HAL
open science

Estimation de l'âge médicolégal grâce à l'étude de la méthylation de l'ADN : revue de la littérature

Juliette Bacquet, Frédérique Magdinier, G. Léonetti, C. Bartoli, J. Chiaroni, L Tuchtan, M.-D Piercecchi

To cite this version:

Juliette Bacquet, Frédérique Magdinier, G. Léonetti, C. Bartoli, J. Chiaroni, et al.. Estimation de l'âge médicolégal grâce à l'étude de la méthylation de l'ADN : revue de la littérature. La Revue de Médecine Légale, 2019, 10.1016/j.medleg.2019.07.001 . hal-02407527

HAL Id: hal-02407527

https://amu.hal.science/hal-02407527v1

Submitted on 12 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

REVUE GÉNÉRALE

Estimation de l'âge médicolégal grâce à l'étude de la méthylation de l'ADN : revue de la littérature

Estimation of medico-legal age through the study of DNA methylation: Review of the literature

J. Bacquet [a,b,*], F. Magdinier [b], G. Leonetti [a,c], C. Bartoli [a,c], J. Chiaroni [d], L. Tuchtan [a,c], M.-D. Piercecchi [a,c]

[a] *Service de médecine légale et droit de la santé, hôpital de la Timone, AP—HM, 264, rue Saint-Pierre, 13385 Marseille cedex 5, France*
[b] *Inserm, MMG, UMR 1251, Aix-Marseille université, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille, France*
[c] *CNRS, EFS, ADES, Aix-Marseille université, 13916 Marseille, France*
[d] *Établissement Français du Sang PACA-Corse, 13005 Marseille, France*

MOTS CLÉS
Estimation ;
Âge ;
Méthylation ;
ADN ;
NGS ;
Revue

Résumé L'estimation d'un âge médicolégal est un paramètre clé (fournissant des informations utiles) pour les enquêtes criminelles, juridiques et anthropologiques. L'âge médicolégal peut être défini comme le reflet de l'âge biologique (et non chronologique) d'un individu dans un contexte de recherche judiciaire. Cette estimation initialement basée sur l'étude morphologique, la radiographie osseuse mais également dentaire, s'est tournée depuis 5 ans vers le domaine de l'épigénétique médicolégale. L'analyse de la méthylation de l'ADN est actuellement le meilleur moyen de prédire un âge chronologique. Le développement d'approches moléculaires pour l'étude de cette méthylation ne cesse de croître et à ce jour plus de 20 publications ont montré une corrélation positive entre vieillissement et changement de méthylation à l'échelle du CpG. Dans cette revue, nous résumons les données de la littérature portant sur l'identification et le développement de marqueurs corrélés à l'âge dans le sang et dans d'autres tissus. Nous recensons aussi les techniques d'études avec leurs avantages et leurs inconvénients.

* Auteur correspondant.
E-mail address: juliette.bacquet@ap-hm.fr (J. Bacquet).

KEYWORDS
Age;
Estimation;
Methylation;
DNA;
NGS;
Review

Summary The estimation of forensic age is a key parameter (providing useful information) for criminal, legal and anthropological investigations. Medico-legal age can be defined as the reflection of the biological (not chronological) age of an individual in a judicial (research) context. This estimate initially based on the morphological study, the bone and dental radiography turned for 5 years towards the field of the epigenetics forensic. Analysis of DNA methylation is currently the best way to predict a chronological age. The development of molecular approaches for the study of this methylation continues to grow and to date more than 20 publications have shown a positive correlation between aging and change of methylation at the CpG scale. In this review, we summarize data from the literature on the identification and development of age-correlated markers in blood and other tissues. We also identify study techniques with their advantages and disadvantages.
© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

En médecine légale, comme dans la plupart des sciences « forensiques » connexes (anthropologie, odontologie, etc.), l'identification d'un corps inconnu reste une problématique fréquemment rencontrée, pour laquelle trois grandes phases d'analyse sont généralement nécessaires.

Tout d'abord, une phase de détermination du profil biologique de l'individu retrouvé (affinité populationnelle, âge, sexe), puis une phase d'observation de caractéristiques et « d'histoire de vie » (variations anatomiques, caractères discrets, traumatismes, pathologies et éventuellement traces témoignant des conditions du décès), et pour finir une troisième phase d'identification comparative (confrontation de données ante et post mortem) qui a pour but de nous conduire à un rejet d'identité supposée (comparaison négative) ou à l'identification formelle (positive) du corps expertisé.

La première de ces trois phases est absolument cruciale puisque c'est celle qui orientera la poursuite de l'enquête et permettra de prioriser les identités supposées, pour lesquelles du matériel ante-mortem sera collecté, afin de nous conduire en phases 2 et 3.

Bien souvent lorsque l'on recherche à identifier une personne disparue ou l'auteur d'un crime, ce matériel ante-mortem/ou les preuves biologiques médicolégales se résume à de l'ADN dégradé présent en très petite quantité et regroupe les liquides organiques (principalement le sang, la salive, le liquide spermatique ou encore les sécrétions vaginales), les phanères (cheveux, poils) et les empreintes digitales. Dans ces cas, lorsque toute comparaison directe avec les bases de données ADN et empreintes génétiques (FNAEG ou Fichier national automatisé des empreintes génétiques) ne permettent pas de fournir une correspondance définitive et fiable, la détermination du profil biologique et par conséquent l'estimation de l'âge est indispensable.

Approches initiales pour l'estimation de l'âge

Malheureusement, cette estimation de l'âge manque cruellement de précision. Dans la majorité des cas, lorsque des restes squelettiques sont intacts chez le défunt, ou lorsque l'accessibilité à la radiographie osseuse chez la personne vivante est possible, la détermination de l'âge peut être effectuée par des mesures et des calculs anthropologiques/anthropométriques ainsi que par des recoupements de dossiers médicaux. L'étude des dents et l'examen des os sont les deux méthodes les plus utilisées pour estimer une fourchette d'âge au décès. On étudiera par exemple chez l'enfant, les stades de maturation squelettique, la soudure des cartilages de conjugaisons, les noyaux d'ossification [1] et chez l'adulte l'examen morphologique de la symphyse pubienne [2], de la surface sacro-pelvienne, de l'extrémité sternale de la 4e côte et de la clavicule [3].

Du côté de l'odontologie, chez l'enfant, on évaluera le degré de minéralisation dentaire et le stade de maturation dentaire avec entre autres la pousse de la 3e molaire qui permet de déterminer si l'individu a plus ou moins de 18 ans [4]. Chez l'adulte on observera une usure de l'émail ou encore une transparence radiculaire [5]. Mais trop peu d'évènements anatomiques et physiologiques sont à même de nous renseigner avec justesse et précision, car leur variabilité inter individuelle et inter populationnelle est bien trop grande. En effet, les méthodes actuellement disponibles présentent beaucoup de faiblesses liées à l'absence de population de référence de qualité. Par exemple, l'atlas de Greulich et Pyle [6] a été établi en 1957 sur une population d'enfants nord-américains, nés entre 1931 et 1942, qui n'est pas du tout comparable à la population d'Europe occidentale du 21ème siècle ou aux populations d'enfants clandestins du Maghreb ou d'Europe centrale.

Il y a une dizaine d'année, les recherches se sont focalisées sur des méthodes biochimiques, comme la racémisation de l'acide aspartique [7], l'accumulation de plomb, les réticulations de collagène, la composition chimique des dents ou encore la glycosylation des protéines [8]. Ces méthodes, qui s'étaient montrées pourtant prometteuses, semblent atteindre des limites pratiques notamment le manque de précision, de reproductibilité et d'applicabilité dans les autres tissus.

Une piste de recherche reste toutefois ouverte et il apparaît que c'est du côté de la biologie moléculaire que les meilleures réponses peuvent être trouvées.

Nouvelle méthode d'estimation de l'âge : étude de la méthylation de l'ADN

Actuellement, les laboratoires habilités aux analyses génétiques réalisent des comparaisons de profils grâce à l'analyse de différentes sous-unités répétitives ou Short Tandem Repeat (STR) par PCR multiplexe au sein de l'ADN nucléaire.

Les récents progrès technologiques en matière de biologie moléculaire ou « génie moléculaire » permettent à ce jour

d'appréhender l'apparence physique, le phénotype d'un individu, notamment la couleur des yeux [9], la forme ou l'ondulation des cheveux [10] mais aussi l'ascendance géographique [11] grâce à l'étude de Single Nucleotide Polymorphisme (SNP) et l'estimation d'un âge biologique vient compléter ce tableau.

Le vieillissement humain est un processus naturel caractérisé par une perte progressive de l'intégrité physiologique causée par l'accumulation de dommages cellulaires tout au long de la vie d'un individu. Différentes marques épigénétiques façonnent le génome : le remodelage de la chromatine, la modification post-traductionnelle des histones et la méthylation de l'ADN. Or il est apparu que le vieillissement est associé à des changements de méthylation de l'ADN sur des sites spécifiques du génome. Ces modifications épigénétiques pourraient donc être utilisées dans le cadre d'une analyse médicolégale afin d'estimer l'âge biologique du donneur. La méthylation de l'ADN est une modification chimique et réversible qui concerne principalement les cytosines lorsque celles-ci sont suivies par des guanines. Cette modification de l'ADN est effectuée par des enzymes particulières appelées DNMTs pour « DNA methyl-transferase ». Dans les cellules de mammifères, cela correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) au niveau du carbone 5 d'une cytosine (5mC). Ces sites de méthylation de l'ADN sont appelés les dinucléotides CpGs et sont principalement méthylés dans le génome humain (70—80 %) [12]. La répartition des sites CpG au sein du génome n'est pas aléatoire et la majorité des sites CpG se situent dans des îlots CpG situés le plus souvent à l'extrémité 5′ de la région promotrice des gènes.

En effet, l'une des principales fonctions de la méthylation est de pouvoir réguler l'expression des gènes. Ces modifications de l'ADN sont significativement plus marquées dans les promoteurs des gènes codant pour les protéines régulant la chromatine bivalente et les gènes régulés par le complexe Polycomb. Cette méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreux autres processus biologiques comme le développement, la différenciation cellulaire et le maintien de la stabilité du génome. De plus la méthylation de l'ADN est un mécanisme tissu-spécifique, c'est à dire que chaque type cellulaire peut avoir un profil de méthylation différent [13].

Le niveau global de méthylation de l'ADN diminue avec l'âge [14] mais des études récentes ont démontré des différences de méthylation (hypo- ou hyperméthylation) de certains sites CpG (AR-CpG) selon l'âge. Dès 2013, Horvath [15] a proposé une horloge de vieillissement constituée de 353 sites CpG corrélés à l'âge. Depuis de nombreuses recherches ont été menées dans ce sens. La méthylation de l'ADN émerge donc comme marqueur potentiel pouvant permettre une meilleure estimation de l'âge, et positionne la « génétique médicolégale » comme un champ d'investigation majeur au cours des prochaines années.

Méthodologies actuelles pour l'établissement de profils épigénétiques médicolégaux

Étude de la méthylation des cytosines par désamination oxydative au bisulfite de sodium

Cette technique très quantitative et résolutive a été mise au point dans les années 1990 et a permis de progresser dans la détection et l'analyse de l'ADN méthylé. La désamination oxydative des cytosines par le traitement au bisulfite de sodium provoque leur conversion en uracile. Elles seront amplifiées comme une thymine après PCR. Seules les cytosines méthylées sur leur carbone 5 ne sont pas converties. Plusieurs kits sont actuellement sur le marché (EpiTect Bisulfite®, EZ DNA Methylation®, MethylEdge Bisulfite®...). Cette conversion chimique provoque une fragmentation importante et une perte de l'ADN, la quantité d'ADN (bien que variable selon le fabricant) requise au départ est donc plus élevée que pour le typage génétique STR. Les méthodes basées sur le bisulfite fournissent une résolution à l'échelle d'une paire de base et des données quantitatives précises. Par conséquent, la grande majorité des études de cette revue ont utilisé cette méthodologie avec une moyenne de 200 à 500 ng d'ADN de départ pour une conversion optimale. Cette étape est ensuite suivie d'une amplification de l'ADN converti par PCR grâce à des amorces spécifiques des séquences d'intérêts.

Digestion enzymatique à base d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation (MSRE)

Les enzymes de restriction sensibles à la méthylation (MSRE) ont été largement utilisées dans la recherche en épigénétique, en raison de leur capacité très spécifique à reconnaître et à couper l'ADN méthylé. Ces enzymes sont utilisées pour analyser le statut de méthylation des résidus de cytosine dans les séquences CpG. Comme leur nom l'indique, ces enzymes de restriction ne sont pas capables de cliver les résidus méthylés de cytosine, laissant ainsi l'ADN méthylé intact. À l'inverse, elles clivent l'ADN au niveau des cytosines non méthylées. Après la digestion, l'ADN est amplifié par PCR multiplex pour les gènes d'intérêts. Puis les fragments de PCR sont détectés par électrophorèse capillaire. MSRE-PCR a été décrit dans le passé comme un moyen rapide et fiable de détecter simultanément les profils de méthylation de l'ADN dans plusieurs fragments, de manière sensible et reproductible [16].

L'équipe de Mawlood [17] a utilisé la technique Epitect Methyl qPCR system (QIAGEN) pour prédire un âge dans une cohorte de 80 femmes âgées de 19 à 91 ans à partir d'échantillons sanguins. Il a comparé les niveaux de méthylation des dinucléotides CpG dans les régions promotrices de quatre gènes liés à l'âge (*NPTX2*, *KCNQ1DN*, *GRIA2* et *TRIM58*). Globalement, la différence entre l'âge prédit et réel était d'environ 11 ans et l'écart moyen absolu (MAD) était de 7,2 ans seulement. Un avantage par rapport à la conversion au bisulfite est que cette technique n'a nécessité que 120 ng d'ADN au départ pour la digestion enzymatique, donc plus pratique pour les échantillons dégradés médicolégaux.

Découverte de marqueurs CpG

Les premières études de corrélation entre âge et méthylation de l'ADN ont permis d'identifier un certain nombre de gènes, dont les îlots CpGs étaient différentiellement méthylés grâce à la technologie Infinium BeadChip (Illumina) [15,18—22].

En effet, il a été possible de mesurer le niveau de méthylation de l'ensemble des gènes grâce à une technologie de micropuce (ou « micro-array »). La première puce à ADN

pouvant mesurer la méthylation a été commercialisée en 2009 par la société Illumina sous le nom de Infinium HumanMethylation27k [23] qui permet de mesurer le niveau de méthylation d'environ 27 000 sites CpG à travers le génome. Fin 2011, une nouvelle génération de puce est apparue, il s'agit de la puce Infinium HumanMethylation450k [24] qui mesure la méthylation d'environ 480 000 sites CpG correspondant à environ 99 % des gènes et ARN non codants connus. Le fonctionnement de ces puces se base sur les propriétés du bisulfite de sodium.

C'est en utilisant ces puces que Bocklandt et al. [18] ont montré des différences dans la méthylation de promoteurs de trois gènes, *EDARADD*, *TOM1L1* et *NPTX2* dans la salive et construit un modèle de régression qui pourrait prédire l'âge d'un individu avec une précision moyenne de 5,2 ans. Garagnani et al. [22] ont montré des changements de méthylation corrélées à l'âge au niveau de sites CpG dans 3 gènes, *ELOVL2*, *FHL2* et *PENK* dans des échantillons sanguins provenant de 245 hommes et 249 femmes âgés de 9 à 99 ans. Ils ont suggéré que le gène *ELOVL2* était le plus prédictif de l'âge et le plus prometteur. Dans un modèle de vieillissement quantitatif construit par Hannum et al. [19], l'étude de la méthylation différentielle de 71 régions dont l'état de méthylation varie avec de l'âge a permis une précision de prédiction très élevée avec une erreur de 3,9 ans dans le sang. Horvath [15] a développé un prédicteur de l'âge multitissu (51 tissus et types cellulaires) en analysant le profil de méthylation de 8000 échantillons sur les deux types de puces 27 K et 450 K. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les prédictions étaient applicables à un large spectre de tissus avec une grande précision et un taux d'erreur de 3,6 années. Seul le tissu mammaire, l'endomètre utérin, les fibroblastes dermiques ainsi que le tissu musculaire squelettique et cardiaque montraient un taux d'erreur élevé.

Cependant, un inconvénient de la puce 450 K est que seul 1,5 % de l'ensemble des CpG génomiques sont représentés. En effet, seuls les CpG situés dans les îlots CpG au niveau des régions promotrices des gènes sont analysés. Une nouvelle micropuce Illumina a été commercialisée, il s'agit de la MethylationEPIC BeadChip [25]. Cette puce EPIC couvre 853 307 sites CpG et contient plus de 90 % des 450 000 sites déjà connus avec 333 265 nouveaux CpG situés dans des régions régulatrices distales, notamment des régions activatrices de la transcription qui possèdent une faible proportion de CpG.

Ces puces permettent donc l'analyse simultanée de milliers de sites CpG et constituent le meilleur compromis à ce jour en termes de couverture, de débit d'échantillon, de temps d'analyse et de coût. Elles sont considérées comme la méthode de référence pour la recherche de biomarqueurs épigénétiques [26] et offrent une bonne résolution à l'échelle d'un seul CpG. Mais une telle technologie basée sur l'hybridation nécessite un ADN de bonne qualité et en grande quantité (plusieurs centaines de ng) pour des performances optimales [27], ce qui limite leur application médicolégale.

Des données de puce micro-array sont publiques, par exemple dans la base de données GEO (Gene Expression Omnibus) (https://www-ncbi-nlm-nih-gov.gate2.inist.fr/geo/), qui peut être utilisée comme point de départ pour les études médicolégales. Cependant, certaines de ces recherches à motivations médicales ont été réalisées sur des patients, où on ignore généralement si le statut de la maladie influence le niveau de méthylation. D'autre part, en particulier pour les tissus d'intérêt médicolégaux tels que le liquide spermatique, les sécrétions vaginales ou le sang menstruel, les données publiques sont plus restreintes, car ces tissus sont rarement inclus dans les études médicales. Cette situation a conduit les chercheurs en criminalistique à générer des données de micro-array pour ces tissus [28,29], même si celles-ci sont généralement en nombre limité en raison des coûts élevés par échantillon impliqués.

Analyse ciblée de la méthylation de l'ADN

Dans cette partie, nous résumons les différentes méthodes ciblées les plus couramment utilisées pour l'analyse de la méthylation de l'ADN. Elles regroupent des systèmes d'extension simple base méthylé (SBE) tels que le Ms-SNuPE, le Pyroséquençage, le système EpiTYPER basé sur la spectrométrie de masse et pour finir le séquençage haut débit ou NGS. Nous discutons aussi de leurs performances et de leur adéquation médicolégale.

Extension d'amorce mononucléotidique sensible à la méthylation bisulfite (Ms-SNuPE), Methylation Sensitive — Single Nucleotide Primer Extension

La technologie Ms-SNuPE dérive du système SBE (Single Base Extension) très utilisé dans le domaine médicolégal pour identifier les polymorphismes mononucléotidiques (SNP). Il permet l'analyse d'ADN très dégradé et a été utilisé pour l'estimation de l'ascendance géographique et l'estimation des traits physiques d'un individu inconnu [30]. Au cours des dernières années, cette technologie, qui étudie aussi les profils de méthylation, a été appliquée pour l'estimation de l'âge.

L'extension d'amorce mononucléotidique sensible à la méthylation (Ms-SNuPE) est une technique quantitative qui peut être utilisée pour la mesure de la méthylation au niveau d'un CpG. Un traitement préalable de l'ADN génomique au bisulfite de sodium est nécessaire. S'ensuit une PCR utilisant une ou plusieurs amorces spécifiques qui viennent se positionner immédiatement en amont du CpG à analyser. L'amorce vient s'hybrider sur la séquence et s'étend d'une seule paire de base (le C ou le T) grâce à l'ADN polymérase et à des didésoxynucléotides (ddNTP) marqués fluorescents. Ainsi, seule la base complémentaire du SNP cible est séquencé. Puis la valeur de méthylation en pourcentage (0 à 100) sur chaque site CpG est calculée en divisant l'intensité du nucléotide C/G (détection de l'ADN méthylé non converti) par le nucléotide C/G plus le nucléotide T/A (détection de l'ADN non méthylé converti).

Par exemple, l'équipe de Lee [31] a étudié les modifications de la méthylation de l'ADN au niveau de 24 CpG dans 68 échantillons de liquide spermatique provenant d'individus âgés de 20 à 73 ans à l'aide de la technique SNaPshot. Il s'agit de la première étude proposant une signature épigénétique de l'âge ayant comme support du liquide spermatique, qui reste l'un des fluides corporels les plus pertinents d'un point de vue médicolégal. Parmi les candidats CpG liés à l'âge, une forte corrélation avec l'âge a été obtenue pour le

cg06304190 situé dans le gène *TTC7B*. Ils ont ensuite créé un modèle de régression linéaire prédictif de l'âge à l'aide de 3 marqueurs CpG (cg06304190 dans le gène *TTC7B*, cg06979108 dans le gène *NOX4* et cg12837463) et ont montré une forte corrélation entre l'âge prédit et l'âge chronologique avec une différence absolue moyenne de 4,2 ans. Cette étude a montré que les sites CpG liés à l'âge dans le sperme étaient différents de ceux du sang. Mais que la précision de ce modèle d'estimation de l'âge médicolégal dans le liquide spermatique était comparable à celle du sang.

L'avantage de cette technique est sa facilité d'utilisation sur des plates-formes d'analyses génétiques bien que sa capacité de multiplexage soit limitée à environ 10 sites CpG.

Pyroséquençage

Le pyroséquençage est de loin la méthode ciblée la plus populaire pour l'analyse épigénétique médicolégale, non seulement en raison de sa simplicité, de sa facilité d'utilisation et de sa disponibilité pour les laboratoires médicolégaux, mais également en raison de sa résolution à l'échelle d'un CpG, de sa nature hautement quantitative et de sa sensibilité [32].

Par exemple, Zbiec-Piekarska [33] ont construit un modèle prédictif d'âge dans le sang en utilisant deux sites CpG du gène *ELOVL2* avec une erreur de prédiction de 6,85 ans et un écart moyen absolu (MAD) de l'âge chronologique de 5,03 ans. Plus tard, ils ont également démontré qu'un modèle composé d'analyse de la méthylation des gènes *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* et *FHL2* permettait une précision de prédiction améliorée dans le sang avec un MAD à partir de l'âge chronologique de 3,9 ans [34].

Les principales étapes de cette technique incluent la conversion au bisulfite de sodium de l'ADN génomique, l'amplification de la région d'intérêt à l'aide d'amorces spécifiques du gène et le séquençage par synthèse en temps réel basé sur la détection de la libération de pyrophosphate lors de l'incorporation de nucléotides.

Le pyroséquençage multiplexe est possible mais peut être très complexe [35], ce qui est problématique pour les analyses médicolégales où les quantités d'ADN sont très limités. Cette méthode a été appliquée avec succès pour l'analyse de petites régions génomiques (50—100 pb) pouvant contenir plusieurs sites CpG adjacents [36]. Le pyroséquençage après conversion au bisulfite est une technique très sensible (jusqu'à 50—100 pg d'ADN), applicable aux vieux échantillons [37]. Un inconvénient est le nombre élevé de cycles de PCR lors de l'amplification (45 cycles), et l'écart-type pour la quantification de la méthylation peut atteindre 10 % en fonction du type de prélèvements.

Spectrométrie de masse

Le système Agena Bioscience EpiTYPER® est une méthode de détection et de quantification de la méthylation de l'ADN basée sur un traitement au bisulfite, utilisée dès 2015 comme une technique de validation dans une étude d'estimation de l'âge médicolégale [38].

La technologie EpiTYPER® est une méthode basée sur la spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF). Les niveaux de méthylation de l'ADN sont calculés en comparant l'intensité du signal de masse entre l'ADN méthylé et non méthylé (différence de masse de 16 Daltons pour chaque position CpG). Des fragments d'ADN de masse différente étant nécessaires, ceux de taille identique ou situés en dehors d'une fenêtre de masse de 1700 à 7000 Da ne peuvent pas être détectés et ne permettent donc pas de fournir des données de méthylation [39]. De plus EpiTYPER® rapporte les niveaux de méthylation de sites CpG contenant un ou plusieurs dinucléotides CpG (généralement 2 à 4 CpG) dans le même fragment. Les dinucléotides CpGs qui sont donc proches les uns des autres seront détectés comme un ensemble, ce qui réduit la résolution de la technologie.

En 2016, l'équipe de Freire-Aradas a utilisé la technologie EpiTYPER dans une cohorte de 725 personnes européennes âgées de 19 à 101 ans pour proposer un nouveau modèle de prédiction de l'âge. Ce modèle basé sur une analyse de régression multivariée a été élaboré à l'aide des sept loci les plus corrélés à l'âge, à savoir *ELOVL2*, *ASPA*, *PDE4C*, *FHL2*, *CCDC102B*, *C1orf132* et chr16:85395429. Les niveaux de méthylation détectés dans ces loci ont fourni une erreur de prédiction de l'âge (MAD) de $\pm$3,07 ans et un pourcentage d'erreur de prédiction par rapport à l'âge de 6,3 %.

Plus récemment, la même équipe [40], toujours avec EpiTYPER, a rapporté une prédiction de l'âge très précise avec une erreur absolue de 0,94 ans dans une cohorte de 209 enfants et adolescents âgés de 2 à 18 ans. Ils ont cette fois ci utilisé un modèle de régression comprenant 6 loci et ont identifié un nouveau gène *KCNAB3* hautement corrélé à l'âge chez les jeunes, qui en fait un biomarqueur d'âge très spécifique et informatif pour ce type de cohorte.

Séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS)

Le NGS avec son approche haut débit a récemment fait son entrée dans le domaine de l'épigénétique médicolégale [41] et a fourni des résultats préliminaires très prometteurs [42]. Une équipe [43] a pu établir une MAD de 7,5 ans entre l'âge réel et l'âge prédit en utilisant 16 CpG et une seconde [44] a rapporté une MAD de 3,2 ans en utilisant 13 CpGs.

Les avantages du NGS, est qu'il permet par rapport aux autres techniques, d'analyser conjointement (multiplexage) plusieurs loci indépendants et 100 échantillons par réaction de séquençage. Pour chaque loci de chaque échantillon, plus de 1000 fragments d'ADN sont séquencés donnant alors accès à une profondeur de champs importante et une reproductibilité élevée. Cette technologie a été appliquée à l'étude de la méthylation de l'ADN dans des régions spécifiques du génome. Il s'agit d'une méthode très quantitative qui permet l'identification d'un ou plusieurs loci relevant pour déterminer l'âge médicolégal.

Actuellement, il existe deux principales plates-formes NGS utilisées en criminalistique : le système MiSeq proposé par Illumina basé sur le séquençage par synthèse chimique et le système PGM proposés par Thermo Fisher Scientific basé sur le séquençage par semi-conducteurs. Jusqu'ici, seuls les résultats du séquençage par MiSeq ont été publiés [43,45]. Ces protocoles ont tous utilisé préalablement la conversion au bisulfite. Le NGS est une méthode très sensible et ne nécessite que de très petites quantités de matériel. Comme

dit dans l'introduction, les preuves biologiques récupérées sur une scène de crime ou dans le cadre d'enquête judiciaires consistent bien souvent en de l'ADN dégradé présent en très petite quantité. Les méthodes d'estimation de l'âge basées sur des amplicons de plus de 300 pb ou sur des besoins en ADN supérieurs à 100 ng pourraient ne pas être applicables à ces échantillons. Les toutes dernières études utilisant le séquençage haut débit après modification de l'ADN au bisulfite de sodium viennent résoudre ce problème. En effet Naue [44] aurait obtenu un niveau de prédiction de l'âge élevé en utilisant 10 ng au stade de la PCR.

Les inconvénients du NGS sont d'abord matériels, en effet les automates requis ne sont pas encore disponibles dans la plupart des laboratoires de médecine légale. De plus les coûts sont élevés même s'ils sont en constante diminution. Un inconvénient aussi réside dans l'analyse bio-informatique qui reste complexe.

Très récemment, une équipe [46] a mis au point un test de quantification de la méthylation de 12 sites CpG dans le sang en utilisant Illumina Miseq dans une cohorte de 110 individus âgés de 11 à 93 ans. L'erreur moyenne de ce test était de 4,1 ans. Pour 52 % des échantillons, l'erreur de prédiction de l'âge était inférieure à 4 ans et pour 86 % des échantillons, l'erreur était inférieure à 7 ans. La sensibilité de cette méthode a été évaluée à la fois en termes d'exactitude de quantification de la méthylation et d'exactitude de prévision. Ils ont construit ce modèle prédictif de l'âge avec seulement 2 ng d'ADN requis au départ, ce qui est donc plus attrayant pour les chercheurs en médecine légale. Ils ont ensuite élargi ce protocole en travaillant sur 34 échantillons de salive et ont prédit un âge avec un taux d'erreur inférieur à 4 ans pour 50 % des échantillons et un taux d'erreur inférieur à 7 ans pour 70 % des échantillons.

En conclusion, bien que toutes ces techniques de pyroséquençage, de spectrométrie de masse aient été appliquées avec succès pour l'estimation de l'âge, le NGS semble être le meilleur candidat pour les analyses judiciaires. En effet, il se caractérise par une sensibilité élevée, une bonne résolution et une capacité de multiplexage.

Applications médicolégales : estimation de l'âge dans le sang

À ce jour, plusieurs modèles de prédiction de l'âge applicables à l'analyse de l'ADN médicolégal (c'est-à-dire un ADN dégradé et présent en très petite quantité) ont été développés sur la base d'une gamme de gènes, de tissus et de technologies. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 1.

La première étude de corrélation entre méthylation de l'ADN et l'âge était celle de Weidner en 2014 [48]. Leur étude a utilisé un modèle 3 CpG situé dans trois régions génomiques indépendantes. Il s'agit du cg02228185 dans le gène *ASPA*, du cg25809905 dans le gène *ITGA2B* et un site CpG proche du cg17861230 dans le gène *PDE4C*. Grâce à ce modèle, ils ont pu prédire un âge avec une précision de $\pm$ 5,43 ans à partir d'ADN provenant d'échantillons sanguins de 151 individus. Bien que le cg17861230 fût initialement la cible de l'analyse, la détection simultanée par pyroséquençage de sites CpG voisins a conduit à la détection d'un autre site CpG distant de 14 pb présentant une meilleure association avec l'âge. Ce modèle a ensuite été appliqué à des échantillons de cellules épithéliales buccales [52], cette équipe en utilisant les mêmes sites CpG et la même technologie a obtenu une précision presque similaire avec une erreur moyenne de prédiction de 7,3 ans. L'utilisation seule du marqueur PDE4C dans des échantillons buccaux a été proposée comme étant suffisamment informative pour permettre des prévisions d'âge fiables.

Un seul gène pour l'estimation de l'âge a également été proposé par Zbiec-Piekarska [33] qui a étudié les niveaux de méthylation du gène *ELOVL2* dans des échantillons de sang par pyroséquençage. Dans cette étude, de fortes corrélations avec l'âge ont été trouvées pour deux sites CpG dans la région promotrice de ce gène. Cependant, un ajout de marqueurs a été suggérée pour améliorer ce modèle de prédiction de l'âge. Cette étude a donc été suivie d'un autre modèle comprenant cinq sites CpG dans les gènes *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* et *FHL2* [34]. La précision fournie par ce modèle a amélioré les résultats précédents en atteignant une valeur prédictive de l'écart absolu moyen (MAD) de $\pm$3,9 ans. L'équipe a mis en ligne un accès à ce modèle prédictif de l'âge à l'adresse suivante : http://www.agecalculator.ies.krakow.pl/. Une fois encore, la détection simultanée par pyroséquençage de sites CpG voisins a permis la découverte de marqueurs supplémentaires, encore plus étroitement associés à l'âge. En raison de la forte corrélation avec l'âge du gène *ELOVL2*, ce gène a été inclus dans tous les systèmes de prévision médicolégales suivants.

Park et al. [51] ont rapporté un modèle prédictif sanguin utilisant les niveaux de méthylation de trois sites CpG dans *ZNF423*, *ELOVL2* et *CCDC102B* (MAD $\pm$ 3,16 ans). *CCDC102B* avait déjà été identifié par Zbiec-Piekarska comme un gène hautement informatif, bien que non inclus dans le modèle final de cette étude. Parallèlement, Zubakov et al. [59] incluaient *ELOVL2*, *DUSP27* et *ORAOV1* dans un modèle basé sur 8 CpG dans le sang et rapportaient un MAD de $\pm$5,09 ans. Fait intéressant, cette équipe a comparé cette méthode d'estimation de l'âge basée sur la méthylation de l'ADN avec d'autres méthodes moléculaires dont la mesure de la longueur des télomères par qPCR et la mesure du nombre de sjTREC par qPCR. Ils ont constaté que les marqueurs de méthylation étaient plus performants que le pouvoir prédictif du sjTREC (MAD $\pm$ 9,75) et de la longueur télomérique (MAD $\pm$ 12,27). Pareillement, Cho et al. [53] ont validé un modèle prédictif de l'âge dans le sang en combinant l'étude de la méthylation et la méthode sjTREC. Les marqueurs de méthylation de l'ADN précédemment décrit dans la population polonaise par Zbiec-Piekarska situés dans les gènes *ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* et *FHL2* (MAD $\pm$ 3,9) ont été réanalysés dans 100 échantillons de sang d'individus coréens afin de tester leur association avec l'âge chronologique. Cho a obtenu une MAD de 4,18 ans pour cette population coréenne avec ces mêmes marqueurs et a montré que la performance prédictive des modèles déjà existants était relativement constante dans les différents groupes de population. De plus, il a montré que la combinaison du dosage de sjTREC et l'étude de la méthylation de l'ADN améliorait la prévision de l'âge dans le groupe des individus plus âgés. Le modèle de Zbiec-Piekarska a aussi été validé chez des individus malades. En effet, la méthylation de l'ADN peut être modifiée par divers facteurs, notamment par un état pathologique sous-jacent [62]. Spolnicka et al.

Tableau 1 Estimation de l'âge grâce à l'étude de la méthylation de l'ADN, résumé de la littérature.

	Technologie	Sélection des marqueurs	Nature de l'échantillon	Nombre d'échantillons testés	Nombre de CpGs	Kit enzymatique	Référence de l'étude	Informations supplémentaires	Gènes	Moyenne absolue de déviation (année)	Quantité d'ADN requise (ng) pour conversion au bisulfite/digestion
Digestion enzym. MSRE	PCR quantitative	Littérature	Sang total	80	4	EpiTect Methyl II DNA	Mawlood et al., 2016 [17]	Kurdish, femmes, 19–91 ans	*BCAS4*, *KCNQ1DN*, *GRIA2*, *TRIM58*	7,2	120
Conversion au Bisulfite de sodium	Methylation-sensitive SNuPE (single nucleotide primer extension)	Illumina 450 K	Liquide spermatique	68	24	Imprint DNA Modification	Lee et al., 2015 [31]	20–73 ans	*MXRA5*, *C5orf25*, *ZC3H11A*, *cg03063928*, *MRPL36*, *BLCAP*, *STRA8*, *ADRB3*, *TTC7B*, *NOX4*, *NPL*, *FCRL1*, *cg13030797*, *DLL1*, *SFRS16*, *PARP14*, *ANKFY1*, *ZC3H11A*, *CTAG2*, *PFKFB3*, *cg23488376*, *ABLIM1*, *cg12837463*	4,2	0,5–200
		Illumina 450 K	Salive	226	7	EpiTect Fast DNA Bisulfite, Imprint DNA Modification	Hong et al., 2017 [47]	18–73 ans	*PTPN7*, *SST*, *CNGA3*, *KLF14*, *TSSK6*, *TBR1*, *SLC12A5*	3,15	500
	Pyroséquençage	Illumina 27 K	Sang total	151	3	EpiTect Bisulfite	Weidner et al., 2014 [48]	20–75 ans	*ASPA*, *ITGA2B*, *PDE4C*	5,43	500
		Littérature	Sang total	95	5	EpiTect Bisulfite	Huang et al., 2015 [49]	Chinois, 9–75 ans	*ASPA*, *ITGA2B*, *NPTX2*, *Tom1L1*, *ZDHHC22*, *ZIC4*	7,9	100
		Littérature	Sang total	427	7	EpiTect Bisulfite	Zbiec-Piekarska et al., 2015 [33]	2–75 ans	*ELOVL2*	5,75	500–2000
		Littérature	Sang total	420	5	EpiTect Bisulfite	Zbiec-Piekarska et al., 2015 [34]	2–75 ans	*C1orf132*, *KLF14*, *TRIM59*, *FHL2*, *ELOVL2*	3,9	2000
		Littérature	Sang total	206	4	EpiTect Bisulfite	Bekaert et al., 2015 [50]	0–91 ans	*ASPA*, *PDE4C*, *ELOVL2*, *EDARADD*	3,75	200
		Littérature	Dents	29	7			19–70 ans	*PDE4C*, *ELOVL2*, *EDARADD*	4,84	200
		Illumina 450 K	Sang total	765	3	EZ DNA Methylation Gold	Park et al., 2016 [51]	Coréens, 11–90 ans	CCDC102B, ELOVL2, ZNF423	3,16	500
		Illumina 450 K et 27 K	Cellules épithéliales buccales	55	3	EZ DNA Methylation Gold	Eipel et al., 2016 [52]	1–85 ans	*ASPA*, *ITGA2B*, *PDE4C*, *CD6*, *SERPINB5*	7,3, 5,1	500
		Littérature	Sang total	100	5	EZ DNA Methylation Gold	Cho et al., 2017 [53]	Coréens, 20–74 ans	*ELOVL2*, *C1orf132*, *KLF14*, *TRIM59*, *FHL2*	4,18	500
		Littérature	Sang total	190	5	EpiTect 96 Bisulfite	Spólnicka et al., 2018 [54]	3 groupes : Alzheimer précoce et tardif et maladies graves	*ELOVL2*, *C1orf132*, *KLF14*, *TRIM59*, *FHL2*	4,4 (mal graves) ; Alz précoce 7,1 ; Alz tardif 6,1	1000–2000
		Littérature	Sang, salive	163	27	EpiTect Fast DNA Bisulfite	Alghanim et al., 2017 [55]	5–73 ans	*KLF14*, *DLX5*, *SCGN*	6,2 (salive) et 6,6 (sang)	200–500
	Melt-curve analysis	Littérature	Sang total	104	24	EpiTect Fast DNA Bisulfite	Hamano et al., 2016 [56]	Vivants et morts, 0–95 ans	*ELOVL2*, *FHL2*	7,7	20
		Littérature	Salive, mégots de cigarettes	254	14	EpiTect Fast DNA Bisulfite	Hamano et al., 2017 [57]	1–73 ans	*ELOVL2*, *EDARADD*	salive 6,25 et mégots 7,65	10
	Spectrometrie de masse	Littérature	Sang total	65	58	EZ DNA Methylation	Yi et al., 2015 [58]	11–72 ans	*USP11*, *NOP14*, *ZIC5*	4,7	2000
		Illumina 450 K	Sang total	49	6	EZ DNA Methylation	Xu et al., 2015 [38]	Chinois, 20–80 ans	*ADAR*, *ITGA2B*, *PDE4C*	2,8	1000
		Affymetrix	Sang total	216	8	EZ DNA Methylation	Zubakov et al., 2016 [59]	4–82 ans	*DUSP27*, *ORAOV1*, *ELOVL2*	5,09	500
		Illumina 450 K	Sang total	725	7	EZ DNA Methylation	Freire-Aradas et al., 2016 [39]	Européens, 19–101 ans, jumeau	*ELOVL2*, *ASPA*, *PDE4C*, *FHL2*, *CCDC102B*, *C1orf132*, *CHR16: 85395429*	3,07	300
		Littérature	Dents	22	13	EZ-96 DNA Methylation	Giuliani et al., 2016 [60]	17–77 ans	*ELOVL2*, *FHL2*, *PENK*	1,2 ± 7,07	200
		Illumina 450 K	Sang total	209	6	EZ DNA Methylation	Freire-Aradas et al., 2018 [40]	2–18 ans	*ELOVL2*, *CCDC102B*, *MIR29B2CHG*, *chr16: 85395429*, *KCNAB3*, *EDARADD*	0,94	300
	Séquençage haut débit NGS	ADNmt	Sang total	82	54	EZ DNA Methylation-Direct	Mawlood et al., 2016 [61]	Kurdish, femmes, 18–91 ans	*12s Ribosomal RNA*, *Origin of light strand*, *Cytochrome C oxidative subunit 1-3*, *MT-ND6*, *T8993G*, *G11778A*	9	nr
		Illumina 450 K	Sang total	46	16	MethylEdge Bisulfite	Vidaki et al., 2017 [43]	11–76 ans	*C21orf63*, *CSNK1D*, *CASC4*, *SSRP1*, *FXN*, *P2RXL1*, *RASSF5*, *ERG*, *TRIP10*, *FZD9*, *KLF14*, *NR2F2*, *VGF*, *NHLRC1*, *SCGN*, *C19orf30*	7,5	500
		Illumina 450 K	Sang total	324	13	EZ DNA Methylation Gold	Naue et al., 2017 [44]	Femmes, 18–69 ans	*DDO*, *ELOVL2*, *F5*, *GRM2*, *HOXC4*, *KLF14*, *LDB2*, *NKIRAS2*, *RPA2*, *SAMD10*, *TRIM59*, *ZYG11A*, *PLAGL1*, *EIF*, *UK344*	3,16	300
		Étude précédente	Sang total, Cellules épithéliales buccales, Cerveau, Os	29	13	EZ DNA Methylation Gold	Naue et al., 2018 [45]	Morts, 0–87 ans	*RPA2*, *F5*, *TRIM59*, *KLF14*, *HOXC4*, *NKIRAS2*, *ZYG11A*, *MEIS1*, *ELOVL2*, *GRM2*, *LDB2*, *SAMD2*, *DDO*		200–300
		Littérature	Sang total Salive	110 34	12	MethylEdge Bisulfite	Aliferi et al., 2018 [46]	11–93 ans 16–91 ans	*VGF*, *TRIP10*, *KLF14*, *CSNK1D*, *FZD9*, *C21orf63*, *SSRP1*, *NHLRC1*, *ERG*, *FXN*, *P2RXL1*, *SCGN*	4,1 7,3	10

[54] ont analysé le profil de méthylation de l'ADN dans les cinq gènes (*ELOVL2*, *C1orf132*, *KLF14*, *FHL2* et *TRIM59*) dans trois groupes de personnes ayant des problèmes de santé diagnostiqués. Un groupe était atteint de maladies graves, un groupe présentait une maladie d'Alzheimer à un stade précoce et un 3e groupe présentait une maladie d'Alzheimer à un stade tardif. Les résultats obtenus ont montré que la capacité de prédiction de l'âge des 5 sites CpG sélectionnés était inchangée dans le groupe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer à début tardif. Une hyperméthylation aberrante et une prédiction diminuée ont été trouvées pour les marqueurs *TRIM59* et *KLF14* dans le groupe de maladie d'Alzheimer à début précoce suggérant un vieillissement accéléré chez ces patients. Chez les patients atteints de maladies graves, une modification du profil de méthylation de l'ADN et une prédiction de l'âge modifiée ont été notées pour *TRIM59* et *FHL2*, avec une hyperméthylation aberrante observée pour *TRIM59* et une hypométhylation aberrante pour *FHL2*. Leur travail a mis l'accent sur la grande utilité des marqueurs *ELOVL2* et *C1orf132* pour la prédiction de l'âge médicolégal en montrant une prédiction inchangée dans les 3 groupes d'individus malades.

Dans la majorité de ces études, aucuns biais liés au sexe de l'individu et à l'origine ethnique n'ont été mis en évidence [34,39,49,56,63].

De plus, des études ont montrées qu'il n'y avait pas de changement significatif des taux de méthylation entre les personnes vivantes et décédées [50,56]. De même, il n'y a pas de changement significatif de ces taux entre les échantillons frais et conservés [64] ce qui suggère que la méthylation de l'ADN reste stable dans le temps et constitue donc l'étude de choix dans le domaine de la criminalistique en termes de robustesse.

Estimation de l'âge dans les tissus

D'autres études ont également rapporté des modèles prédictifs de l'âge qui pouvaient être appliqués à un large spectre de tissus avec une précision de prédiction considérable ($<$ 5 ans).

Bekaert et al. [50] ont construit un modèle permettant des prédictions d'âge très précises en utilisant des CpG associés aux gènes *ASPA*, *PDE4C*, *ELOVL2* et *EDARADD* dans des échantillons dentaires et sanguins avec un MAD de 4,9 années. Giuliani et al. [60] ont également montré que les CpG différentiellement méthylés au cours du vieillissement des gènes *ELOVL2*, *FHL2* et *PENK* dans le sang pouvaient être un outil puissant pour prédire l'âge en utilisant l'ADN présent dans la dentine. Cependant, le MAD de l'âge chronologique variait (1,2—7,1 ans) selon la partie de la dent à partir de laquelle l'ADN a été extrait. À noter que le CpG le plus informatif du gène *ELOVL2* n'a pas été inclus dans le modèle préliminaire de prédiction de l'âge construit par Lee et al. [31]. Cette équipe a construit un modèle de prédiction avec un MAD de 4,2 ans dans des échantillons de liquide spermatique utilisant 3 nouveaux sites CpG jamais décrits dans le sang au sein des gènes *TTC7B*, *NOX4* et cg12837463. Eipel et al. [52] ont eux aussi construit un modèle prédictif spécifique aux cellules épithéliales buccales grâce aux gènes *CD6* et *SERPINB5* avec un MAD de 5,1 ans.

L'équipe d'Hannum [19] et l'équipe de Koch [20] ont pu identifier des sites CpG présentant une corrélation similaire avec l'âge entre deux tissus distincts, alors que d'autres ont rapportées une spécificité tissulaire [31,49,65,66]. Ces résultats suggèrent que la variation de méthylation en fonction de l'âge pourrait être similaire ou significativement opposée dans les différents tissus en fonction du site CpG sélectionné. Par conséquent, dans le cadre des analyses médicolégales il convient de connaître préalablement la nature de l'échantillon testé et il convient de rester prudent car l'applicabilité d'une méthode d'estimation de l'âge sur plusieurs tissus doit être étudiée de manière plus approfondie.

En partant des données de micropuces Illumina 450 K, Hong et al. [47] ont identifié six CpG associés à l'âge dans la salive malgré la petite taille de l'échantillon utilisé (n = 54). Ils ont ensuite construit un nouveau modèle de prédiction grâce à la technologie SNaPshot® multiplexe et l'ont testé sur un ensemble indépendant de 226 échantillons de salive, fournissant une prédiction de l'âge avec un écart absolu moyen (MAD) de 3,2 ans.

En utilisant le pyroséquençage après conversion au bisulfite, Alghanim et al. [55] ont examiné trois loci dans les gènes *SCGN*, *DLX5* et *KLF14* dans 52 échantillons de salive et 40 échantillons de sang. Le gène *DLX5* n'a pas montré de corrélation avec l'âge. Concernant les échantillons de salive, deux modèles prédictifs de l'âge ont été développés au moyen d'une analyse de régression linéaire et ont présentés des performances similaires. Le modèle à locus unique présentait un écart absolu moyen de 5,8 ans et le modèle à deux locus présentait un écart absolu moyen de 6,2 ans. Concernant les échantillons de sang, ce modèle présentait un écart absolu moyen de 6,6 ans. Les résultats indiquaient que les CpG au sein des gènes *SCGN* et *KLF14* peuvent être utilisés en tant que marqueurs épigénétiques pour estimer l'âge dans ces 2 types d'échantillons.

Dans une approche plus simple, Hamano et al. [57] ont mis au point une méthode HRM sensible à la méthylation basée sur les promoteurs de deux gènes associés à l'âge précédemment décrits (*ELOVL2* et *EDARADD*) et ont testé près de 250 échantillons de salive et de mégots de cigarettes. Les auteurs ont réussi à prédire l'âge avec un MAD de 6,25 ans dans la salive et de 7,65 ans sur les mégots de cigarettes. En utilisant la même approche expérimentale, ce groupe a également testé les régions promotrices d'ELOVL2 et FHL2 dans des échantillons de sang post mortem, avec des résultats similaires obtenus à partir de sang d'individus vivants [56].

De même, Naue a développé un outil de prédiction de l'âge dans le sang basé sur la technologie NGS en utilisant 13 sites CpG permettant d'obtenir un MAD = 3,16 ans [44]. Dans une étude plus récente sur 29 personnes décédées [45], il a été constaté que certains de ces marqueurs (7 sur 13) pouvaient être transposés sur plusieurs tissus dont l'os, le cerveau, les tissus buccaux et les muscles. Cependant, les effets de méthylation observés en fonction de l'âge différaient entre les tissus analysés. Ce modèle de prédiction basé sur les gènes *DDO*, *ELOVL2*, *KLF14*, *NKIRAS*, *RPA2*, *TRIM59* et *ZYG11A* peut être appliqué à un ensemble de tissus si la source de l'échantillon n'est pas connue, cependant il n'est pas nécessaire de mesurer tous les marqueurs si cette source est connue. Le gène *LDB2* semble présenté une forte corrélation à l'âge dans le sang et les os,

MEIS1 présente une forte corrélation dans le sang et moins dans les tissus buccaux, *SAM10* a une corrélation significative uniquement dans le sang. *HOX4* et *GRM2* ont un fort pouvoir prédictif dans tous les tissus sauf dans l'os et enfin *ZYG11A* montre une dépendance à l'âge dans tous les tissus, cependant, le changement de méthylation avec l'âge est faible dans les os et le cerveau, ce qui indique que des méthodes très sensibles sont nécessaires pour utiliser ce marqueur.

Au final, il existe trois types de marqueurs tissulaires pour les applications médicolégales :

- des marqueurs universels pouvant être utilisés à l'aide d'un prédicteur multi-tissus, comme proposé par Horvath [15] ;
- des marqueurs universels inclus dans des modèles spécifiques pour chaque tissu, comme l'ont proposé Bekaert [50], Giuliani [60] (sang et dents) ou Eipel [52] (salive et sang) ;
- des marqueurs prédictifs de l'âge et spécifiques aux tissus, comme l'a fait Lee pour le sperme [31] et Hong [47] pour la salive.

Conclusion générale

L'analyse de la méthylation de l'ADN est à ce jour le meilleur moyen d'estimer un âge chronologique et est donc considérée comme le biomarqueur prédictif de l'âge le plus prometteur. Cependant, la majorité des études susmentionnées utilisant les techniques de pyroséquençage, SNaPshot ou EpiTYPER ont consommé des quantités relativement importantes d'ADN au départ (200 ng à 5 µg) ce qui peut poser problème pour les échantillons médicolégaux dégradés et présents en petite quantité. Avec l'arrivée du séquençage haut débit, certaines équipes ont pu établir des modèles prédictifs de l'âge très encourageants (MAD $\pm$ 4,1 ans) avec seulement 10 ng d'ADN au départ. De plus, cette technique se caractérise par une sensibilité élevée, une bonne résolution à l'échelle d'un CpG et une grande capacité de multiplexage, ce qui la place comme la méthode d'étude la plus attractive. Ces techniques d'analyses de la méthylation fournissent des résultats qui varient en fonction des tissus analysés, en effet des équipes ont pu identifier des sites CpG présentant une corrélation similaire avec l'âge entre deux tissus distincts, alors que d'autres ont rapporté une spécificité tissulaire. Ces résultats suggèrent que la variation de méthylation en fonction de l'âge pourrait être similaire ou significativement opposée dans les différents tissus en fonction du site CpG sélectionné. Par conséquent, dans le cadre des analyses médicolégales il convient de connaître préalablement la nature de l'échantillon testé. Même si des niveaux de précision encore plus élevés sont souhaitables, les laboratoires de recherche en génétique médicolégale devront statuer à l'avenir sur les marqueurs méthylés les plus informatifs de l'âge et développer en ce sens un modèle universel de prédiction, exploitable dans différents tissus, dans des tranches d'âges opposées et dans différentes populations. En effet, la plupart des recherches ont été axées sur les populations européennes et eurasiennes occidentales, il est donc nécessaire d'explorer l'ensemble des groupes de population géographiquement différente afin de déterminer si les prédicteurs d'âges peuvent être appliqués indépendamment de la population d'origine ou si des ajustements spécifiques à la population étudiée sont nécessaires pour le modèle de prévision utilisé. Ces populations ont des conditions de santé, des modes de vie et des expositions à des facteurs climatiques et environnementaux différents susceptibles d'influencer cette estimation.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Macha M, Lamba B, Avula JSS, Muthineni S, Maragana PGJS, Chitoori P. Estimation of correlation between chronological age, skeletal age and dental age in children — A cross-sectional study. Clin Diagn Res 2017;11(9):ZC01—4.

[2] KotěrováA,NavegaD,Štepanovský M,BukZ,BrůžekJ,CunhaE. Age estimationofadulthumanremainsfromhipbonesusing advanced methods.ForensicSciInt2018;287:163—75.

[3] Langley NR. The lateral clavicular epiphysis: fusion timing and age estimation. Int J Legal Med 2016;130(2):511—7.

[4] Márquez-Ruiz AB, Treviño-Tijerina MC, González-Herrera L, Sánchez B, González-Ramírez AR, Valenzuela A. Three-dimensional analysis of third molar development to estimate age of majority. Sci Justice 2017;57(5):376—83.

[5] Zorba E, Goutas N, Spiliopoulou C, Moraitis K. An evaluation of dental methods by Lamendin and Prince and Ubelaker for estimation of adult age in a sample of modern Greeks. Homo 2018;69(1—2):17—28.

[6] Acheson RM, Fowler G, Fry El, Janes M, Koski K, Urbano P, et al. Studies in the reliability of assessing skeletal maturity from X-rays. I. Greulich-Pyle Atlas. Hum Biol 1963;35:317—49.

[7] Ohtani S, Abe I, Yamamoto T. An application of D- and L-aspartic acid mixtures as standard specimens for the chronological age estimation. J Forensic Sci 2005;50(6):1298—302.

[8] Sato Y, Konfo T, Ohshima T. Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. Histopathology 2001;38(3):217—20.

[9] Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Sci Int Genet 2011;5:170—80.

[10] Pośpiech E, Chen Y, Kukla-Bartoszek M, Breslin K, Aliferi A, Andersen JD, et al. EUROFORGEN-NoE Consortium. Towards broadening Forensic DNA Phenotyping beyond pigmentation: improving the prediction of head hair shape from DNA. Forensic Sci Int Genet 2018;37:241—51.

[11] Maroñas O, Phillips C, Söchtig J, Gomez-Tato A, Cruz R, Alvarez-Dios J, et al. Development of a forensic skin colour predictive test. Forensic Sci Int Genet 2014;13:34—44.

[12] Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res 1982;10(8):2709—21.

[13] Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature 2015;518(7539):317—30.

[14] Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. Mol Cell Biol 2003;23:5594—605.

[15] Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol 2013;14:R115.

[16] MelnikovAA,GartenhausRB,LevensonAS,MotchoulskaiaNA, LevensonChernokhvostovVV.MSRE-PCRforanalysisofgene-specificDNAmethylation.NucleicAcidsRes2005;33(10):e93.
[17] Mawlood SK, Dennany L, Watson N, Pickard BS. The EpiTect Methyl qPCR Assay as novel age estimation method in forensic biology. Forensic Sci Int Genet 2016;264:132—8.
[18] Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sanchez FJ, Sinsheimer FS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. PLoS One 2011;6:e14821.
[19] HannumG,GuinneyJ,ZhaoL,ZhangL,HuguesG,SaddaS, etal. Genome-widemethylationprofilesrevealquantitative viewsof humanagingrates.MolCell2013;49:359—76.
[20] Koch CM, Wagner W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. Aging (Albany NY) 2011;3:1018—27.
[21] Florath I, Butterbach K, Muller H, Bewerunge-Hudler M, Brenner H. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. Hum Mol Genet 2014;23:1186—201.
[22] Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, et al. Methylation of *ELOVL2* gene as a new epigenetic marker of age. Aging Cell 2012;11:1132—4.
[23] BibikovaM,LeJ,BarnesB,Saedinia-MelnykS,ZhouL,ShenR, etal. Genome-wideDNAmethylationprofilingusingInfiniumR assay. Epigenomics2009;1(1):177—200.
[24] Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. Genomics 2011;98(4):288—95.
[25] Logue MW, Smith AK, Wolf EJ, Maniates H, Stone A, Schichman SA, et al. The correlation of methylation levels measured using Illumina 450K and EPIC BeadChips in blood samples. Epigenomics 2017;9(11):1363—71.
[26] DedeurwaerderS,DefranceM,CalonneE,DenisH,SotiriouC, Fuks F.EvaluationoftheInfiniumMethylation450Ktechnology. Epigenomics2011;3:771—84.
[27] Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. Epigenetics 2011;6(6): 692—702.
[28] ForatS,HuettelB,ReinhardtR,FimmersR,HaidlG,Denschlag D,et al.Methylationmarkersfortheidentificationofbody fluidsand tissuesfromforensictraceevidence.PLoSOne 2016;11(5):e0156472.
[29] LeeHY,JungSE,LeeEH,YangWI,ShinKJ.DNAmethylation profiling foraconfirmatorytestforblood,saliva,semen, vaginalfluidand menstrualblood.ForensicSciIntGenet 2016;24:75—82.
[30] Fondevila M, Børsting C, Phillips C, de la Puente M, Consortium EN, Carracedo A, et al. Forensic SNP genotyping with SNaPshot — Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. Forensic Sci Rev 2017;29(1):57—76.
[31] LeeHY,JungSE,OhYN,ChoiA,YangWI,ShinKJ.Epigenetic age signaturesintheforensicallyrelevantbodyfluidofsemen: a preliminarystudy.ForensicSciIntGenet2015;19:28—34.
[32] LeeSB,McCordB,BuelE.AdvancesinforensicDNAquantifica-tion: areview.Electrophoresis2014;35(21—22):3044—52.
[33] Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. Forensic Sci Int Genet 2015;14:161—7.
[34] Zbieć-PiekarskaR,SpólnickaM,KupiecT,Parys-ProszekA, MakowskaZ,PałeczkaA,etal.Developmentofaforensically useful agepredictionmethodbasedonDNAmethylationana-lysis. ForensicSciIntGenet2015;17:173—9.
[35] Masser DR, Berg AS, Freeman WM. Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing. Epigenetics Chromatin 2013;6(1):33.
[36] VidakiA,GiangasparoF,SyndercombeCourtD.Discoveryof potentialDNAmethylationmarkersforforensictissueidentifi-cation using bisulphite pyrosequencing. Electrophoresis 2016; 37(21):2767—79.
[37] Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. Forensic Sci Int Genet 2016;23:55—63.
[38] Xu C, Qu H, Wang G, Xie B, Shi Y, Yang Y, et al. A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. Sci Rep 2015;5:17788.
[39] Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares de Cal M, et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. Forensic Sci Int Genet 2016;24:65—74.
[40] Freire-Aradas A, Phillips C, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Gómez-Tato A, Casares de Cal MA, et al. Tracking age-correlated DNA methylation markers in the young. Forensic Sci Int Genet 2018;36:50—9.
[41] RichardsR,PatelJ,StevensonK,HarbisonS.Evaluationof massivelyparallelsequencingforforensicDNAmethylation profiling.Electrophoresis2018;39(21):2798—805.
[42] Børsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. Forensic Sci Int Genet 2015;18:78—89.
[43] VidakiA,BallardD,AliferiA,MillerTH,BarronLP,Syndercombe CourtD.DNAmethylation-basedforensicagepredictionusing artificialneuralnetworksandnextgenerationsequencing. ForensicSciIntGenet2017;28:225—36.
[44] Naue J, Hoefsloot HCJ, Mook ORF, Rijlaarsdam-Hoekstra L, van der Zwalm MCH, Henneman P, et al. Chronological age prediction based on DNA methylation: massive parallel sequencing and random forest regression. Forensic Sci Int Genet 2017;31:19—28.
[45] Naue J, Sänger T, Hoefsloot HCJ, Lutz-Bonengel S, Kloosterman AD, Verschure PJ. Proof of concept study of age-dependent DNA methylation markers across different tissues by massive parallel sequencing. Forensic Sci Int Genet 2018;36:152—9.
[46] Aliferi A, Ballard D, Gallidabino MD, Thurtle H, Barron L, Syndercombe Court D. DNA methylation-based age prediction using massively parallel sequencing data and multiple machine learning models. Forensic Sci Int Genet 2018;37:215—26.
[47] Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from saliva: high age predictability by combination of 7 CpG markers. Forensic Sci Int Genet 2017;29:118—25.
[48] Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. Genome Biol 2014;15(2):R24.
[49] Huang Y, Yan J, Hou J, Fu X, Li L, Hou Y. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. Forensic Sci Int Genet 2015;17:129—36.
[50] Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. Epigenetics 2015;10(10):922—30.
[51] ParkJL,KimJH,SeoE,BaeDH,KimSY,LeeHC,etal. Identification andevaluationofage-correlatedDNAmethyla-tionmarkersfor forensicuse.ForensicSciIntGenet 2016;23:64—70.
[52] EipelM,MayerF,ArentT,FerreiraMR,BirkhoferC,Gersten-maier U,etal.Epigeneticagepredictionsbasedonbuccalswabs aremore preciseincombinationwithcelltype-specificDNA methylation signatures.Aging(AlbanyNY)2016;8(5):1034—48.
[53] Cho S, Jung SE, Hong SR, Lee EH, Lee JH, Lee SD, et al. Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. Forensic Sci Int Genet 2017;29:250—6.
[54] SpólnickaM,PośpiechE,PepłońskaB,Zbieć-PiekarskaR, MakowskaZ,PiętaA,etal.DNAmethylationinELOVL2and

C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. Int J Legal Med 2018;132(1):1—11.
[55] Alghanim H, Antunes J, Silva DSBS, Alho CS, Balamurugan K, McCord B. Detection and evaluation of DNA methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age. Forensic Sci Int Genet 2017;31:81—8.
[56] Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Ozeki M, Tamaki K. Forensic age prediction for dead or living samples by use of methylation-sensitive high resolution melting. Leg Med (Tokyo) 2016;21:5—10.
[57] Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Tamaki K. Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts. Sci Rep 2017;7(1):10444.
[58] Yi SH, Jia YS, Mei K, Yang RZ, Huang DX. Age-related DNA methylation changes for forensic age-prediction. Int J Legal Med 2015;129(2):237—44.
[59] Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JBJ, van IWFJ, et al. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. Forensic Sci Int Genet 2016;24:33—43.
[60] Giuliani C, Cilli E, Bacalini MG, Pirazzini C, Sazzini M, Gruppioni G, et al. Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. Am J Phys Anthropol 2016;159(4):585—95.
[61] MawloodSK,DennanyL,WatsonN,DempsterJ,PickardBS. QuantificationofglobalmitochondrialDNAmethylationlevels and inversecorrelationwithageattwoCpGsites.Aging(Albany NY) 2016;8(4):636—41.
[62] Moss J, Magenheim J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. Nat Commun 2018;9(1):5068.
[63] Zaghlool SB, Al-Shafai M, Al Muftah WA, Kumar P, Falchi M, Suhre K. Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. Clin Epigenetics 2015;7:6.
[64] AntunesJP,MadiT,BalamuruganK,BombardiR,DuncanG, McCord B.DNAmethylationmarkersasapowerfultechniqueto discriminatebodyfluidspresentincrimescenes.In:Procee-dings ofthe24thInternationalSymposiumonHumanIdentifi-cation; 2014.
[65] SongF,MahmoodS,GhoshS,LiangP,SmiragliaDJ,NagaseH, etal. Tissuespecificdifferentiallymethylatedregions(TDMR): changes inDNAmethylationduringdevelopment.Genomics 2009;93(2):130—9.
[66] MaLL,YiSH,HuangDX,MeiK,YangRZ.Screeningand identification oftissue-specificmethylationforbodyfluid identification; ForensicSciIntGenetSupplSer2013;4(1): e37—e38.