

Université du Québec à Trois-Rivières

Analyse de la dégradation des traces de sang par méthodes spectroscopiques

Mémoire présenté  
comme exigence partielle de la  
Maîtrise en science forensique

*Par*  
Laurianne Huard

Janvier 2024

© 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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



Université du Québec à Trois-Rivières

Programme en science forensique

---

*Ce mémoire (ou cette thèse) intitulé(e)*

**Analyse de la dégradation des traces de sang par méthodes spectroscopiques**

*Présenté par*

**Laurianne Huard**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Cyril Muehlethaler**

Directeur de recherche

**Frank Crispino**

Codirecteur

**Benoit Daoust**

Membre du jury

**Andy Bécue**

Membre du jury



## Résumé

Le sang est l'un des types de traces les plus souvent rencontré sur les scènes de crime. Cependant, d'un point de vue forensique, le potentiel des traces de sang n'est toujours pas complètement exploité, puisqu'il n'existe pas encore de technique fiable pour la datation des traces de sang retrouvées sur les scènes. Les mêmes difficultés sont citées dans la littérature pour les recherches publiées sur les traces de sang : les mécanismes de la dégradation du sang sont connus et validés, mais les traces retrouvées sur les scènes ne sont pas des échantillons contrôlés. Les traces doivent donc être évaluées en considérant cette incertitude et les facteurs pouvant exercer une influence sur le modèle de datation des traces de sang. Au cours de ce projet, nous avons évalué l'importance des effets environnementaux, soit la température (10 à 40°C), l'humidité (25 à 75%) et le rayonnement (aucun et maximal) à l'aide de trois techniques spectroscopiques différentes, soit la spectroscopie Raman, la spectroscopie MicroNIR et l'imagerie hyperspectrale. L'utilisation d'une enceinte climatique avec ajout de lampes DEL (lumière du jour et UV) a permis de contrôler les paramètres durant un vieillissement de 3 jours pour chaque échantillon. Au moyen d'un design expérimental de screening des trois facteurs à 2 niveaux, nous avons pu observer une complémentarité entre les méthodes utilisées. La spectroscopie Raman a davantage fait ressortir les influences dues à la température, la spectroscopie MicroNIR a quant à elle permis de renseigner sur l'influence de la température ainsi que l'humidité relative et l'imagerie hyperspectrale a permis de démontrer l'influence de la température et de la présence de rayonnement. Ces résultats permettent donc de mieux comprendre les facteurs faisant dévier le modèle de dégradation du sang et donc de pouvoir développer un modèle plus compréhensif de ces facteurs.

**Mots-clés** : Science forensique, sang, dégradation, datation, Raman, proche infra-rouge, imagerie hyperspectrale, design expérimental.



## Abstract

Blood is one of the most common types of trace found at crime scenes. However, from a forensic point of view, the potential of blood traces is still not fully exploited, as there is as yet no reliable technique for dating blood traces found at scenes. The same difficulties are cited in the literature for published research on blood traces: the mechanisms of blood degradation are known and validated, but traces found at scenes are not controlled samples. Traces therefore need to be evaluated in the light of this uncertainty and the factors that can influence the blood trace dating model. In the course of this project, we assessed the significance of the environmental effects of temperature (10 to 40°C), humidity (25 to 75%) and radiation (none and maximum) using three different spectroscopic techniques: Raman spectroscopy, MicroNIR spectroscopy and hyperspectral imaging. The use of a climatic chamber with the addition of LED lamps (daylight and UV) enabled parameters to be controlled during a 3-day aging period for each sample. By means of a 2-level experimental screening design of the three factors, we were able to observe complementarity between the methods used. Raman spectroscopy highlighted the influence of temperature, MicroNIR spectroscopy provided information on the influence of temperature and relative humidity, and hyperspectral imaging demonstrated the influence of temperature and the presence of radiation. These results provide a better understanding of the factors that cause the blood degradation model to deviate, enabling us to develop a more comprehensive model of these factors.

**Keywords:** Forensic science, blood, degradation, time-since-deposition, Raman spectroscopy, near-infrared, hyperspectral imaging, design of experiments.



# Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table des matières .....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations .....	17
Remerciements .....	19
Introduction .....	21
Contexte .....	21
Objectif.....	22
Chapitre 1 – Historique et état des lieux .....	25
Revue de littérature .....	25
Datation du sang .....	25
Influence des facteurs environnementaux .....	26
Méthodes d’analyse .....	27
Théorie .....	28
Processus de dégradation du sang .....	28
Design expérimental.....	29
Spectroscopie NIR.....	31
Spectroscopie Raman .....	32

Imagerie hyperspectrale.....	33
Analyse en composante principale .....	34
Chapitre 2 – Méthodologie.....	35
Matériel et méthode .....	35
Échantillonnage .....	35
Optimisation des méthodes d’analyse.....	35
Protocole et appareillage .....	37
Traitement des données.....	39
Chapitre 3 – Résultats.....	41
Photographie.....	41
Spectroscopie NIR .....	42
Spectroscopie Raman .....	52
Imagerie hyperspectrale.....	62
Chapitre 4 – Discussion .....	75
Interprétation des résultats.....	75
Photographie.....	75
Spectroscopie MicroNIR .....	76
Spectroscopie Raman .....	79
Imagerie hyperspectrale.....	81
Limitations.....	83
Importance pour la pratique .....	84
Prochaines étapes .....	85
Conclusion .....	89

Perspectives ..... 90

Références bibliographiques ..... 93

Annexes ..... 97



## Liste des tableaux

Tableau 1. Exemple de matrice de design expérimental factoriel de trois facteurs à deux niveaux .....	30
Tableau 2. Design expérimental factoriel de trois facteurs à deux niveaux.....	37
Tableau 3. Matrice de design expérimental pour le pic à 1450 nm des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.....	50
Tableau 4. Matrice de design expérimental pour le pic à 1645 nm des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.....	51
Tableau 5. Matrice de desgin expérimental pour le pic à 1648 cm <sup>-1</sup> des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.....	60
Tableau 6. Matrice de desgin expérimental pour le pic à 1585 cm <sup>-1</sup> des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.....	61
Tableau 7. Matrice de desgin expérimental pour le pic à 675 nm des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang .....	69
Tableau 8. Matrice de design expérimental pour le pic à 580 nm des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang .....	70



## Liste des figures

Figure 1. Processus de dégradation de l'hémoglobine lors du vieillissement ex vivo du sang [1]. .....	29
Figure 2. Photographies des traces de sang en ordre croissant de la plus rouge vif à la plus brunâtre .....	41
Figure 3. Spectres MicroNIR des cinq répliques acquies à différents endroits sur l'échantillon #1 sur une échelle arbitraire .....	43
Figure 4. Spectres MicroNIR moyens de chaque échantillon de sang ayant été laissé à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire. ....	44
Figure 5. Spectres MicroNIR moyens prétraités de chaque échantillon de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire.....	45
Figure 6. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des répliques des huit différents échantillons de sang. ....	46
Figure 7. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang. ....	47
Figure 8. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.....	48
Figure 9. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.....	49
Figure 10. Spectres Raman des cinq répliques de l'échantillon #1 sur une échelle arbitraire.....	53
Figure 11. Spectres Raman moyens des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire.....	54
Figure 12. Spectres Raman moyens prétraités de chaque échantillon de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire.....	55
Figure 13. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres Raman des répliques des huit différents échantillons de sang. ....	56
Figure 14. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang .....	57

Figure 15. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.....	58
Figure 16. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.....	59
Figure 17. Schéma de la surface couverte par les hypercubes de l'imagerie hyperspectrale sur la trace. ....	62
Figure 18. Spectres de l'imagerie hyperspectrale moyens des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire.....	63
Figure 19. Spectres de l'imagerie hyperspectrale moyens prétraités des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire .....	64
Figure 20. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des réplicas des huit différents échantillons de sang.....	65
Figure 21. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang.....	66
Figure 22. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang. ....	67
Figure 23. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang. ....	68

## Liste des sigles et abréviations

DeoxyHB : désoxyhémoglobine

HC : hémichrome et hémochrome

MetHB : méthémoglobine

NIR : *near-infrared* (proche infrarouge)

OxyHB : oxyhémoglobine

PCA : *principal component analysis* (analyse en composante principale)



## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes deux co-directeurs de recherche, les professeurs Cyril Muehlethaler et Frank Crispino de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), pour leur soutien et leurs précieux conseils tout au long du déroulement de ce projet.

Je tiens aussi à remercier le Conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG) ainsi que les Fonds de recherche du Québec en nature et technologies (FRQNT) pour le financement de ce projet par l'octroi de bourses de recherche de maîtrise.

Finalement, je souhaite remercier le professeur Andy Bécue de l'Université de Lausanne (UNIL) pour son accueil et son soutien dans le cadre d'un séjour de recherche à l'étranger pour la collecte de données pour ce projet.



# Introduction

## Contexte

La question de temps et de datation des traces est un problème qui passionne les experts depuis longtemps. Les forensiens tentent de reconstruire les événements du passé, en utilisant les propriétés physicochimiques des traces retrouvées [1, 2]. Ils peuvent ainsi montrer une association entre une trace et une source, voire entre une trace et une activité. La question de dater précisément le moment où une trace a été déposée est cependant beaucoup plus compliquée. Une différence de quelques jours peut permettre de distinguer une trace liée au crime ou au contraire une déposition licite ayant été effectuée préalablement aux événements investigués. Cette défense est d'ailleurs de plus en plus utilisée par les défendants au tribunal [1], et les experts sont actuellement démunis car ils ne peuvent pas estimer l'intervalle de temps précisément. Ce manquement est d'autant plus important que le sang est l'un des types de traces les plus souvent rencontrés sur les scènes de crime [1]. Cependant, d'un point de vue forensique, le potentiel des traces de sang n'est toujours pas complètement exploité [1]. Malgré les quelques avancements dans le domaine au cours des dernières années par différents groupes de recherche [1, 3-10], il n'existe pas encore de technique fiable pour la datation des traces de sang retrouvées sur les scènes. Ce problème est d'ailleurs souvent cité dans la littérature spécialisée comme étant la quête du Saint Graal [1]. En effet, une estimation précise de l'âge d'une tache de sang pourrait fournir un lien temporel entre la tache de sang et la commission d'un crime, et renforcer le poids de la preuve par une unité de temps, de lieu, et d'action [11, 12].

Lorsqu'une tache de sang se dégrade à l'air libre, elle subit plusieurs transformations physicochimiques soit principalement : un changement de la couleur, du rouge au brun foncé, un changement de la configuration de l'hémoglobine, ainsi qu'un changement physique des globules rouges [4]. Étant donné que ces changements dépendent du temps, les proportions des différentes configurations de l'hémoglobine peuvent être utilisées pour estimer l'âge d'une tache de sang [5]. Les recherches publiées sur la datation du sang ont toutes fait face aux mêmes difficultés : les principes physico-chimiques de la dégradation sont connus et validés, mais les

traces ne sont pas des échantillons contrôlés dont les propriétés sont connues et maîtrisées. Au contraire, elles sont déposées dans des conditions souvent chaotiques (agression, meurtre), et sont très souvent imparfaites, de mauvaise qualité, contaminées et/ou dégradées. Les études précédentes ont évalué que l'environnement direct des traces (intérieur/extérieur, température, humidité, vent ...) avait une influence directe sur la dynamique de dégradation, et qu'il était ainsi très difficile de développer des modèles de datation précis [3, 5]. Les traces doivent être évaluées en considérant cette incertitude, puisqu'on ne sait pas quels éléments ont pu exercer une influence sur celles-ci entre leur déposition et leur détection.

## **Objectif**

Ce projet vise à évaluer l'influence des paramètres environnementaux, soit la température, l'humidité relative et le rayonnement, sur la dégradation des traces de sang. Une compréhension de ces facteurs pourrait permettre d'évaluer de quelle façon les différents paramètres viennent modifier la dynamique de dégradation du sang, et donc ainsi les modèles de datation du sang. De plus, l'influence de ces facteurs environnementaux sera analysée entre des valeurs minimales et maximales pour chaque facteur afin de mieux comprendre la dynamique de dégradation aux limites inférieures et supérieures correspondant aux conditions environnementales qui sont susceptibles d'être rencontrées sur une scène de crime intérieure. Cela permet d'obtenir un modèle plus large adapté aux changements de conditions, contrairement à un modèle trop précis qui ne fonctionne plus dans des conditions environnementales différentes.

Un second objectif de ce projet consiste à développer et valider des méthodes d'analyse spectroscopiques pour l'analyse de la dégradation du sang, soit la spectroscopie proche infrarouge (MicroNIR), la spectroscopie Raman et l'imagerie hyperspectrale, et de déterminer les méthodes les plus appropriées pour ce type d'analyse. Ces méthodes sont rapides, simples et non destructives et ont en plus la possibilité d'être portatives. Le développement d'une méthode utilisant ces techniques pour l'analyse de la dégradation du sang permettrait donc de valider l'utilisation de techniques spectroscopiques pouvant être utilisées directement sur les scènes de

crime, et qui ne sont pas destructives pour les traces, permettant alors les analyses forensiques successives.



# Chapitre 1 – Historique et état des lieux

## Revue de littérature

### Datation du sang

La question de temps demeure au centre des investigations en science forensique [1, 13]. En effet, l'estimation de l'âge de toute trace est une précieuse information pour la reconstruction des événements dans les enquêtes. En effet, la datation de différents types de traces est une quête qui a été entreprise par beaucoup de chercheurs, que ce soit pour les encres, les traces digitales ou même les éléments de munitions [14-16]. Avant 2011, peu d'études s'étaient penchées sur la question de la datation du sang [1]. Cependant, au cours de la dernière décennie, de plus en plus de chercheurs se sont concentrés sur la problématique, sans toutefois qu'une méthode fiable n'ait encore été développée. Parmi celles-ci, il existe un réel consensus quant à l'importance de la détermination de l'âge d'une trace de sang retrouvée sur une scène de crime et le besoin de développer une méthode de datation. Ces études tentent de développer des méthodes d'analyses fiables et appropriées à la datation du sang. Toutefois, un problème majeur a été rencontré par la majorité de ces chercheurs, ou bien une faille évidente demeure dans certaines études : une trace n'est pas un échantillon contrôlé [17]. En effet, plusieurs facteurs incontrôlables et parfois même inconnus au moment de la détection de la trace interviennent dans le processus de dégradation du sang, et aucune étude n'a pu développer un modèle de datation en tenant compte de ces différents facteurs. Ceux-ci sont, entre autres, les facteurs environnementaux (température, humidité et rayonnement) et leurs fluctuations, le type de surface sur laquelle le sang a été déposé et le type de sang du donneur.

## **Influence des facteurs environnementaux**

Les traces de sang en contexte criminalistique sont laissées dans des conditions incontrôlées, sur différents types de surfaces et proviennent de sources variables. Les plus gros obstacles à la datation du sang sont donc les facteurs influençant la dégradation de celui-ci. Ils peuvent être séparés en trois catégories générales, soit : l'influence du substrat, la variabilité dans la composition du sang et l'influence des facteurs environnementaux [1]. Cependant, dans un souci de temps et de ressources, l'influence du substrat et la variabilité dans la composition du sang ne seront pas des facteurs évalués au cours de cette recherche. Les efforts seront concentrés sur l'influence des facteurs environnementaux, qui jouent le rôle le plus important dans la variabilité de la dégradation du sang [1].

Les facteurs environnementaux peuvent être divisés en trois paramètres, soit la température, l'humidité relative et l'exposition à un rayonnement. Les changements chimiques subis par les molécules d'hémoglobine au cours de la dégradation sont dépendants de la température, donc il est impératif de reconnaître l'influence de celle-ci sur le vieillissement d'une trace. En règle générale, il a été déterminé que l'augmentation de la température accélère la dégradation d'une trace, soit autant l'accélération de la vitesse de l'étape d'oxydation de l'oxyhémoglobine (oxyHB) en méthémoglobine (metHB) que la transition du metHB en HC [3]. De plus, l'humidité relative de l'environnement dans lequel la trace se trouve est aussi un paramètre affectant son vieillissement. Selon Bremmer et al. [3], l'humidité n'aurait pas d'incidence sur l'oxydation du oxyHB en metHB, mais jouerait un rôle très important dans la conversion du metHB en HC. Plus l'humidité relative est importante, plus la transition de metHB en HC serait ralentie. D'ailleurs, un taux d'humidité de 100% empêche complètement la formation de HC [18]. Pour ce qui est de l'influence du rayonnement électromagnétique, les différentes études conduites au cours des dernières années ont reçu des résultats contradictoires. Selon Bauer et al. [19], la présence d'un rayonnement solaire aurait peu d'incidence sur la vitesse de dégradation, alors que Fujita et al. [20] ont observé que le taux de dégradation augmente lorsque la trace est exposée à une source de lumière naturelle. Pour les sources de lumières artificielles, comme les fluorescents, l'impact du rayonnement est toujours indéterminé, puisque certaines études comme celle de Bauer et al. [19] n'ont observé aucune influence sur la dégradation du sang, alors que d'autres comme celle

d'Inoue et al. [21] ont observé des changements dans la vitesse de dégradation seulement lorsque le rayonnement était couplé à une température élevée.

## **Méthodes d'analyse**

Les premières approches de datation du sang [22] utilisaient la comparaison visuelle du changement de la couleur du sang, du rouge vif vers le brun foncé. Cette méthode était dépendante de la perception qualitative des couleurs, sans moyen de caractériser quantitativement ce changement de couleur. Avec les progrès technologiques et scientifiques, cette méthode a rapidement été remplacée par des méthodes spectrophotométriques, chromatographiques et/ou spectroscopiques [1]. Les progrès les plus significatifs dans la quête de la datation du sang ont eu lieu plus récemment, après 2011 [1]. En effet, les méthodes spectroscopiques s'avèrent être les plus appropriées pour ce type d'analyse [3] et la popularité grandissante de la spectroscopie parmi la communauté scientifique a permis une progression rapide. Les méthodes spectroscopiques vibrationnelles, couplées à des méthodes d'extraction et de traitement de données statistiques et chimiométriques, sont des méthodes hautement sensibles et reproductibles, en plus d'être non destructives, ce qui les rendent appropriées pour l'analyse du sang en contexte forensique [12]. Les méthodes les plus utilisées et les plus appropriées sont la spectroscopie Raman, la spectroscopie NIR (proche infrarouge) et l'imagerie hyperspectrale.

D'ailleurs, l'utilisation de méthodes d'analyse portatives pouvant être utilisées directement sur la scène de crime est à privilégier pour ce type d'analyse, puisqu'elles permettent d'obtenir une mesure au moment même de la détection d'une trace de sang, en plus d'éviter de prendre en compte le temps et les conditions de transport et d'entreposage pour les analyses successives. De plus, puisque l'étape de la conversion du metHB en hémichromes lors de sa dégradation est réversible à l'hydratation, l'utilisation d'un coton-tige imbibé d'eau au moment de la collecte de la trace viendrait fausser l'état réel de dégradation dans lequel le sang a été trouvé.

Les étapes de traitement des données sont sous-estimées par les chercheurs, mais elles sont indispensables à l'analyse des données spectrales obtenues. En effet, les spectres obtenus sont

le résultat de non seulement la composition chimique des échantillons de sang, mais aussi de ses propriétés physiques pouvant affecter l'interaction de l'échantillon avec la lumière, telles que la taille des érythrocytes ou bien l'épaisseur et la rugosité de la tache de sang [2]. Le prétraitement des données spectrales permet donc de contrer ce phénomène en retirant le bruit et les variations entre les spectres résultant de causes non chimiques. Les prétraitements peuvent être appliqués aux spectres individuellement ou bien à l'entièreté d'un jeu de données, et servent à corriger ou bien améliorer les spectres [23-25]. Les prétraitements de correction incluent la normalisation et la technique de centrer-réduire, entre autres, alors que les prétraitements d'amélioration incluent l'application de dérivées, de correction de la ligne de base et du lissage des spectres.

## **Théorie**

### **Processus de dégradation du sang**

La datation du sang est un concept théoriquement possible en raison du processus de dégradation qui est subit par une trace de sang. Ce processus débute dès que le sang est exposé à l'air, et donc dès sa sortie du corps (*ex vivo*). Les changements initiaux consistent à l'évaporation de l'eau contenue dans le sang et la coagulation, ce qui augmente la viscosité [26, 27]. Une fois l'eau évaporée, ce sont les globules rouges qui forment la majorité de la tache de sang sèche, et ceux-ci sont composés à 90% d'hémoglobine [27]. Les changements de l'hémoglobine constituent donc la majeure partie du processus de dégradation du sang et est donc le composé ciblé pour l'évaluation de la dégradation du sang. Ces changements consistent d'abord en la saturation du deoxyHB en oxyHB au contact de l'oxygène ambiant, puis en l'auto-oxydation du oxyHB en metHB. Ensuite, l'étape de dénaturation qui suit est un changement de conformation du metHB pour former des hémochromes et des hémichromes. Cette étape est réversible avec la réhydratation du sang. Donc, cette dénaturation est plus susceptible de survenir lorsque l'humidité est basse [18]. Les connaissances sur le processus de dégradation *ex vivo* du sang sont

toujours superficielles, la durée de chacune de ces étapes demeure donc inconnue. La figure 1 ci-dessous illustre le processus de dégradation de l'hémoglobine.

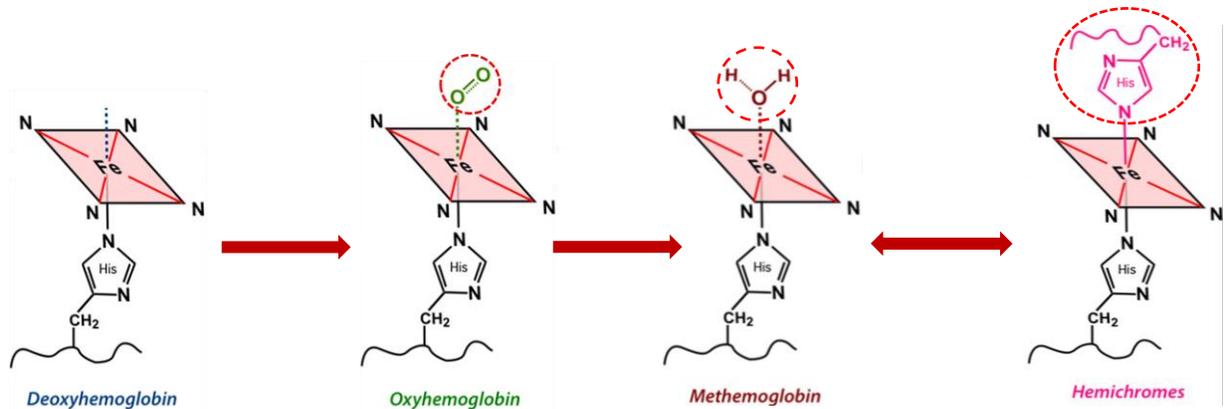


Figure 1. Processus de dégradation de l'hémoglobine lors du vieillissement ex vivo du sang [1].

## Design expérimental

La méthode du design expérimental a été priorisée pour la réalisation des expériences, afin d'optimiser le nombre d'expériences conduites et de plus rapidement découvrir l'influence de chaque paramètre sur la dégradation du sang et les possibles interactions entre eux [28-31]. En effet, en débutant par un design de *screening* factoriel à deux niveaux, il est possible de faire varier les trois facteurs (température, humidité et rayonnement) entre un niveau minimum et un niveau maximum. Pour un tel design factoriel, le nombre d'expériences nécessaires est décrit par  $2^k$ , où  $k$  est le nombre de facteurs étudiés [30]. Donc, dans le cas de cette étude où trois facteurs sont évalués, le nombre d'expériences est  $2^3$ , soit seulement 8 en tout. L'influence de chaque paramètre étudié sur les réponses obtenues peut être ensuite calculée pour chaque technique d'analyse. De plus, en utilisant un design expérimental faisant varier les trois paramètres entre un niveau haut et un niveau bas, il est possible d'obtenir un modèle compréhensif se trouvant entre deux extrêmes représentant les limites de température, humidité et rayonnement les plus souvent attendues pour les scènes de crime, au lieu d'un modèle trop précis qui est seulement

adapté à des conditions environnementales précises. La matrice de design est construite selon la figure suivante.

Tableau 1. Exemple de matrice de design expérimental factoriel de trois facteurs à deux niveaux

Expérience	Linéaire			Interactions				Réponse
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	
1	-	-	-	+	+	+	-	R1
2	-	-	+	+	-	-	+	R2
3	-	+	-	-	-	+	+	R3
4	-	+	+	-	+	-	-	R4
5	+	-	-	-	+	-	+	R5
6	+	-	+	+	-	+	-	R6
7	+	+	-	-	-	-	-	R7
8	+	+	+	+	+	+	+	R8
Influence								

Les influences des colonnes linéaires représentent l'influence directe de chaque facteur (A, B, C), et les signes positifs ou négatifs signifient le niveau de chaque paramètre, soit le niveau minimum (-) ou maximum (+). Les colonnes des interactions (AB, BC, AC, ABC) représentent les influences des interactions entre les paramètres. Les signes sont calculés en multipliant les signes des niveaux des facteurs pour chaque case correspondante. Par exemple, A (-) et B (-) résultent en une interaction AB (+), puisque -1 multiplié par -1 est +1. La colonne de réponse correspond à la valeur d'un pic sélectionné comme réponse du spectre pour chaque expérience. Finalement, le coefficient d'influence (b) est calculé pour chaque colonne en faisant la moyenne des réponses avec le signe correspondant (+ ou -) devant chaque réponse. Par exemple, pour l'influence de la première colonne, soit le facteur A, le calcul se ferait de cette façon :

$$b = \frac{(-R1 - R2 - R3 - R4 + R5 + R6 + R7 + R8)}{8}$$

## Spectroscopie NIR

La spectroscopie NIR est une méthode spectroscopique qui permet de renseigner sur la composition chimique de certaines substances, dans un domaine spectral proche-infrarouge de 800 nm à 2500 nm [32]. Le MicroNIR, soit l'appareil utilisé dans le cadre de cette recherche, opère dans un domaine allant de 900 nm à 1700 nm. La spectroscopie NIR est basée sur les différentes vibrations moléculaires des composés lors de leur irradiation à l'aide d'une source lumineuse [32].

Les bandes obtenues dans les spectres NIR correspondent à l'absorption des vibrations moléculaires de composés chimiques, surtout pour les liaisons -OH, -CH, -NH et -SH dans le sang. Les bandes d'absorption obtenues peuvent donc permettre de comparer la présence et la concentration de certains composés dans la trace de sang, selon le niveau de dégradation. L'eau est un composé qui contribue grandement aux spectres NIR, formant de larges bandes d'absorption notamment dans la région de 1300 nm à 1600 nm [8]. Comme le processus de dégradation du sang implique l'évaporation de l'eau au sein de la trace, l'intensité de ces bandes peut renseigner sur la dégradation du sang à cette étape d'évaporation. De ce fait, la spectroscopie NIR pourrait donc permettre d'évaluer comment les conditions environnementales d'humidité relative influencent le niveau de dégradation. De plus, la diminution des bandes d'absorption de l'eau avec le temps ou selon les conditions d'humidité permet de révéler d'autres bandes associées aux changements de l'hémoglobine qui ne sont pas présentes sur du sang frais. Plus particulièrement, la formation de méthémoglobine (metHb) induit des changements dans la région autour de 1460 nm à 1800 nm [8, 33].

L'analyse de spectres NIR doit être combinée à des techniques de prétraitement des données afin d'optimiser les résultats. En effet, les spectres NIR obtenus sont généralement formés de larges courbes sans pics qui sont clairement définis. Les variations entre différents échantillons, comme de légers épaulements entre les larges courbes, sont donc peu visibles. C'est pourquoi un des prétraitements les plus utilisés est l'application de dérivées sur les spectres [25]. La première dérivée d'un spectre NIR représente donc la pente de la droite tangente de la courbe sur l'ensemble du spectre. Cela permet donc d'augmenter la résolution en obtenant des pics définis

et aussi de corriger la ligne de base. Cependant, il n'est plus possible d'interpréter les pics suite à l'application de la dérivée puisque les pics obtenus constituent l'intensité de la pente des courbes et non l'endroit réel de la courbe des spectres bruts.

## **Spectroscopie Raman**

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse de spectroscopie vibrationnelle. L'échantillon est irradié à l'aide d'un laser, ce qui entraîne l'émission de photon par le phénomène de diffusion. La perte ou le gain d'énergie de ces photons émis par rapport à ceux du laser incident est ensuite traduit en déplacement de fréquence Raman représenté sur les spectres. Le signal Raman obtenu cible la polarisabilité des molécules, alors que la spectroscopie infrarouge cible la polarisation des molécules [34]. Donc, ces deux méthodes d'analyse sont complémentaires. Alors que les molécules d'eau sont facilement détectées par la spectroscopie NIR, celles-ci sont très faiblement diffusées en Raman [35], contrairement aux érythrocytes qui sont quant à eux fortement diffusés. La spectroscopie Raman permet donc d'obtenir des informations qui pourraient potentiellement être camouflées par l'eau avec la spectroscopie NIR. L'utilisation de la spectroscopie Raman pour l'analyse du sang a révélé que les spectres permettent de renseigner sur le niveau d'oxygénation de l'hémoglobine et l'état de spin des atomes de fer dans les globules rouges [35, 36]. La partie de la structure de l'hémoglobine ciblée par les pics est majoritairement l'anneau porphyrine dans l'hème [36]. De façon générale, les intensités relatives des pics Raman diminuent graduellement dans le temps, ce qui est associé avec les changements subis par l'hémoglobine lors de la dégradation du sang [37]. Il est aussi important de bien choisir les paramètres du laser en spectroscopie Raman. En effet, le laser le plus souvent utilisé pour l'analyse du sang est le plus énergétique, soit celui d'une longueur d'onde de 532 nm. Cependant, les autres paramètres doivent être choisis pour limiter la possibilité d'une dégradation artificielle causée par l'irradiation du sang par le laser. Il faut donc prioriser l'utilisation d'une puissance d'exposition faible couplée à un temps d'exposition plus long [38].

L'utilisation de prétraitements est aussi une étape cruciale de l'analyse spectrale en spectroscopie Raman. La méthode de prétraitement la plus souvent utilisée pour le traitement des données

spectrales Raman est la méthode *standard normal variate* (SNV). Le calcul appliqué individuellement sur chacun des spectres du jeu de données est la soustraction de chaque variable par la valeur moyenne du spectre, suivi d'une division par l'écart-type du spectre. Cette méthode est d'ailleurs généralement couplée à une méthode de *detrending*, qui est une correction de la ligne de base. Ces deux opérations permettent de corriger les erreurs de diffusion dans les spectres, qui peuvent être dues à des causes non chimiques, telles que l'épaisseur et l'irrégularité de la surface de l'échantillon [23].

### **Imagerie hyperspectrale**

L'imagerie hyperspectrale est une technique d'analyse simple et rapide qui permet d'obtenir des spectres d'absorbance/réflectance de la surface analysée dans le domaine du visible et proche infra-rouge (400 nm à 1000 nm) [11]. Une source lumineuse, soit une lampe halogène, illumine la surface et le détecteur de la caméra hyperspectrale enregistre un ensemble d'images superposées les unes sur les autres, correspondant à un hypercube. Chacune des images empilées de l'hypercube correspond en fait à une longueur d'onde d'une bande spectrale [9]. Il est donc possible d'obtenir le spectre complet (composé de toutes les bandes spectrales) d'un pixel de l'image spectrale acquise en un point précis de l'image, et d'ensuite sélectionner les pixels pertinents à analyser. En l'occurrence, il est possible d'obtenir le spectre complet de tous les pixels correspondant à la trace de sang sur une image hyperspectrale de l'échantillon analysé.

Dans le domaine visible et proche infra-rouge du spectre électromagnétique (400 nm à 1000 nm), le sang présente des bandes d'absorption de l'hémoglobine autour de 420 nm, 540 nm et 577 nm [9], en plus d'une forte absorbance après 700 nm [9], correspondant à la couleur rouge dans le spectre visible. Ces bandes peuvent donc permettre d'évaluer le comportement l'hémoglobine au cours de la dégradation selon les différentes conditions environnementales, en plus d'évaluer le changement de couleur qui survient lors de la dégradation.

Les spectres NIR-VIS obtenus sont ensuite aussi prétraités afin d'améliorer la résolution et de corriger les erreurs dues à des variations non chimiques de l'échantillon. Tout comme les spectres NIR, l'utilisation de dérivées est la technique de choix pour le prétraitement des spectres obtenus

par imagerie hyperspectrale. L'application de la dérivée première permet de corriger la ligne de base et d'augmenter la résolution en obtenant des pics définis. Elle est aussi suivie d'une méthode *standard normal variate* (SNV) pour corriger les erreurs de diffusion [25].

### **Analyse en composante principale**

L'analyse en composante principale (PCA, *principal component analysis*) est une méthode d'analyse multivariée utilisant des statistiques multidimensionnelles. Elle est utilisée afin de traiter un grand nombre de variables en même temps. Elle permet de déterminer quelles variables sont les plus pertinentes, comprendre de quelle façon ces variables contribuent à la séparation entre les échantillons, réduire la dimensionnalité en prenant en compte les variables qui sont corrélées et en éliminant les variables non pertinentes, par exemple du bruit de fond [39]. La PCA permet de produire un *score-plot* qui présente une illustration simplifiée de la séparation entre les différents échantillons analysés. Elle crée en quelque sorte de nouvelles variables (variables latentes), appelées composantes principales, qui résument les nombreuses variables originales. Il est aussi possible d'en extraire les *loadings*, qui correspondent au poids associé à chaque variable, soit l'importance de celles-ci pour maximiser la séparation entre les échantillons et de quelle façon ces variables séparent les échantillons en différents groupements. La PCA permet aussi d'obtenir un graphique de variance expliquée, qui permet de déterminer le nombre optimal de composantes nécessaires afin de maximiser la séparation entre les échantillons. Comme l'objectif de la PCA est de réduire la dimensionnalité, la variance expliquée permet de choisir le nombre de dimensions (composantes principales) qui peuvent apporter suffisamment d'information pour optimiser la séparation dans le jeu de données [40].

## **Chapitre 2 – Méthodologie**

### **Matériel et méthode**

#### **Échantillonnage**

Premièrement, un certificat éthique pour la recherche avec des êtres humains a été obtenu pour ce projet afin d'utiliser des échantillons de sang humain pour effectuer les analyses. Le certificat (CER-22-285-07.08) a été émis le 22 mars 2022 et renouvelé pour une autre année le 14 avril 2023 par le Comité d'éthique et de la recherche avec des êtres humains de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Afin d'obtenir les échantillons de sang, le donneur volontaire s'est bien lavé les mains et s'est piqué le doigt à l'aide d'une lancette de sécurité de marque McKesson calibre 28G stérile. Tout en appliquant une pression autour du doigt pour faciliter l'écoulement du sang, le donneur a ensuite déposé le sang sur un morceau de coton blanc, qui est un support n'interférant pas avec le signal du sang pour les méthodes d'analyses choisies. Tous les morceaux de coton ont été découpés à partir d'un t-shirt blanc 100% coton. Tous les échantillons ont été déposés immédiatement avant de les déposer au sein de l'enceinte climatique pour le début du vieillissement. Dans un souci de reproductibilité, des échantillons de quantité et de grosseur similaires ont été créés pour les huit différentes expériences. Le sang provenait également du même donneur pour toutes les traces.

#### **Optimisation des méthodes d'analyse**

Avant de pouvoir débiter l'analyse des échantillons, plusieurs étapes d'optimisation ont été effectuées afin d'assurer l'acquisition de mesures optimales et la reproductibilité des données. Tout d'abord, les paramètres de chacun des appareils utilisés ont dû être testés afin de sélectionner les meilleurs paramètres d'acquisition. Pour la photographie des échantillons, il était important que les huit taches de sang sortant des huit expériences différentes soient photographiées sous les mêmes conditions lumineuses pour assurer la reproductibilité entre les expériences. De ce fait, la même source lumineuse a été utilisée pour toutes les expériences et

un montage de l'appareil photo et de la lampe a été effectué afin que la source lumineuse et l'appareil soient placés de la même façon par rapport à l'échantillon, et ce à chaque expérience. La balance des blancs a été effectuée sous ce montage avec cette même source lumineuse et les paramètres de l'ouverture du diaphragme, de l'ISO et la durée d'exposition ont été ajustés pour obtenir l'exposition optimale. Ces paramètres sont demeurés les mêmes pour chaque expérience. Pour les mesures acquises en Raman, il y a eu beaucoup d'étapes d'optimisation à effectuer afin de régler les paramètres de l'instrument. En effet, une très grande quantité de spectres Raman ont été acquis pour choisir les paramètres optimaux pour l'analyse des traces de sang. Ces tests ont été effectués sur des traces de sang à des niveaux de dégradation différents pour prendre en compte les conditions de l'expérience et pour s'assurer que les paramètres choisis soient adaptés aux différents niveaux de dégradation. Tout d'abord, le laser d'une longueur d'onde de 532 nm a été préféré au laser à 785 nm puisqu'il permettait d'atteindre une meilleure résolution des pics. Ensuite, il s'agissait de tester différents paramètres de puissance du laser et de temps d'exposition qui permettent d'obtenir la meilleure résolution des pics possible sur l'ensemble du spectre, tout en évitant la saturation de l'intensité du signal. Pour les mesures réalisées à l'aide de la caméra hyperspectrale, l'optimisation de la méthode a été effectuée au niveau de la balance des blancs. En effet, l'éclairage utilisé était le même que pour la photographie des échantillons et en utilisant le même montage afin d'assurer la reproductibilité entre les expériences. Plusieurs tests ont été effectués afin d'optimiser la balance des blancs pour pouvoir la reproduire de façon systématique avant la prise de l'image pour chacun des échantillons. De plus, le traitement des images hyperspectrales a aussi nécessité des étapes d'optimisation. En effet, une étape de sélection des zones d'intérêt est nécessaire pour l'imagerie hyperspectrale, puisque l'image obtenue contient aussi les spectres du support et du background. Une démarche a donc été établie au préalable afin de pouvoir définir les zones d'intérêt de chacun des échantillons de façon systématique.

## Protocole et appareillage

Afin d'optimiser les analyses et d'évaluer l'importance des différents facteurs en plus des interactions entre eux, un design expérimental a été créé, et celui-ci consiste de 8 expériences faisant varier deux niveaux (maximum et minimum) des trois paramètres à analyser, soit la température, l'humidité et le rayonnement (voir

*Tableau 2*). Pour chaque expérience, le sang a été laissé vieillir pendant 72 heures dans les conditions correspondantes.

*Tableau 2. Design expérimental factoriel de trois facteurs à deux niveaux*

Expérience	Température (°C)	Humidité relative (%)	Rayonnement
1	10	25	Aucun
2	10	25	Maximum
3	10	75	Aucun
4	10	75	Maximum
5	40	25	Aucun
6	40	25	Maximum
7	40	75	Aucun
8	40	75	Maximum

Les échantillons ont été laissés à vieillir dans une enceinte climatique à climat constant Memmert HPP110eco dont la température à l'intérieur de l'enceinte est réglable de 5,0°C à 70,0°C, avec une incertitude de 0,1°C et l'humidité relative est réglable de 10,0% à 90,0% avec une incertitude de 0,5%. Le barème de températures a été choisi selon les conditions susceptibles d'être rencontrées sur les scènes de crime intérieures, soit de 10°C à 40°C. Les valeurs minimales et maximales d'humidité relative ont été choisies en fonction du barème établi par le fabricant (voir Annexe 1), indiquant les valeurs d'humidité atteignables dans l'enceinte selon la température,

soit de 25% à 75%. En effet, il est difficile d'atteindre une humidité relative sous 25% lorsque la température est à 10°C et une humidité de plus de 75% lorsque la température est à 40°C. Les conditions d'humidité relative normalement rencontrées à l'intérieur se retrouvent majoritairement entre 30% et 70%.

Deux sources lumineuses ont aussi été ajoutées à l'intérieur de l'enceinte afin de reproduire les conditions de la lumière du jour. La première était une bande LED Absolute Series D50 de 99 CRI avec un température de couleur corrélée (CCT) de 6500K et une illumination de 3039 lux. La deuxième était un bande LED realUV d'une longueur d'onde de 365 nm. Dès la sortie de l'enceinte climatique, les échantillons ont été immédiatement analysés suivant la même séquence : 1) Photographie sous la lampe halogène, 2) Spectroscopie NIR (proche infrarouge), 3) Spectroscopie Raman et 4) Photographie hyper-spectrale sous la lampe halogène. Comme toutes les techniques d'analyse sont rapides, le temps de la séquence est d'une durée totale de moins de 10 minutes, ce qui est négligeable pour le vieillissement. L'appareil photo utilisé était un Nikon 5100. Les photos ont ensuite été optimisées à l'aide du logiciel Photoshop. L'appareil utilisé pour les mesures en proche infrarouge était le MicroNIR OnSite-W de Viavi Solutions, équipé d'un détecteur à photodiodes. Cinq répliques ont été mesurés à différents endroits sur la tache pour chaque échantillon. Les spectres NIR ont été optimisés à l'aide du logiciel Unscrambler. L'instrument Raman utilisé était un microscope Raman Thermo Fisher DXR3 allant de 400 à 2000  $\text{cm}^{-1}$ , équipé d'un laser d'une longueur d'onde de 532 nm. La puissance du laser a été réglée à 3 mW, avec un temps d'exposition de 5 secondes et une ouverture de diaphragme en fente de 25  $\mu\text{m}$ . Un objectif de 20X a été utilisé pour le microscope et 5 répliques à différents endroits sur la tache ont été mesurés pour chaque échantillon. Les spectres Raman ont été optimisés à l'aide du logiciel Unscrambler. La caméra hyper-spectrale était de marque Specim, modèle SpecimIQ, enregistrant des longueurs d'onde allant de 400 à 1000 nm et d'une résolution spectrale de 7 nm. L'analyse des données spectrales obtenues a ensuite été effectuée à l'aide du logiciel ENVI53 et une zone d'intérêt constituée des 500 pixels situés au centre de la trace de sang a été sélectionnée pour chacune des traces.

## Traitement des données

Le traitement des données a été effectué entièrement à l'aide du logiciel Unscrambler. Pour le MicroNIR, une première dérivée Savitsky-Golay de polynôme de degré deux avec sept points de lissage a d'abord été appliquée sur l'entièreté des répliques des spectres bruts, soit les cinq répliques des huit échantillons. La première dérivée a ensuite été suivie d'une méthode *standard normal variate* (SNV) sur l'ensemble du jeu de données. Pour les données Raman, c'est d'abord la SNV qui a été effectuée sur l'ensemble des spectres obtenus (5 répliques pour chacun des huit échantillons), suivie d'une méthode de *detrending* (correction de la ligne de base). Finalement, pour l'imagerie hyperspectrale, c'est aussi une première dérivée dérivée Savitsky-Golay de polynôme de degré deux avec sept points de lissage qui a été appliquée sur les spectres des 500 pixels constituant le centre de la trace pour chacun de huit échantillons de sang, suivie de la SNV. Ensuite, les jeux de données prétraités ont été analysés par analyse en composante principale (PCA) à l'aide du logiciel Unscrambler, et les graphes du *score-plot*, des *loadings* et de la variance expliquée ont été obtenus et extraits. Les résultats des *loadings* de la PCA ont ensuite été utilisés pour le choix des réponses pertinentes à analyser pour le design expérimental. Le logiciel Excel a finalement été utilisé pour la création des matrices de design expérimental et pour le calcul des influences des paramètres.

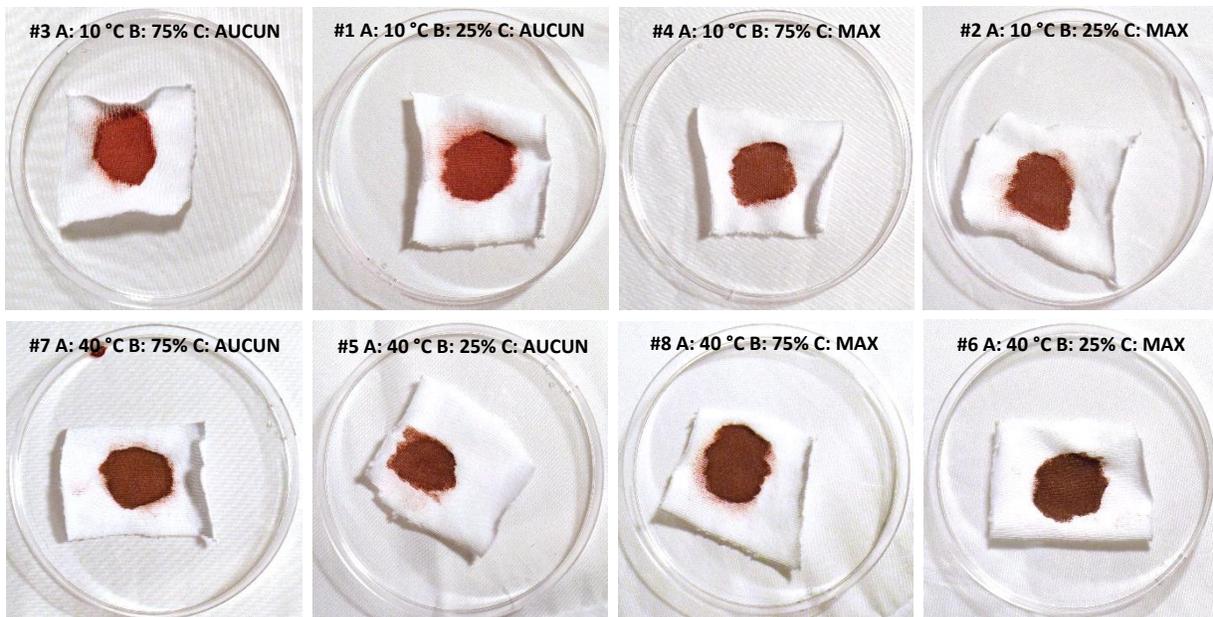


## Chapitre 3 – Résultats

### Photographie

Premièrement, une photographie sous lampe halogène a été acquise pour chacun des huit échantillons de sang qui ont été laissés à vieillir sous différentes conditions (*Voir section Protocole et appareillage,*

*Tableau 2*). Ces photographies permettent d'observer les différences de couleur entre les taches de sang ayant subi différentes conditions environnementales. Les huit photographies obtenues traitées ont été placées en ordre de la moins foncée à la plus foncée (*Figure 2*).



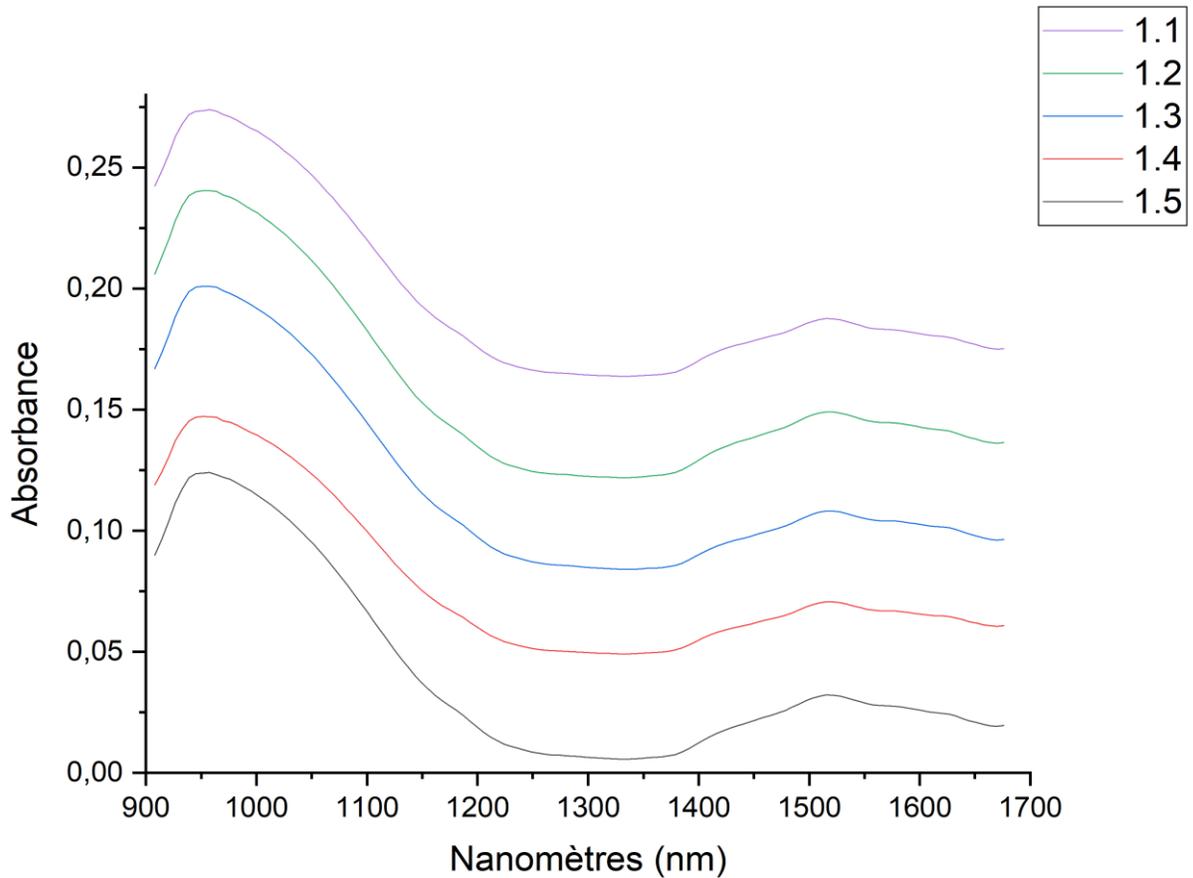
*Figure 2. Photographies des traces de sang en ordre croissant de la plus rouge vif à la plus brunâtre*

La légende représente le numéro de l'expérience (Tableau 2) et les conditions environnementales du vieillissement de la trace de sang en question. Il est possible de voir que les quatre traces les

plus rouge vif, donc les moins foncées, sont celles dont la température était réglée au niveau plus bas, soit 10°C. Au contraire, les traces les plus brunâtres, donc les plus foncées, sont celles qui ont vieilli à une température de 40°C. Parmi quatre traces de même température, une seconde séparation est visible selon le facteur de rayonnement. En effet, pour la même température, les deux traces les plus foncées sont celles ayant subi un rayonnement, autant pour celles à 40°C que celles à 10°C. Finalement, entre deux traces laissées à vieillir dans les mêmes conditions de rayonnement et de température, c'est la trace avec l'humidité relative la plus basse qui est la plus foncée.

## **Spectroscopie NIR**

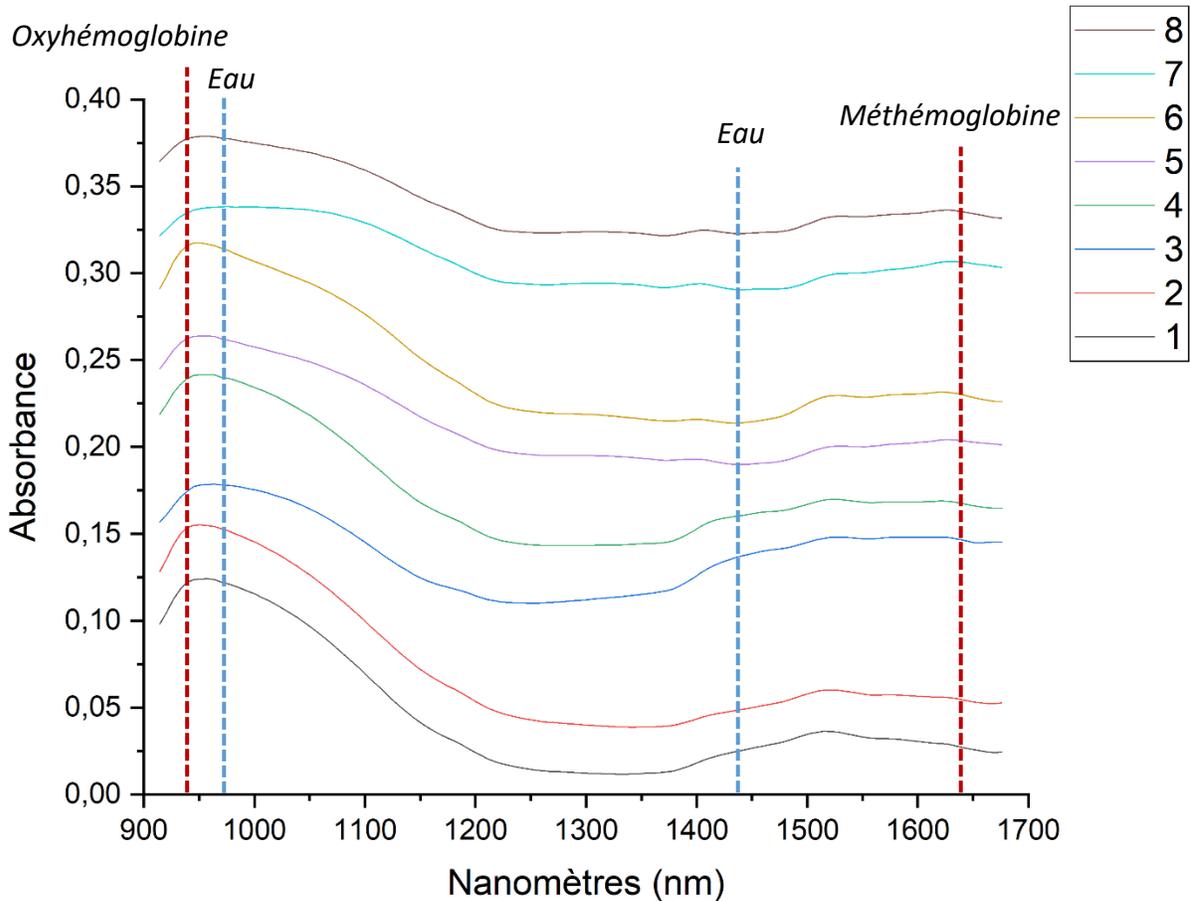
Tout d'abord, afin d'observer s'il y a une intra-variabilité au sein de la même trace de sang pour la spectroscopie proche-infrarouge (NIR), cinq mesures ont été effectuées à des endroits différents sur la tache de sang avec l'appareil MicroNIR. La Figure 3 ci-dessous illustre les cinq répliques pour l'échantillon #1.



*Figure 3. Spectres MicroNIR des cinq répliques acquies à différents endroits sur l'échantillon #1 sur une échelle arbitraire*

Il est possible d'observer qu'il n'y a pas de variations semi-quantitatives entre les spectres des cinq répliques, et donc qu'il y a une faible intra-variabilité au sein d'une même tache de sang pour les spectres NIR. L'emplacement de la mesure sur la tache ne cause donc pas de variabilité dans les mesures et il en est de même pour tous les autres échantillons (#2 à #8).

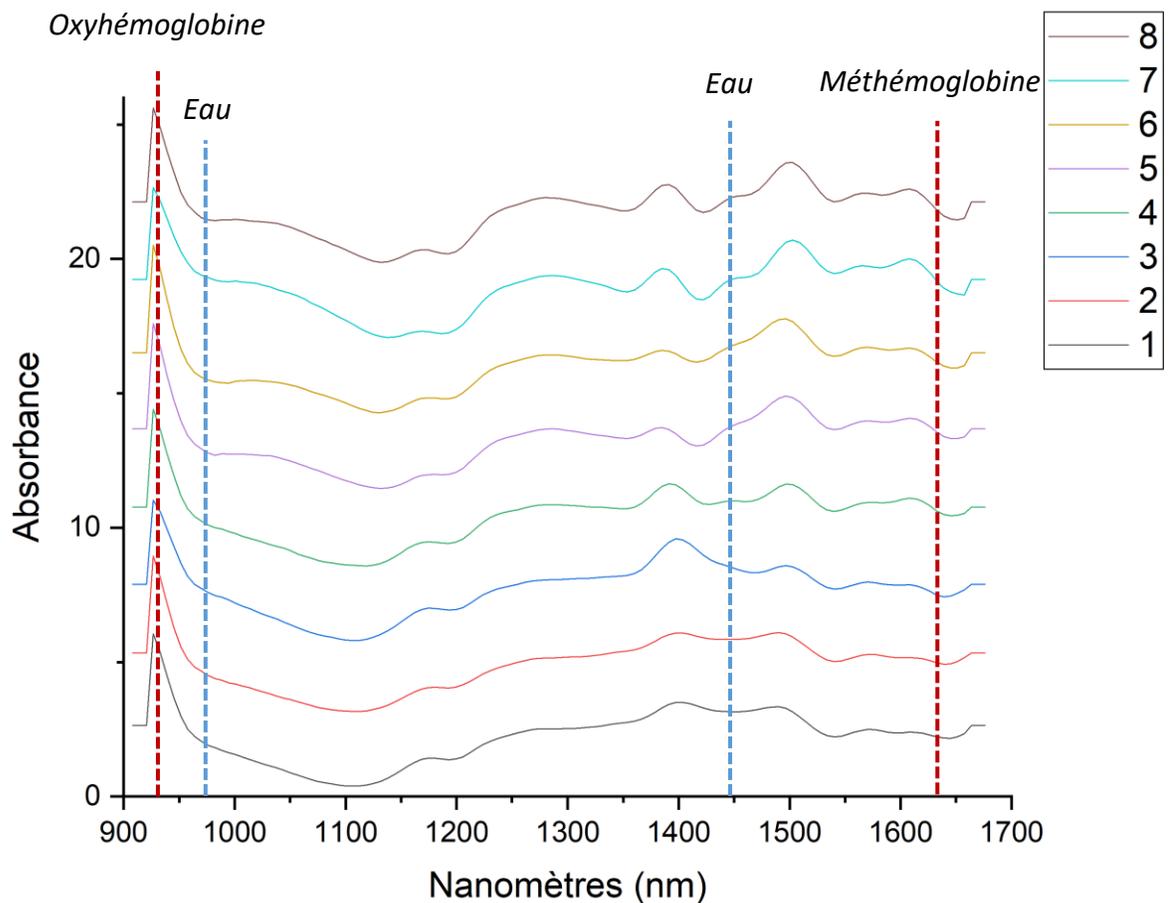
Ensuite, puisqu'il n'y avait pas de variation entre les différents répliques pour une même trace, les spectres moyens des répliques des huit expériences ont été obtenus et compilés sur le même graphique (Figure 4) pour observer les variations entre les huit traces ayant vieilli dans différentes conditions environnementales.



*Figure 4. Spectres MicroNIR moyens de chaque échantillon de sang ayant été laissé à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire.*

Le graphique compare les intensités des bandes d'absorbance présentes entre chaque échantillon de 900 à 1650 nm. Les bandes mises en évidence représentent celles étant associées à des composés subissant des changements lors de la dégradation du sang [8, 33]. Tout d'abord, les bandes en bleu correspondent à l'eau présente dans le sang, soit à environ 970 nm et 1450 nm. Les bandes en rouge représentent les composés présents dans les érythrocytes. Le signal de l'oxyhémoglobine se retrouve à environ 930 nm, alors que le signal de la méthémoglobine ainsi que d'autres protéines telles que l'albumine et la globuline apparaît à environ 1640 nm. Il est possible d'observer certaines variations dans l'intensité des bandes d'absorbance pour les différents échantillons des spectres bruts.

Cependant, comme les bandes d'absorption des spectres NIR sont difficiles à observer et à comparer, puisque les bandes sont larges et les variations semblent faibles dans les spectres bruts, les spectres ont été prétraités à l'aide de l'application d'une première dérivée suivie d'une SNV afin d'optimiser les résultats. La Figure 5 ci-dessous représente les spectres prétraités des huit échantillons de sang ayant vieilli dans différentes conditions environnementales.



*Figure 5. Spectres MicroNIR moyens prétraités de chaque échantillon de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire.*

Une analyse en composante principale (PCA) a ensuite été conduite sur l'ensemble des données NIR prétraitées afin d'observer la variabilité entre les échantillons.

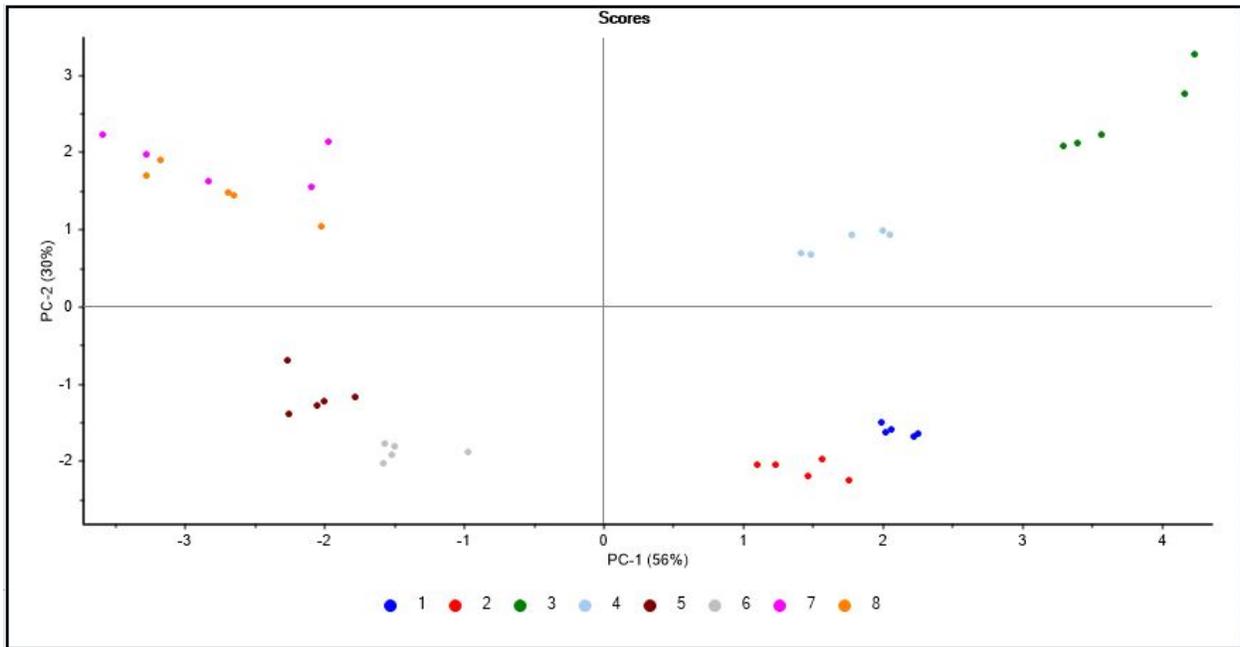
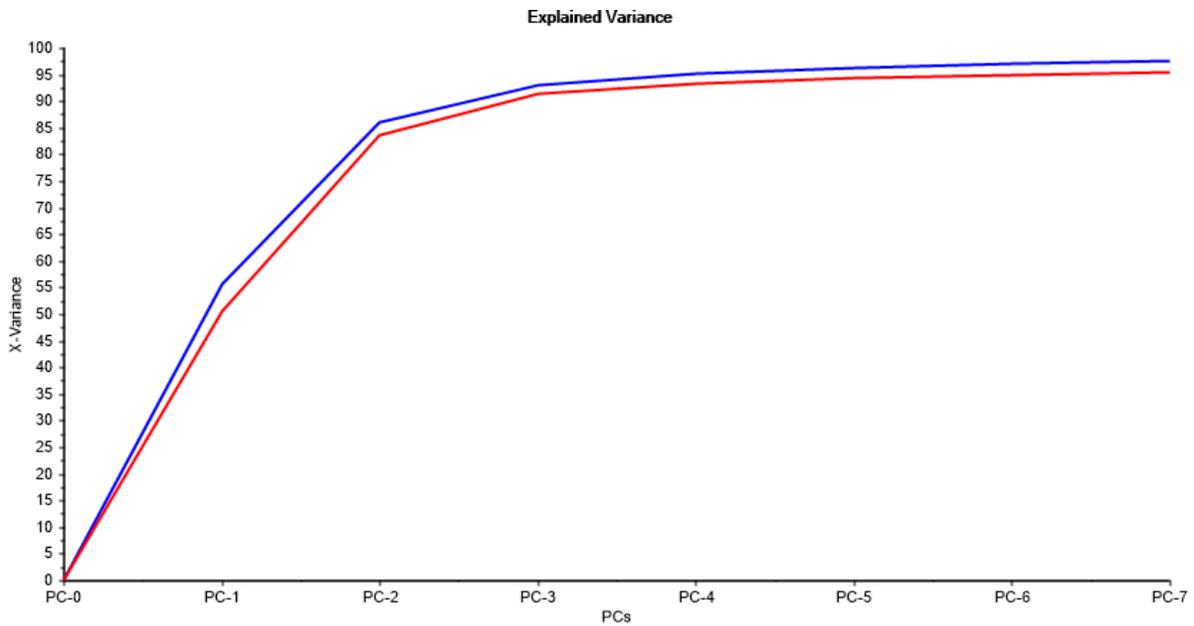


Figure 6. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des répliques des huit différents échantillons de sang.

Le score-plot de la PCA a permis de voir que tous les échantillons sont séparés en fonction de PC1 et PC2, sauf pour les échantillons 7 et 8 dont certains répliques se superposent. D'ailleurs, les huit échantillons semblent être séparés en quatre sous-groupes de deux, correspondant aux quatre cadrans du score-plot selon PC1 et PC2. De plus, les sous-groupes correspondent aux deux échantillons possédant les mêmes conditions de température et d'humidité. Les échantillons #3 et #4, soit les échantillons à 10°C et 75% d'humidité se retrouvent dans le cadran supérieur droit (+/+). Dans le cadran inférieur droit (+/-) se retrouvent les échantillons #1 et #2, soit ceux à 10°C et 25% d'humidité. Les échantillons #7 et #8, soit les échantillons à 40°C et 75% d'humidité se retrouvent dans le cadran supérieur gauche (-/+). Dans le cadran inférieur gauche (-/-) se retrouvent les échantillons #5 et #6, soit ceux à 40°C et 25% d'humidité. Donc, PC1 sépare les échantillons en fonction de la température et PC2 sépare les échantillons en fonction de l'humidité relative.

La PCA a aussi permis d'obtenir le graphique de la variance expliquée des composantes principales (Figure 7).



**Figure 7. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.**

Celui-ci indique que la première composante principale seule permet d'obtenir 56% de variance entre les différents échantillons. En ajoutant la deuxième composante principale, qui a une variance expliquée de 30%, il est possible d'obtenir un total de 86%. De cette façon, avec PC1 et PC2, la PCA a permis de réduire la dimensionnalité des variables en deux dimensions, tout en conservant 86% de variance pour le même jeu de données.

L'analyse en composantes principales a aussi permis d'obtenir les *loadings*, soit les poids associés aux différentes variables pour la séparation des échantillons selon les composantes principales 1 et 2 (PC1 et PC2).

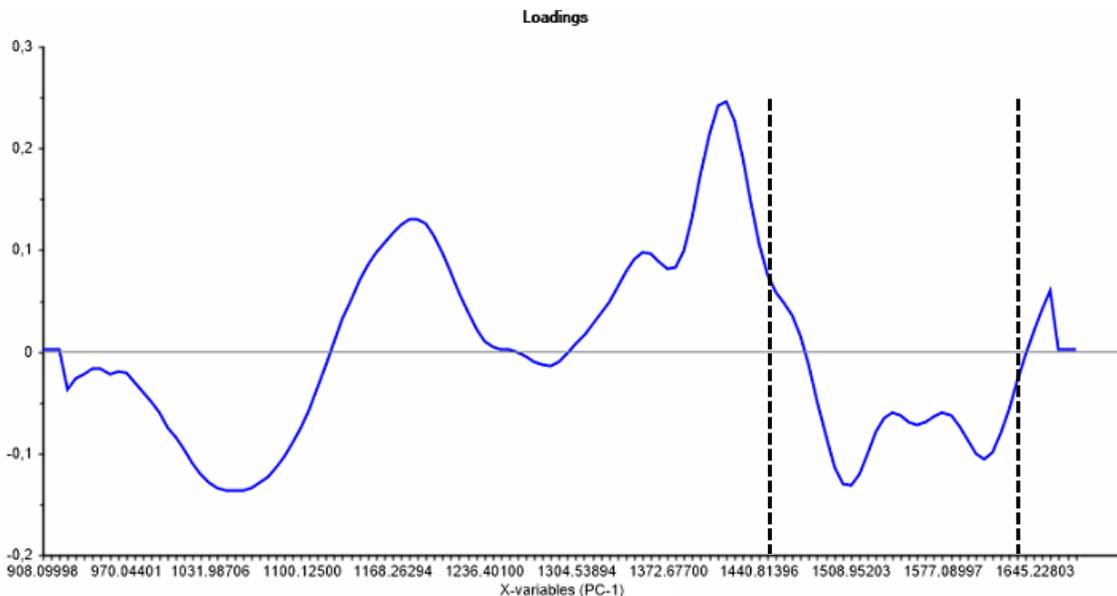


Figure 8. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.

Les *loadings* de la PC1 pour la spectroscopie proche infrarouge (MicroNIR) sont représentés à la figure ci-dessus (Figure 8). Ils sont ceux des spectres prétraités à l'aide d'une première dérivée suivi d'une SNV, donc les valeurs représentées sont plutôt les pentes à chaque point du spectre, ce qui change l'apparence du graphique. Celui-ci illustre que l'une variable importante pour la séparation des échantillons se retrouve à 1450 nm, soit le pic associé à l'eau dans le sang [8]. Plus l'intensité du pic de l'eau est élevée, plus les échantillons se retrouveront du côté positif du score-plot de la PCA selon PC1. Une deuxième variable importante, associée à la présence de méthémoglobine dans le sang [8, 33], se situe à 1645 nm. Plus l'intensité de ce pic est élevée plus les échantillons se trouveront du côté négatif du score-plot de la PCA.

La Figure 9 ci-dessous représente les loadings des variables selon la deuxième composante principale pour la spectroscopie MicroNIR.

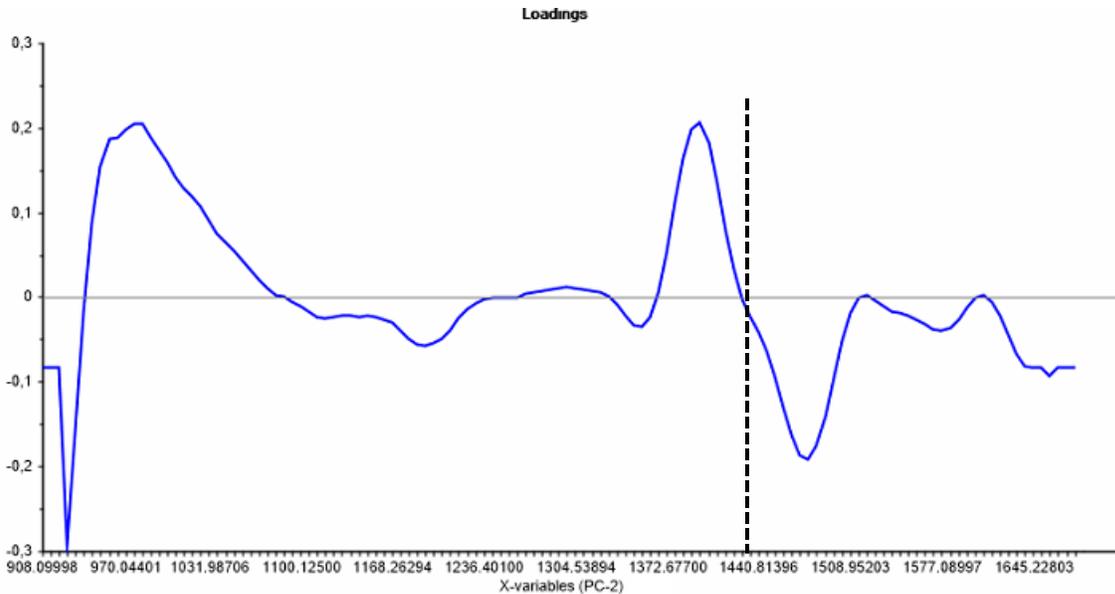


Figure 9. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.

Les *loadings* de la PC2 pour la spectroscopie proche infrarouge (MicroNIR) des spectres prétraités démontre que la variable la plus importante pour la séparation des échantillons est le pic associé à l'eau dans le sang, soit celui à 1450 nm [8]. Plus l'intensité du pic de l'eau augmente, plus les échantillons se retrouveront du côté positif du score-plot de la PCA selon PC2, donc en-haut. Les échantillons se trouvant du côté positif du score-plot selon PC2 sont d'ailleurs ceux qui ont vieilli à un haut niveau d'humidité.

Finalement, deux matrices de design expérimental ont été construites avec les données de la spectroscopie MicroNIR, afin de calculer l'influence des différents paramètres sur deux bandes de réponse différentes dans le domaine du NIR. Le premier tableau, soit le Tableau 3 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 1450 nm.

Tableau 3. Matrice de design expérimental pour le pic à 1450 nm des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.

Expérience	Linéaire			Interactions				Réponse
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	<b>y= 1450nm</b>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,3255339
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,2462499
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,6034435
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,212734
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-0,0800153
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-0,0244008
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-0,0823677
8	1	1	1	1	1	1	1	-0,0392777
Influence	<b>-0,1195</b>	<b>0,1098</b>	-0,046	-0,0327	-0,0405	-0,0712	0,0369	

La réponse à 1450 nm a été choisie puisqu'il s'agit du pic de l'eau dans le sang, qui varie au cours de la dégradation [8]. Le graphique des *loadings* de la PCA (Figure 8) a aussi démontré qu'il s'agissait d'une variable contribuant grandement à la séparation des différents échantillons. Cela permet donc de déterminer l'influence des différents facteurs, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C) sur un pic qui est variable selon le niveau de dégradation du sang. De plus, les influences des interactions entre les paramètres peuvent aussi être calculées (AB, BC, AC, ABC).

Le design expérimental pour le pic à 1450 nm de la spectroscopie MicroNIR a permis de déterminer que les deux paramètres qui affectent le plus ce pic sont la température et l'humidité relative. Le coefficient b calculé pour le premier paramètre (A), soit l'influence de la température, est de -0.1195. Cela signifie que l'augmentation de la température, entre le niveau bas à 10°C et le niveau haut à 40°C a pour effet de réduire l'intensité du pic à 1450, donc une influence négative. Le coefficient b qui a été calculé pour le second paramètre (B), correspondant à l'influence de l'humidité relative, est de +0,1098. Contrairement à la température, cela signifie que l'augmentation de l'humidité relative ambiante entre un niveau bas à 25% et le niveau haut à 75% résulte en une augmentation du pic à 1450 nm. Pour le paramètre du rayonnement (C), ce

coefficient d'influence est plus faible (-0,0460), donc l'influence du rayonnement sur le pic de l'eau en spectroscopie NIR est négligeable par rapport aux deux autres paramètres étudiés, mais se produit tout de même de façon négative pour ce pic. Pour ce qui est des interactions entre les paramètres, ces coefficients sont aussi plus faibles et démontrent donc qu'il n'y a pas d'interaction particulière entre les différents paramètres.

Le deuxième tableau, soit le Tableau 4 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 1645 nm.

Tableau 4. Matrice de design expérimental pour le pic à 1645 nm des spectres MicroNIR des huit différents échantillons de sang.

Expérience	Linéaire			Interactions				Réponse
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	<b>y=1645nm</b>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-0,3310009
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-0,2665178
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-0,5308085
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-0,2094643
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-0,0507574
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-0,1187604
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-0,121142
8	1	1	1	1	1	1	1	-0,0801582
Influence	<b>0,1208</b>	-0,0219	0,0449	0,0137	0,0457	-0,0516	-0,0185	

Le pic à 1645 nm a été choisi puisqu'il est associé à la formation de méthémoglobine, soit une conformation plus dégradée de l'hémoglobine, qui se produit lors de la dégradation du sang [8]. Le graphique des *loadings* de la PCA (Figure 9) a aussi démontré qu'il s'agissait d'une variable contribuant à la séparation des différents échantillons. Il est donc ainsi possible de déterminer l'influence des différents facteurs, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C), pour la réponse associée à la méthémoglobine qui est variable selon le niveau de dégradation du sang. De plus, les influences des interactions entre les paramètres ont été évaluées (AB, BC, AC, ABC).

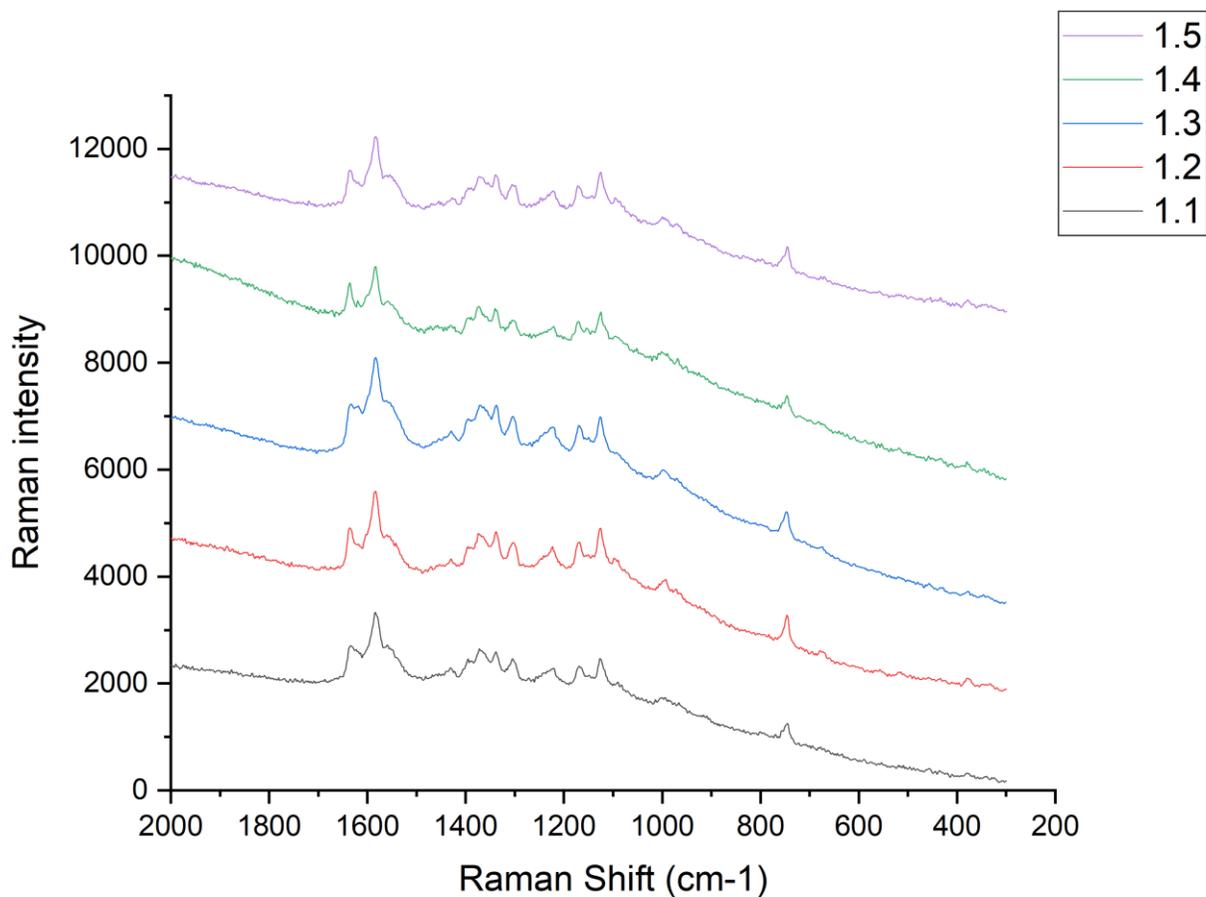
Le design expérimental pour le pic à 1645 nm de la spectroscopie MicroNIR a permis de déterminer qu'il y a un paramètre en particulier qui affecte la formation de méthémoglobine de façon plus importante que les autres, soit la température. Le coefficient b calculé pour ce premier paramètre (A) est de +0,1208. Cela signifie que le fait de passer d'un niveau bas de température (10°C) à un niveau haut (40°C) a pour effet d'augmenter l'intensité du pic à 1645 nm, donc une influence positive. Les coefficients b qui ont été calculés pour le second paramètre (B), soit l'humidité relative, et le troisième paramètre (C), soit le rayonnement, sont plus faibles que pour le paramètre de la température. Pour l'humidité relative (B), ce coefficient est de seulement -0,0219, ce qui veut dire que l'influence est faible, mais tout de même de façon négative, contrairement au rayonnement (C), qui est négative, soit +0,0449. Les coefficients calculés pour ce qui est des interactions entre les paramètres sont aussi faibles, et donc il n'y a pas d'interaction entre les différents paramètres.

## **Spectroscopie Raman**

La deuxième méthode d'analyse spectroscopique utilisée était la spectroscopie Raman et la même procédure qu'en MicroNIR a été utilisée pour l'analyse des résultats.

Premièrement, cinq mesures répliquées ont été acquises à différents endroits sur chaque tache de sang afin d'observer s'il y a une intra-variabilité dans les mesures pour la spectroscopie Raman.

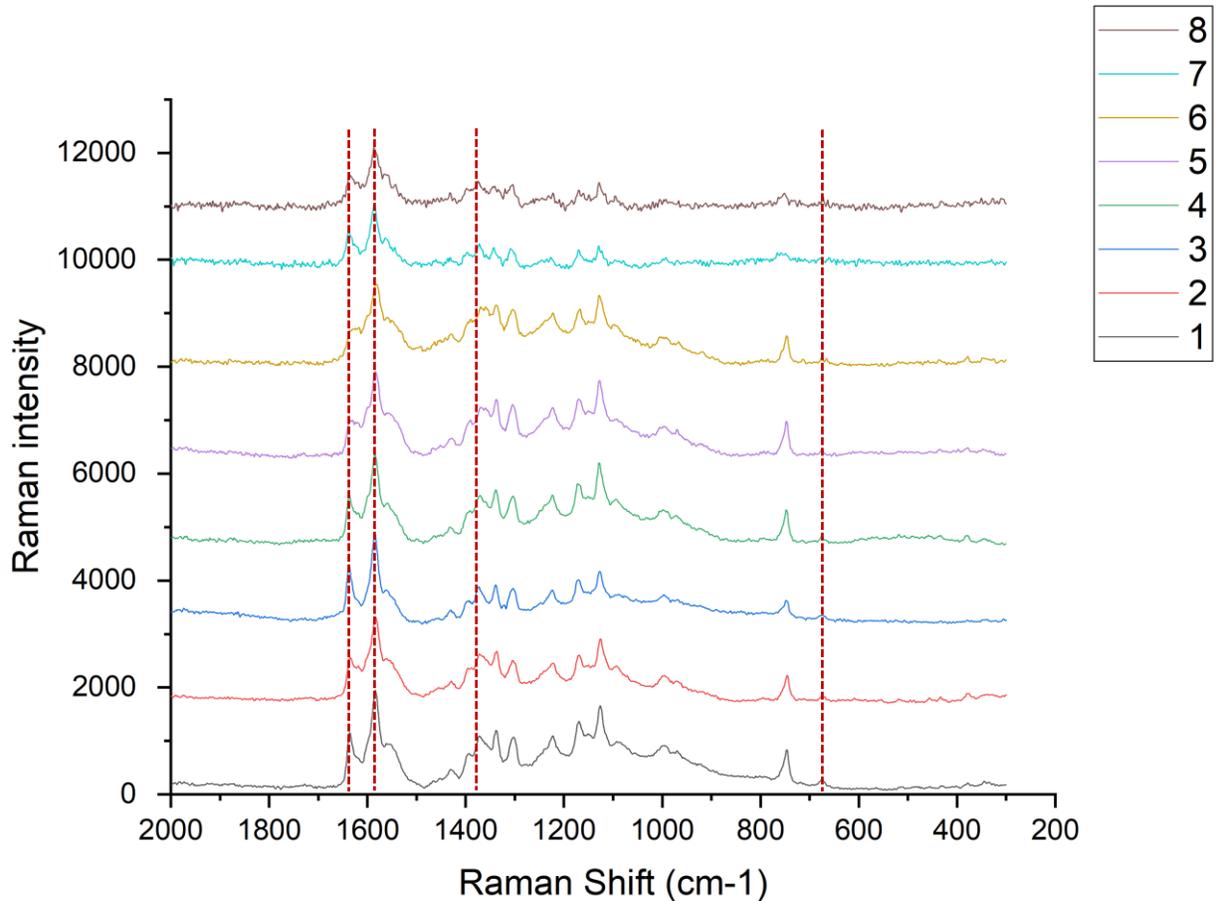
La Figure 10 ci-dessous illustre les cinq répliques pour l'échantillon #1.



*Figure 10. Spectres Raman des cinq répliques de l'échantillon #1 sur une échelle arbitraire.*

Le graphique démontre qu'il n'y a pas de variations et que l'on retrouve les mêmes pics aux mêmes endroits entre les spectres des cinq répliques, et donc que l'intra-variabilité au sein d'une même tache de sang est faible pour ce qui est de la spectroscopie Raman. Une fois de plus, tout comme avec la spectroscopie NIR, cela démontre que l'emplacement de la mesure sur la tache ne cause pas de variabilité dans les mesures et c'était aussi le cas pour tous les autres échantillons (#2 à #8).

Deuxièmement, les spectres moyens des cinq répliques pour chaque échantillon ont été obtenus et comparés sur le même graphique (Figure 11), puisqu'il n'y avait pas de variation entre les différents répliques pour une même trace. Ainsi, les variations entre les huit traces ayant vieilli dans différentes conditions environnementales ont pu être observées.



*Figure 11. Spectres Raman moyens des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire.*

Le graphique présente les spectres Raman bruts moyens de tous les échantillons de sang ayant vieilli dans différentes conditions environnementales. Certains pics ont été mis en évidence sur la figure à l'aide des bandes rouges pour illustrer les pics associés à des changements lors la dégradation du sang [35-37]. Ceux-ci sont les pics à  $1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1585\text{ cm}^{-1}$ ,  $1390\text{ cm}^{-1}$  et  $675\text{ cm}^{-1}$ . Seulement avec les spectres bruts, il est possible de voir une diminution de l'intensité de ces pics pour certains échantillons, plus particulièrement les échantillons #5, #6, #7 et #8, qui sont ceux ayant été laissés à vieillir à haute température ( $40^{\circ}\text{C}$ ), comparés aux quatre premiers qui étaient à basse température ( $10^{\circ}\text{C}$ ). Ces pics sont attribués à la vibration du squelette de l'hème dans les érythrocytes [35-37].

Cependant, des prétraitements ont une fois de plus été appliqués sur le jeu de données afin de limiter les erreurs de diffusion et d'améliorer la résolution des pics. La Figure 12 ci-dessous représente les huit spectres de huit différents échantillons de sang suite à l'application de la méthode *standard normal variate* (SNV) suivie de la méthode de *detrending* sur l'ensemble du jeu de données.

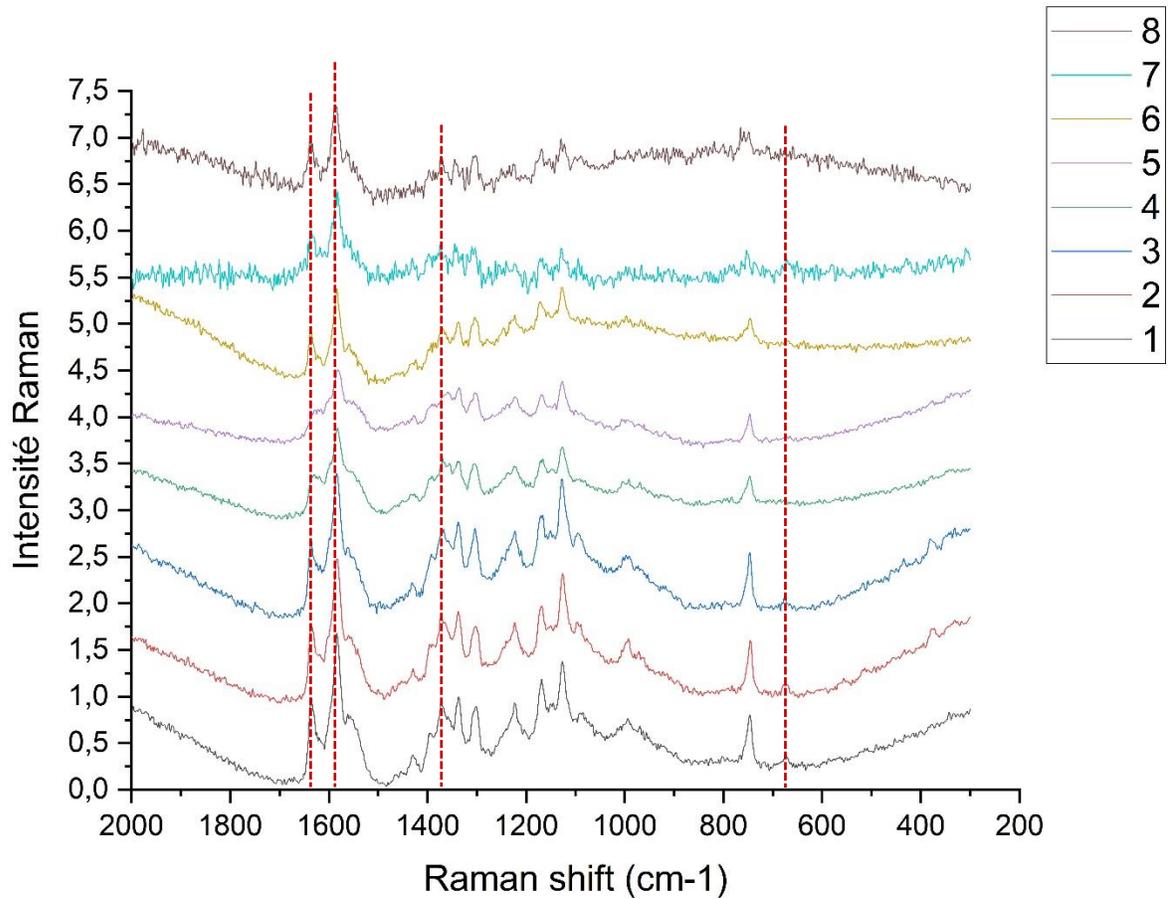
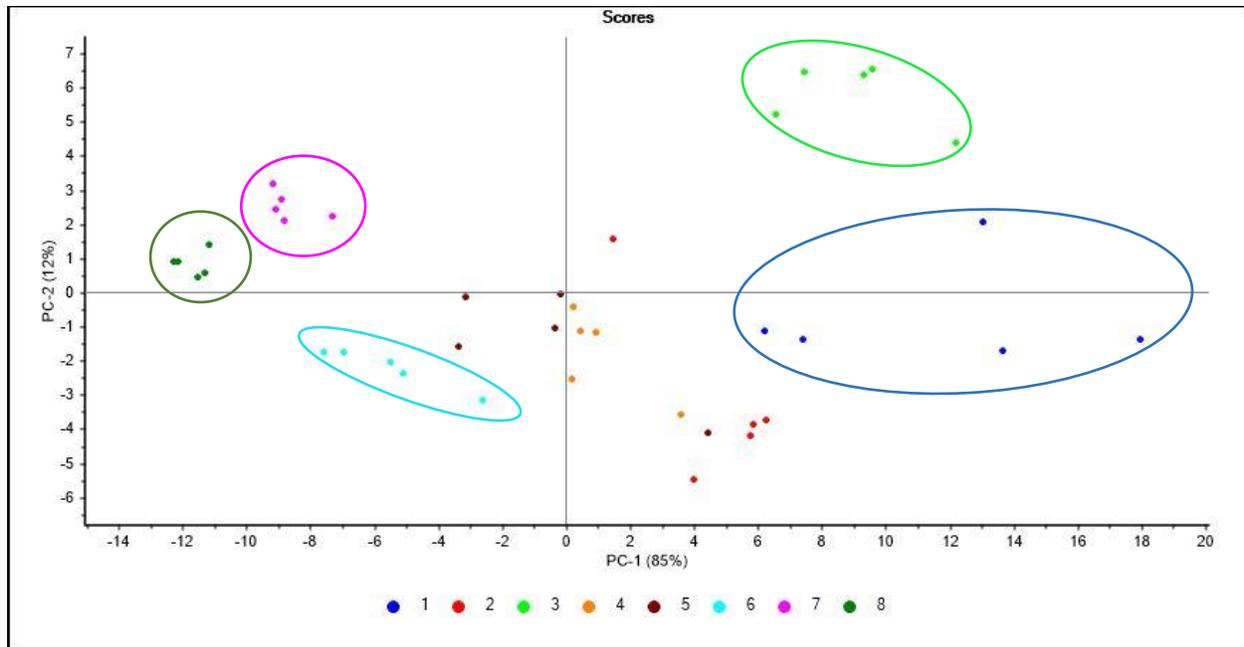


Figure 12. Spectres Raman moyens prétraités de chaque échantillon de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions sur une échelle arbitraire.

Une analyse en composante principale (PCA) a aussi été conduite pour les spectres Raman, afin de pouvoir visualiser la séparation des différents échantillons. La Figure 13 ci-dessous représente le score-plot des cinq répliques des huit échantillons en fonction de PC1 et PC2.



*Figure 13. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres Raman des répliques des huit différents échantillons de sang.*

Selon PC1 et PC2, les échantillons #1, #3, #6, #7 et #8, sont tous séparés des autres, alors qu'il y a une superposition de certains répliques pour les échantillons #2, #4 et #5. En fonction de PC1, soit l'axe horizontal, les échantillons dont la température était basse se retrouvent du côté positif, alors que les échantillons dont la température était haute se retrouvent du côté négatif. Il n'y a pas de tendance observable avec le score-plot pour ce qui est des paramètres d'humidité relative ou de rayonnement.

Ensuite, la PCA conduite sur le jeu de données en Raman a aussi permis d'obtenir le graphique de la variance expliquée, représenté à la [Figure 14](#) ci-dessous.

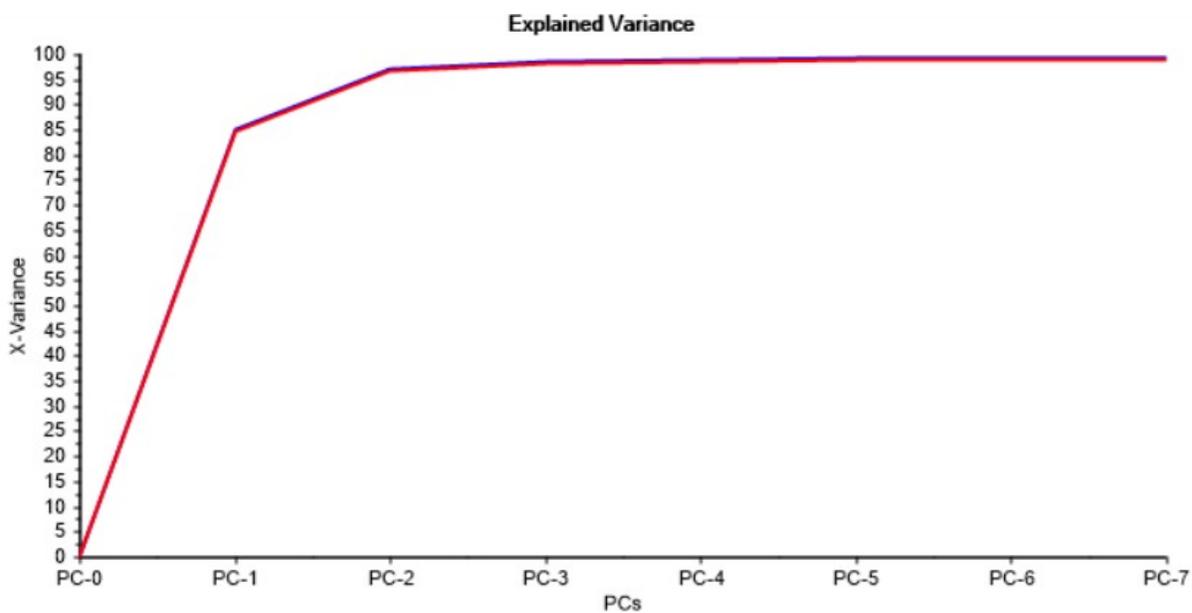


Figure 14. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.

Le graphe de la variance expliquée illustre que la première composante principale, soit PC1, à elle seule permet d'obtenir jusqu'à 85% de variance pour la séparation entre les échantillons. Il démontre aussi que lorsque l'on ajoute la deuxième composante principale, soit PC2, dont la variance est de 12%, le total de la variance est de 97%. Donc, la PCA a permis d'obtenir un total de variance de 97% tout en réduisant la dimensionnalité des variables jusqu'à seulement deux dimensions (PC1 et PC2).

Ensuite, les graphiques des *loadings* de la PCA ont aussi pu être extraits de l'analyse en composante principale (PCA). Ceux-ci ont donc permis d'évaluer le poids de chaque variable pour la séparation des données. La Figure 15 ci-dessous représente les *loadings* pour les données de la spectroscopie Raman selon la première composante principale (PC1).

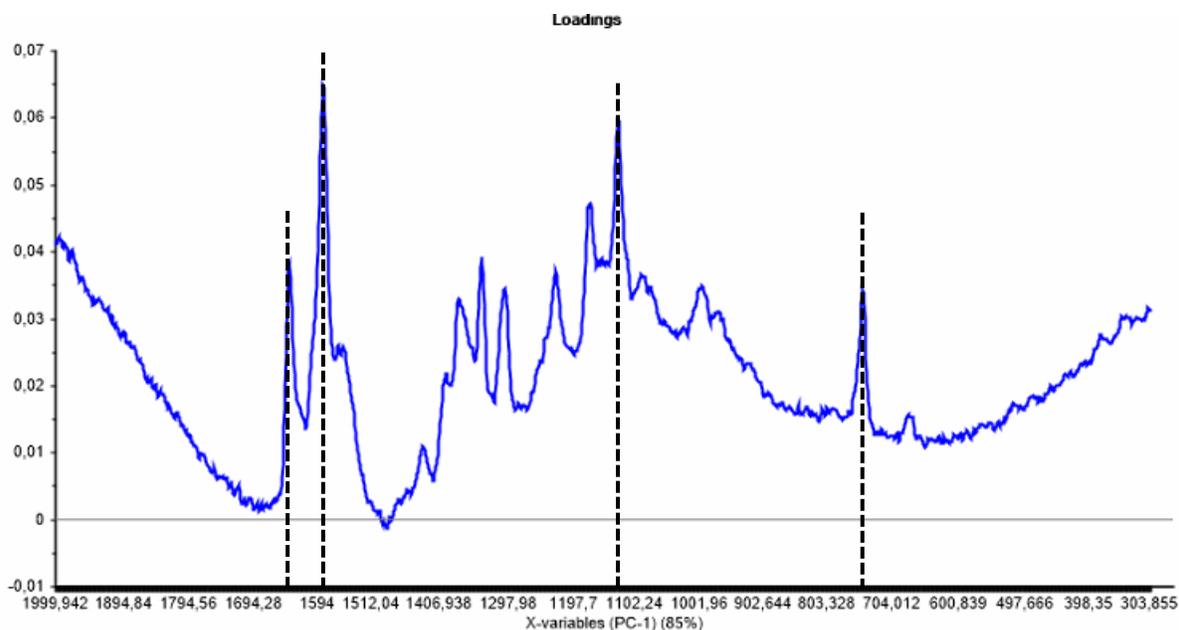


Figure 15. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.

Les *loadings* de la PC1 pour la spectroscopie Raman démontrent que l'entièreté du spectre Raman contribue de façon positive à la séparation des données sur le *score-plot* de la PCA. Cela signifie que la séparation des différents échantillons selon PC1 se fait en fonction de l'intensité des pics Raman obtenus. Donc, plus l'intensité des pics augmente, plus les échantillons se retrouveront du côté droit (positif) du *score-plot* de la PCA. On y retrouve notamment les pics les plus intenses qui varient de façon plus importante, soit ceux à  $1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1585\text{ cm}^{-1}$ ,  $1120\text{ cm}^{-1}$  et  $745\text{ cm}^{-1}$ .

La Figure 16 ci-dessous représente les loadings des variables selon la deuxième composante principale pour la spectroscopie Raman.

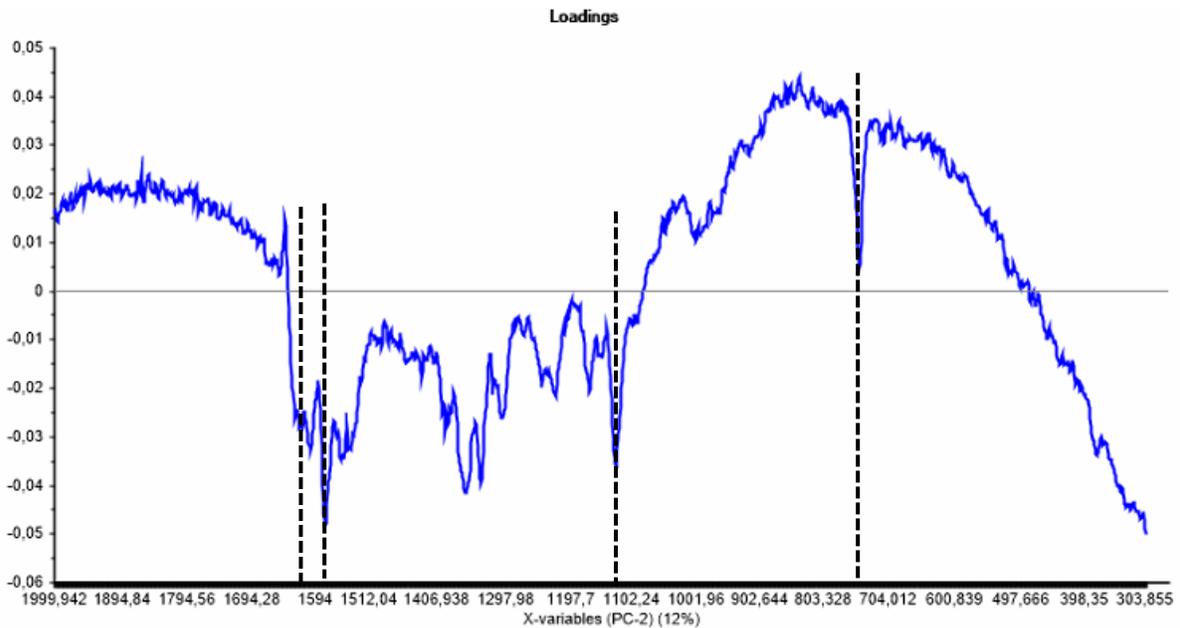


Figure 16. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.

Plusieurs pics importants des *loadings* de PC1 se retrouvent aussi de façon importante sur le graphique des *loadings* de PC2, tels que les pics à 1585, 1120 et 745  $\text{cm}^{-1}$ , mais de façon négative cette fois-ci, donc plus bas sur le *score-plot* de la PCA. Cependant, l'apparence de certains pics diffère de celle des *loadings* de PC1. Par exemple, le pic intense à 1648  $\text{cm}^{-1}$  qui possède un poids important dans les *loadings* de PC1 prend plutôt la forme d'un triplet large pour PC2. Cela signifie que certains spectres possédant un triplet à 1648  $\text{cm}^{-1}$  sont séparés des autres en fonction de PC2 et se trouveront du côté négatif selon l'axe de PC2 dans le *score-plot* de la PCA.

Finalement, deux matrices de design expérimental ont été construites sur le jeu de données de la spectroscopie Raman, pour pouvoir calculer l'influence des différents paramètres environnementaux tels que la température, l'humidité relative et le rayonnement sur deux pics Raman qui varient selon le niveau de dégradation. Le premier tableau, soit le Tableau 5 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 1648  $\text{cm}^{-1}$ .

Tableau 5. Matrice de design expérimental pour le pic à 1648 cm<sup>-1</sup> des spectres Raman des huit différents échantillons de sang

Expérience	Linéaire			Interactions				Réponse
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	y = 1648cm <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,422007
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,36931
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,376399
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,263841
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,118653
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,094371
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,143954
8	1	1	1	1	1	1	1	0,083449
Influence	<b>-0,1239</b>	-0,0171	-0,0313	0,0207	-0,0120	0,0101	0,0030	

La réponse à 1648 cm<sup>-1</sup> a été choisie puisqu'il s'agit d'un pic qui varie au cours de la dégradation du sang [35-37]. De plus, le graphique des *loadings* de la PCA (Figure 15) a aussi démontré qu'il s'agissait d'une variable contribuant grandement à la séparation des différents échantillons. Cela permet donc de déterminer l'influence des différents facteurs étudiés, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C), sur un pic Raman qui varie au cours de la dégradation du sang. De plus, les influences des interactions entre les paramètres ont aussi été calculées (AB, BC, AC, ABC).

Le design expérimental pour le pic à 1648 cm<sup>-1</sup> de la spectroscopie Raman a permis de déterminer que le paramètre des conditions environnementales qui possède la plus grande influence sur ce pic est la température (A). Le coefficient b calculé pour ce paramètre est de -0,1239. Cela signifie que l'augmentation de la température, entre le niveau bas à 10°C et le niveau haut à 40°C a une influence négative sur le pic à 1648 cm<sup>-1</sup>, donc qu'elle a pour effet de réduire l'intensité de ce pic. Pour les paramètres d'humidité relative (B) et du rayonnement (C), ce coefficient d'influence est plus faible, soit -0,0171 pour l'humidité et -0,0313 pour le rayonnement, donc l'influence de l'humidité relative et du rayonnement sur ce pic du sang en spectroscopie Raman est négligeable par rapport à la température. Pour ce qui est des interactions entre les paramètres, ces coefficients sont aussi faibles et donc cela veut dire qu'il n'y a pas d'interaction particulière entre les paramètres.

Le deuxième tableau, soit le Tableau 6 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 1585 cm<sup>-1</sup> en spectroscopie Raman.

Tableau 6. Matrice de design expérimental pour le pic à 1585 cm<sup>-1</sup> des spectres Raman des huit différents échantillons de sang.

Expérience	Linéaire			Interactions				Réponse
	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	y = 1585cm <sup>-1</sup>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1,270684
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1,051273
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,894748
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,760168
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,596069
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	0,460812
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,310498
8	1	1	1	1	1	1	1	0,205687
Influence	<b>-0,3983</b>	0,0155	-0,0917	<b>0,1822</b>	-0,0368	-0,0032	-0,0580	

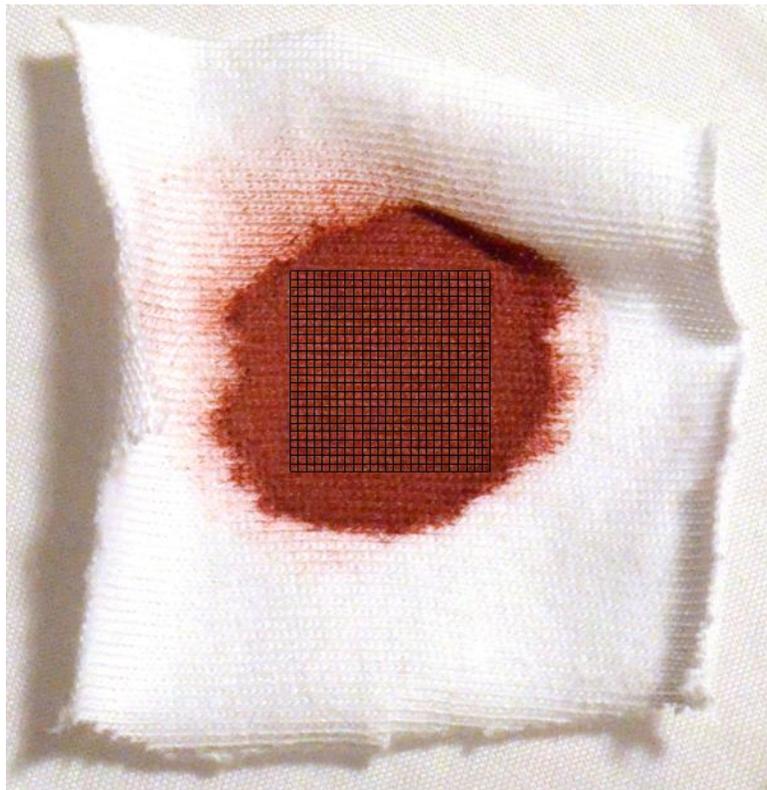
Le pic de réponse à 1585 cm<sup>-1</sup> a été choisi comme deuxième réponse qu'il s'agit aussi d'un pic Raman associé à la dégradation du sang [35-37]. De plus, les *loadings* de la PCA (Figure 15) ont aussi démontré que cette variable était importante pour la séparation des échantillons sur le score-plot de la PCA. Cela permet donc de déterminer l'influence de chaque facteur des conditions environnementales, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C), sur un pic Raman qui varie selon le niveau de dégradation du sang et qui diffère en fonction des différents échantillons. De plus, il a été possible de déterminer s'il existe des interactions entre les paramètres (AB, BC, AC, ABC).

Le design expérimental pour le pic à 1585 cm<sup>-1</sup> de la spectroscopie Raman a permis de déterminer que le paramètre qui possède la plus grande influence sur ce pic est aussi la température (A). Le coefficient b calculé pour ce paramètre est de -0,3983. Cela signifie que lorsque l'on augmente la température entre le niveau bas à 10°C et le niveau haut à 40°C, l'intensité du pic à 158 cm<sup>-1</sup> diminue. La température possède donc une influence négative sur ce pic. Pour les paramètres d'humidité relative (B) et du rayonnement (C), ce coefficient d'influence est plus faible, soit -0,0155 pour l'humidité et -0,0917 pour le rayonnement. L'influence de l'humidité relative et du

rayonnement sur ce pic du sang en spectroscopie Raman est faible et donc négligeable par rapport à l'influence de la température. Pour ce qui est des interactions entre les paramètres, il existe une possible interaction entre la température et l'humidité relative (AB), puisque le coefficient b calculé était plus important, soit de 0,1822. Cela signifie donc que le fait d'avoir une température haute (40°C) couplée à un haut niveau d'humidité (75%) exerce une influence positive sur le pic Raman à  $1585\text{ cm}^{-1}$ . Pour les autres interactions (BC, AC et ABC), les coefficients sont faibles et donc cela veut dire qu'il n'y a pas d'interaction particulière entre les paramètres.

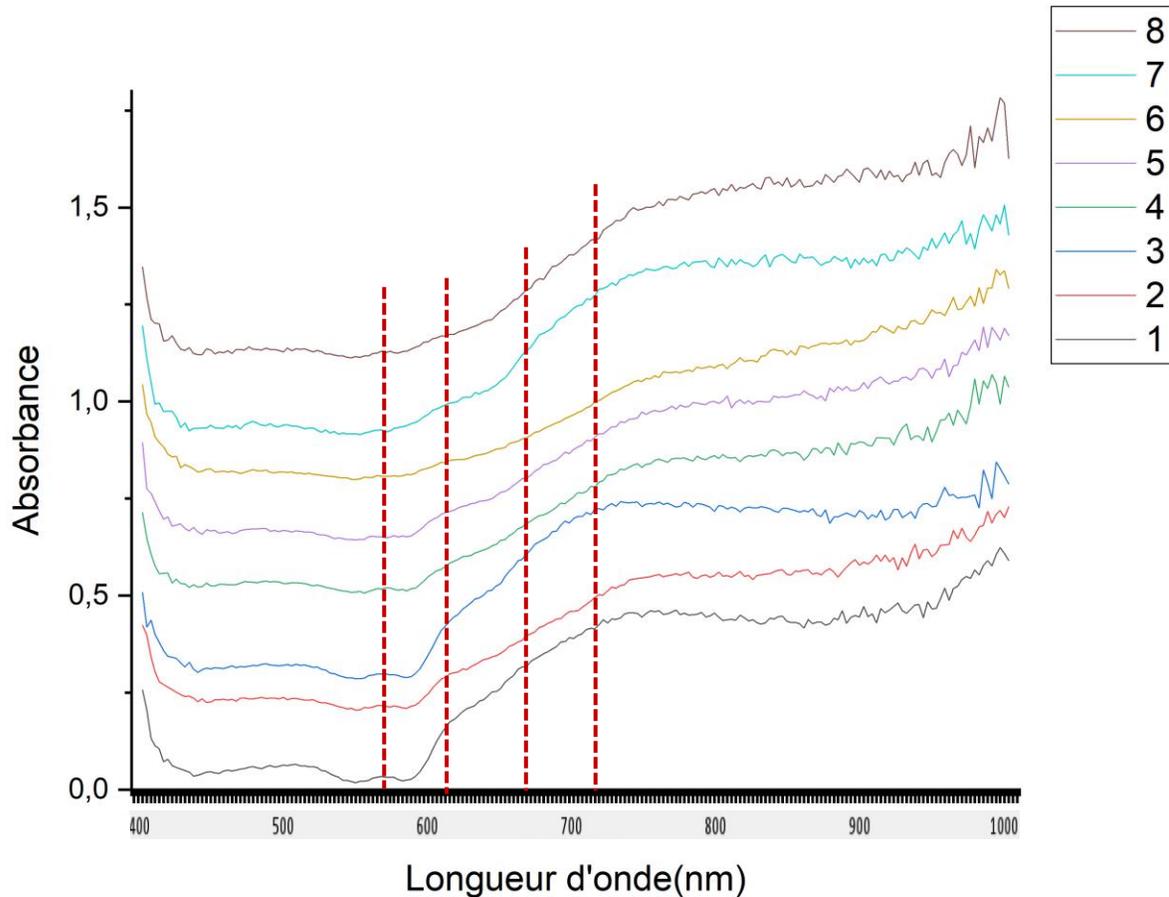
## Imagerie hyperspectrale

Pour l'imagerie hyperspectrale, une seule image a été acquise par échantillon, puisque celle-ci contient des milliers d'hypercubes constituant les spectres de l'entièreté de la trace, et donc il n'y avait pas besoin de prendre des mesures répliquées à différents endroits sur la trace.



*Figure 17. Schéma de la surface couverte par les hypercubes de l'imagerie hyperspectrale sur la trace.*

Ensuite, les spectres moyens obtenus à partir des spectres des 500 hypercubes des huit différents échantillons de sang ayant été laissés à vieillir pendant la même période de temps mais dans différentes conditions ont été compilés sur le même graphique afin de pouvoir les comparer entre eux.

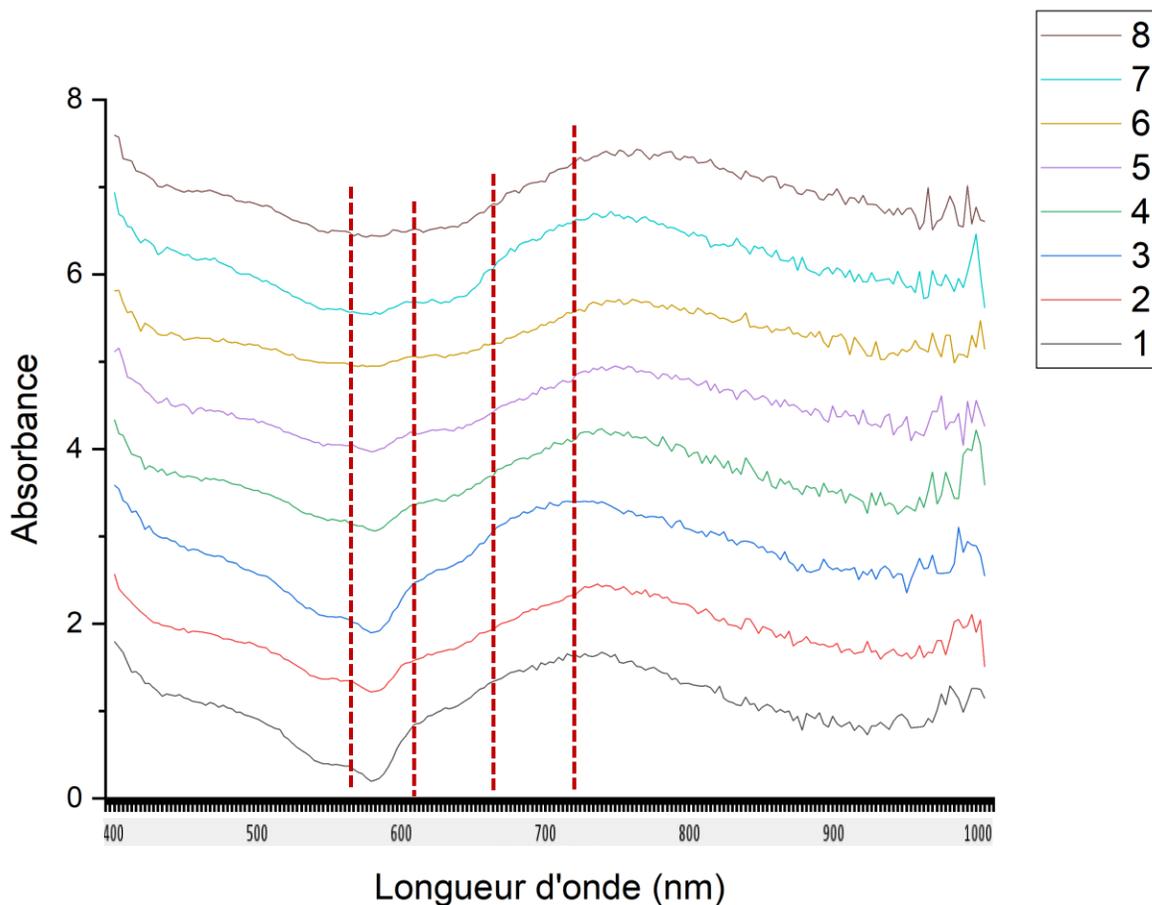


*Figure 18. Spectres de l'imagerie hyperspectrale moyens des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire.*

Le graphique présente les spectres de l'imagerie hyperspectrale bruts moyens de tous les échantillons de sang ayant vieilli dans différentes conditions environnementales. Les pics mis en évidence sur la figure à l'aide des traits rouges illustrent les bandes associées à des changements lors la dégradation du sang [9]. Ceux-ci sont les pics à 580 nm, 620 nm, 675 nm et 720 nm.

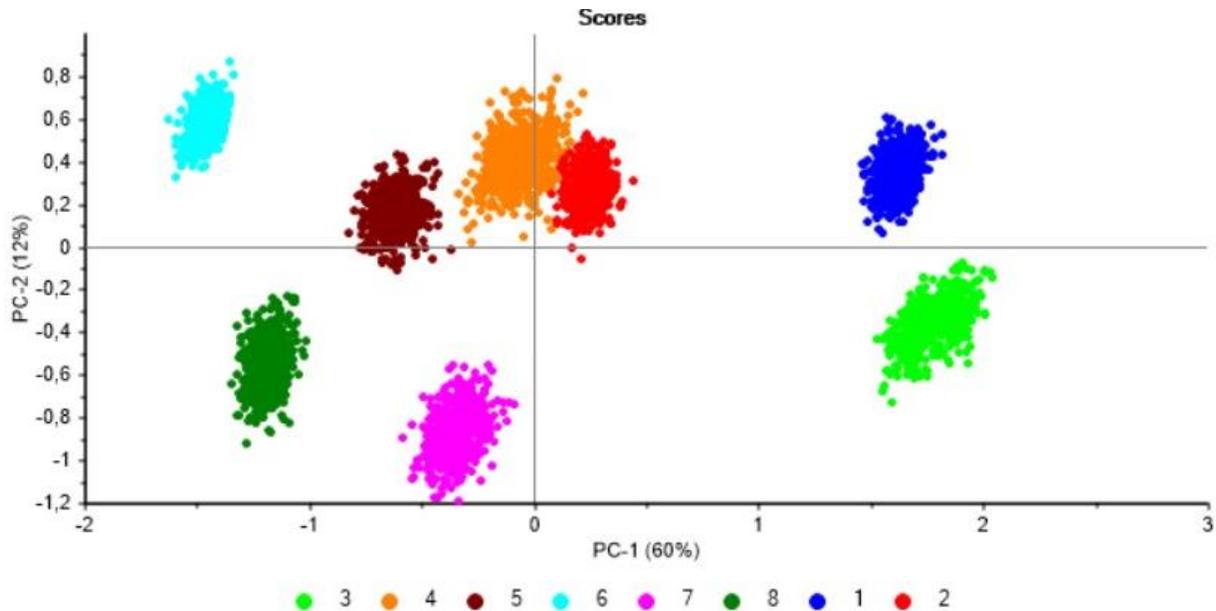
Seulement avec les spectres bruts, il est possible de voir une variation dans l'intensité de l'absorbance de ces pics entre les différents échantillons. Ces pics sont attribués à l'hémoglobine dans le sang, et à l'absorption dans le rouge pour le spectre électromagnétique autour de 700 nm [9].

Une fois de plus, des prétraitements ont été appliqués sur l'ensemble des spectres pour l'imagerie hyperspectrale afin de limiter les erreurs de diffusion et d'améliorer la résolution des pics. La Figure 19 ci-dessous représente les huit spectres moyens des différents échantillons de sang suite à l'application de la méthode *standard normal variate* (SNV) suivie de la méthode de *detrending* sur l'ensemble du jeu de données.



*Figure 19. Spectres de l'imagerie hyperspectrale moyens prétraités des huit échantillons de sang ayant été laissés à vieillir dans différentes conditions environnementales sur une échelle arbitraire*

Une analyse en composante principale (PCA) a aussi été conduite pour les données de l'imagerie hyperspectrale. Cela a permis de visualiser la séparation des différents échantillons. La Figure 20 ci-dessous représente le score-plot des 500 spectres des pixels composant la trace de sang de chacun des huit échantillons en fonction de PC1 et PC2.

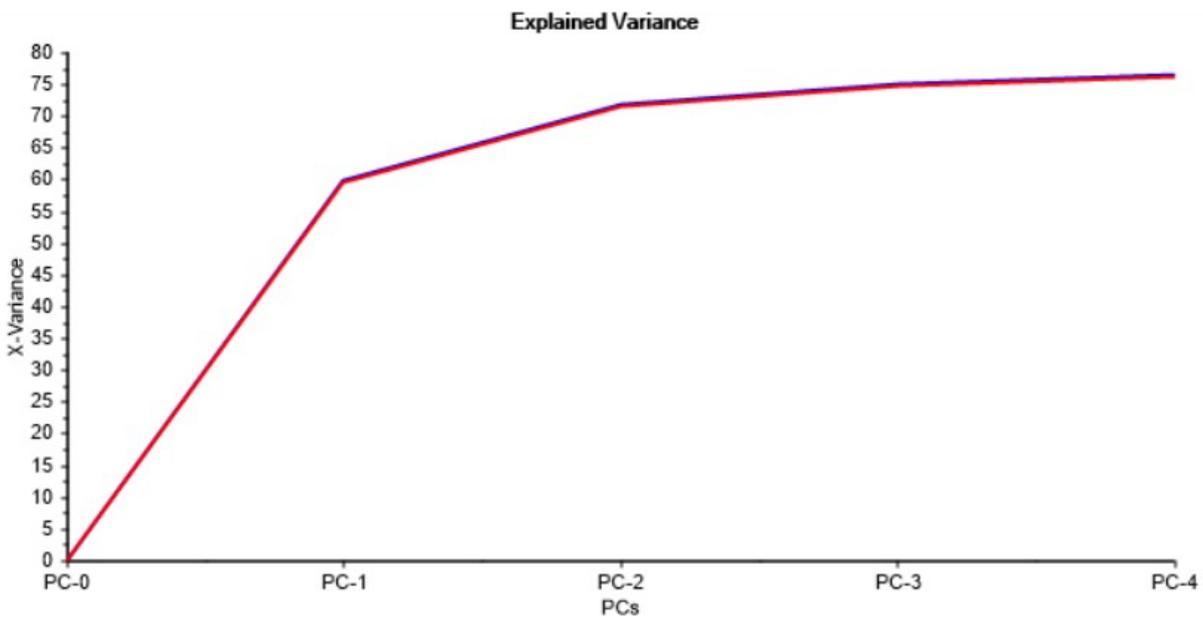


*Figure 20. Score-plot de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des répliques des huit différents échantillons de sang.*

En fonction des deux premières composantes principales, tous les échantillons sont séparés les uns des autres, sauf pour une très légère superposition entre les échantillons #2 et #4. Sur l'axe horizontal, soit selon PC1, les échantillons dont la température était basse se retrouvent plutôt du côté droit du score-plot (positif), alors que les échantillons dont la température était haute se retrouvent plutôt à gauche (négatif). Seulement l'échantillon #4, qui était à une température de 10°C, se retrouve au centre à cheval entre le côté positif et négatif. Il n'y a pas de tendance visuellement observable avec le score-plot pour ce qui est des paramètres d'humidité relative ou de rayonnement. Le score-plot de la PCA permet aussi d'observer la faible intra-variabilité au sein

d'une même trace. En effet, les 500 différents spectres représentés pour chaque échantillon se retrouvent tous très concentrés et très peu de réplicas sont plus éloignés des autres.

Ensuite, la PCA a aussi permis d'observer le graphe de la variance expliquée, représenté à la Figure 21 ci-dessous.



*Figure 21. Graphique de la variance expliquée de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang.*

Le graphique de la variance expliquée démontre que la première composante principale à elle seule permet d'obtenir 60% de variance pour la séparation entre les échantillons. Lorsque l'on ajoute la deuxième composante principale, dont la variance est de 12%, il est possible d'obtenir un total de variance de 72%. La PCA a donc permis d'obtenir une réduction de la dimensionnalité des variables en seulement deux dimensions, tout en conservant 72% de variance pour le même jeu de données.

Ensuite, il a aussi été possible d'extraire les graphiques des *loadings* de la PCA, représentant le poids de chaque variable pour la séparation des données. La Figure 22 ci-dessous représente les *loadings* pour les données hyperspectrales selon la première composante principale (PC1).

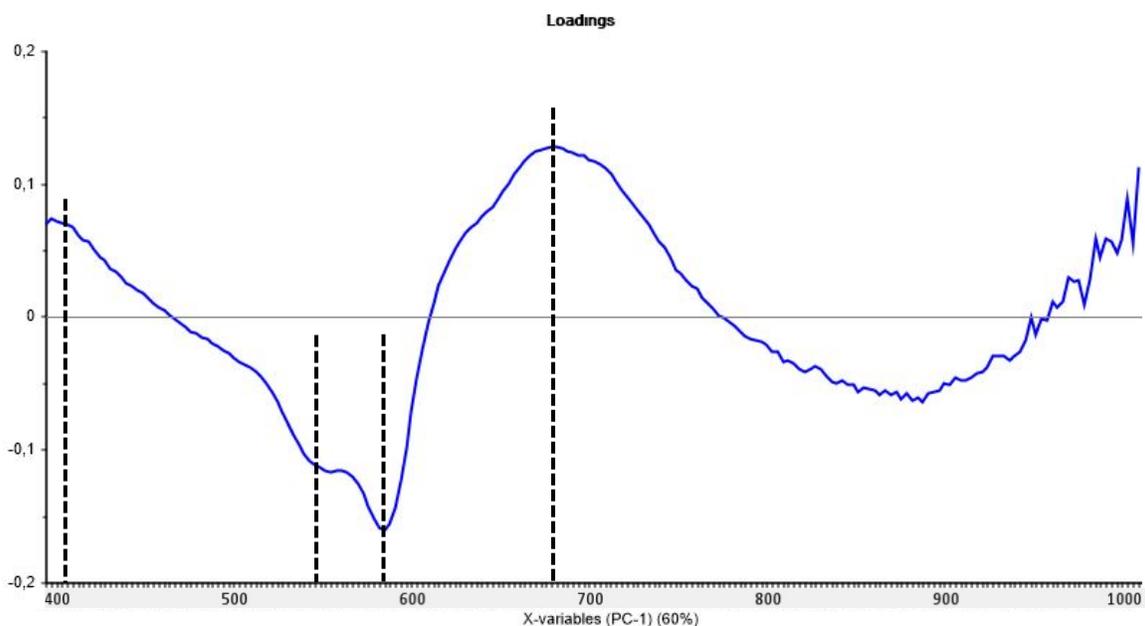


Figure 22. Loadings de la PC1 de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang.

Les loadings des différentes variables selon la première composante principale (PC1) démontrent que la variable à environ 675 nm est celle qui a la plus grande influence positive sur la séparation des données. Donc, les échantillons dont la valeur d'absorbance est plus élevée à 675 nm se retrouveront plus à droite sur le score-plot de la PCA. Il en est de même pour la variable à environ 420 nm. De plus, les variables possédant la plus grande influence négative sur la séparation des données en selon PC1 sont celles se trouvant à 540 nm et 580 nm. Cela signifie donc que les échantillons possédant des pics plus intenses à 540 nm et 580 nm se retrouvent plutôt du côté gauche sur le score plot de la PCA.

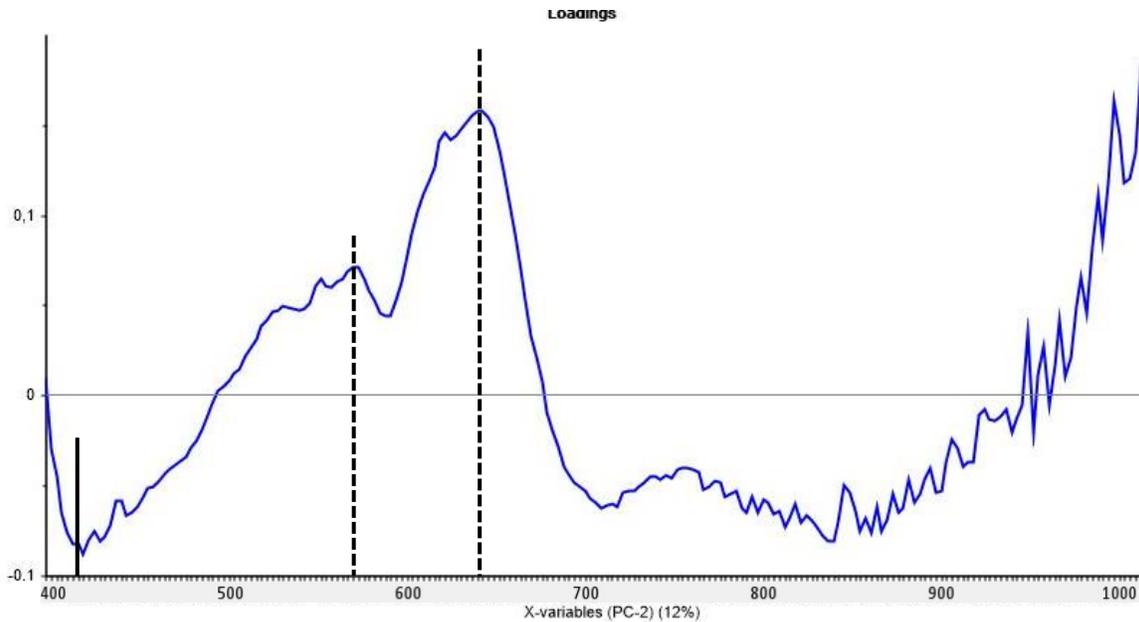


Figure 23. Loadings de la PC2 de l'analyse en composante principale des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang.

Selon PC2, les loadings des différentes variables démontrent que la variable à environ 635 nm est celle qui a la plus grande influence positive sur la séparation des données. Donc, les échantillons dont la valeur d'absorbance est plus élevée à 635 nm se retrouveront plus en-haut sur le score-plot de la PCA. La même chose peut être observée pour la variable à environ 565 nm. Ensuite, la variable possédant une influence négative sur la séparation des données selon PC2 est la variable se trouvant à environ 420 nm. Cela signifie que les échantillons possédant un pic plus intense à 420 nm se retrouvent plutôt dans le bas du score plot de la PCA.

Finalement, deux matrices de design expérimental ont aussi été créées pour le jeu de données de l'imagerie hyperspectrale, afin de pouvoir calculer l'influence des différents paramètres environnementaux tels que la température, l'humidité relative et le rayonnement sur deux bandes variables selon le niveau de dégradation. Le premier tableau, soit le Tableau 7 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 675 nm.

Tableau 7. Matrice de desqin expérimental pour le pic à 675 nm des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang

PC1	Linéaire			Interactions				Réponse
Expérience	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	y= 675 nm
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,36300868
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,16738126
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,42901547
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,1531816
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,08765044
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-0,01500594
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,15439324
8	1	1	1	1	1	1	1	0,02731286
Influence	<b>-0,8582</b>	0,1609	<b>-0,7012</b>	0,0573	-0,1046	0,2417	0,0558	

La réponse à 675 nm a été choisie puisqu'il s'agit d'un pic qui varie au cours de la dégradation du sang [9]. De plus, le graphique des *loadings* de la PCA (Figure 22) a aussi démontré qu'il s'agissait d'une variable contribuant grandement à la séparation des différents échantillons. Cela permet donc de déterminer l'influence des différents facteurs étudiés, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C), sur une réponse qui varie au cours de la dégradation du sang et qui est aussi variable entre les différents échantillons. De plus, les influences des interactions entre les paramètres ont aussi été calculées (AB, BC, AC, ABC).

Le design expérimental pour la réponse à 675 nm de l'imagerie hyperspectrale a permis de déterminer que les deux paramètres des conditions environnementales qui possèdent la plus grande influence sur cette bande sont la température (A) et le rayonnement électromagnétique (C). Pour le premier paramètre, soit la température, le coefficient b qui a été calculé est de -0,8582. La température a donc une influence négative sur l'intensité de l'absorbance à 675 nm. Cela signifie que lorsque la température augmente entre un niveau bas de 10°C et un niveau haut de 40°C, il y a un abaissement du pic à 675 nm. Pour le facteur de rayonnement (C), ce coefficient d'influence est de -0,7012. Le rayonnement fait donc varier la bande à 675 nm de la même façon que pour la température, donc de façon négative. L'ajout d'un rayonnement électromagnétique de 99CRI et UV entraîne donc aussi un abaissement de l'absorbance à 675 nm. L'influence de l'humidité est plus faible comparée aux deux autres paramètres, soit de 0,1609, mais elle est

positive. Pour ce qui est des interactions entre les paramètres, les coefficients sont aussi plus faibles et donc cela veut dire qu'il n'y a pas d'interaction particulière entre les paramètres.

Le deuxième tableau, soit le Tableau 8 ci-dessous, représente la matrice de design pour le pic à 580 nm de l'imagerie hyperspectrale.

Tableau 8. Matrice de design expérimental pour le pic à 580 nm des spectres de l'imagerie hyperspectrale des huit différents échantillons de sang

PC1	Linéaire			Interactions				Réponse
Expérience	A	B	C	AB	BC	AC	ABC	$y= 580 \text{ nm}$
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-0,87920207
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-0,65964667
3	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-0,9259263
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-0,57942021
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-0,52885524
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-0,35707681
7	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-0,57978931
8	1	1	1	1	1	1	1	-0,48537393
Influence	<b>1,0931</b>	-0,1457	<b>0,8323</b>	-0,2127	0,0496	-0,2999	-0,2043	

La réponse à 580 nm a été choisie puisqu'elle est aussi une bande qui varie au cours de la dégradation du sang [9]. Le graphique des *loadings* de la PCA (Figure 22) a d'ailleurs permis de démontrer qu'elle est une variable qui participe d'une façon importante à la séparation des différents échantillons. Donc, le design expérimental pour ce pic permet de déterminer de quelle façon les différents paramètres environnementaux, soit la température (A), l'humidité relative (B) et le rayonnement (C), influencent la dégradation du sang des huit échantillons analysés. De plus, il est aussi possible d'observer s'il y a des interactions entre les facteurs (AB, BC, AC, ABC).

Le design expérimental pour la réponse à 580 nm de l'imagerie hyperspectrale a permis de déterminer que les deux paramètres des conditions environnementales qui possèdent la plus grande influence sur cette bande sont aussi la température (A) et le rayonnement électromagnétique (C). Cependant, contrairement au pic à 675 nm, ceux-ci font varier la réponse à cette bande de façon positive. En effet, pour la température, le coefficient b qui a été calculé

est de 1.0931. Donc, lorsque la température augmente entre un niveau bas de 10°C et un niveau haut de 40°C, il y a une augmentation de l'absorbance à 580 nm. La même chose se produit pour le facteur de rayonnement (C), puisque son coefficient d'influence est de +0,8323. Le rayonnement fait donc aussi varier la bande à 580 nm de façon positive, et l'ajout d'un rayonnement électromagnétique entraîne donc aussi une augmentation de l'absorbance à 580 nm. L'influence de l'humidité est négligeable comparée à la température et le rayonnement, soit de -0,1457, mais elle est négative. Le design expérimental à 580 nm a aussi permis de déterminer que les interactions entre les paramètres étaient négligeables, puisque les coefficients sont aussi plus faibles.







## Chapitre 4 – Discussion

### Interprétation des résultats

#### Photographie

Des photographies sous lampe halogène ont d'abord été effectuées pour chacun des huit différents échantillons de sang. Ces photos ont été prises dès la sortie de la cuve des échantillons à la suite des 72 heures de vieillissement dans les différentes conditions environnementales prédéfinies.

Les images obtenues ont permis d'observer les changements de couleur qui surviennent lors de la dégradation *ex vivo* du sang sur le coton blanc. Une gradation de couleur allant du rouge vif à un brun plus foncé a été visiblement observable à l'œil nu. Comme le changement de couleur du sang résulte directement du processus de vieillissement, la couleur observée est un indicateur qualitatif du niveau de dégradation atteint par les échantillons de sang. Donc, puisqu'il y a une différence de couleur entre les différents échantillons, cela indique que ceux-ci n'ont pas le même niveau de dégradation, malgré le fait que le temps de vieillissement était exactement le même.

Il a ensuite été possible d'observer une tendance présente entre la couleur du sang et les paramètres environnementaux de température, d'humidité relative et de rayonnement électromagnétique au sein de la chambre climatique pendant la période de vieillissement des huit échantillons. Il a été observé que les quatre échantillons qui ont vieilli dans des conditions de température basse, soit à 10°C, étaient les plus rouge vif, alors que les quatre échantillons d'une couleur brun foncé étaient ceux à température haute, soit 40°C. Au sein de ces deux groupes de quatre échantillons, les deux plus foncés étaient ceux qui ont subi un rayonnement électromagnétique lors du vieillissement. Finalement, un taux d'humidité relative plus bas, soit 25%, a résulté en une tache de sang plus foncée qu'un taux d'humidité relative haut de 75%, entre deux taches qui avaient les mêmes conditions de température et de rayonnement. Cela signifie donc que le changement de couleur du sang est plus grandement influencé d'abord par la

température ambiante. Ensuite, c'est la présence d'un rayonnement qui exerce une influence plus importante sur la couleur observée que l'humidité relative.

De façon générale, une couleur brun foncé indique un niveau de dégradation du sang plus avancé. Donc, l'augmentation de la température entre 10°C et 40°C accélère la dégradation *ex vivo*. C'est aussi le cas pour l'ajout d'un rayonnement, puisque les échantillons ayant été laissés à vieillir sous les bandes DEL UV et 99CRI sont plus foncés que ceux qui étaient dans le noir complet. Le contraire est observé pour le taux d'humidité relative. L'augmentation du taux d'humidité à 75% a résulté en des taches plus rougeâtres que le niveau bas à 25%, qui a quant à lui résulté en des taches plus brunâtres.

Ces observations correspondent aux concepts théoriques dictés par la littérature. En effet, un haut taux d'humidité correspond à une tache plus rouge, donc un ralentissement de la vitesse de dégradation du sang. Cela peut être expliqué par le fait que l'augmentation de l'humidité ambiante entraîne une hydratation de la tache de sang et peut empêcher la dernière étape de dégradation, soit la conversion de la méthémoglobine en hemichromes, tel que déterminé par Colombo et al. [18]. Une haute température agit quant à elle comme un catalyseur du processus de dégradation, particulièrement pour l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine selon Bremmer et al. [3], ce qui a aussi pu être observé. Selon Bauer et al. [19], la présence d'un rayonnement aurait peu d'incidence sur la l'estimation de l'âge d'une trace de sang, mais il nous a été possible de voir que celui-ci a une certaine influence sur la vitesse de dégradation, puisque de façon générale dans les 8 traces, à même température, ce sont les échantillons laissés à vieillir sous un rayonnement qui auraient atteint une couleur brun plus foncé, et donc un niveau de dégradation supérieur.

### **Spectroscopie MicroNIR**

Les échantillons ont ensuite été analysés à l'aide de l'appareil MicroNIR, afin d'obtenir le spectre du sang sur le coton blanc dans le domaine du proche infrarouge. Ces mesures ont été prises dès la sortie hors de l'enceinte climatique après la période de vieillissement de 72 heures pour chacun des échantillons de sang. À la suite de l'application des prétraitements appropriés aux spectres

du jeu de données, une analyse en composante principale a été conduite pour observer la séparation des échantillons et déterminer le nombre de composantes nécessaires pour réduire la dimensionnalité tout en conservant une variance suffisante. À l'aide des connaissances acquises dans la littérature quant aux pics importants associés à la dégradation du sang et des *loadings* de la PCA, les pics de réponses ont été choisis pour le calcul des influences des différents paramètres environnementaux analysés par le design expérimental.

Tout d'abord, il n'y avait pas de variations entre les cinq répliques pris à différents endroits sur la tache de sang pour chacun des échantillons, et donc il n'y a pas d'intravariabilité pour les mesures NIR au sein d'une même tache de sang. Cela veut donc dire que la possible différence de niveau de dégradation entre les bords d'une tache de sang et le centre d'une tache de sang est négligeable lors de l'analyse à l'aide du MicroNIR. L'endroit où la mesure est prise sur la trace de sang importe donc peu. Cependant, comme la fenêtre d'analyse de l'appareil MicroNIR est assez large, avec une lentille frontale d'un diamètre de 2 cm, mais une fenêtre de mesure d'environ 2 mm par 2 mm, il est préférable d'effectuer la prise de mesure de façon à couvrir la plus grande surface de la trace possible. De plus, comme l'acquisition est rapide, soit d'une durée d'environ cinq secondes, la prise de plusieurs répliques n'est pas coûteuse en temps.

Les spectres NIR obtenus ont permis de voir qu'il y a une variation entre les différents échantillons de sang qui ont été laissés à vieillir pour la même période de temps, mais dans différentes conditions environnementales. Ces variations sont les plus importantes pour quatre bandes en particulier. La première est celle à environ 930 nm, associée au signal de l'oxyhémoglobine dans le sang [8]. Ensuite, deux bandes associées au signal de l'eau dans le sang varient aussi entre les échantillons, soit celles à environ 970 nm et 1450 nm [8, 33]. Finalement, le signal de la méthémoglobine ainsi que d'autres protéines telles que l'albumine et la globuline apparaît à environ 1640 nm sous forme d'une bande variant en intensité d'absorbance [8].

Un design expérimental a été construit pour le calcul des influences des différents paramètres environnementaux sur les pics des réponses de la spectroscopie NIR. Il s'agit d'un design expérimental de trois facteurs (température, humidité relative et rayonnement) à deux niveaux, soit un maximum et un minimum pour chaque facteur, résultant en huit différentes expériences.

Les pics de réponses ont été choisis pour représenter les pics qui sont associés à la réponse du sang, mais qui sont aussi des pics variables selon le niveau de dégradation du sang. Cela a permis de calculer l'influence de chaque paramètre sur une réponse liée à la dégradation, et donc d'observer de quelle façon chacun de ces paramètres affecte le niveau de dégradation du sang. Le premier pic de réponse NIR est celui de l'eau à 1450 nm, puisque celui-ci est lié à l'évaporation de l'eau dans le sang lors de son vieillissement [8]. Cela a aussi permis de vérifier s'il est affecté par le niveau d'humidité ambiante. Le design expérimental a révélé que les facteurs environnementaux influençant le plus le pic à 1450 nm sont la température et l'humidité. Cependant, ces deux paramètres agissent de façon contraire l'un de l'autre. La température a pour effet de réduire son intensité, alors que l'humidité relative a pour effet de l'augmenter. Puisque l'eau s'évapore au cours de la dégradation du sang et que ce processus est favorisé par l'augmentation de la température et la diminution de l'humidité, le pic à 1450 nm devrait être plus bas pour une trace ayant atteint un niveau de dégradation plus élevé. Le deuxième pic de réponse NIR est celui à 1645 nm, soit une bande qui apparaît lors de la dégradation du sang, et qui est due à la formation de méthémoglobine [8, 33]. Puisque la méthémoglobine est une forme dégradée de l'hémoglobine, cela a permis de vérifier quels paramètres affectent la vitesse de formation de la méthémoglobine détectable à l'aide de l'appareil NIR et de quelle façon ceux-ci interviennent. Le design expérimental a permis de déterminer que les facteurs environnementaux influençant le plus le pic à 1645 nm sont aussi la température et l'humidité. Contrairement au pic à 1450 nm, la température a pour effet d'augmenter son intensité, alors que l'humidité relative a pour effet de la diminuer. Puisque la méthémoglobine est formée par l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine au cours de la dégradation du sang et que ceci est favorisé par l'augmentation de la température et la diminution de l'humidité, le pic à 1645 nm devrait être plus élevé pour une trace ayant atteint un niveau de dégradation plus élevé. Cette tendance est d'ailleurs celle qui avait été observée pour le score-plot de l'analyse en composante principale qui avait été conduite sur le jeu de données. Celle-ci sépare les échantillons selon les deux axes de PC1 et PC2 qui correspondaient aux conditions de température et d'humidité.

Ceci démontre donc que la spectroscopie NIR, dans le domaine spectral allant de 900 nm à 1700 nm, permet d'observer différents niveaux de dégradation du sang, et que ce sont les paramètres

de température et d'humidité qui exercent des changements les plus importants détectables avec cette méthode d'analyse.

## **Spectroscopie Raman**

Les huit échantillons ont par la suite été analysés par spectroscopie Raman, ce qui a permis d'obtenir le spectre Raman du sang sur le coton. Les spectres de chacun des échantillons de sang ont été acquis à la sortie hors de l'enceinte climatique après la période de vieillissement de 72 heures. Ensuite, les prétraitements appropriés au jeu de données ont été appliqués sur l'entièreté des spectres, puis une analyse en composante principale a été conduite pour observer la séparation des échantillons et déterminer le nombre de composantes nécessaires pour réduire la dimensionnalité tout en conservant une variance suffisante. Les pics de réponses ont finalement été choisis pour le calcul des influences des différents paramètres environnementaux analysés par le design expérimental en fonction des pics importants pour la dégradation du sang définis dans la littérature et ceux déterminés par les *loadings* de la PCA.

Premièrement, cinq répliques à différents endroits sur la tache de sang ont été acquises pour chacun des échantillons, et ceux-ci ont démontré qu'il n'y avait pas de variation entre eux, et donc il n'y a pas d'intravariabilité pour les mesures Raman au sein d'une même tache de sang. Donc, la différence entre le niveau de dégradation entre les bords d'une tache de sang et le centre de la tache de sang est négligeable lorsque celle-ci est analysée par spectroscopie Raman. Cela veut donc dire que l'endroit où la mesure est prise sur la trace de sang est peu importante. Cependant, la surface d'acquisition couverte par le laser est très petite, soit de l'ordre de quelques microns. Donc, il est tout de même préférable de prendre plusieurs mesures couvrant différents endroits sur la tache de sang. D'ailleurs, comme la spectroscopie Raman est une technique de surface, puisque le laser peut descendre quelques microns sous la surface dans la tache, le fait de prendre plusieurs répliques est important puisque l'épaisseur de la tache de sang peut varier entre le centre et les bords. Cependant, l'acquisition est aussi rapide, soit d'une durée d'exposition de cinq secondes. Il n'est donc pas chronophage de prendre plusieurs répliques.

Les spectres Raman obtenus pour chaque échantillon de sang ont démontré qu'il y avait une variation entre les spectres des échantillons qui ont vieilli dans différentes conditions de température, humidité relative et rayonnement. Ces changements surviennent sous forme de différences dans les intensités de certains pics Raman. Les pics et leurs emplacements restent les mêmes qualitativement, mais diminuent visiblement en intensité relative selon les différents échantillons, et donc selon leur niveau de dégradation. Cette tendance est davantage visible pour certains pics plus importants, soit ceux à  $1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1585\text{ cm}^{-1}$ ,  $1390\text{ cm}^{-1}$ ,  $1120\text{ cm}^{-1}$  et  $745\text{ cm}^{-1}$ .

De plus, l'aspect de certains de ces pics varie entre les différents échantillons. C'est le cas des pics se situant à  $1648\text{ cm}^{-1}$ , et  $1390\text{ cm}^{-1}$ . En effet, pour les échantillons 1 à 4, le pic à  $1648\text{ cm}^{-1}$  est plus intense et défini, alors qu'il se transforme en un large triplet pour les échantillons 5 à 8. Il en est de même pour le pic à  $1390\text{ cm}^{-1}$ , où l'on observe un pic défini pour les échantillons 1 à 4, mais un doublet plus large pour les échantillons 5 à 8.

Puisque tous les échantillons de sang ont vieilli pendant une période de 72 heures et ont tous été analysés de la même façon, ce sont les conditions environnementales variables qui induisent les variations entre les spectres Raman. Donc, afin de déterminer de quelle façon ces changements se produisent entre les différents spectres et afin de comprendre quels paramètres environnementaux influencent ces variations, un design expérimental a été construit. Celui-ci a été créé de façon à faire varier les trois facteurs analysés, soit la température, l'humidité relative et le rayonnement entre un niveau haut et un niveau bas pour connaître les tendances observables entre deux limites dans lesquelles les conditions environnementales d'une scène de crime sont susceptibles de se retrouver. Le premier pic de réponse Raman est celui à  $1585\text{ cm}^{-1}$  puisque celui-ci est associé à la vibration du squelette de l'hème dans les érythrocytes et qu'il diminue au cours de la dégradation du sang [35-37]. Le design expérimental a révélé que le facteur environnemental le plus influant pour la variation du pic à  $1585\text{ cm}^{-1}$  est la température. Puisque la température accélère la dégradation du sang, le pic à  $1585\text{ cm}^{-1}$  devrait être plus bas pour une trace ayant atteint un niveau de dégradation plus élevé. Le deuxième pic de réponse Raman est celui à  $1648\text{ cm}^{-1}$ , soit un autre pic qui est d'une intensité variable selon le niveau de dégradation du sang, et qui est lié à la vibration du squelette de l'hème dans les globules rouges [35-37]. Une fois de plus, le design expérimental a permis de déterminer que le facteur

environnemental influençant le plus le pic à  $1648\text{ cm}^{-1}$  est aussi seulement la température. Une fois de plus, la température a pour effet de diminuer l'intensité de ce pic. Tout comme le pic précédent, comme la température accélère la dégradation du sang, il devrait être moins intense pour une tache de sang ayant atteint un niveau de dégradation plus important.

### **Imagerie hyperspectrale**

Les échantillons ont finalement été analysés par imagerie hyperspectrale, afin d'obtenir un spectre électromagnétique pour chacun des pixels de l'image de la tache de sang des échantillons. La capture des images hyperspectrales a été effectuée dès la sortie des échantillons hors de la chambre climatique à la suite de la période de vieillissement de 72 heures. Après l'application des prétraitements appropriés à l'entièreté du jeu de données, une analyse en composante principale a été conduite sur celui-ci afin de pouvoir observer la séparation des échantillons et déterminer combien de composantes principales sont nécessaires pour réduire la dimensionnalité des variables en conservant une variance suffisante. À l'aide à la fois de la littérature et des données obtenues dans les *loadings* de la PCA, les bandes de réponses appropriées ont été choisies pour pouvoir calculer les influences que les différents paramètres environnementaux analysés possèdent sur les spectres électromagnétiques obtenus par imagerie hyperspectrale à l'aide d'un design expérimental.

Tout d'abord, chacune des images acquises par imagerie hyperspectrale est constituée de plusieurs milliers de pixels, des hypercubes, couvrant la tache de sang mais aussi le support autour de la tache. Par souci de reproductibilité et pour obtenir les hypercubes du sang seulement, une zone de 500 pixels a été conservée pour chacun des échantillons. Donc, 500 spectres ont été obtenus pour une seule tache, couvrant l'entièreté de la région centrale de la trace. Cela a donc permis d'observer l'intra-variabilité des mesures au sein d'une même tache. Une PCA a été conduite sur tous ces spectres et le score-plot a permis d'observer une importante superposition des 500 répliques d'un même échantillon, et donc que l'intra-variabilité est faible au sein d'une même trace pour les données hyperspectrales. Cela veut donc dire que la possible différence de niveau de dégradation entre les bords d'une tache de sang et le centre de cette tache est

négligeable. Cependant, comme l'acquisition d'une image hyperspectrale permet d'obtenir directement tous les spectres couvrant la surface d'une trace de sang, il n'est pas nécessaire d'effectuer plusieurs mesures à différents endroits sur la trace, contrairement en spectroscopie Raman ou NIR.

Les spectres moyens obtenus par imagerie hyperspectrale ont permis d'observer une variation entre les différents échantillons de sang qui ont été laissés à vieillir pour la même période de temps mais dans différentes conditions environnementales. Ces variations sont les plus importantes pour les pics à environ 580 nm, 620 nm, 675 nm et 720 nm, qui sont attribués à l'hémoglobine dans le sang, et à l'absorption dans le rouge pour le spectre électromagnétique pour celle autour de 720 nm [9, 41].

Un design expérimental a aussi été construit avec les données hyperspectrales afin de déterminer les influences des différents facteurs environnementaux sur les spectres obtenus. Il s'agit d'un design expérimental factoriel faisant varier les trois facteurs étudiés, soit la température, l'humidité relative et le rayonnement entre deux niveaux, soit un maximum et un minimum pour chaque facteur. Les pics de réponses ont été choisis pour représenter les pics qui sont associés au sang et qui sont variables selon le niveau de dégradation du sang. Cela a permis de calculer l'influence de chaque paramètre environnemental sur une réponse liée à la dégradation, et donc d'observer l'effet que chacun de ces paramètres possède sur le niveau de dégradation du sang. Le premier pic de réponse pour l'imagerie hyperspectrale est situé à 675 nm, puisque celui-ci est associé à l'oxyhémoglobine dans le sang et qu'il diminue au cours de la dégradation du sang [9, 41]. Le design a permis de révéler que les facteurs environnementaux les plus influents pour la variation de ce pic sont la température et le rayonnement. En effet, la température et le rayonnement ont pour effet de réduire l'intensité de l'absorbance à cette bande. Donc, puisque la température et le rayonnement sont deux facteurs qui accélèrent la conversion de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine, le pic à 675 nm devrait être plus faible pour une trace plus dégradée. Le deuxième pic de réponse est celui à 580 nm, soit un autre pic qui dont l'intensité varie selon le niveau de dégradation du sang [9, 41]. Le design expérimental a permis de déterminer que les deux facteurs environnementaux ayant la plus grande influence sont aussi la température et le rayonnement. Cependant, ils ont pour effet d'augmenter l'intensité de ce pic,

contrairement à celui à 675 nm. Une absorbance plus intense à 580 nm indique donc que la tache a atteint un niveau de dégradation plus élevé.

## **Limitations**

Bien que ce projet ait permis d'obtenir des informations sur l'influence des conditions environnementales sur la dégradation des traces de sang, quelques limitations demeurent. Une des limites de la méthode est en effet les limites de l'étendue des conditions environnementales évaluées. Les niveaux maximums et minimums ont été choisis pour obtenir un design expérimental adapté à des conditions environnementales situées aux extrêmes permis par les capacités de l'enceinte climatique utilisée, au lieu d'un modèle trop précis pour des conditions environnementales moyennes qui ne convient plus lorsque l'on s'éloigne de cette moyenne. Donc, les paramètres de température choisis étaient d'une valeur minimum de 10°C et d'une valeur maximum de 40°C et les paramètres d'humidité relative étaient d'une valeur minimum de 25% et d'une valeur maximum de 75%. Pour le rayonnement, il s'agissait d'un minimum correspondant à l'extinction des sources lumineuses, donc dans le noir complet, et d'un maximum correspondant à l'ouverture au niveau maximal des sources lumineuses. Ce sont les valeurs qu'il était possible d'atteindre au sein de la cuve de vieillissement, mais il est possible de se retrouver dans des conditions environnementales allant au-delà de celles-ci sur une scène de crime. Les conditions évaluées sont donc adaptées à des scènes intérieures, mais pas à certaines conditions de scènes extérieures. Il faudrait donc par exemple évaluer le comportement de traces de sang conservées dans des températures allant sous le point de congélation pour représenter des conditions hivernales québécoises.

De plus, les échantillons analysés au cours de cette expérience étaient des échantillons contrôlés, qui étaient tous déposés sur le même substrat et de la même façon. Les traces collectées sur les scènes de crime ne sont cependant pas des échantillons créés en laboratoire de façon contrôlée. Elles sont plutôt laissées de façon involontaire dans des conditions souvent chaotiques et elles sont donc souvent imparfaites, de mauvaise qualité, ou bien même contaminées. Au cours de cette expérience, le sang d'un seul donneur a été utilisé. Cependant, il est possible que certaines

maladies affectant la coagulation du sang par exemple puissent influencer la dynamique de dégradation du sang [4, 9, 10, 35, 42], ce qui n'a pu être vérifié ici. Un autre paramètre influant pour la dégradation *ex vivo* du sang est le type de substrat sur lequel celui-ci est déposé. Au cours de cette expérience, seulement le coton blanc a été utilisé comme substrat. Cependant, certains substrats peuvent potentiellement camoufler le signal du sang lors de l'analyse par les différentes méthodes spectroscopiques [8, 11, 43]. Il est aussi possible qu'un autre type de substrat non poreux influence la dynamique de dégradation en affectant le temps d'évaporation de l'eau par exemple. D'ailleurs, la rugosité de la surface des traces de sang est une variable incontrôlable qui induit des différences de diffusion entre chaque tache de sang lors de l'analyse par méthodes spectroscopiques [2]. Les prétraitements des données sont donc indispensables afin de s'assurer d'éliminer ces sources d'erreur. De plus, comme les mesures sont prises à des jours différents sur un instrument qui a été éteint puis rallumé, il peut y avoir des différences de puissance ou bien même des différences dans l'environnement. Les prétraitements des données permettent donc de s'assurer qu'elles soient comparables entre elles.

## **Importance pour la pratique**

Tout d'abord, les méthodes qui ont été utilisées dans le cadre de cette expérience ont été choisies afin de prioriser des techniques portatives. En effet, celles-ci peuvent être facilement transportées sur une scène de crime et les mesures peuvent être acquises directement sur la scène au moment de la détection des traces. Cela permet donc d'éviter le temps de transport des traces de la scène de crime jusqu'en laboratoire, et aussi le temps et les conditions d'entreposage des pièces, qui pourraient poser un problème dans un contexte de datation. De plus, les conditions d'entreposage des traces biologiques, qui sont conservées à basse température, pourraient intervenir dans le processus de dégradation du sang. Les mesures acquises en laboratoire à la suite de tous les événements se produisant entre la collection des traces de sang et leur analyse ne correspondraient donc pas à la condition dans laquelle les traces ont été détectées. De plus, les méthodes spectroscopiques utilisées dans le cadre de ce projet permettent de procéder à l'analyse directement sur le support. En effet, l'utilisation d'un coton-tige imbibé

d'eau contribuerait à la réhydratation de la trace de sang, ce qui peut être réversible pour le processus de dégradation du sang [18]. Ces méthodes sont aussi rapides, avec des temps d'acquisition de moins de 30 secondes par mesure pour chacune des techniques utilisées.

Ensuite, cette expérience a permis de comprendre de quelle façon les conditions environnementales influencent la dynamique de dégradation du sang. En effet, ce projet offre une nouvelle compréhension quant au comportement de traces de sang différentes qui ne subissent pas les mêmes conditions de température, d'humidité relative et de rayonnement et de quelle façon celles-ci peuvent faire dévier un potentiel modèle de datation des traces de sang. De plus, ce projet a permis de déterminer que les différentes méthodes d'analyse spectroscopiques sont appropriées pour l'analyse des traces de sang qu'elles pourraient être utilisées dans une perspective de datation. Les paramètres de chacune des méthodes spectroscopiques utilisées ont pu être optimisés pour ce type d'analyse, en plus d'avoir pu déterminer les méthodes de traitements des données appropriées pour l'analyse de la dégradation du sang. Les régions importantes dans les différents spectres obtenus ont été identifiées et il est possible de comprendre de quelle façon les réponses obtenues à ces régions d'intérêt varient selon le niveau de dégradation du sang sur le coton. Donc, avant même de procéder à la construction d'un modèle statistique de datation, il est possible de comparer des traces de sang dont les spectres sont différents et de procéder à leur datation relative, sous condition de connaître les conditions environnementales de leur vieillissement.

## **Prochaines étapes**

Ce projet de recherche s'est concentré entièrement sur l'influence des conditions environnementales sur la dégradation du sang, puisqu'il s'agit d'un paramètre important pouvant faire dévier un potentiel modèle de datation du sang. Tous les échantillons des différentes expériences ont donc été laissés à vieillir pendant la même période de temps, soit pendant trois jours. Ce sont seulement les paramètres de température, d'humidité relative et de rayonnement qui étaient variables. Une prochaine étape sera donc d'ajouter le paramètre de temps et donc de faire varier le temps de vieillissement dans l'optique de développer un modèle de datation, en

intégrant les connaissances acquises quant aux conditions environnementales. Cela permettra donc d'observer les variations dans les spectres à différents temps de dégradation et d'observer la dynamique du vieillissement du sang, ou même s'il y a atteint d'un plateau où il n'y a plus de changement.

Un autre paramètre qui n'a pas été évalué dans le cadre de ce projet, mais qui peut aussi exercer une influence sur la datation du sang est le type de substrat sur lequel le sang est déposé. Le signal du coton blanc, qui est le substrat utilisé au cours de ce projet, n'interfère pas avec le signal du sang pour les différentes méthodes d'analyse, mais il est possible qu'un autre matériau ou couleur puisse posséder des pics qui interfèrent avec le signal du sang dans les spectres obtenus. Dans le cadre d'un séjour de recherche à l'étranger, différents tissus ont été évalués afin d'observer leur influence sur l'analyse du sang par spectroscopie NIR. Les substrats analysés étaient le denim, un tissu 50% coton et 50% polyester de couleur rose, une chemise 100% coton de couleur bleue, une moquette grise et un tissu provenant d'un coussin de couleur noire. Les spectres NIR obtenus ont démontré que les différents types de tissus offrent des spectres différents, mais que la couleur importe peu dans le domaine spectral du proche infrarouge. Les pics importants pour la dégradation du sang n'étaient cependant pas camouflés par le signal provenant du substrat. Les deux autres techniques spectroscopiques, soit la spectroscopie Raman et l'imagerie hyperspectrale, n'ont cependant pas été utilisées pour l'évaluation de l'influence du substrat. Une prochaine étape serait donc de répéter les mêmes étapes, mais en utilisant la spectroscopie Raman et l'imagerie hyperspectrale afin de déterminer si ces techniques sont appropriées pour l'analyse de la dégradation du sang sur différents tissus. Il serait aussi possible d'évaluer la dynamique de la dégradation du sang sur d'autres substrats qui ne sont pas des tissus. En effet, le processus d'évaporation de l'eau se produirait probablement plus rapidement sur un substrat non poreux tel que du verre ou de la céramique par exemple. Il serait donc nécessaire d'évaluer la dégradation du sang sur ce type de substrat dans l'optique de développer un modèle de datation qui serait aussi approprié pour des surfaces non poreuses.

Un autre paramètre qui serait intéressant d'évaluer serait d'ajouter d'autres donneurs. En effet, il est possible que le sang du donneur (groupe sanguin, sexe, potentielles maladies) joue un rôle dans la dynamique de dégradation, ce qui pourrait faire dévier un modèle de datation. Donc, une

prochaine étape sera de répéter les expériences avec plusieurs donneurs afin de couvrir les différents groupes sanguins et sexes biologiques, pour observer si ceux-ci exercent une influence sur la dégradation du sang.

Finalement, les trois techniques spectroscopiques ont été utilisées séparément, et les designs expérimentaux ont aussi été construits séparément. Cela constitue donc beaucoup de traitement de données et trois différentes matrices de design. Une solution pour simplifier le traitement de données et pour fusionner les résultats des trois techniques est l'utilisation de l'analyse statistique *multiblock*. Cela permettrait de combiner les résultats des spectres et de procéder à l'analyse statistique des trois méthodes spectroscopiques ensemble. De cette façon, il est possible d'obtenir une seule matrice de design et de combiner les informations importantes des trois techniques en une seule étape.



## Conclusion

En conclusion, l'influence des paramètres environnementaux, soit la température, l'humidité relative et le rayonnement, sur la dégradation des traces de sang déposées sur du coton blanc a pu être analysée. Cela a été possible grâce à un design expérimental factoriel faisant varier les trois facteurs environnementaux entre deux niveaux, soit un minimum et un maximum. Ces deux extrêmes représentent l'étendue des conditions susceptibles de se retrouver sur les scènes de crime, contrairement à un modèle trop précis qui ne serait pas adapté à des changements de conditions environnementales. Il a aussi été possible de déterminer quelles techniques d'analyse spectroscopique étaient appropriées pour l'analyse de la dégradation du sang sur le coton, et ce que chacune des techniques permet d'obtenir comme information sur la trace. Ce projet a aussi permis de déterminer le traitement de données approprié pour l'analyse des traces de sang, et ce pour chaque méthode d'analyse spectroscopique.

Tout d'abord, il a été possible d'observer qu'au niveau de la couleur de la trace, la température est le paramètre qui possède la plus grande incidence, et qu'une augmentation de température accélère le changement de couleur vers le brun foncé. Il en est de même avec l'ajout de rayonnement. Cependant, l'augmentation de l'humidité relative a pour effet de ralentir le passage au brun foncé. Donc, la trace la plus rouge vif était celle au niveau minimum de température (10°C), au niveau minimum de rayonnement (aucun rayonnement) et au niveau maximum d'humidité relative (75%), alors que ces paramètres étaient tous contraires pour la trace la plus foncée (40°C, rayonnement maximal et 25% d'humidité relative).

Les techniques spectroscopiques ont aussi permis de renseigner sur le niveau de dégradation de la trace, et de déterminer quels paramètres environnementaux influencent le plus cette dégradation. Pour la spectroscopie NIR, ce sont majoritairement la température et l'humidité qui possèdent la plus grande influence sur les variations observées dans les spectres. Pour la spectroscopie Raman, c'est seulement la température qui induit des variations visibles dans les spectres obtenus, alors que pour l'imagerie hyperspectrale, ce sont la température et le

rayonnement électromagnétique qui influencent le plus les variations dans les spectres. Cela permet de démontrer que les méthodes sont donc complémentaires, puisque les trois ensemble permettent d'obtenir de l'information sur la dégradation en fonction de tous les paramètres étudiés. Ce projet a aussi permis de déterminer comment l'environnement de l'échantillon affecte sa dynamique de dégradation : l'augmentation de la température accélère la vitesse de dégradation, l'augmentation de l'humidité relative ralentit la vitesse de dégradation et la présence d'un rayonnement électromagnétique accélère la vitesse de dégradation. En plus d'avoir permis de renseigner sur la façon dont chaque paramètre environnemental affecte le niveau de dégradation du sang déposé sur le coton, il a aussi été possible de déterminer quelles régions doivent être ciblées sur les différents spectres pour l'évaluation de la dégradation des traces de sang. En effet, les pics importants dont l'intensité et l'apparence varient selon le niveau de dégradation atteint ont pu être identifiés pour chacune des techniques.

Finalement, ce projet a permis d'optimiser et de valider des méthodes d'analyse de la dégradation du sang qui sont aussi des appareils portatifs. En effet, l'utilisation de techniques portatives permet de prendre les mesures directement sur la scène de crime au moment de la détection des traces, ce qui est un important avantage pour l'analyse de la dégradation du sang et sa datation. La prise de mesure directement sur la scène permet d'éviter le temps de transport et d'entreposage des pièces avant l'analyse en laboratoire et aussi les conditions environnementales variables que celles-ci subiront pendant ce processus, des éléments qui pourraient affecter le niveau de dégradation de la pièce. De plus, ces mesures peuvent être prises directement sur le support sur lequel la trace est retrouvée, évitant donc des techniques de collecte de la trace telles que l'utilisation d'un coton-tige imbibé d'eau, pouvant affecter le processus de dégradation.

## **Perspectives**

Il reste encore beaucoup d'approches possibles et de paramètres importants à étudier pour la dégradation du sang, dans une perspective de datation. Tout d'abord, l'évaluation de l'effet des conditions environnementales sur le processus de dégradation ne constitue qu'un seul des trois facteurs d'influence majeurs, les deux autres étant l'influence du substrat et des variations dans

la composition du sang [1]. Il sera donc impératif d'aussi analyser ces deux autres paramètres, afin de prendre en compte ces particularités de la trace, qui n'est pas un échantillon contrôlé. Donc, puisqu'il n'y avait qu'un seul donneur et substrat pour tous les échantillons, il faudra vérifier si les résultats obtenus sont répétables avec différents donneurs et si les mêmes tendances sont observées sur différents substrats.

Il sera aussi pertinent d'effectuer un design expérimental d'optimisation. En effet, le design de screening a permis de déterminer les facteurs les plus importants et comment ils influencent la réponse, mais à deux niveaux seulement (minimum et maximum). Cependant, il ne nous renseigne pas sur la façon dont cette réponse évolue avec les niveaux entre ce minimum et ce maximum. Donc, la réalisation d'un design d'optimisation permettra de voir les ensembles de conditions qui permettent d'obtenir une réponse de dégradation la plus haute et donc de mieux comprendre leurs interactions et la linéarité des réponses.

Par la suite, des modèles de dégradation dans le temps basés sur le principe de *time-since-deposition* seront développés en faisant une évaluation au moyen de méthodes de régressions multivariées (*PLS*, *PCR*, *SVM-regression*) dans l'enceinte climatique utilisée [1]. Il sera aussi important d'effectuer la validation de ces résultats avec des tests à l'aveugle réalisés en conditions naturelles.

Finalement, comme il a été possible de démontrer au cours de ce projet que toutes les techniques qui ont été utilisées sont complémentaires entre elles puisqu'elles renseignent toutes sur des paramètres différents, mais qu'elles sont analysées individuellement, il sera possible de tester un modèle de régression *multiblock* afin de combiner les techniques ensemble pour créer un modèle de dégradation unique. La performance de ce modèle pourra être comparée à la performance des techniques individuelles. L'idéal serait d'avoir une seule technique, puisque l'analyse individuelle des trois représente beaucoup de travail et de temps, mais la combinaison par ce modèle permettra de démontrer la complexité que représente l'étude de la dégradation dans le temps. Ensuite, si la performance de ce modèle est suffisante et que celui-ci fonctionne bien, il serait envisageable de proposer une suite d'outils qui permettront de l'utiliser sans connaissances

particulières dans le domaine de traitement statistique ou en programmation, afin de le rendre disponible pour les praticiens du domaine de la science forensique.

Ce projet de recherche mise donc sur la complémentarité des différentes techniques utilisées jusqu'à maintenant et dont les résultats sont intéressants et nécessitent d'être exploités davantage. Il prend d'ailleurs véritablement en considération la trace comme élément central et il est unique et différent de ce qui est actuellement fait ailleurs dans le monde. L'objectif principal demeure de pouvoir développer un ensemble d'outils portables pour réaliser les mesures directement sur la scène, en plus de construire un modèle de dégradation dans le temps pouvant être utilisé par les forensiciens dans leur pratique, ce qui serait un avancement considérable dans le domaine.

## Références bibliographiques

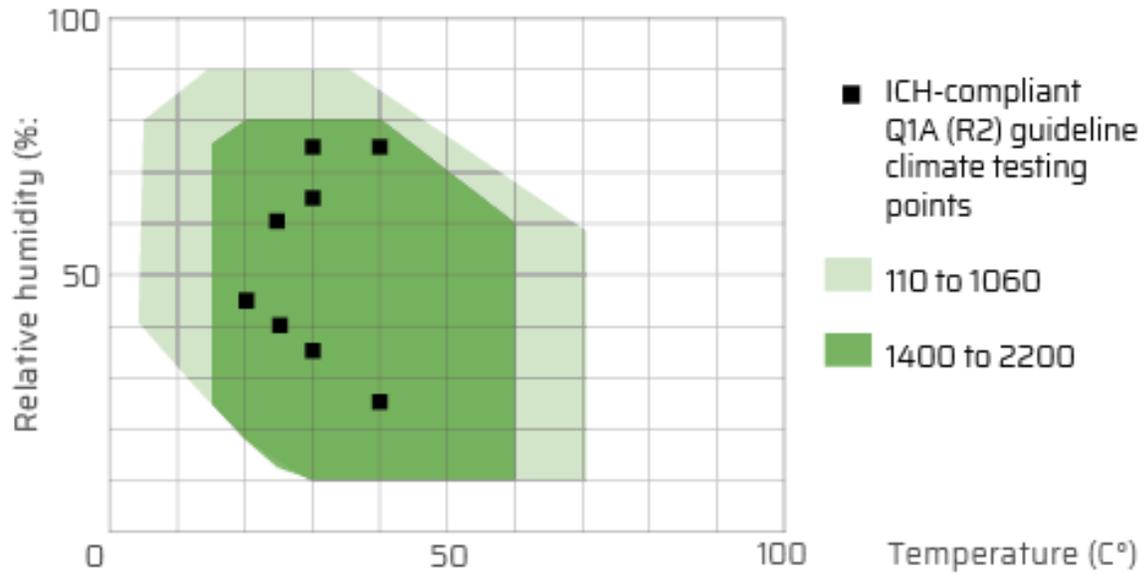
1. Zadora, G. and A. Menzyk, *In the pursuit of the holy grail of forensic science – Spectroscopic studies on the estimation of time since deposition of bloodstains*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018. **105**.
2. Larkin, B.A.J. *Bloodstain pattern analysis: scratching the surface*. 2015.
3. Bremmer, R.H., et al., *Forensic quest for age determination of bloodstains*. Forensic Sci Int, 2012. **216**(1-3): p. 1-11.
4. Doty, K.C., C.K. Muro, and I.K. Lednev, *Predicting the time of the crime: Bloodstain aging estimation for up to two years*. Forensic Chemistry, 2017. **5**: p. 1-7.
5. Lin, H., et al., *Estimation of the age of human bloodstains under the simulated indoor and outdoor crime scene conditions by ATR-FTIR spectroscopy*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 13254.
6. Menzyk, A., et al., *Toward a novel framework for bloodstains dating by Raman spectroscopy: How to avoid sample photodamage and subsampling errors*. Talanta, 2020. **209**: p. 120565.
7. Li, B., et al., *The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis*. Forensic Science International, 2011. **212**(1): p. 198-204.
8. Edelman, G.J., et al., *Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy*. Forensic science international, 2012. **220 1-3**: p. 239-44.
9. Edelman, G., T.G. van Leeuwen, and M.C. Aalders, *Hyperspectral imaging for the age estimation of blood stains at the crime scene*. Forensic Sci Int, 2012. **223**(1-3): p. 72-7.
10. Thanakiatkrai, P., A. Yaodam, and T. Kitpipit, *Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis*. Forensic science international, 2013. **233 1-3**: p. 288-97.

11. Choumilov, V., *The influence of the substrate on the characterisation and visualisation of blood using hyperspectral imaging*, in *École des sciences criminelles*. 2016, Université de Lausanne: Lausanne.
12. Stritt, N., *L'estimation de l'âge d'une trace de sang : Quels sont les défis?*, in *École des sciences criminelles*. 2014, Université de Lausanne: Lausanne.
13. Weyermann, C., et al., *Une question de temps : apprentissage par problème dans un cours de police scientifique*. *Revue Internationale de Pédagogie en Enseignement Supérieur*, 2015. **31**: p. 1-13.
14. Gallidabino, M.D. and C. Weyermann, *Time since last discharge of firearms and spent ammunition elements: state of the art and perspectives*. *Forensic Science International*, 2020. **311**: p. 110290.
15. Brunelle, E., M. Eldridge, and J. Halánek, *Determination of Time since Deposition of Fingerprints via Colorimetric Assays*. *ACS Omega*, 2021. **6**(19): p. 12898-12903.
16. Ezcurra, M., et al., *Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper*. *Forensic Science International*, 2010. **197**(1): p. 1-20.
17. Elliott, C., A. Shafer, and T. Stotesbury, *The crux of time: A meta-analysis of ex vivo whole blood degradation*. *Frontiers in Analytical Science*, 2022. **2**.
18. Colombo, M.F. and R. Sanches, *Hydration-dependent conformational states of hemoglobin: Equilibrium and kinetic behavior*. *Biophysical Chemistry*, 1990. **36**(1): p. 33-39.
19. Bauer, M., S. Polzin, and 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*, 2003. **138**(1-3): p. 94-103.
20. Fujita, Y., et al., *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*, 2005. **152**(1): p. 39-43.
21. Inoue, H., et al., *A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography*. *Forensic Sci Int*, 1992. **57**(1): p. 17-27.

22. Patterson, D., *Use of Reflectance Measurements in assessing the Colour Changes of Ageing Bloodstains*. *Nature*, 1960. **187**(4738): p. 688-689.
23. Xu, Y., et al., *Raman spectroscopy coupled with chemometrics for food authentication: A review*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020. **131**: p. 116017.
24. Peng, W., et al., *Applications of near infrared spectroscopy and hyperspectral imaging techniques in anaerobic digestion of bio-wastes: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2022. **165**: p. 112608.
25. Xiaoli, C., H. Yuan, and W.Z. Lu, *Progress and application of spectral data pretreatment and wavelength selection method in NIR analytical technique*. *Progress in Chemistry*, 2004. **16**: p. 528-542.
26. Stadler, A.M., et al., *Hemoglobin dynamics in red blood cells: correlation to body temperature*. *Biophys J*, 2008. **95**(11): p. 5449-61.
27. Faivre, B., et al., *Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of autooxidation reaction*. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 1998. **26**(1): p. 17-26.
28. Kailkhura, B., et al., *A Spectral Approach for the Design of Experiments: Design, Analysis and Algorithms*. *Journal of Machine Learning Research*, 2017. **19**.
29. Garud, S.S., I.A. Karimi, and M. Kraft, *Design of computer experiments: A review*. *Computers & Chemical Engineering*, 2017. **106**: p. 71-95.
30. Jankovic, A., G. Chaudhary, and F. Goia, *Designing the design of experiments (DOE) – An investigation on the influence of different factorial designs on the characterization of complex systems*. *Energy and Buildings*, 2021. **250**: p. 111298.
31. Jacquez, J.A., *Design of experiments*. *Journal of the Franklin Institute*, 1998. **335**(2): p. 259-279.
32. Ozaki, Y., *Near-Infrared Spectroscopy—Its Versatility in Analytical Chemistry*. *Analytical Sciences*, 2012. **28**(6): p. 545-563.
33. Botoniic-Sehic, E., et al., *Forensic Application of Near-Infrared Spectroscopy: Aging of Bloodstains*. *Spectroscopy (Santa Monica)*, 2009. **24**.
34. Smith, E. and G. Dent. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. 2005.

35. Doty, K.C., G. McLaughlin, and I.K. Lednev, *A Raman "spectroscopic clock" for bloodstain age determination: the first week after deposition*. *Anal Bioanal Chem*, 2016. **408**(15): p. 3993-4001.
36. Ramser, K., et al., *Importance of substrate and photo-induced effects in Raman spectroscopy of single functional erythrocytes*. *J Biomed Opt*, 2003. **8**(2): p. 173-8.
37. Boyd, S., M.F. Bertino, and S.J. Seashols, *Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications*. *Forensic Sci Int*, 2011. **208**(1-3): p. 124-8.
38. Lemler, P., et al., *NIR Raman spectra of whole human blood: effects of laser-induced and in vitro hemoglobin denaturation*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(1): p. 193-200.
39. David, C.C. and D.J. Jacobs, *Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1084**: p. 193-226.
40. Cui, F., et al., *Application of principal component analysis (PCA) to the assessment of parameter correlations in the partial-nitrification process using aerobic granular sludge*. *Journal of Environmental Management*, 2021. **288**: p. 112408.
41. Pallocci, M., et al., *Forensic applications of hyperspectral imaging technique: a narrative review*. *Medico-Legal Journal*, 2022. **90**(4): p. 216-220.
42. Shine, S.M., et al. *The applicability of fluorescence lifetime to determine the time since deposition of biological stains*. 2017.
43. Bergmann, T., F. Heinke, and D. Labudde, *Towards substrate-independent age estimation of blood stains based on dimensionality reduction and k-nearest neighbor classification of absorbance spectroscopic data*. *Forensic Science International*, 2017. **278**: p. 1-8.

## Annexes



Annexe 1. Barème des paramètres d'humidité relative possibles en fonction de la température au sein de l'enceinte climatique.