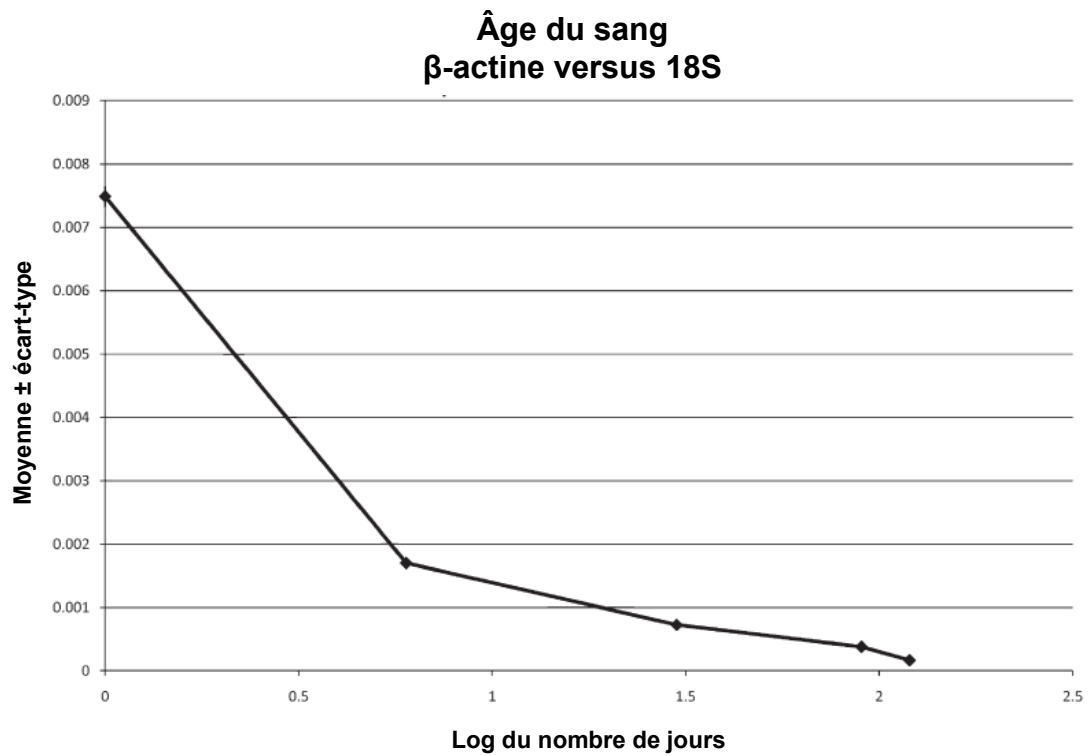
#### **4.2 MÉCANISME DE DÉGRADATION DES ARN DANS LES ÉCHANTILLONS SÉCHÉS**

Dans les cellules vivantes, les mécanismes de dégradation de l'ARN sont relativement bien décrits (résumés à la section 1.3.3). Toutefois, les mécanismes de dégradation de l'ARN dans les échantillons de fluides séchés ne sont pas encore bien documentés. La majorité des études [79, 88] se sont concentrées sur le changement du ratio d'expression de deux ARN, mais n'ont pas illustré de façon précise la façon dont l'ARN était dégradé dans les échantillons au cours de l'entreposage. Une étude récente sur la datation des follicules pileux [91] est la première à documenter la stabilité des ARN testés individuellement, en plus de fournir les résultats du ratio d'expression relative calculé. Également, une publication récente de Van Doorn et al. [92] détaille la stabilité de l'ARN extrait d'échantillons d'os et de moelle osseuse après le décès. En plus de l'analyse dans le temps de l'intégrité de leurs ARN par RT-qPCR et détermination du RIN, ils suggèrent de comparer les mécanismes moléculaires de dégradation de l'ARN dans les tissus post-mortem aux processus connus *in vivo*. Par exemple, est-ce que la dégradation de l'ARN contenu dans les échantillons séchés se fait par la présence d'endonucléases et d'exonucléases, ou principalement par une hydrolyse chimique ou thermique [93]? Afin de pouvoir sélectionner les marqueurs les plus prometteurs à partir desquels l'âge des spécimens pourra être estimé ou extrapolé et comparer plus facilement les résultats entre les différentes études, il sera nécessaire de bien documenter la dégradation des ARN en fonction du temps et des conditions d'entreposage. Une compréhension globale des phénomènes de dégradation des

échantillons séchés permettra de déterminer plus précisément si cette dégradation est prévisible et peut permettre une estimation fiable de l'âge d'un spécimen.

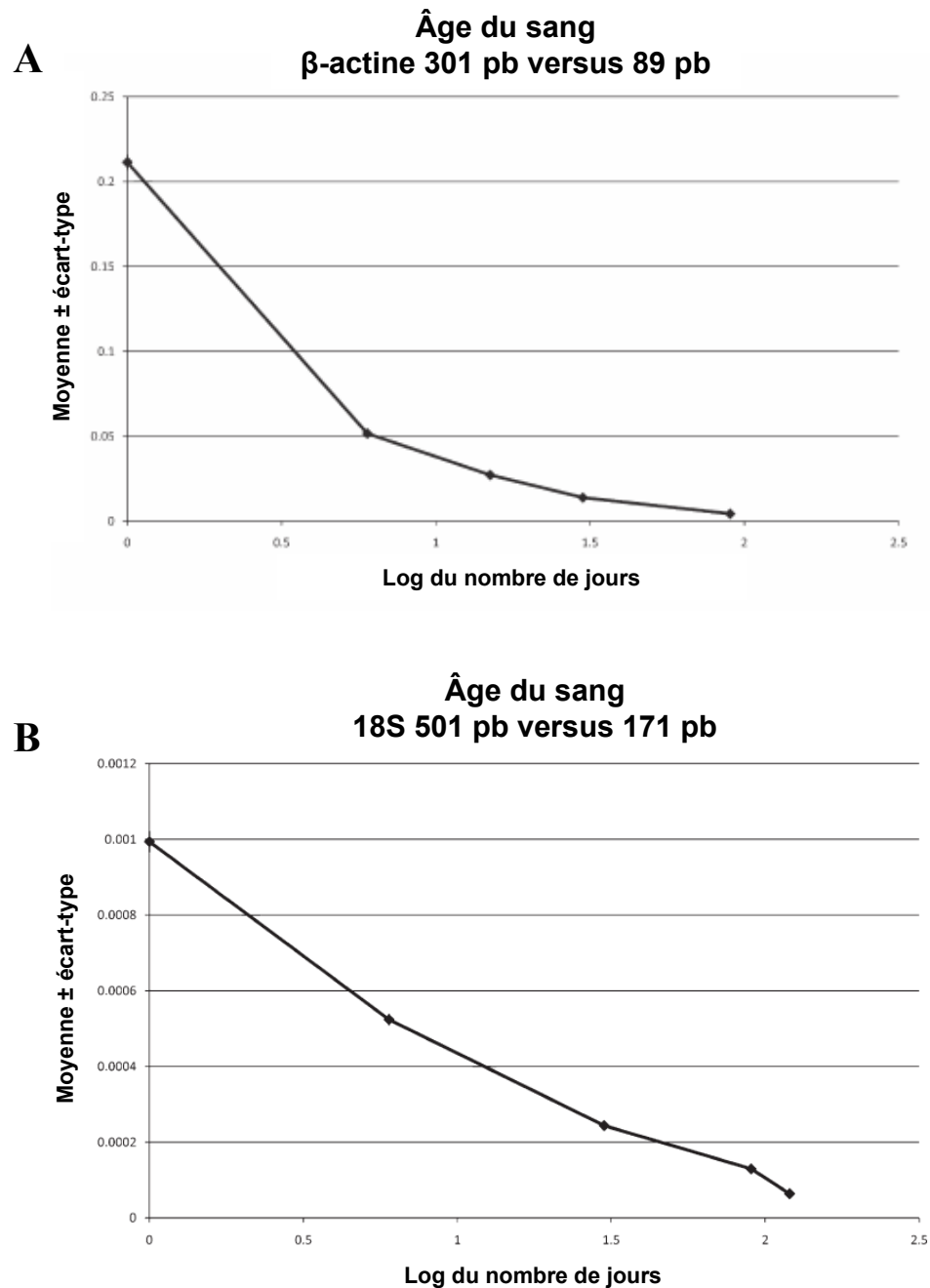
#### 4.3 COMBINAISON DE MARQUEURS

Afin de consolider les méthodes de datation des fluides corporels basées sur l'ARN, il sera intéressant de combiner les résultats obtenus pour l'amplification de séquences de longueur ou de localisation variées sur un même ARN, des transcrits distincts ou encore des ratios d'expression mettant en relation des ARN de familles différentes. En effet, la combinaison de ces paramètres pourrait être efficace pour améliorer la précision de l'estimation tout en élargissant l'intervalle de temps où l'âge estimé est fiable. Par exemple, une étude a montré qu'aucun des marqueurs biochimiques analysés seuls n'était assez informatif pour estimer précisément l'âge des taches de sperme. Toutefois, l'utilisation d'une matrice de corrélation combinant l'ensemble de ces paramètres a permis de mettre en évidence leur relation avec le temps d'entreposage des spécimens [26]. Une seconde étude a analysé le ratio d'expression relative de plusieurs paires d'amplicons en fonction du temps d'entreposage des taches de sang. En combinant les résultats de chaque paire d'amplicons dans une analyse par *clustering* (classement par regroupement de données), ils ont montré qu'il était possible de regrouper les taches de sang analysées en fonction de leur âge [88]. Bref, ces résultats suggèrent que l'estimation de l'âge des spécimens bénéficierait de la combinaison de plusieurs marqueurs et paramètres.



**Figure 4.1 : La stabilité de l'ARNr 18S est différente de celle de l'ARNm de la β-actine.**

Les données représentent le ratio de l'expression relative de la β-actine et de l'ARNr 18S mesuré par RT-qPCR dans des taches de sang séchées sur une période d'entreposage de 120 jours (adapté de [88]).



**Figure 4.2 : Le niveau de détection d'un ARN varie selon la longueur de l'amplicon.**

Le ratio de l'expression relative de deux amplicons de taille différente de la  $\beta$ -actin (A) ou de l'ARNr 18S (B) change en fonction du temps d'entreposage. Plus l'amplicon est grand, plus le signal détecté par RT-qPCR diminue rapidement (adapté de [88]).



#### 4.4 LIMITATIONS DE L'ÉTUDE

Lors de l'établissement du projet de recherche, le calcul d'un ratio d'expression relative de deux ARN semblait être la méthode de choix pour effectuer la datation des taches. En mesurant la quantité de deux ARN et en établissant un ratio entre les quantités détectables de chacun, la quantité initiale d'ARN dans la tache n'était plus un paramètre important à considérer. En effet, l'analyse d'un ratio rend l'estimation indépendante de la taille de l'échantillon, puisque l'on suppose que le ratio de deux ARN à un temps donné sera le même peu importe la grosseur de la tache. Bien entendu, cela ne tient pas compte de la régulation indépendante de l'expression des deux ARN dans les cellules, pouvant entraîner des variations en fonction de l'état de santé ou de diverses variantes génétiques de l'individu auquel appartient le fluide. Cet inconvénient pourra être éliminé en analysant le ratio de deux amplicons différents sur un même transcrit.

Les résultats présentés dans ce mémoire ne nous permettent pas d'effectuer l'estimation de l'âge des échantillons à l'aide d'un ratio de deux ARN. Effectivement, la différence de stabilité entre les marqueurs choisis est trop faible. Par contre, les cinétiques de dégradation de chaque ARN peuvent être décrites par une fonction qui pourrait être utilisée pour effectuer la datation, tel que suggéré au chapitre 2. La limitation majeure de cette méthode est que l'estimation de l'âge n'est plus indépendante de la taille de l'échantillon. En effet, l'utilisation d'une équation décrivant la dégradation d'un ARN en fonction du temps suppose que l'on connaisse la quantité initiale d'ARN présente dans l'échantillon, ce qui n'est pas le cas pour des échantillons récoltés sur une scène de crime.

Avec nos résultats actuels, plusieurs mesures devront être effectuées sur le même prélèvement pour que l'analyse soit indépendante de la taille de l'échantillon. Par exemple, en mesurant la quantité d'un marqueur d'ARN détectable dans un échantillon à 3 reprises sur un intervalle de temps adéquat, il sera possible d'établir le taux de dégradation de l'ARN. En remplaçant ces mesures sur la fonction de référence pour un marqueur particulier, l'âge de l'échantillon lors de la première mesure pourra être estimé. Cela implique donc que l'échantillon soit maintenu dans des conditions contrôlées au laboratoire pour simuler celles de la scène de crime (si elles sont

connues), ou que l'impact de conditions standards d'entreposage soit bien établi afin de ne pas fausser l'estimation de l'âge de l'échantillon conservé en laboratoire. De plus, dans le cas où la taille du spécimen est limitée, il pourrait être difficile d'effectuer plusieurs mesures pour le même prélèvement si la quantité d'ARN est insuffisante. Finalement, augmenter la quantité de manipulations d'un échantillon accroît le risque d'erreurs incorporées à l'estimation de l'âge du fluide corporel.

L'intervalle de temps au cours duquel la datation du sang et du sperme est possible constitue une autre limitation de cette étude. En effet, la présence d'une première phase de dégradation de l'ARN suivie d'un plateau après 2 semaines (sang) ou 2 mois (sperme) d'entreposage ne permet qu'une estimation par groupe d'âge. Par exemple, un échantillon de sang pourrait être classé comme plus vieux ou plus jeune que 14 jours, mais ne pourrait être précisément attribué à un âge de 7 jours. Ce principe de datation par groupe d'âge est semblable aux conclusions tirées par Anderson et al. pour la datation des taches de sang [88]. Le fait que les marqueurs choisis dans notre étude ont des profils de dégradation similaires souligne l'importance de rechercher de nouveaux marqueurs de stabilité différente à combiner à l'analyse, afin d'augmenter l'intervalle au cours duquel l'âge pourrait être établi de façon précise. Par exemple, un marqueur se dégradant rapidement en 2 semaines pourrait être analysé en parallèle avec un autre marqueur pour lequel la quantité détectée diminue de façon importante à l'intérieur de 3 jours, ou encore de plusieurs semaines.

L'ajout de marqueurs à vitesses de dégradation variées contribuera différemment à l'analyse que la découverte d'un marqueur étant très stable dans le temps. En effet, la dégradation rapide de l'ARN observée dans cette étude dans les premières semaines est suivie d'un plateau. Si un ratio est créé à partir de ce transcrit avec un second ARN plus stable ne se dégradant que très peu dans le temps, la datation pourrait être effectuée de façon plus précise à l'aide d'une seule mesure à l'intérieur de la phase de dégradation rapide du premier ARN (par exemple, attribuer l'âge de 7 jours à une tache au lieu de la classer comme une tache de moins de 14 jours). Toutefois, la présence du plateau va limiter la variation du ratio lorsque le temps d'entreposage augmente au-delà de quelques semaines. Un résultat semblable a été obtenu récemment, où le ratio de l'expression relative de deux ARN extraits dans des follicules pileux augmente de façon linéaire sur 60 jours, puis atteint une phase de plateau. Il y a

donc une perte de discrimination de l'âge des spécimens après 60 jours avec la méthode proposée [91]. Il sera donc intéressant de trouver de nouveaux marqueurs ayant des rapidités de dégradation variées, puisque seul l'ajout d'un transcrit très stable n'augmentera pas l'intervalle de temps (quelques semaines à quelques mois) où l'estimation de l'âge est possible.

Bien entendu, ce mémoire consiste en une étude « preuve de concept », et il faudra appliquer les méthodes de datation par l'ARN à des échantillons réels pour déterminer leur applicabilité dans les enquêtes judiciaires. Il faudra également faire plusieurs études à l'aveugle pour tester la fiabilité des corrélations établies. De plus, des études de population devront être effectuées afin de mieux connaître l'impact de la variabilité génétique entre les individus et les groupes ethniques. En effet, un polymorphisme des sites de liaison des amorces ou des sondes utilisées pour amplifier un ARN cible pourrait entraîner une estimation erronée de l'âge d'un échantillon. Si une différence de séquence empêche ou retarde la liaison des amorces ou de la sonde, l'amplification sera retardée et résultera en une détection plus faible de l'ARN d'intérêt. Si l'on effectue la datation à l'aide d'un ratio de deux amplicons, l'échantillon sera estimé plus jeune qu'il ne l'est réellement lorsqu'un polymorphisme diminue la détection de l'amplicon le plus stable. À l'inverse, une variabilité génétique affectant l'amplification de l'amplicon le moins stable augmentera l'âge estimé du spécimen. La présence possible de variabilité génétique souligne l'importance d'utiliser la combinaison de plusieurs marqueurs pour effectuer la datation des échantillons biologiques, afin de réduire l'impact d'une estimation erronée causée par une variante de l'un des marqueurs.

Une autre limitation des méthodes de datation concerne la provenance du sang sur une scène de crime. En effet, les tests d'identification courants ne peuvent différencier le sang menstruel du sang provenant d'une blessure, ce qui peut avoir un impact crucial dans une cause d'agression sexuelle. Le sang menstruel provient du détachement de la couche fonctionnelle de l'endomètre, qui se décompose en absence de grossesse. De plus, l'expression de certains marqueurs vaginaux déjà étudiés pour l'identification par profil ARN varie en fonction du cycle menstruel chez la femme [62]. Il faudra donc éventuellement vérifier si la provenance du sang a un

impact sur l'estimation de son âge par la détection de certains ARN, entre autres si la méthode choisie est basée sur l'analyse du ratio de deux ARN distincts.

De plus, tel que suggéré par Hanson et al. [16], il est important de déterminer l'impact de la grosseur d'une tache sur l'estimation de son âge. Cela est particulièrement vrai pour les taches de sang, qui peuvent être présentes sous forme de traces (quelques microlitres) ou encore sous forme de flaque. Dans le cas de taches de plus grande taille, les contours sècheront plus rapidement et pourraient être soumis à des processus de dégradation légèrement différents que les composés retrouvés au centre de l'échantillon.

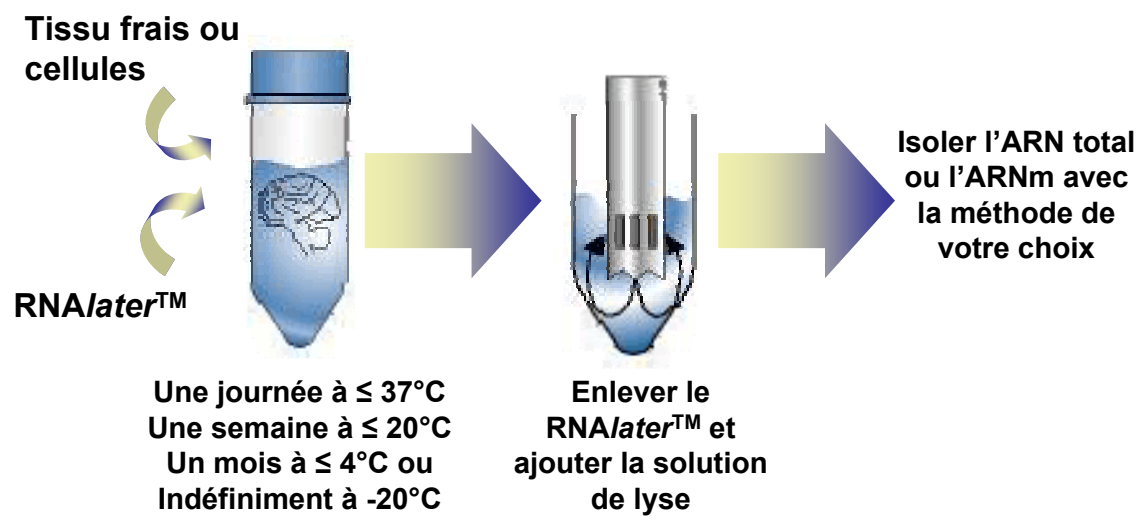
Un avantage important de l'utilisation de l'ARN est la possibilité de rendre les analyses spécifiques aux échantillons humains. Dans notre étude, seules les amorces ciblant l'ARNr 18S (eucaryote) n'étaient pas ciblées spécifiquement vers l'humain. Toutefois, il est possible de concevoir des essais spécifiques pour l'ARNr 18S humain, tel que montré par Anderson et al. [79].

#### **4.5 STABILISATION DE L'ARN AVANT L'ANALYSE DES ÉCHANTILLONS**

Les échantillons biologiques sont rarement analysés dès leur prélèvement sur une scène de crime. En effet, il existe un certain délai d'analyse des spécimens avant et après leur arrivée au laboratoire, ce qui pourrait affecter la qualité de l'ARN analysable. Tel que montré dans ce mémoire, il semble possible de congeler les échantillons un certain temps afin de bloquer la dégradation de l'ARN. Une combinaison de méthodes pour stabiliser l'échantillon pourrait également être utilisée. Par exemple, une solution de stabilisation de l'ARN, comme le RNAlater<sup>TM</sup>, [94] pourrait être ajoutée au spécimen nécessitant une datation lors de son prélèvement. Quelques études portant sur l'utilisation de l'ARN en médecine légale ont d'ailleurs déjà utilisé ce produit dans leurs protocoles [92]. Comme l'illustre la figure 4.3, il serait possible d'entreposer le spécimen dans différentes conditions, selon le temps de traitement requis pour l'analyse. Le manufacturier propose également un protocole d'extraction organique de l'ADN à partir des échantillons en solution ; il faudra s'assurer que les protocoles d'extraction de l'ARN et de l'ADN restent compatibles.

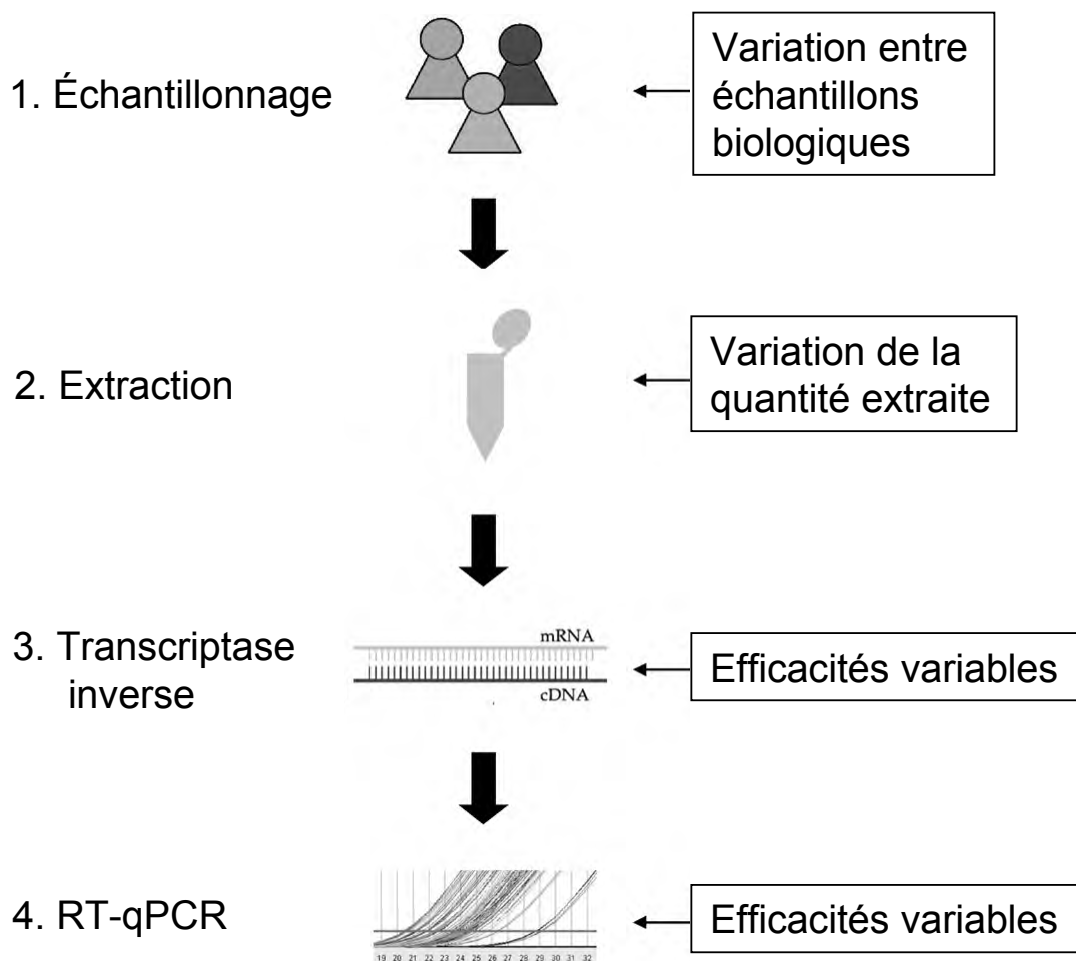
#### 4.6 CHOIX DE LA MÉTHODE DE NORMALISATION

Finalement, l'uniformisation des méthodes de normalisation des échantillons analysés par RT-qPCR demeure un des problèmes les plus importants de cette technique. Puisqu'il s'agit d'une méthode de quantification très sensible, une faible variation de la quantité d'ADNc ajouté pour l'amplification pourra être détectée. Afin d'assurer une interprétation fiable des résultats et corriger les sources d'erreurs provenant des différences entre les spécimens testés, il faut que les échantillons d'intérêt soient normalisés de façon adéquate. Les avantages et les inconvénients de chaque stratégie de normalisation fréquemment utilisée a été discuté en détail [95] et leur utilisation dans les problématiques propres aux échantillons en médecine légale récemment considérée [96]. La figure 4.4 résume les sources de variation expérimentales possibles lors de l'analyse d'un échantillon par RT-qPCR. En biologie judiciaire, plusieurs paramètres, tels que les conditions environnementales et l'âge des échantillons, pourraient influencer la quantité et la qualité des échantillons analysés. D'ailleurs, puisque l'on ne peut assurer la qualité de l'ARN recueilli sur une scène de crime, il devient difficile de normaliser en se basant sur les quantités dosées au départ entre les échantillons. Une méthode intéressante pour normaliser les analyses consisterait en l'incorporation d'une molécule d'ARN artificielle dès l'étape de l'extraction, afin de corriger pour la variabilité expérimentale tout au long du processus. Conçues *in vitro*, ces molécules d'ARN, aussi appelées contrôles externes [97] ou ARN *spike-in* [95], permettent de comparer les résultats obtenus entre des expériences indépendantes ou à l'aide de réactifs différents. Il a d'ailleurs été suggéré que ces standards soient développés et rendus disponibles commercialement, afin de faciliter leur utilisation dans le futur [98]. Cela permettrait également de mieux comparer les résultats obtenus entre les différents laboratoires.



**Figure 4.3 : Procédure simplifiée de l'utilisation du RNAlater™ d'Ambion.**

L'ARN est stabilisé par l'ajout de la solution et peut être conservé dans différentes conditions sur une longue période avant son extraction.



**Figure 4.4 : Sources de variation possibles dans l'expérimentation.**

Il est important de contrôler la variation à chaque étape de l'analyse des échantillons. La variabilité entre les individus, le rendement du procédé d'extraction ainsi que l'efficacité de la transcriptase inverse et de la réaction d'amplification peuvent influencer les résultats finaux obtenus (adapté de [96]).

#### 4.7 CONCLUSION

Nos résultats montrent que l'analyse de différents ARN par RT-qPCR pourrait être utilisée pour estimer l'âge des taches de sang et de sperme. Tout d'abord, les profils de dégradation des ARN seuls corrélaient avec le temps d'entreposage des taches. La stabilité de tous les marqueurs choisis dans cette étude est similaire, mais varie entre les fluides, la dégradation des ARN testés étant plus rapide dans les taches de sang que dans les taches de sperme. La composition distincte des deux fluides pourrait expliquer cette différence. De plus, la variation entre les échantillons de sang provenant de multiples individus est minime. Pour le sperme, la composition non homogène du fluide pourrait expliquer la faible variation observée entre les individus. Finalement, afin de faciliter le traitement des spécimens provenant des scènes de crime, les échantillons pourraient être congelés un certain temps avant leur analyse en laboratoire. Toutefois, pour la salive, une variation importante de la détection des ARN choisis dans cette étude est observée entre les individus. De meilleurs marqueurs devront donc être identifiés si l'on veut poursuivre des études sur la datation par l'ARN dans ce fluide.

Plusieurs précautions devront être prises pour obtenir des données biologiquement significatives lorsque des études de grande envergure seront effectuées pour valider les méthodes d'analyse de l'ARN en sciences judiciaires. Par exemple, il faudra augmenter la taille de l'échantillonnage et des réplicats biologiques (dans ce cas le nombre d'individus analysés) et effectuer une validation exhaustive des méthodes de normalisation choisies. Les prochaines études devraient également documenter l'intégrité des ARN entreposés dans différentes conditions et mesurer son impact sur la fiabilité de l'analyse par RT-qPCR. Finalement, il faudra analyser en détail les données obtenues pour s'assurer de leur répétabilité, leur reproductibilité et leur robustesse, et ce, à travers la communauté judiciaire avant leur implantation dans les analyses de routine.

Vu les différentes stratégies de datation basées sur l'ARN (ratios ou vitesse de dégradation) et la variété de transcrits pouvant être analysés, les possibilités de développement d'une méthode d'estimation de l'âge des taches surpassent les résultats présentés dans ce mémoire. Les prochaines études devront se concentrer



sur l'identification de nouveaux marqueurs de stabilité variée ainsi que les possibilités d'effectuer une datation lorsque ceux-ci sont combinés dans une même analyse. De plus, tous les autres fluides ou tissus corporels desquels l'ARN peut être extrait, comme les sécrétions vaginales et le sang menstruel, pourraient être soumis à une telle évaluation. Effectivement, il serait en théorie possible de développer une méthode de datation basée sur l'ARN pour tous les fluides contenant suffisamment d'ARN et pour lesquels la variation entre les individus est faible. Finalement, dans la mesure où l'identification des fluides corporels sera effectuée par profil d'ARN dans les laboratoires judiciaires d'ici quelques années, l'estimation de l'âge des taches à l'aide de l'ARN pourrait également être jumelée à cette analyse si certains marqueurs sont communs aux deux méthodes.

**Chapitre 5**  
**ANNEXES**

	Nom	Taille de l'amplicon (pb)	Assay ID (ABI)	Localisation
<b>18S</b>	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>	187	Hs99999901_s1	609
<b>ACTB</b>	<i>Beta actin</i>	171	Hs99999903_m1	53
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	122	Hs99999905_m1	157
<b>PPIA</b>	<i>Peptidylpropyl isomerase A (cyclophilin A)</i>	98	Hs99999904_m1	433

**Tableau III : Réactifs développés commercialement utilisés pour la détection des marqueurs ARN.**

Sang		
Homme	Femme	Âge
	x	28
x		29
	x	31
x		31
	x	38
	x	45
x		59

Sperme		
Homme	Vasectomisé	Âge
x		25
x		29
x	x	38
x	x	53
x	x	59

Salive		
Homme	Femme	Âge
	x	27
x		29
	x	30
	x	37
	x	38
	x	42
	x	45
x		53
x		59
	x	60

**Tableau IV : Description des participants à l'étude.**

Pour le sang, 7 donneurs âgés de 28 à 59 ans, dont 3 hommes et 4 femmes. Pour le sperme, 5 donneurs âgés de 25 à 59 ans, dont 3 sont vasectomisés. Pour la salive, 10 donneurs âgés de 27 à 60 ans, dont 3 hommes et 7 femmes. Tous les participants sont caucasiens. Il existe un faible chevauchement des donneurs entre les fluides, qui peut être identifié en consultant l'âge des individus.

20°C	Nombre d'individus	Tache/individu	Tache/date	Nombre de date analysées	Nombre total de taches
Sang	7	3	21	11	231
Sperme	5	3	15	12	180
Salive	10	2	20	9	180

-80°C	Nombre d'individus	Tache/individu	Tache/date	Nombre de date analysées	Nombre total de taches
Sang	3	2	6	7	42
Sperme	3	2	6	7	42
Salive	3	2	6	5	30

**Tableau V : Nombre d'échantillons analysés pour chaque cinétique.**

La quantité de taches totales analysées est différente selon le nombre de participants, le nombre de dates analysées, la température choisie ainsi que le fluide corporel à l'étude.

<b>SANG</b>	<b>RIN</b>	<b>[pg/<math>\mu</math>L]</b>	<b>ng total pour tache de 30<math>\mu</math>L</b>
Tache 1	8.10	234	7.02
Tache 2	8.40	301	9.03
Tache 3	8.20	318	9.54
Tache 4	7.90	402	12.06
Tache 5	8.00	369	11.07
Tache 6	8.00	319	9.57
Tache 7	7.60	371	11.13
Moyenne	8.03	330.57	9.92
Écart-type	0.26	46.24	1.39

<b>SALIVE</b>	<b>RIN</b>	<b>[pg/<math>\mu</math>L]</b>	<b>ng total pour tache de 30<math>\mu</math>L</b>
Tache 1	9.30	275	8.25
Tache 2	8.80	372	11.16
Tache 3	9.00	321	9.63
Tache 4	8.80	809	24.27
Tache 5	8.10	1463	43.89
Tache 6	6.90	2062	61.86
Tache 7	9.00	721	21.63
Tache 8	8.70	1113	33.39
Moyenne	8.58	892.00	26.76
Écart-type	0.71	587.05	17.61

<b>SPERME</b>	<b>RIN</b>	<b>[pg/<math>\mu</math>L]</b>	<b>ng total pour tache de 30<math>\mu</math>L</b>
Tache 1	8.00	4951	148.53
Tache 2	7.70	3687	110.61
Tache 3	6.60	2993	89.79
Tache 4	8.40	1906	57.18
Tache 5	8.50	1883	56.49
Tache 6	8.40	1278	38.34
Tache 7	8.40	1295	38.85
Moyenne	8.00	2570.43	77.11
Écart-type	0.63	1270.74	38.12

**Tableau VI : Intégrité et dosage de l'ARN extrait.**

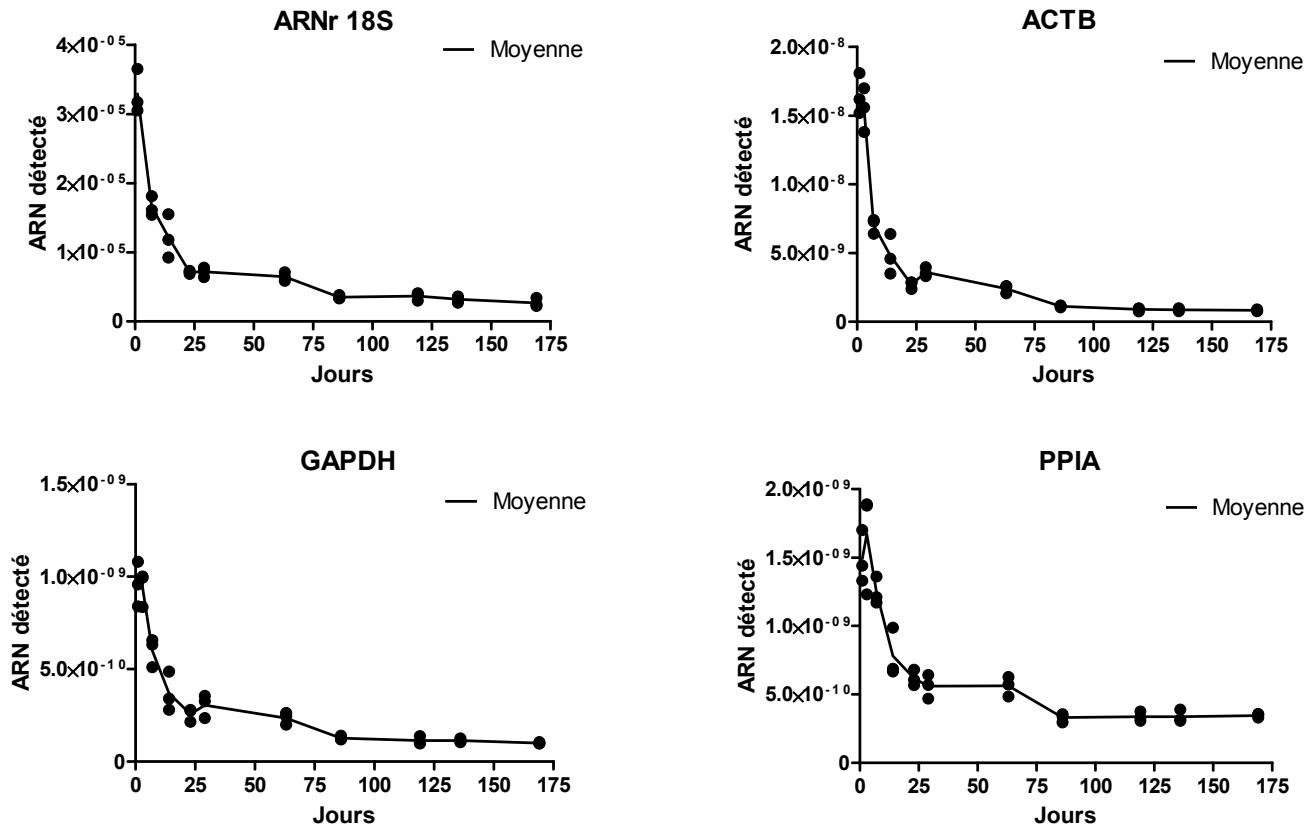
L'ARN recueilli de taches fraîchement aliquotées est de très bonne qualité (RIN moyen > 8.00) pour tous les fluides analysés et la quantité d'ARN est comparable à celle décrite dans la littérature.

	Référence	Moyenne	Tache	Reporté pour 30 µL	Méthode d'extraction
<b>Sang</b>	1	450 ± 140 ng	50 µL	270 ng	Organique
	2	100-150 ng	10 µL	300-450 ng	Organique
	3	0.5-1.0 ng	0.75 cm <sup>2</sup>	0.8 cm <sup>2</sup> = 0.5-1.0 ng	Rneasy Mini Kit
	4	1.27 ng	10 µL	3.8 ng	Organique co-extraction ADN/ARN
	5	0.045 ng/µL	1 µL	1.35 ng	DNA IQ co-extraction
	5	0.032 ng/µL	1 µL	0.96 ng	Organique
	Référence	Moyenne	Tache	Reporté pour 30 µL	Méthode d'extraction
<b>Salive</b>	1	430 ± 230 ng	50 µL	258 ng	Organique
	5	0.051 ng/µL	10 µL	1.53 ng	DNA IQ co-extraction
	5	0.090 ng/µL	10 µL	2.7 ng	Organique
	Référence	Moyenne	Tache	Reporté pour 30 µL	Méthode d'extraction
<b>Sperme</b>	1	1100 ± 680 ng	50 µL	660 ng	Organique
	5	3.625 ng/µL	1 µL	109 ng	DNA IQ co-extraction
	5	3.025 ng/µL	1 µL	91 ng	Organique

Références : <sup>1</sup>[54], <sup>2</sup>[79], <sup>3</sup>[53], <sup>4</sup>[60], <sup>5</sup>[40]

**Tableau VII : Quantité d'ARN extrait de taches de fluides biologiques dans la littérature.**

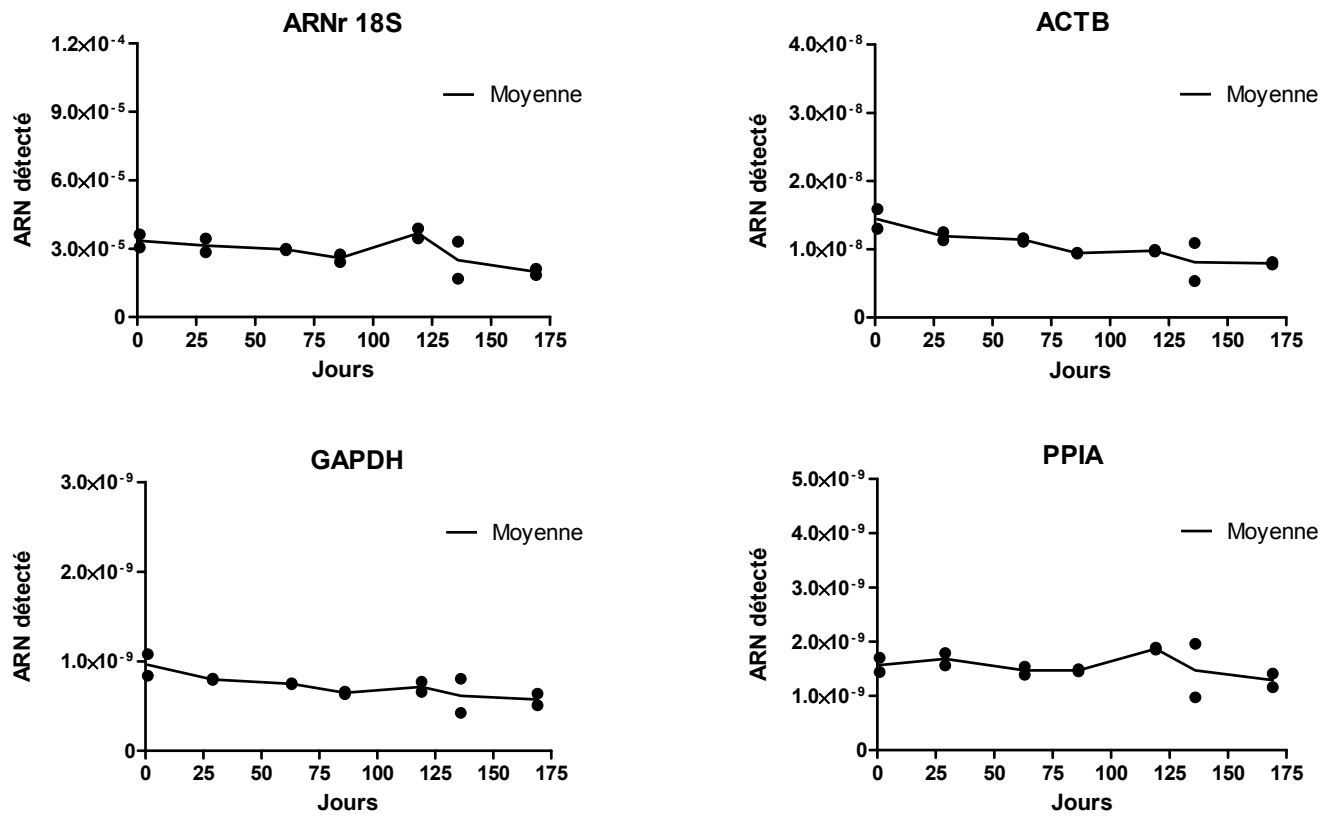
La quantité d'ARN obtenue dépend du type de protocole utilisé et varie entre les laboratoires.



**Figure 5.1 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sang à température pièce.**

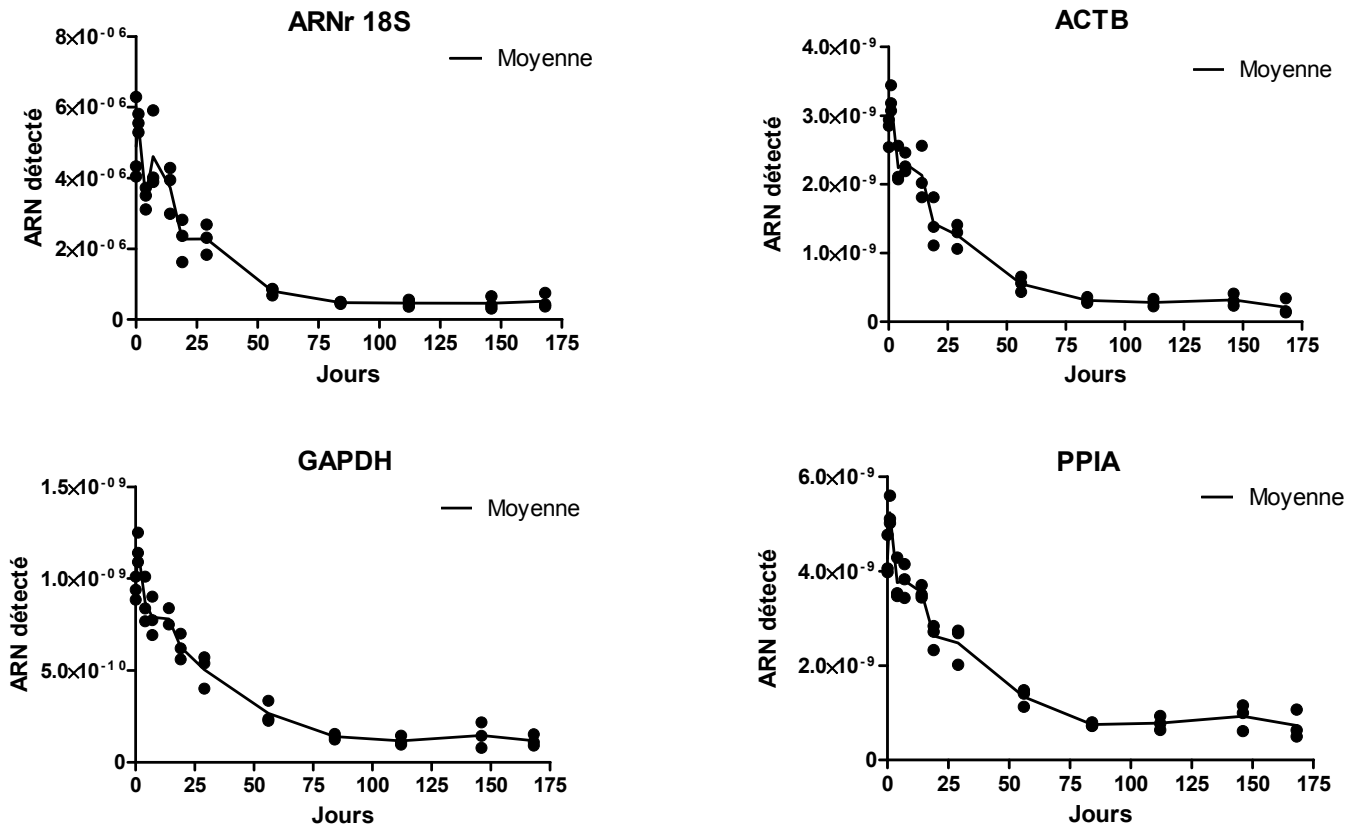
Les résultats obtenus pour plusieurs taches de sang d'un même donneur sont semblables pour les différents marqueurs.





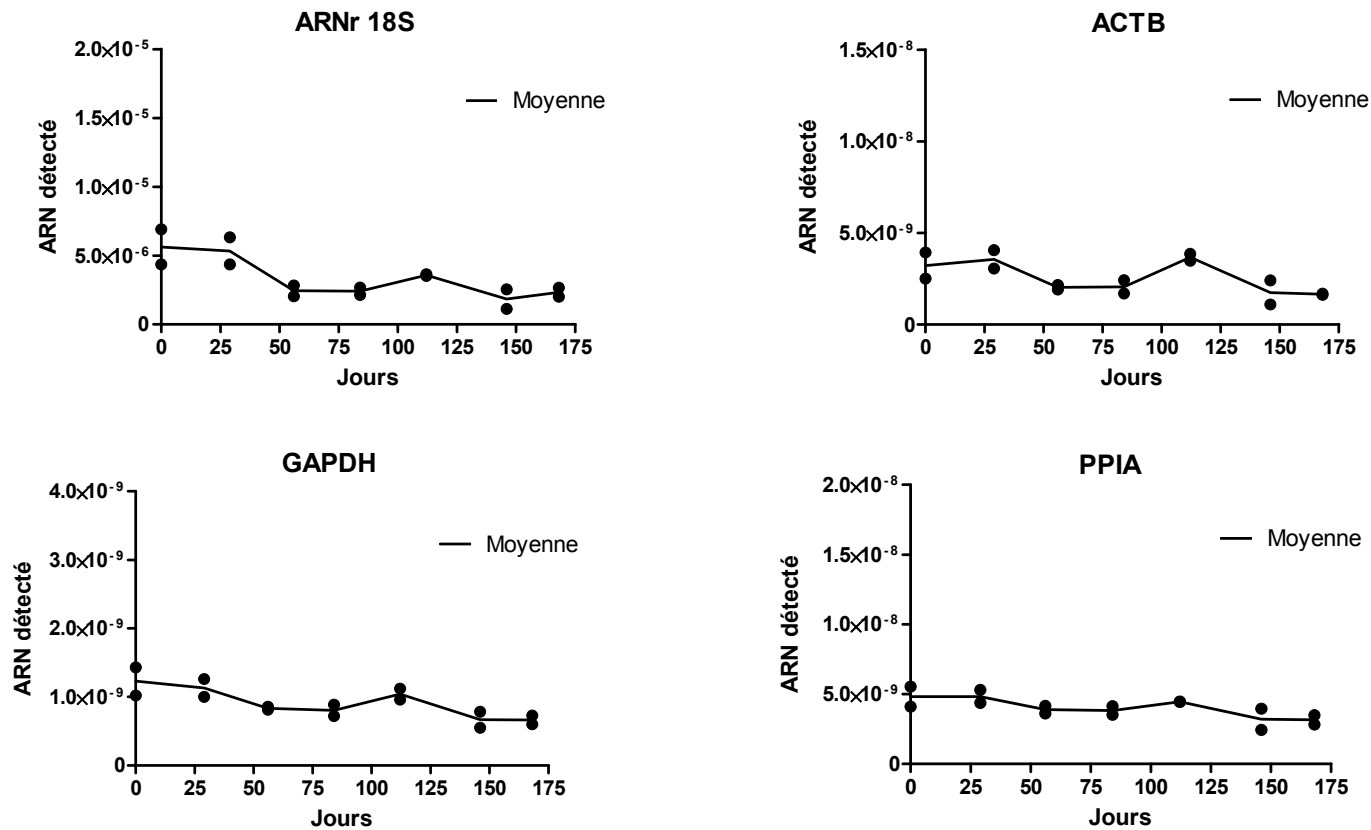
**Figure 5.2 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sang au congélateur.**

Les résultats obtenus pour plusieurs taches de sang d'un même donneur sont semblables pour les différents marqueurs.



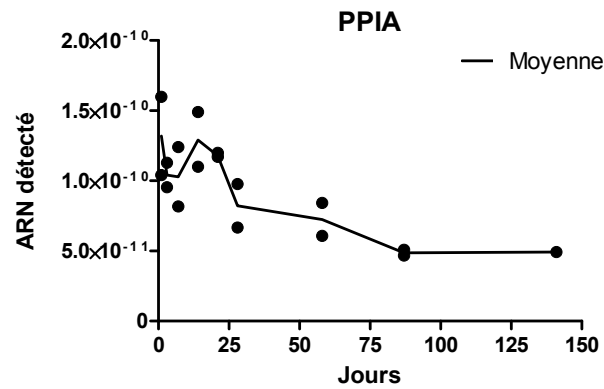
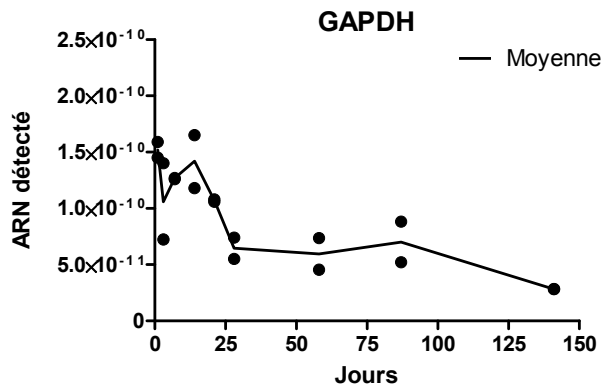
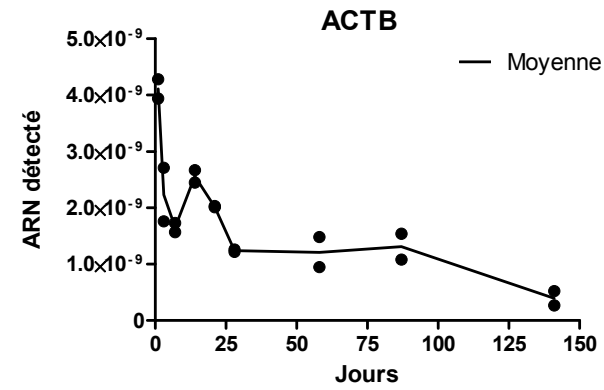
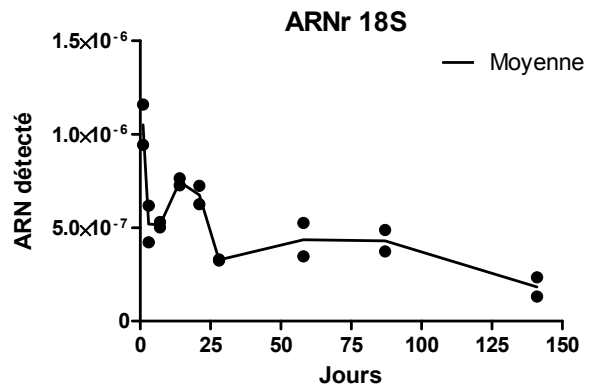
**Figure 5.3 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sperme à température pièce.**

Les résultats obtenus pour plusieurs taches de sperme d'un même donneur sont semblables pour les différents marqueurs.



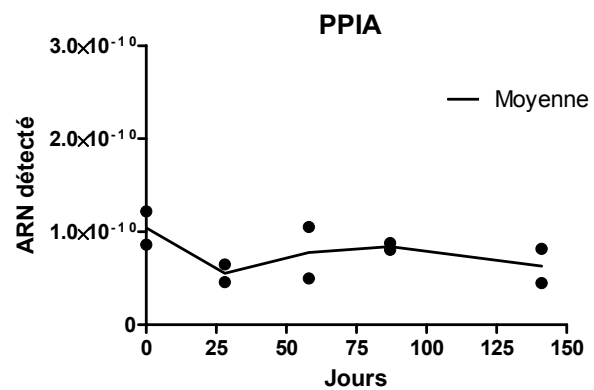
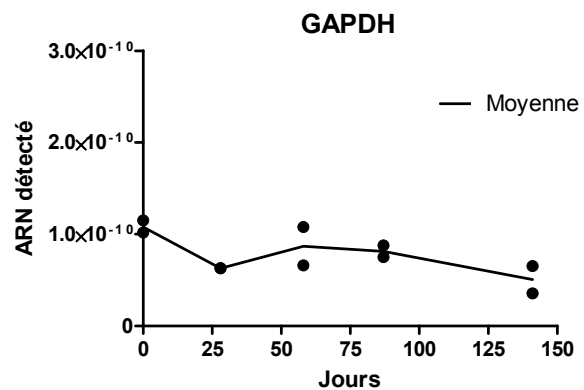
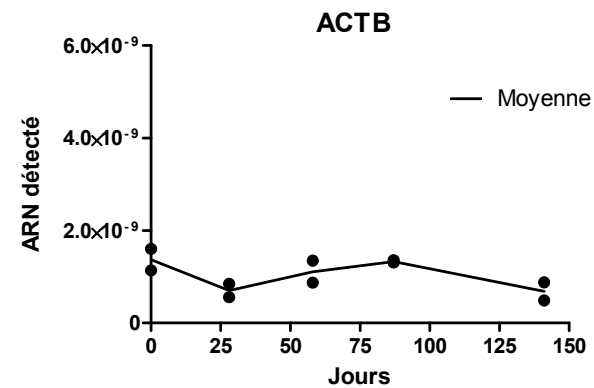
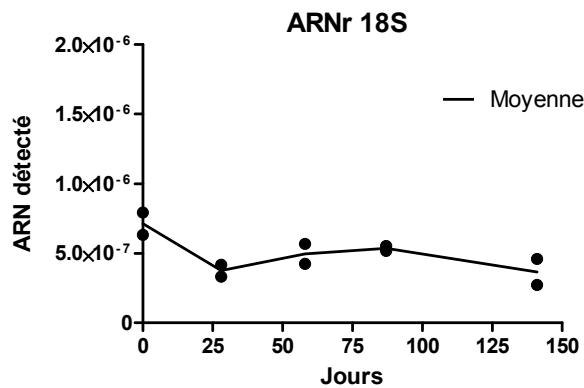
**Figure 5.4 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour le sperme au congélateur.**

Les résultats obtenus pour plusieurs taches de sperme d'un même donneur sont semblables pour les différents marqueurs.



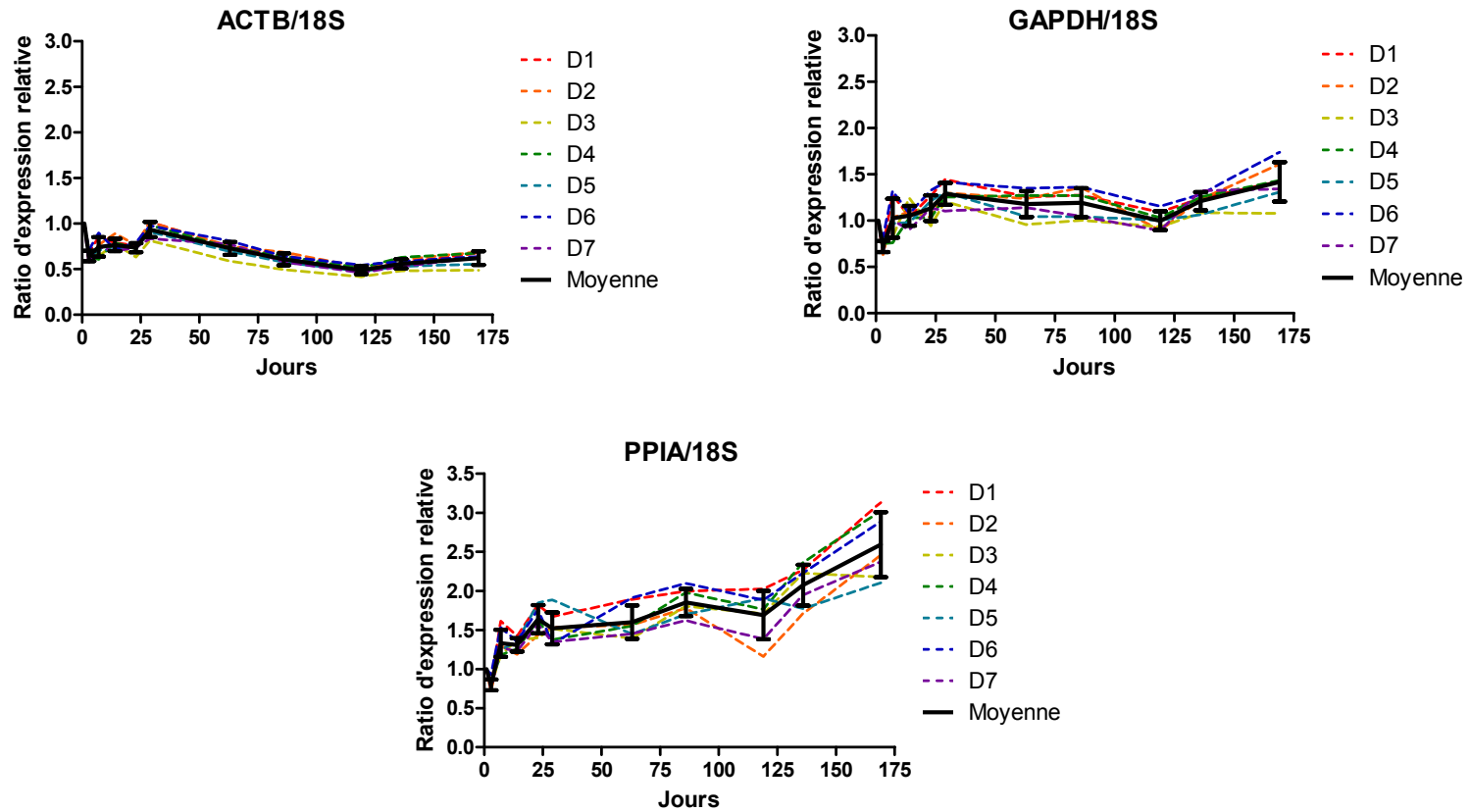
**Figure 5.5 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour la salive à température pièce.**

Les résultats obtenus pour deux taches de salive d'un même donneur pour les différents marqueurs sont un peu plus variables que pour les autres fluides.



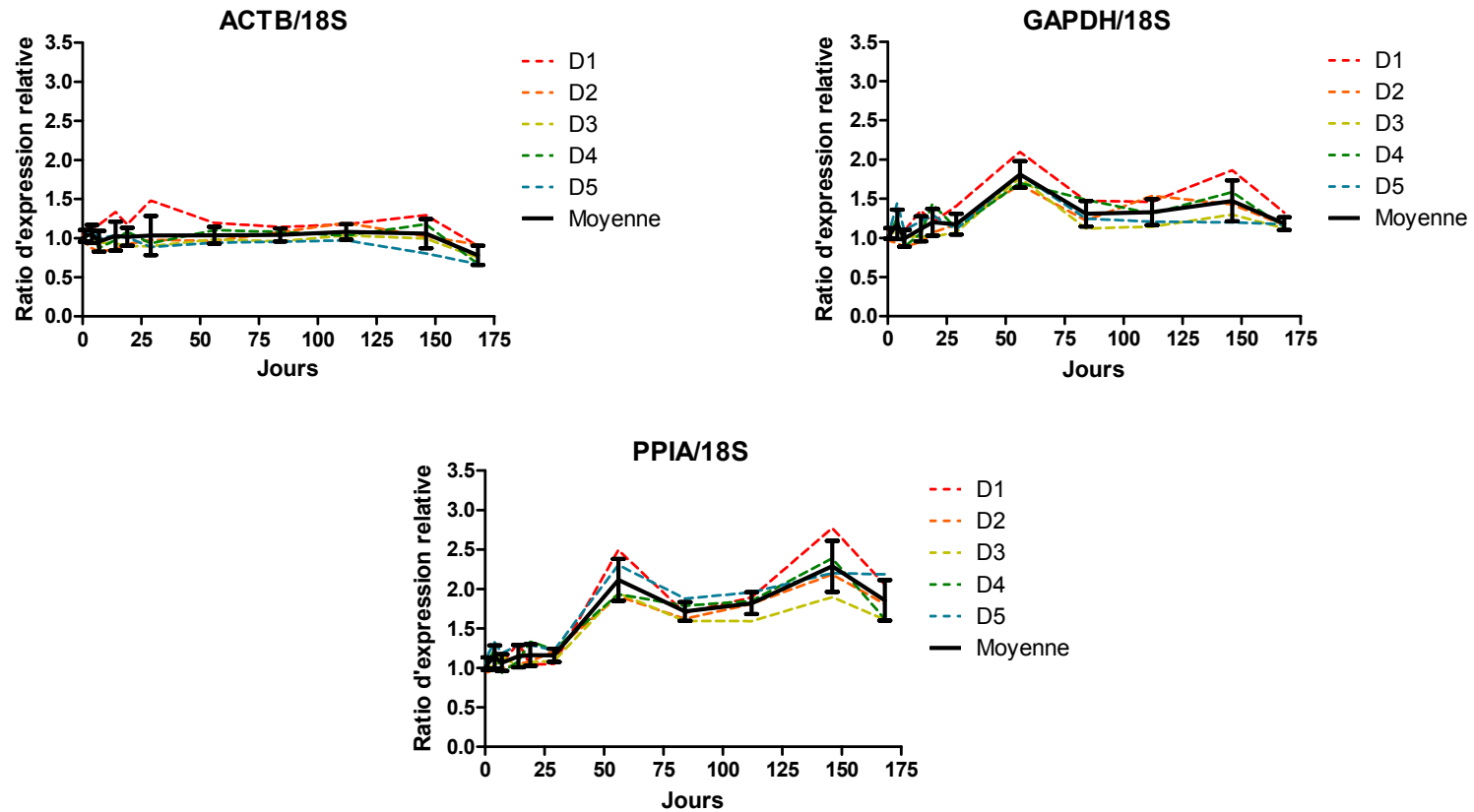
**Figure 5.6 : Observation graphique de la variabilité intra-individuelle pour la salive au congélateur.**

Les résultats obtenus pour plusieurs taches de salive d'un même donneur pour les différents marqueurs sont un peu plus variables que pour les autres fluides.



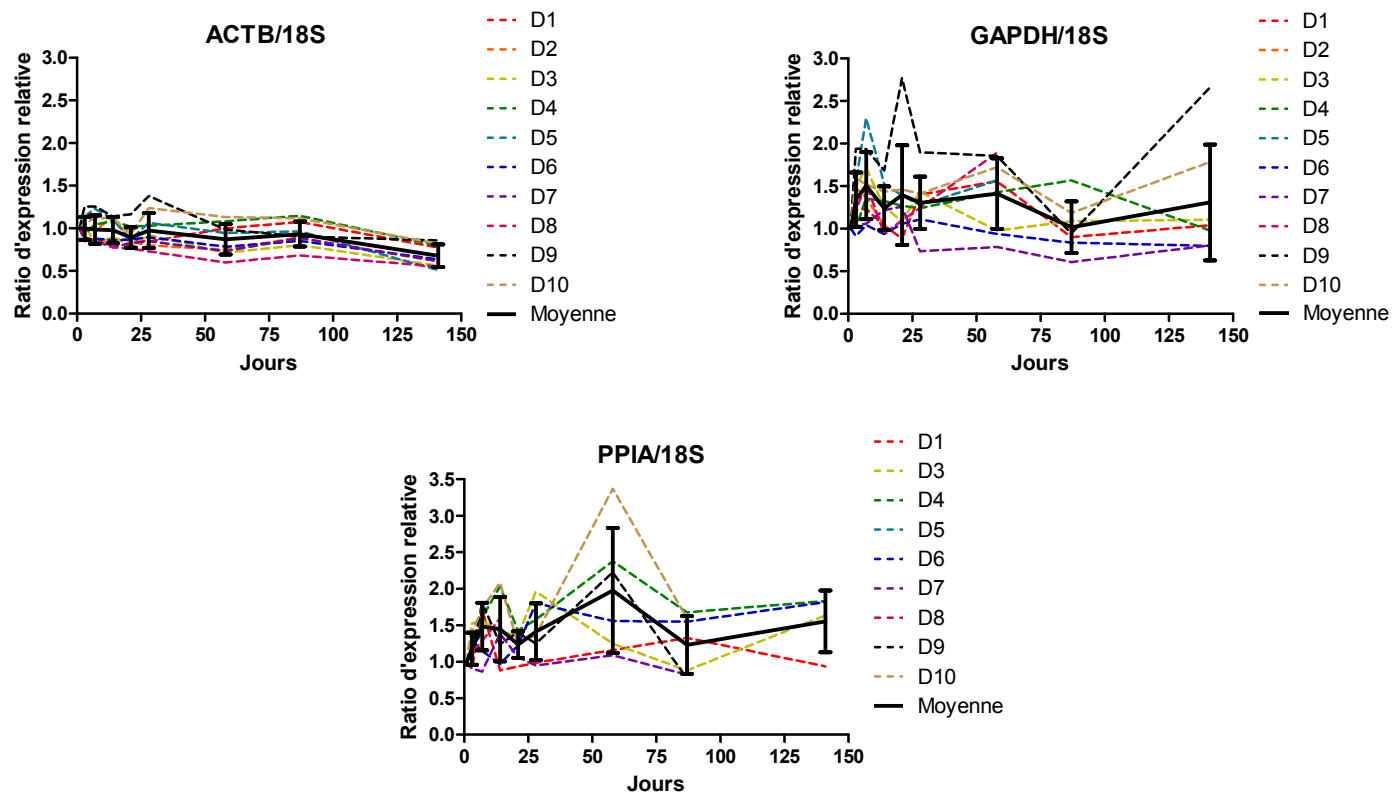
**Figure 5.7 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour le sang.**

Le ratio ARNm/ARNr mesuré par RT-qPCR dans les échantillons entreposés à température pièce sur une période de 6 mois varie peu.



**Figure 5.8 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour le sperme.**

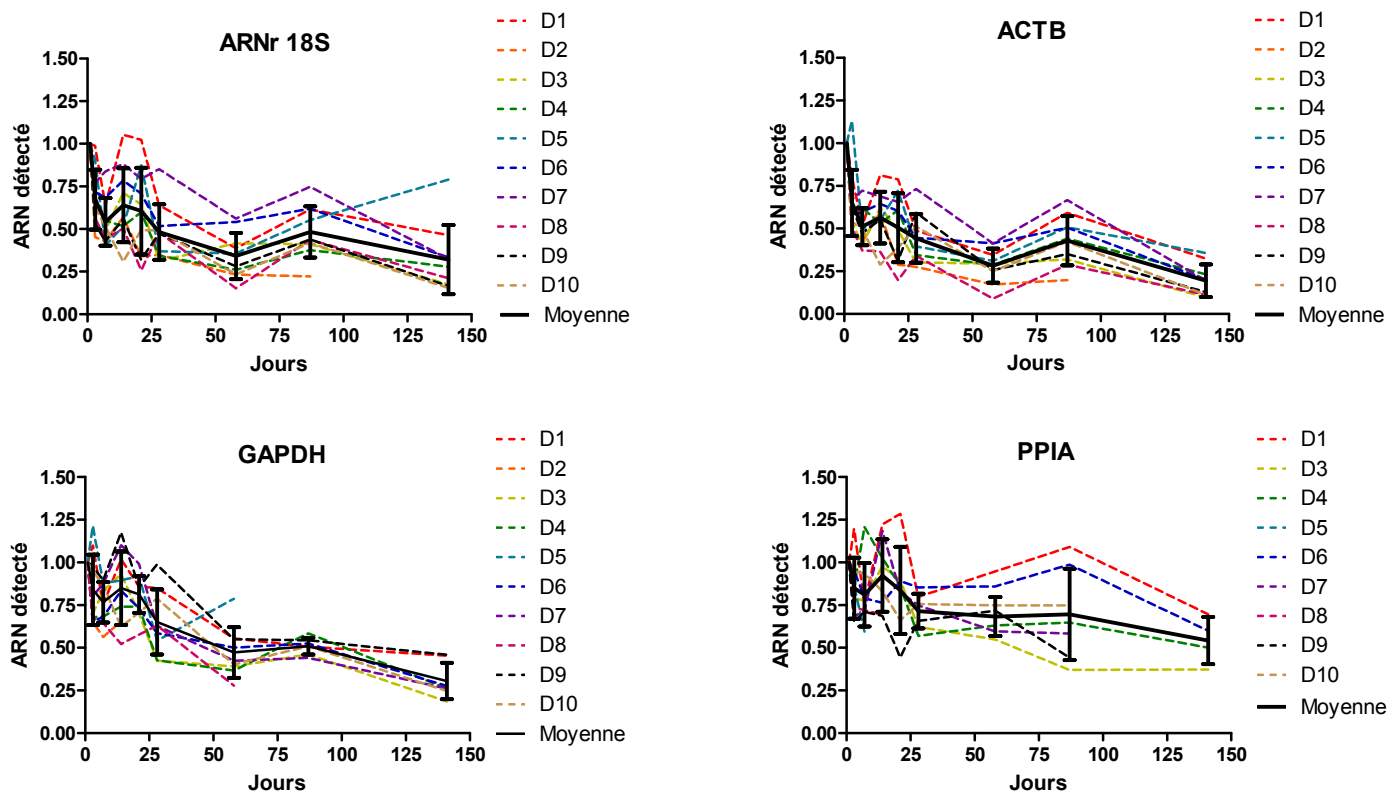
Le ratio ARNm/ARNr mesuré par RT-qPCR dans les échantillons entreposés à température pièce sur une période de 6 mois varie peu.



**Figure 5.9 : Ratio de l'expression relative des différents duplex pour la salive.**

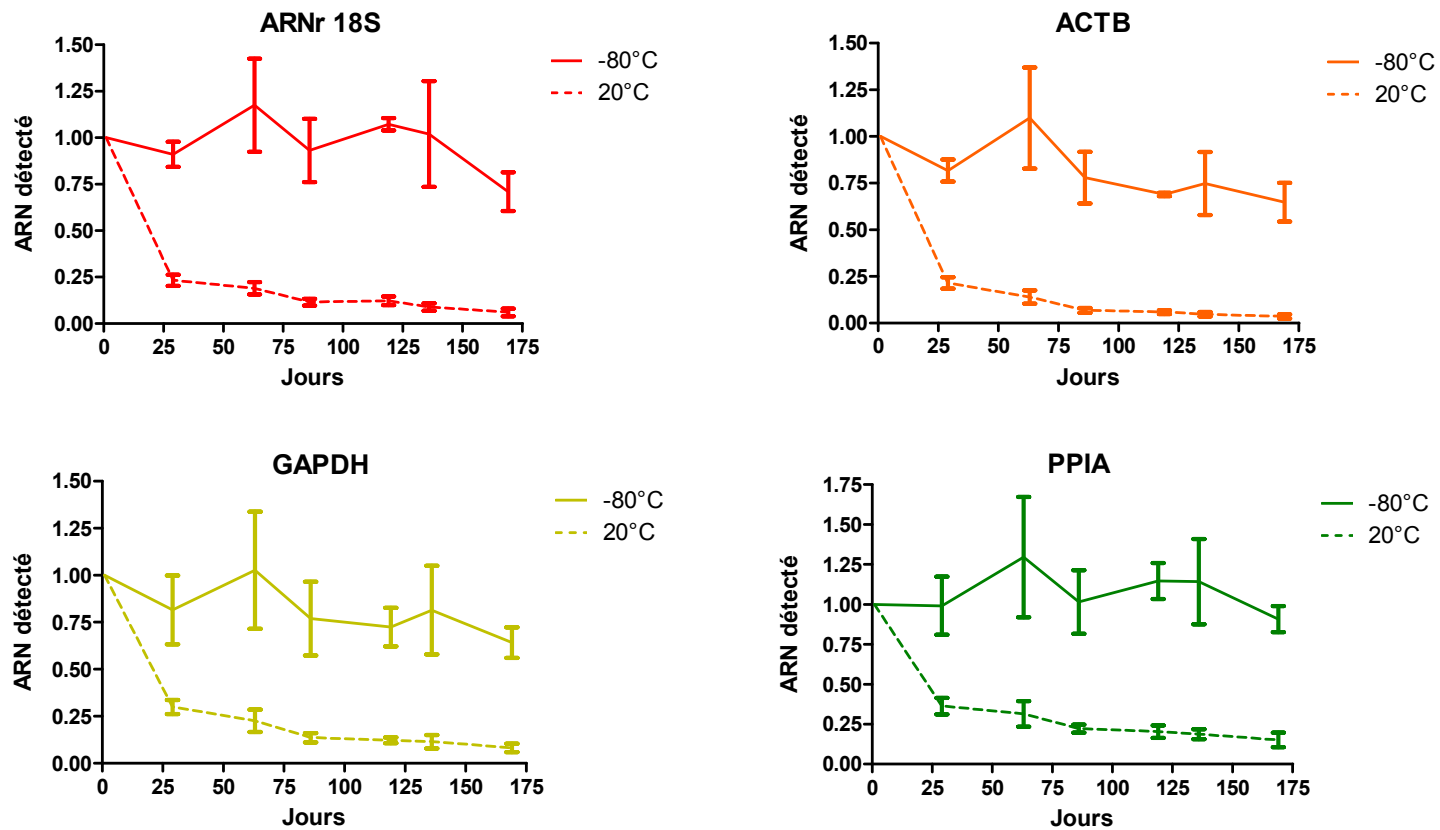
Le ratio ARNm/ARNr mesuré par RT-qPCR est représenté pour les échantillons entreposés à température pièce sur une période de 5 mois. La variabilité entre les donneurs est grande et ne permet pas d'observer des corrélations fiables entre le temps d'entreposage et la détection des ARN.





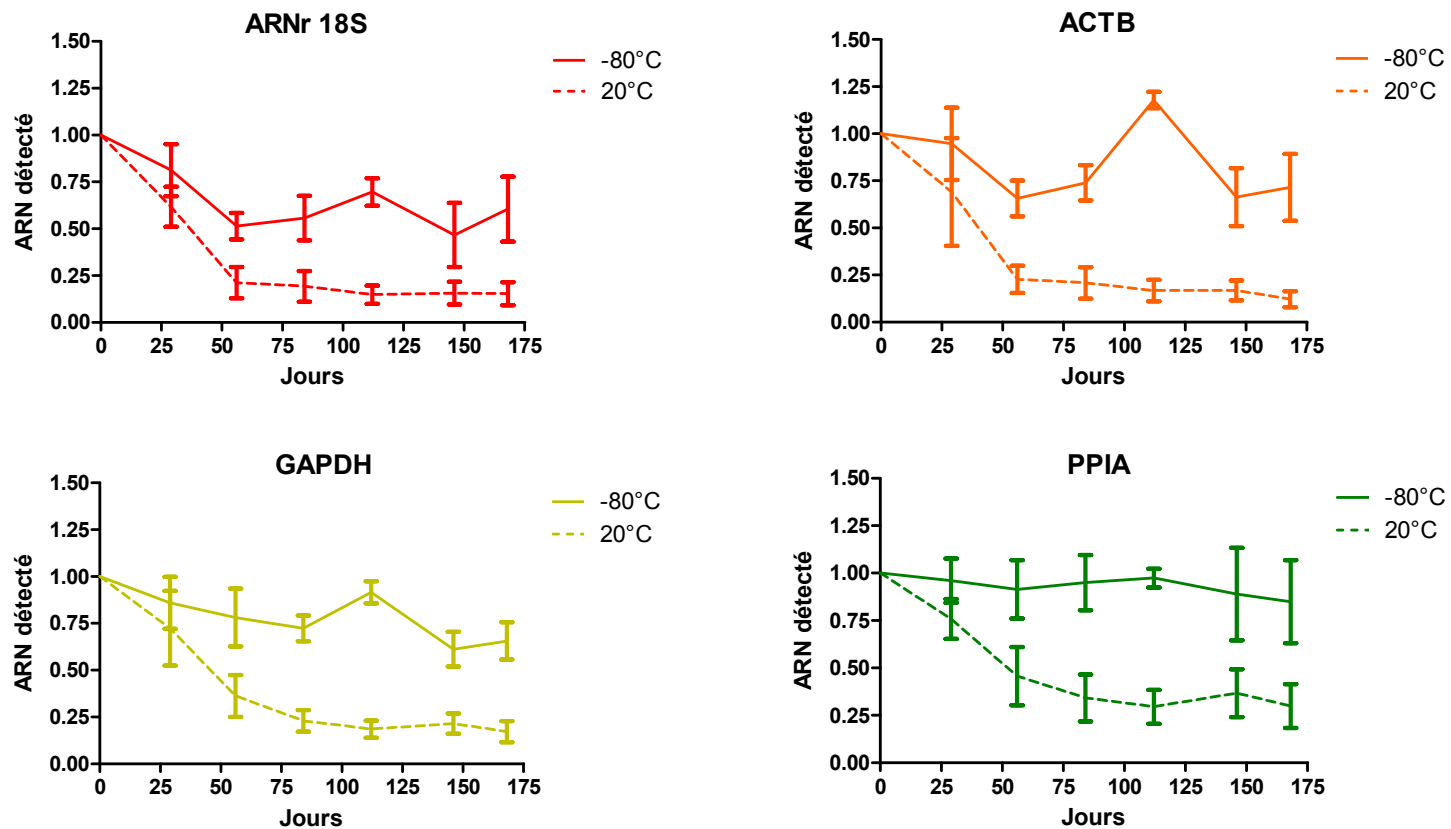
**Figure 5.10 : Profil de dégradation des différents marqueurs pour la salive.**

La quantité d'ARN détectable par RT-qPCR dans les échantillons entreposés à température pièce sur une période de 5 mois. La variabilité entre les donneurs est grande et ne permet pas d'observer des corrélations fiables entre le temps d'entreposage et la détection des ARN.



**Figure 5.11 : Profils de dégradation obtenus selon la température pour le sang.**

La congélation diminue la perte de signal observée par RT-qPCR dans les échantillons entreposés sur une période de 6 mois.



**Figure 5.12 : Profils de dégradation obtenus selon la température pour le sperme.**

La congélation diminue la perte de signal observée par RT-qPCR dans les échantillons entreposés sur une période de 6 mois.

**LISTE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. E. Locard, *Enquête criminelle et méthodes scientifiques*. Ernest Flammarion Éditeur, Paris, 1920.
2. J. Martin, O. Délémont, P. Esseiva, A. Jacquat, *Investigation de scène de crime. Fixation de l'état des lieux et traitement des traces d'objets*, 3e ed. Presses Polytechniques et universitaires romandes, Lausanne (SU), 2010.
3. A. Fontaine, *Intervenir sur la scène d'un crime*, 2e ed. Éditions André Fontaine inc., Rock Forest 2004.
4. L. Prévost, P. Boulanger, A. Lauzon, *Éléments de criminalistique appliquée*, 2e ed. Modulo Éditeur, Mont-Royal, 1990.
5. R. Coquoz, F. Taroni, *Preuve par l'ADN. La génétique au service de la justice*, 2e ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne (SU), 2006.
6. K. Virkler, I.K. Lednev, *Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene*, *Forensic Sci Int.* 188 (2009) 1-17.
7. J. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Academic Press, Burlington 2010.
8. Schwarzacher, *Determination of the age of bloodstains*, *American Journal of Police Sciences* 1. (1930).
9. S. Smith, K. Simpson, *Taylor's principles and practice of medical jurisprudence*, eleventh ed. J. and A. Churchill LTD, London, 1956.
10. J. Gainster, E. Rentoul, *Medical jurisprudence and toxicology*, twelfth ed. E. and S. Livingstone LTD, Edinburgh, 1966.
11. D. Patterson, *Use of Reflectance Measurements in assessing the Colour Changes of Ageing Bloodstains*, *Nature.* 187 (1960) 688-9.

12. R.H. Bremmer, A. Nadort, T.G. van Leeuwen, M.J.C. van Gemert, M.C.G. Aalders, Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy, *Forensic Science International*. 206 (2011) 166-71.
13. S. Strasser, A. Zink, G. Kada, P. Hinterdorfer, O. Peschel, W.M. Heckl, et al., Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy, *Forensic Sci Int*. 170 (2007) 8-14.
14. S.S. Kind, D. Patterson, G.W. Owen, Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method, *Forensic Sci*. 1 (1972) 27-54.
15. S.S. Kind, M. Watson, The estimation of blood stain age from the spectrophotometric properties of ammoniacal blood stain extracts, *Forensic Sci*. 2 (1973) 325-32.
16. E.K. Hanson, J. Ballantyne, A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains, *PLoS One*. 5 (2010) e12830, doi:10.1371/journal.pone.0012830.
17. T. Miki, A. Kai, M. Ikeya, Electron spin resonance of bloodstains and its application to the estimation of time after bleeding, *Forensic Sci Int*. 35 (1987) 149-58.
18. H. Sakurai, K. Tsuchiya, Y. Fujita, K. Okada, Dating of human blood by electron spin resonance spectroscopy, *Naturwissenschaften*. 76 (1989) 24-5.
19. Y. Fujita, K. Tsuchiya, S. Abe, Y. Takiguchi, S. Kubo, H. Sakurai, Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors, *Forensic Sci Int*. 152 (2005) 39-43.
20. K. Rajamannar, Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis, *J Forensic Sci*. 22 (1977) 159-64.
21. J. Andrasko, The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis, *J Forensic Sci*. 42 (1997) 601-7

22. A. Tsutsumi, Y. Yamamoto, H. Ishizu, Determination of the age of bloodstains by enzyme activities in blood cells, *Nihon Hoigaku Zasshi*. 37 (1983) 770-6.
23. A. Marrone, J. Ballantyne, Hydrolysis of DNA and its molecular components in the dry state, *Forensic Science International: Genetics*. 4 (2010) 168-77.
24. J. Dissing, A. Søndervang, S. Lund, Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains, *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 17 (2010) 392-6.
25. A. Fiori, *Detection and Identification of Bloodstains: Methods of Forensic Science*. Interscience, New York, London, 1962.
26. A. Jimenez-Verdejo, E. Osuna, E. Garcia-Olivares, A. Luna, Study of the enzymatic activity of GGT, LDH, PAP and PSA in semen stains: application to age calculation, *Forensic Sci Int*. 68 (1994) 7-15.
27. K. Ackermann, K.N. Ballantyne, M. Kayser, Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction, *Int J Legal Med*. 124 (2010) 387-95.
28. M. Vennemann, A. Koppelkamm, mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations, *Forensic Sci Int*. 203 (2010) 71-5.
29. J.S. Mattick, M.J. Gagen, The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms, *Mol Biol Evol*. 18 (2001) 1611-30.
30. P. Doty, H. Boedtke, J.R. Fresco, R. Haselkorn, M. Litt, Secondary structure in ribonucleic acids, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 45 (1959) 482-99.
31. S.A. Woodson, Metal ions and RNA folding: a highly charged topic with a dynamic future, *Curr Opin Chem Biol*. 9 (2005) 104-9.
32. M.A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G.J. Hannon, R. Parker, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes Dev*. 20 (2006) 515-24.

33. E.M. Hollams, K.M. Giles, A.M. Thomson, P.J. Leedman, mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease, *Neurochem Res.* 27 (2002) 957-80.
34. C.Y. Chen, N. Xu, A.B. Shyu, mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation, *Mol Cell Biol.* 15 (1995) 5777-88.
35. Z. Wang, M. Kiledjian, Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping, *Cell.* 107 (2001) 751-62.
36. M. Oehmichen, K. Zilles, [Postmortem DNA and RNA synthesis. Preliminary studies in human cadavers], *Z Rechtsmed.* 91 (1984) 287-94.
37. M. Bauer, A. Kraus, D. Patzelt, Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *J Forensic Sci.* 44 (1999) 1232-6.
38. M. Bauer, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains?, *Forensic Sci Int.* 138 (2003) 94-103.
39. M. Bauer, D. Patzelt, A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains, *Forensic Sci Int.* 136 (2003) 76-8.
40. A. Bowden, R. Fleming, S. Harbison, A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ system, *Forensic Sci Int Genet.* 5 (2011) 64-8.
41. C. Haas, E. Hanson, W. Bar, R. Banemann, A.M. Bento, A. Berti, et al., mRNA profiling for the identification of blood--results of a collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci Int Genet.* 5 (2011) 21-6.
42. C. Haas, B. Klessner, C. Maake, W. Bar, A. Kratzer, mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Sci Int Genet.* 3 (2009) 80-8.

43. A. Koppelkamm, B. Vennemann, T. Fracasso, S. Lutz-Bonengel, U. Schmidt, M. Heinrich, Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue, *Int J Legal Med.* 124 (2010) 371-80.
44. F.M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascues, A.I. Lamond, The multifunctional nucleolus, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (2007) 574-85.
45. P. Gunning, R. Weinberger, P. Jeffrey, Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis, *Anat Embryol (Berl).* 195 (1997) 311-5.
46. A.V. Bryksin, P.P. Laktionov, Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum, *Biochemistry (Mosc).* 73 (2008) 619-25.
47. S. Obchoei, S. Wongkhan, C. Wongkham, M. Li, Q. Yao, C. Chen, Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer, *Med Sci Monit.* 15 (2009) RA221-32.
48. D. Zubakov, E. Hanekamp, M. Kokshoorn, W. van Ijcken, M. Kayser, Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples, *Int J Legal Med.* 122 (2008) 135-42.
49. J. Juusola, J. Ballantyne, Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification, *Forensic Sci Int.* 135 (2003) 85-96.
50. C. Nussbaumer, E. Gharehbaghi-Schnell, I. Korschineck, Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Sci Int.* 157 (2006) 181-6.
51. J. Juusola, J. Ballantyne, mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *J Forensic Sci.* 52 (2007) 1252-62.
52. M. Bauer, D. Patzelt, Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood, *J Forensic Sci.* 47 (2002) 1278-82.



53. D. Zubakov, M. Kokshoorn, A. Kloosterman, M. Kayser, New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains, *Int J Legal Med.* 123 (2009) 71-4.
54. M. Setzer, J. Juusola, J. Ballantyne, Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains, *J Forensic Sci.* 53 (2008) 296-305.
55. C. Haas, E. Hanson, A. Kratzer, W. Bar, J. Ballantyne, Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood, *Forensic Sci Int Genet.* (2010) doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.006.
56. C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, W. Bar, R. Banemann, A. Berti, et al., RNA/DNA co-analysis from blood stains-Results of a second collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci Int Genet.* (2011) doi:10.1016/j.fsigen.2011.02.004.
57. E.K. Hanson, H. Lubenow, J. Ballantyne, Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs, *Anal Biochem.* 387 (2009) 303-14.
58. D. Zubakov, A.W. Boersma, Y. Choi, P.F. van Kuijk, E.A. Wiemer, M. Kayser, MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation, *Int J Legal Med.* 124 (2010) 217-26.
59. K. Sakurada, H. Ikegaya, H. Fukushima, T. Akutsu, K. Watanabe, M. Yoshino, Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen, *Leg Med (Tokyo).* 11 (2009) 125-8.
60. R.I. Fleming, S. Harbison, The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids, *Forensic Sci Int Genet.* 4 (2010) 244-56.
61. J. Juusola, J. Ballantyne, Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, *Forensic Sci Int.* 152 (2005) 1-12.
62. G. Patel, C. Peel, Identifying the origin of cells, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 1 (2008) 574-6.

63. K. Sakurada, T. Akutsu, H. Fukushima, K. Watanabe, M. Yoshino, Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA, *Forensic Sci Int.* 194 (2010) 80-4.
64. T. Akutsu, H. Ikegaya, K. Watanabe, H. Fukushima, H. Motani, H. Iwase, et al., Evaluation of Tamm-Horsfall protein and uroplakin III for forensic identification of urine, *J Forensic Sci.* 55 (2010) 742-6.
65. M. Visser, D. Zubakov, K.N. Ballantyne, M. Kayser, mRNA-based skin identification for forensic applications, *Int J Legal Med.* 125 (2011) 253-63.
66. T.W. Phang, C.Y. Shi, J.N. Chia, C.N. Ong, Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues, *J Forensic Sci.* 39 (1994) 1275-9.
67. D. Zhao, B.L. Zhu, T. Ishikawa, L. Quan, D.R. Li, H. Maeda, Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials, *Leg Med (Tokyo).* 8 (2006) 132-6.
68. D. Zhao, B.L. Zhu, T. Ishikawa, D.R. Li, T. Michiue, H. Maeda, Quantitative RT-PCR assays of hypoxia-inducible factor-1alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor mRNA transcripts in the kidneys with regard to the cause of death in medicolegal autopsy, *Leg Med (Tokyo).* 8 (2006) 258-63.
69. K. Ikematsu, H. Takahashi, T. Kondo, R. Tsuda, I. Nakasono, Temporal expression of immediate early gene mRNA during the supravital reaction in mouse brain and lung after mechanical asphyxiation, *Forensic Sci Int.* 179 (2008) 152-6.
70. S. Partemi, P.M. Berne, M. Batlle, A. Berruezo, L. Mont, H. Riuró, et al., Analysis of mRNA from human heart tissue and putative applications in forensic molecular pathology, *Forensic Science International.* 203 (2010) 99-105.
71. M. Bauer, I. Gramlich, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval--a pilot study, *Leg Med (Tokyo).* 5 (2003) 220-7.

72. M. Heinrich, S. Lutz-Bonengel, K. Matt, U. Schmidt, Real-time PCR detection of five different "endogenous control gene" transcripts in forensic autopsy material, *Forensic Sci Int Genet.* 1 (2007) 163-9.
73. A. Kimura, Y. Ishida, T. Hayashi, M. Nosaka, T. Kondo, Estimating time of death based on the biological clock, *Int J Legal Med.* 125 (2011) 385-91.
74. M. Heinrich, K. Matt, S. Lutz-Bonengel, U. Schmidt, Successful RNA extraction from various human postmortem tissues, *Int J Legal Med.* 121 (2007) 136-42.
75. Y. Sato, T. Ohshima, The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II), *Int J Legal Med.* 113 (2000) 140-5.
76. M. Takamiya, K. Saigusa, N. Nakayashiki, Y. Aoki, Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination, *Int J Legal Med.* 117 (2003) 46-50.
77. M. Takamiya, K. Saigusa, R. Kumagai, N. Nakayashiki, Y. Aoki, Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation, *Int J Legal Med.* 119 (2005) 16-21.
78. M. Takamiya, S. Fujita, K. Saigusa, Y. Aoki, A study on mRNA expressions of interleukin 10 during fracture healing for wound age determination, *Leg Med (Tokyo).* 10 (2008) 131-7.
79. S. Anderson, B. Howard, G.R. Hobbs, C.P. Bishop, A method for determining the age of a bloodstain, *Forensic Sci Int.* 148 (2005) 37-45.
80. D.H. Owen, D.F. Katz, A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant, *J Androl.* 26 (2005) 459-69.
81. A. Boerke, S.J. Dieleman, B.M. Gadella, A possible role for sperm RNA in early embryo development, *Theriogenology.* 68 Suppl 1 (2007) S147-55.
82. Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis, and UV spectrometry, Publication Number 5988-7650EN, Agilent Application Note, (2002).

83. A. Schroeder, O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC Mol Biol.* 7 (2006) 3.
84. S. Fleige, V. Walf, S. Huch, C. Prgomet, J. Sehm, M.W. Pfaffl, Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR, *Biotechnol Lett.* 28 (2006) 1601-13.
85. T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat Protoc.* 3 (2008) 1101-8.
86. J. Gingrich, T. Rubio, C. Karlak, Effect of RNA degradation on data quality in quantitative PCR and microarray experiments, *Bio-Rad Bulletin* 5452 Rev B. (2008).
87. Y. Xu, W. Jiang, Y. Ping, G. Bi, L.K. Chen, H.G. Zhou, [Determination of bloodstain formation time by RNA analysis], *Fa Yi Xue Za Zhi.* 26 (2010) 340-2.
88. S.E. Anderson, G.R. Hobbs, C.P. Bishop, Multivariate analysis for estimating the age of a bloodstain, *J Forensic Sci.* 56 (2011) 186-93.
89. M. Palmer, E. Prediger, Assessing RNA Quality, *Ambion TechNotes.* 1.
90. P.V. Venkov, A.A. Hadjiolov, Differential stability of 28s and 18s rat liver ribosomal ribonucleic acids, *Biochem J.* 115 (1969) 91-4.
91. C. Hampson, J. Louhelainen, S. McColl, An RNA expression method for aging forensic hair samples, *J Forensic Sci.* 56 (2011) 359-65.
92. N.L. van Doorn, A.S. Wilson, E. Willerslev, M.T. Gilbert, Bone Marrow and Bone as a Source for Postmortem RNA\*, *J Forensic Sci.* 56 (2011) 720-5.
93. R. Garrett, C. Grisham, *Biochimie*, 2e ed. De Boeck Université, Paris, 2000.
94. RNeasy® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution, P/N 7020M Revision E, Ambion, (2010).
95. J. Huggett, K. Dheda, S. Bustin, A. Zumla, Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Genes Immun.* 6 (2005) 279-84.

96. M. Vennemann, A. Koppelkamm, Postmortem mRNA profiling II: Practical considerations, *Forensic Sci Int.* 203 (2010) 76-82.
97. I.V. Yang, Use of external controls in microarray experiments, *Methods Enzymol.* 411 (2006) 50-63.
98. M. Cronin, K. Ghosh, F. Sistare, J. Quackenbush, V. Vilker, C. O'Connell, Universal RNA reference materials for gene expression, *Clinical Chemistry.* 50 (2004) 1464-71.

