



UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Apport du Séquençage Haut-Débit dans le diagnostic moléculaire
de rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et liées à l'X :
comparaison de quatre stratégies diagnostiques**

Présentée et soutenue publiquement le 10 octobre 2017 à 16h
Au Pôle Recherche
Par Valérie CHUNE

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Franck Broly

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Thierry Brousseau

Madame le Docteur Sabine Defoort-Dhellemmes

Madame le Docteur Catherine Vincent-Delorme

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Claire-Marie Dhaenens

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

ACMG : *American College of Medical Genetics*
ADRP : rétinite pigmentaire autosomique dominante
AV : acuité visuelle

CGH : comparative genomic array
CNV variation du nombre de copie
CV : champ visuel

ExAC : *Exome Aggregation Consortium*

FO : fond d'œil

gnomAD : *Genome Aggregation Database*

HGMD : *Human Gene Mutation Database*

MLPA : (multiplex ligation-dependant probe amplification)

NMD : *Nonsense-Mediated Decay*

PDE : phosphodiesterase 6
PGM : Ion Personal Genome Machine
PHRC : projet hospitalier de recherche clinique national

RP : rétinite pigmentaire
RPE : épithélium pigmentaire de la rétine

vcf : *Variant Calling File*
VSI : variant de signification indéterminée

Table des matières

RESUME.....	3
INTRODUCTION.....	5
I. La Rétine Humaine.....	6
A. Anatomie de la rétine	6
a) Neurorétine	6
b) Epithélium pigmentaire de la rétine	10
B. Physiologie de la rétine.....	11
a) Phototransduction	11
b) Le cycle visuel des rétinoïdes	12
c) La fonction ciliaire et le transport intra flagellaire.....	13
II. Les dystrophies rétinienne héréditaires	14
A. Clinique	14
B. Génétique	15
III. La rétinite pigmentaire	18
A. Manifestations cliniques de la rétinite pigmentaire	18
B. Diagnostic.....	20
IV. Le séquençage haut débit dans le diagnostic moléculaire de dystrophies rétinienne	23
A. Séquençage haut-débit: panel ciblé, exome et génome	23
B. Stratégie d'analyse des variants	26
C. Données de séquençage haut-débit dans les dystrophies rétinienne	30
D. Absence de diagnostic moléculaire dans les dystrophies rétinienne	32
V. Génétique de la rétinite pigmentaire autosomique dominante et liée à l'X	34
A. Fonction normale des gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante ..	36
B. Prévalence des gènes dans la littérature	37
VI. Objectif du travail	41
MATERIEL ET METHODES	42
I. Sélection des patients.....	42
II. Extraction de l'ADN.....	43
III. Séquençage par méthode Sanger	44
A. PCR	44
a) Mode opératoire.....	45
b) Migration sur gel	46
c) Purification des produits de PCR	46
B. Séquençage Sanger	47
a) Principe	47
b) Mode opératoire.....	48
IV. Protocole du séquençage haut-débit.....	50
V. Séquençage haut-débit PGM 12 gènes	52
A. Construction des bibliothèques : technologie AmpliSeq.....	52
a) Principe	52
b) Mode opératoire.....	54
B. Préparation de la matrice de séquençage.....	55
C. Séquençage	56
VI. Séquençage haut-débit 18 gènes et 150 gènes	57

A.	Construction des bibliothèques : technologie Haloplex™.....	57
a)	Principe	57
b)	Mode opératoire.....	58
B.	Amplification clonale par technologie Illumina	60
C.	Séquençage	61
VII.	Panel de gènes analysés sur séquenceurs Illumina	63
VIII.	Analyse bio-informatique des données de séquençage	65
RESULTATS	67
I.	Données obtenues par Sanger	67
II.	Données obtenues par PGM 12 gènes	77
III.	Données obtenues avec le panel 18 gènes	86
IV.	Données obtenues par le panel 150 gènes.....	91
V.	Prévalence des gènes de Rétinite Pigmentaire en France.....	96
VI.	Comparaison des techniques.....	98
VII.	Etude de corrélation génotype/phénotype et comparaison aux données de la littérature	114
A.	Patients porteurs d'une mutation <i>RHO</i>	114
B.	Patients porteurs d'un variant <i>PRPH2</i>	116
C.	Patients porteurs d'un variant <i>RPI</i>	118
D.	Patients porteurs d'une mutation <i>PRPF31</i>	120
E.	Patients porteurs d'une mutation <i>NR2E3</i>	120
DISCUSSION	123
I.	Comparaison aux études internationales.....	123
II.	Prévalence des gènes	125
III.	Stratégie d'analyse au laboratoire du CHRU de Lille	131
CONCLUSION	132
Références bibliographiques	133
Annexes	138
	Annexe 1 : Critères proposés par l'ACMG pour la classification de variant pathogène ..	138
	Annexe 2 : Critères proposés par l'ACMG pour la classification de variant bénin.....	139
	Annexe 3: Combinaison de critères proposée pour la classification de variants.....	140

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma d'organisation des cellules de la rétine et coupe transversale de rétine	7
Figure 2: Schéma d'un bâtonnet et d'un cône	9
Figure 3 Structure de la rhodopsine et son organisation	9
Figure 4: Mécanisme d'activation de la phototransduction	11
Figure 5 : Cycle visuel des rétinoïdes.....	13
Figure 6 : Classification des Dystrophies Rétiniennes Héritaires.....	15
Figure 7 : Dystrophies rétiniennes et leurs gènes	17
Figure 8: Fond d'œil au stade avancé d'un patient atteint de rétinite pigmentaire	20
Figure 9 : OCT maculaire : œdème maculaire compliquant une rétinite pigmentaire	21
Figure 10 : Imagerie en autofluorescence :	22
Figure 11: Arbre décisionnel d'interprétation d'un variant	28
Figure 12: Principe du séquençage Sanger.....	48
Figure 13: Préparation de la librairie d'ADN par AmpliSeq.....	52
Figure 14 : Principe de la PCR en émulsion.....	55
Figure 15: Principe du séquençage par la technologie Ion Torrent	56
Figure 16: Préparation de la librairie d'ADN par Haloplex	57
Figure 17: principe de la « bridge PCR » appliqué à la technologie Illumina	60
Figure 18: Principe du séquençage Illumina	61
Figure 19 : Image de la <i>flowcell</i> au cours du séquençage	62
Figure 20 : Résultats obtenus par la technique Sanger.....	67
Figure 21: Prévalence des gènes identifiés dans l'ADRP par la technique Sanger.....	68
Figure 22 : Fond d'œil d'un patient homozygote pour le variant p.Gly114Ser de <i>RHO</i>	69
Figure 23: Résultats obtenus par la technique PGM	77
Figure 24: Prévalence des gènes identifiés dans l'ADRP par le panel 12 gènes.....	78
Figure 25 : Fond d'œil du patient OPH573 porteur de variant p.Arg220Pro <i>PRPH2</i> et Glu205Lys <i>RP2</i>	79
Figure 26 : Fond d'œil du patient OPH322 porteur du variant IVS4+ 6C>T de <i>IMPDH1</i>	80
Figure 27 : Fond d'œil du patient OPH780, porteuse du variant IVS1-2A>G de <i>NR2E3</i> à l'état homozygote	82
Figure 28: Résultats obtenus par le panel 18 gènes.....	86
Figure 29 : Résultats obtenus par le panel 150 gènes.....	91
Figure 30: Workflow d'analyse des patients atteints de rétinite pigmentaire.....	96
Figure 31: Taux de diagnostic positif par séquençage Sanger et par séquençage haut débit 12, 18 et 150 gènes.	98
Figure 32: Fond d'œil de patients avec variant <i>RHO</i>	115
Figure 33 : Fond d'œil d'un patient porteur du variant p.Arg172Trp de <i>PRPH2</i>	117
Figure 34 : Fond d'œil d'un patient porteur du variant <i>RP1</i> p.Arg677*.....	119
Figure 35 : Champ visuel (A) et autofluorescence révélée par l'angiographie (B) d'une patiente avec un variant <i>RP1</i> p.Arg396*.....	119
Figure 36: Phénotype d'un patient de 13 ans, d'après Coppieters F et al., 2007.....	122
Figure 37: Fond d'œil d'une patiente avec un Goldmann Favre,.....	122

Tableau 1: Données de séquençage haut-débit sur les patients atteints de dystrophies rétiniennes héréditaires	30
Tableau 2: Gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante et de la rétinite pigmentaire liée à l’X	35
Tableau 3 : Prévalence des gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante	38
Tableau 4: Mélange de PCR utilisé pour l’amplification des exons des gènes d’ADRP	45
Tableau 5: programme de la PCR.....	45
Tableau 6: Mélange réactionnel pour l’extension.....	48
Tableau 7: programme PCR de séquençage	49
Tableau 8: Mélange réactionnel pour l’amplification des régions cibles	54
Tableau 9: Programme d’amplification pour les régions cibles	54
Tableau 10: Programme de digestion par la FUPA.....	54
Tableau 11 : Mélange réactionnel pour l’amplification des régions cibles	54
Tableau 12: Programme de ligation des primers	54
Tableau 13: Mélange réactionnel pour la digestion de l’ADN	58
Tableau 14: Mélange réactionnel pour l’hybridation de l’ADN.....	58
Tableau 15 : Programme d’hybridation de l’ADN	59
Tableau 16 : Mélange réactionnel pour la réaction de séquence	59
Tableau 17 : Conditions réactionnelles pour la réaction de séquence	59
Tableau 18: Liste des gènes du panel 150 gènes, sur fond gris gènes du panel 18 gènes.	64
Tableau 19 : Résultats obtenus par séquençage Sanger.....	71
Tableau 20 : Résultats obtenus par le panel 12 gènes.....	83
Tableau 21: Résultats obtenus par le panel 18 gènes.....	89
Tableau 22: Résultats obtenus avec le panel 150 gènes, les cas résolus sont sur fond rose	93
Tableau 23 : Prévalence des gènes de rétinite pigmentaire en France.....	97
Tableau 24: Prévalence des gènes selon le séquençage Sanger et le séquençage haut débit sur un panel de 12, 18 et 150 gènes.....	99
Tableau 25: Comparaison des couvertures selon les méthodes de séquençage.....	100
Tableau 26: Coûts médico-économique et temps d’analyse par technique	101
Tableau 27 : Résumé des variants identifiés dans l’étude	102

RESUME

Contexte : La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie rare, caractérisée par une perte progressive de la vision, pour laquelle plus d'une cinquantaine de gènes ont été identifiés. Le laboratoire du CHRU de Lille est recours national pour le diagnostic moléculaire de ces pathologies depuis 2008, et utilise dorénavant le séquençage haut débit (SHD), qui permet une analyse étendue et non plus séquentielle et partielle des gènes. L'objectif de notre étude est d'évaluer la prévalence des gènes responsables de rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et liés à l'X en France et de comparer quatre stratégies de diagnostic génétique développées pour leur identification.

Méthode : 625 patients issus de l'ensemble du territoire et atteints de RP ont été analysés entre 2008 et 2017, tout d'abord par séquençage ciblé des points chauds mutationnels par technique Sanger (n=337) puis par séquençage haut débit selon 3 modalités : i) un panel de 12 gènes le séquenceur PGM (Life Technologies) (n=193) ii) par un panel de 18 gènes (n=95) et iii) un panel de 150 gènes (n=32) sur séquenceurs Illumina.

Résultats : Un diagnostic moléculaire a été établi chez 33,12% des patients analysés. Les gènes les plus fréquemment identifiés sont *RHO* (10.56%) *PRPH2* (4.96%) et *RPI* (4%). Parmi les 265 variants identifiés, 106 n'ont jamais été décrits dans la littérature. Nous montrons que l'analyse par SHD, bien que permettant l'analyse de toutes les régions codantes des gènes, n'améliore pas significativement le nombre de diagnostics positifs par rapport au séquençage ciblé par méthode Sanger. Enfin les grands panels de gènes ont surtout permis d'élucider des formes récessives et atypiques sur le plan phénotypique. Le SHD offre également l'avantage d'une analyse simultanée d'un grand nombre de gènes pour un grand nombre de patients à moindre coût.

Conclusion : Nous rapportons l'analyse de la plus grande cohorte de rétinite pigmentaire sur le plan international. Ce travail a permis d'identifier un grand nombre de variants non décrits

et de réaliser une corrélation génotype/phénotype. Une meilleure connaissance de ces pathologies et l'identification des gènes en cause est un prérequis pour de futures inclusions de ces patients dans des essais médicamenteux ou de thérapie génique

INTRODUCTION

La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie dégénérative de l'œil qui se caractérise par une perte progressive et graduelle de la vision évoluant généralement vers la cécité. Elle est liée à l'altération du programme génétique des cellules de la rétine, les photorécepteurs, indispensables à la vision.

Il s'agit d'une maladie génétique complexe : il existe plusieurs modes de transmission, elle est génétiquement hétérogène avec plus d'une cinquantaine de gènes identifiés comme responsables de la pathologie et peut être associée à d'autres manifestations cliniques dans des syndromes différents et variés (Syndrome de Usher, Syndrome de Bardet Biedl) (1).

L'hétérogénéité génétique et la diversité des mécanismes de la dégénérescence des photorécepteurs représentent un challenge pour le diagnostic moléculaire. La connaissance du mécanisme moléculaire est essentielle pour le diagnostic clinique, le pronostic et le conseil génétique des patients et leurs familles. Avec les progrès de la thérapie génique et des techniques de manipulation génétique tel que le CRISPR/CAS9, l'identification des gènes de rétinite pigmentaire deviendra indispensable pour l'utilisation de ces thérapies prometteuses.

I. La Rétine Humaine

A. Anatomie de la rétine

L'homme possède la remarquable habilité à percevoir les couleurs, les formes et le mouvement et à différencier les variations d'intensité de lumière. L'œil est un système optique qui transmet la lumière à la rétine (2): l'information lumineuse entre par la pupille, traverse le cristallin puis l'humeur aqueuse pour finalement atteindre la rétine. La rétine se compose de deux tissus : la neurorétine et l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) (3)

a) Neurorétine

La neurorétine est un tissu d'origine neuroectodermique dérivé du diencéphale, composé de cellules neuronales (photorécepteurs, cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires) et de cellules gliales (cellules de Müller, astrocytes et cellules microgliales).

La neurorétine est organisée en couches de noyaux cellulaires alternant avec des couches de synapses.

Sur le plan histologique, l'architecture de la rétine se présente de la manière suivante (3) (figure1) :

- une **couche de cellules ganglionnaires**, qui collectent l'information visuelle pour la transmettre au système nerveux. Les signaux des photorécepteurs sont relayés vers les cellules ganglionnaires par un réseau d'interneurones (cellules horizontales, bipolaires et amacrines).

Les axones des cellules ganglionnaires convergent vers la papille pour former le nerf optique.

- une **couche plexiforme interne** : réseau de connexions synaptiques entre les axones des cellules bipolaires et amacrines et les dendrites des cellules ganglionnaires

- une **couche nucléaire interne** composée des noyaux de cellules bipolaires, amacrines, horizontales et des cellules gliales de Müller. Les cellules de Müller sont présentes

dans toutes les couches de la rétine car elles traversent radialement la rétine et sont en contact avec tous les neurones rétiniens. Elles sont impliquées dans le contrôle de l'angiogenèse, la régulation du flux sanguin rétinien et contribuent à la formation et au maintien de la barrière hémato-rétinienne.

-une **couche plexiforme externe** : lieu de formation des connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires et horizontales (interneurones)

-une **couche nucléaire externe**, composée exclusivement de photorécepteurs qui sont les cellules sensibles à la lumière. Il existe deux types de photorécepteurs qui portent des noms reflétant leur forme : les bâtonnets, fins, et les cônes, de forme conique.

La rétine centrale ou macula est spécialisée dans la vision des détails. Au centre de la macula se trouve une dépression appelé fovéa, qui est la zone de la rétine où la vision est la plus précise et qui ne contient que des cônes (4).

Les photorécepteurs reposent sur la partie externe de la rétine, la localisation la plus éloignée de la lumière « entrante ». Le stimulus lumineux passe à travers les couches internes avant d'être capturé par les photorécepteurs. Bien que cette organisation semble contre intuitive, il permet à l'épithélium pigmentaire juxtaposé à la partie externe des photorécepteurs d'absorber la lumière non captée par les photorécepteurs.

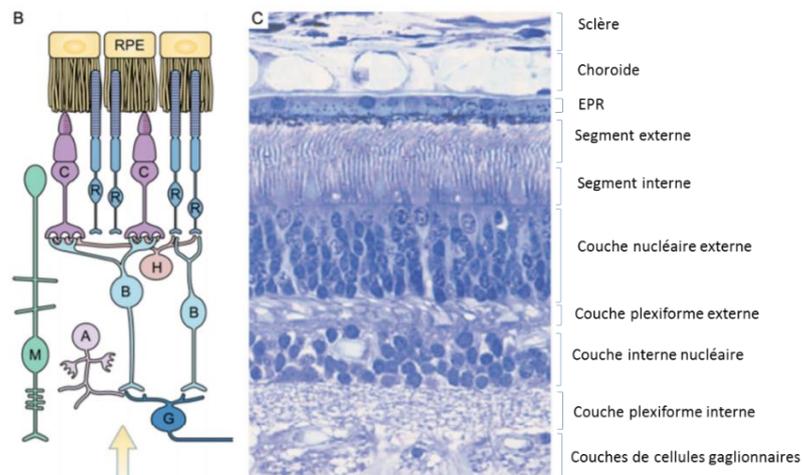


Figure 1 : Schéma d'organisation des cellules de la rétine et coupe transversale de rétine
d'après Sung et al., 2010 (2)

Les photorécepteurs

Les bâtonnets (*rods*) constituent 95% des photorécepteurs (120 millions) et sont concentrés dans la périphérie de la rétine. Ils sont sensibles à une faible luminosité et permettent la vision nocturne, la vision périphérique et la détection du mouvement.

Les cônes sont moins nombreux (6 millions) et sont concentrés dans la fovéa. Les cônes sont sensibles à la lumière vive et interviennent dans la vision diurne, la vision des couleurs, la vision centrale et fine (2).

La structure des bâtonnets et des cônes est globalement très similaire. Chaque photorécepteur est organisé en 4 compartiments distincts (figure2):

- le corps cellulaire contient le noyau
- le segment interne contient la machinerie métabolique avec les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le complexe de Golgi, les lysosomes et les ribosomes
- le segment externe, relié au segment interne par un cil connecteur, constitue la partie photosensible
- la terminaison synaptique

Les cônes se distinguent des bâtonnets par leur segment externe : on observe un repliement de la membrane plasmique au niveau du segment externe des cônes alors que le segment externe des bâtonnets contient un empilement d'environ 2000 disques qui sont entourés d'une membrane plasmique. De nouveaux disques sont constamment synthétisés à la base du segment externe et se déplacent vers la portion apicale où ils sont phagocytés par l'épithélium pigmentaire, ainsi chaque disque a une durée de vie approximative de 15 jours.

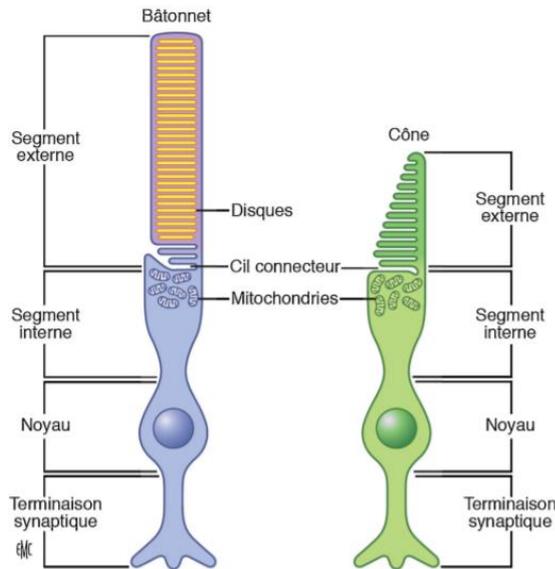


Figure 2: Schéma d'un bâtonnet et d'un cône

D'après Salesse et al., 2017(5).

Les membranes des disques des bâtonnets contiennent le pigment visuel, la rhodopsine. La rhodopsine fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Elle est composée d'une protéine transmembranaire, l'opsine, et d'un chromophore, le 11-*cis* rétinol (figure 3). Le 11-*cis* rétinol permet l'absorption de la lumière.

Les 3 types de cônes L-cônes (sensibles au rouge), M-cônes (sensibles au vert) et S-cônes (sensibles au bleu) expriment des pigments d'opsine dans l'empilement de leur membrane plasmique, sensibles à des longueurs d'ondes différentes et permettant la vision des couleurs.

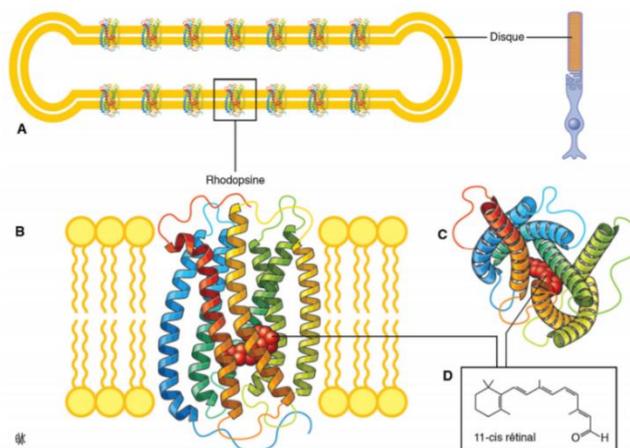


Figure 3 Structure de la rhodopsine et son organisation

D'après Salesse et al., 2017 (5).

b) Epithélium pigmentaire de la rétine (EPR)

L'EPR est un élément majeur de la rétine par ses propriétés physiques et métaboliques. Il est composé d'une monocouche de cellules situées à l'interface entre la neurorétine et la choroïde (3). L'EPR a de multiples rôles dans le maintien de l'intégrité et du fonctionnement de la rétine :

- adhésion de la rétine neurale, par l'interdigitation de ses villosités avec les photorécepteurs et par l'existence d'une pompe ionique
- synthèse et stockage de facteurs de croissance (FGF, VEGF, TGFbeta)
- phagocytose des segments externes des photorécepteurs, permettant le renouvellement des articles externes
- synthèse et stockage de pigments de mélanine par les mélanosomes. La mélanine permet l'absorption de l'excès de photons non capturés par les photorécepteurs permettant de diminuer les effets phototoxiques
- stockage de grains de lipofushine
- transport transépithélial d'ions et de métabolites et maintien de la barrière hémato-encéphalique

B. Physiologie de la rétine

a) Phototransduction

La phototransduction est le processus biochimique par lequel les photons absorbés par les pigments visuels dans les photorécepteurs sont amplifiés et convertis en une réponse électrique (figure 4).

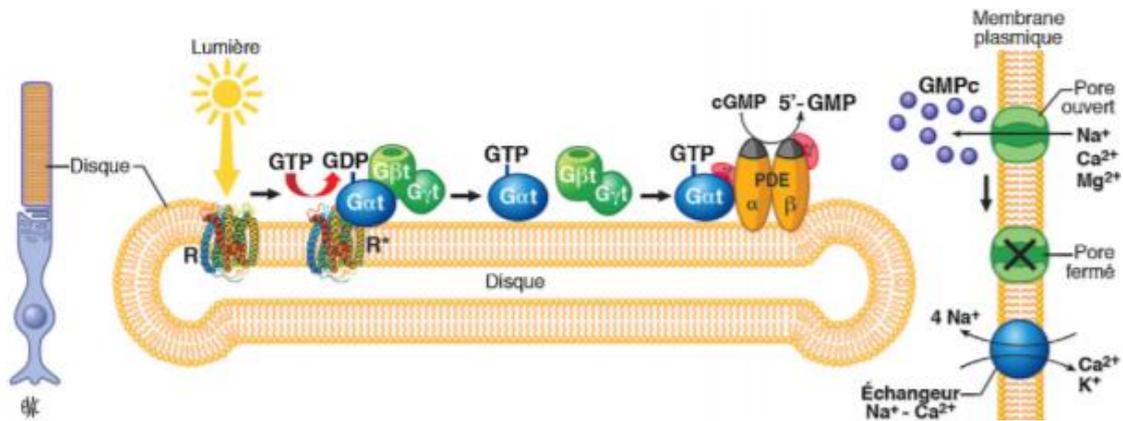


Figure 4: Mécanisme d'activation de la phototransduction

D'après Salesse et al., 2017 (5)

L'absorption de la lumière active la rhodopsine par l'isomérisation du 11-*cis* rétinol en tout-*trans* rétinol puis par la formation de la métarhodopsine II (rhodopsine activée). La métarhodopsine II active la transducine en catalysant l'échange du GDP pour le GTP de la sous-unité Gat. La métarhodopsine II peut lier une autre transducine pour l'activer, contribuant ainsi à l'amplification du signal.

La sous-unité Gat-GTP de la transducine va se dissocier du complexe pour activer la phosphodiésterase 6 (PDE) en se liant à ses sous-unités γ . La PDE activée va hydrolyser le GMPc en 5'-GMP. La diminution de la GMPc provoque la fermeture des pores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrane plasmique dont l'ouverture dépend de la liaison au GMPc. L'activité d'hydrolyse de la PDE6 est extrêmement élevée conduisant ainsi à la deuxième étape d'amplification de la phototransduction.

Cependant, un échangeur continue à pomper le Ca^{2+} à l'extérieur des photorécepteurs ce qui conduit à une chute importante de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} dans le segment

externe du photorécepteur et son hyperpolarisation ainsi que l'arrêt de la sécrétion de glutamate au niveau de leur terminaison synaptique.

b) Le cycle visuel des rétinoïdes

La rhodopsine est régénérée à partir de l'opsine et du 11-*cis* rétinol par le cycle visuel des rétinoïdes qui implique des enzymes se trouvant à la fois dans les photorécepteurs et l'EPR.

L'absorption de la lumière par la rhodopsine mène à l'isomérisation du 11-*cis* rétinol en tout-*trans* rétinol. Le tout-*trans* rétinol se dissocie de l'opsine et est oxydé par la rétinol déshydrogénase 8 (RDH8) en tout-*trans* rétinol, qui est par la suite transporté par l'*interphotoreceptor binding protein* (IRBP) et le *cellular retinol binding protein* (CRBP1) dans l'EPR.

Dans l'EPR, la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) va transformer le tout-*trans* rétinol en rétinylester qui sera ensuite isomérisé et clivé pour produire le 11-*cis* rétinol par la RPE65. Ce produit sera réduit en 11-*cis* rétinol par la RDH5 et transporté jusqu'aux photorécepteurs par la CRBP-1 et l'IRBP ou il se liera à l'opsine pour régénérer la rhodopsine.

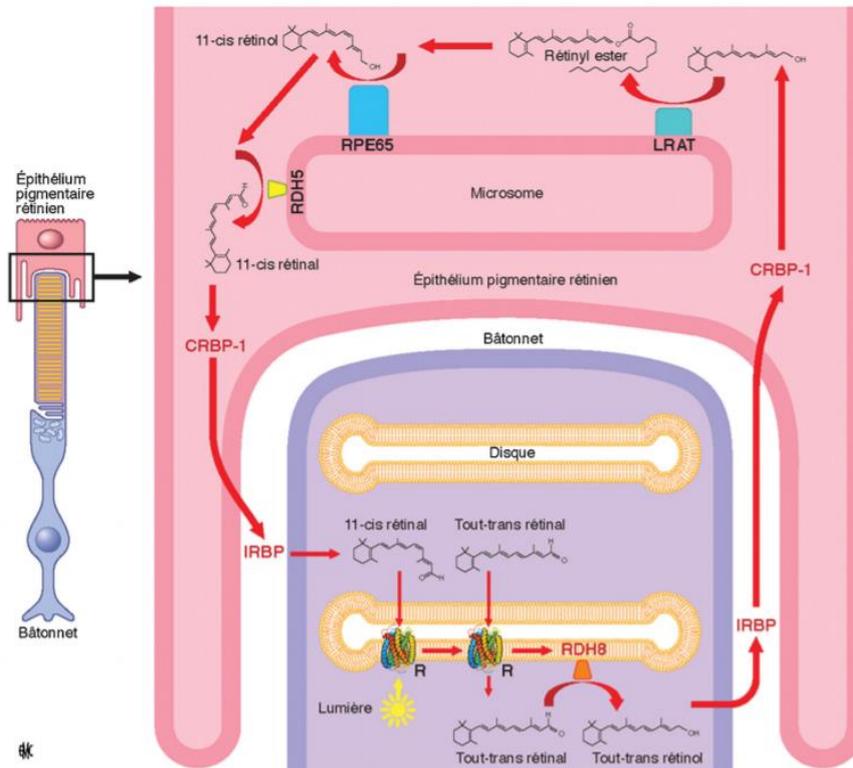


Figure 5 : Cycle visuel des rétinoïdes

D'après Salesse et al., 2017(5)

c) La fonction ciliaire et le transport intra flagellaire

Le cil connecteur relie le segment interne au segment externe des photorécepteurs. L'assemblage et le maintien du cil requiert des mouvements bidirectionnels le long d'un axonème. Aucune synthèse protéique n'a lieu dans le segment externe et toutes les protéines qui y sont destinées doivent être acheminées depuis le segment interne via le cil. Le transport est assuré par des complexes protéiques IFT (*intraflagellar transport*) qui délivrent des protéines nécessaires pour la phototransduction.

Les mutations dans les gènes de fonction ciliaire sont associées à des dystrophies rétiniennes syndromique et non syndromique (ciliopathies) avec anomalies du squelette, malformations rénales, dystrophie rétinienne et malformations cérébrales.

II. Les dystrophies rétiniennes héréditaires

Les dystrophies rétiniennes correspondent à une dégénérescence progressive des cellules de la rétine avec une atteinte primitive des photorécepteurs ou de l'épithélium pigmentaire. Les dystrophies rétiniennes héréditaires sont des maladies rares, avec une incidence de 1 sur 2 000 à 3 000 (6) (Soit près de 40 000 à 50 000 personnes en France) mais représentent 20% des cas de cécité chez le sujet de moins de 20 ans (7).

A. Clinique

Les phénotypes sont très variables dans l'âge d'apparition, la progression de la maladie et la sévérité de l'atteinte visuelle, allant de la cécité totale pour les formes les plus sévères (Amaurose Congénitale de Leber) à des phénotypes plus modérés (cécité nocturne, achromatopsie). L'hétérogénéité des dystrophies rétiniennes est d'autant plus complexe qu'elles sont soit isolées et confinées à l'œil ou font partie d'un syndrome avec une atteinte multisystémique. Dans de multiples syndromes, la dystrophie rétinienne est le premier symptôme détectable. L'utilisation de la tomographie par cohérence optique, l'imagerie en auto fluorescence du fond d'œil et la vision des couleurs ainsi que les mesures d'électrophysiologie a permis de mieux détailler ces phénotypes. Les dystrophies rétiniennes présentent des phénotypes très variés et chevauchants mais elles peuvent se distinguer en quatre groupes (6) :

- le groupe des **rétinites pigmentaires**, affectant la vision périphérique et des **dystrophies de type cône-bâtonnet**, touchant la vision centrale, est le plus représenté (70%). Ces atteintes peuvent être syndromiques ou non.

- les **maculopathies** (20%) qui se caractérisent par une photophobie, des anomalies de la vision des couleurs, une baisse de la vision centrale et l'incapacité à voir les détails. Ces

signes sont présents à des degrés variables (la photophobie est majeure dans la dystrophie des cônes mais discrète dans la maladie de Best).

- les **formes stationnaires** (7%)
- les **troubles du développement** (2,8%)

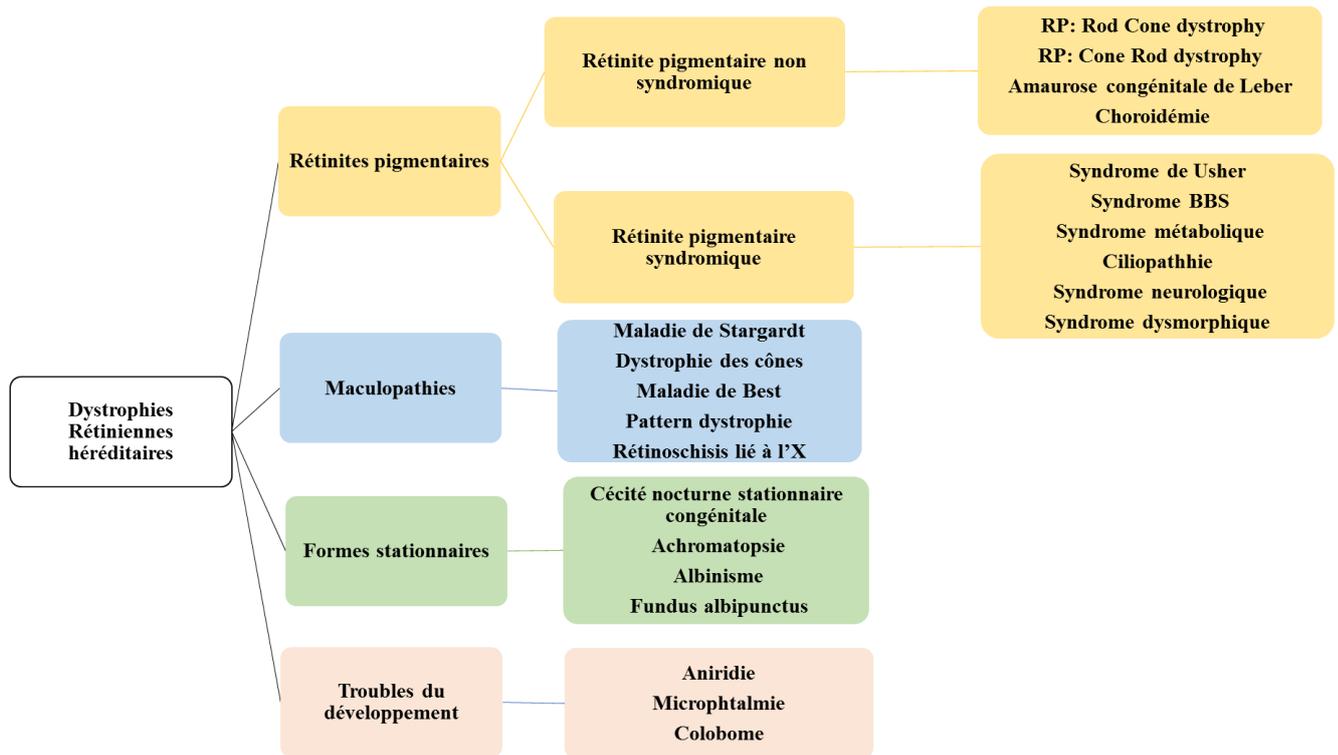


Figure 6 : Classification des Dystrophies Rétiniennes Héréditaires

adaptée de Bocquet et al, 2013 (6)

B. Génétique

Les dystrophies rétiniennes sont hétérogènes sur le plan génétique avec plus de 290 gènes et localisations chromosomiques identifiés (261 gènes identifiés d'après la base RETNET, <https://sph.uth.edu/retnet/>). Les progrès de la génétique ont permis de mieux comprendre la physiopathologie des dégénérescences rétiniennes et de commencer les premiers essais de thérapie génique. La plupart des gènes sont impliqués dans les trois voies de signalisation visuelle : phototransduction, cycle visuel et transport ciliaire. Une pathologie

peut être associée à plusieurs gènes, par exemple plus de 60 gènes sont associés à la rétinite pigmentaire non syndromique ou à l'inverse certains sous-types de dystrophies rétiniennes ne sont causés que par des mutations dans un seul gène : le rétinoblastome lié à l'X (mutations du gène *RS1*), la maladie de BEST (mutations dans le gène *BEST1*). Des mutations sur un même gène peuvent être responsables de phénotypes très différents, comme c'est le cas des mutations sur le gène *NR2E3* qui peut causer des rétinites pigmentaires ou un syndrome de Goldmann Favre et le gène de la périphérine (*PRPH2*) associé à des maculopathies ou à des rétinites pigmentaires (figure 7).

Tous les modes de transmission sont possibles : récessif, dominant ou liés à l'X et bien que la majorité des dystrophies soient héréditaires, une mutation *de novo* peut survenir chez un individu. Une transmission mitochondriale est également possible par l'ADN mitochondrial maternel, elles sont rares et une atteinte systémique accompagne l'atteinte rétinienne (syndrome de Kearns-Sayre, neuropathie optique de Leber). Pour ajouter en complexité, il existe plusieurs types de transmission pour un gène comme *RPI* qui est associé à des rétinites pigmentaires de forme autosomique ou récessive selon la localisation de sa mutation et l'effet sur la protéine produite (8,9). De rares formes digéniques combinant les mutations de deux gènes ont également été rapportées (10–12). Enfin, des formes autosomiques dominantes avec une pénétrance incomplète (*PRPF31-PRPF8*) sont également possibles, avec des individus porteurs de la mutation pathogène qui ne développent pas la maladie (13–15).

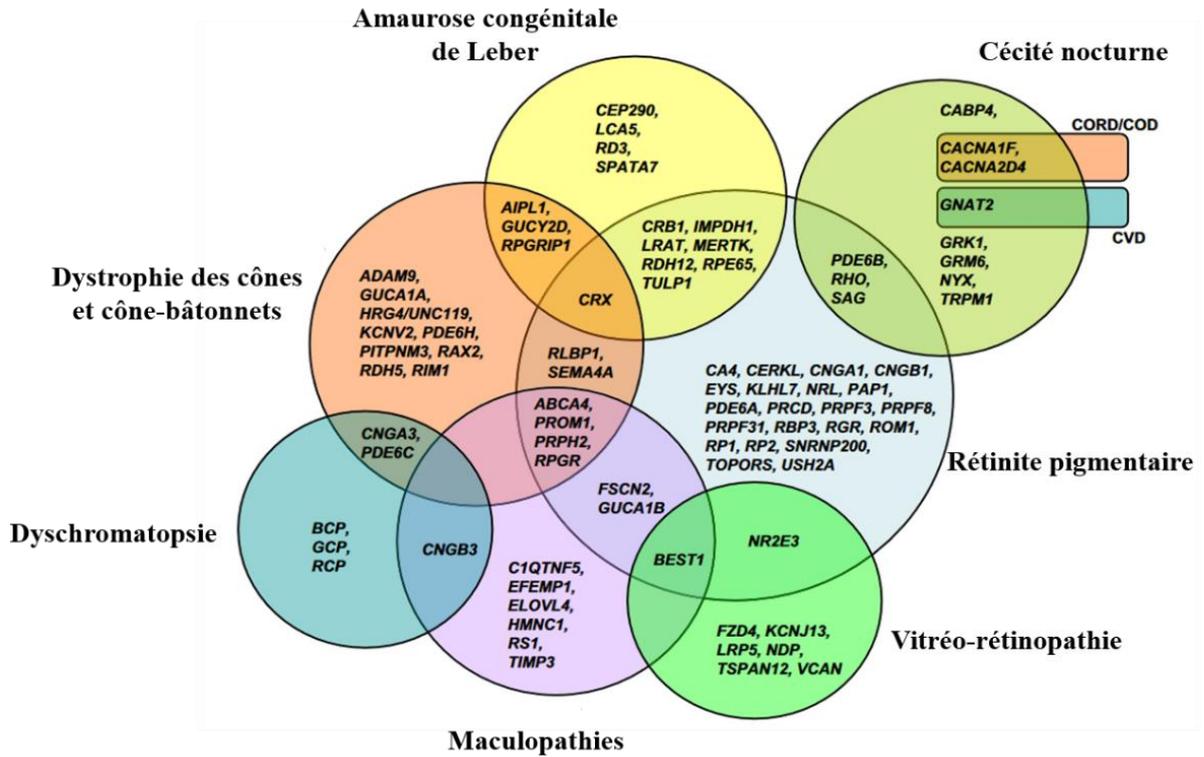


Figure 7 : Dystrophies rétiniennes et leurs gènes

D’après Berger et al 2010, (16). Les phénotypes sont indiqués par des cercles, les gènes dans les zones chevauchantes indiquent que des mutations dans un gène peuvent conduire à des phénotypes différents.

III. La rétinite pigmentaire

Les rétinites pigmentaires (*rod-cone dystrophy*) constituent la principale forme de dystrophies héréditaires avec une prévalence de 1/3000 à 1/5000 selon les populations (17,18). Les rétinites pigmentaires sont caractérisées par la présence de migrations pigmentaires de forme et de localisation variables secondaires à la perte progressive des photorécepteurs. La dégénérescence débute et prédomine aux bâtonnets, qui sont les photorécepteurs responsables de la vision périphérique et nocturne (7). Les rétinites pigmentaires non syndromiques, sont des maladies mendéliennes monogéniques qui se répartissent en 45% de cas sporadiques et 55% de cas familiaux, qui comprennent 20% de cas à transmission autosomique dominante, 20% de cas récessifs autosomiques et 15% de cas liés à l’X (6). Au-delà de la complexité génétique, les RP ont des signes cliniques communs et caractéristiques.

A. Manifestations cliniques de la rétinite pigmentaire

Les aspects varient en fonction de l’âge de début, du mode de transmission et du gène causal (7). La maladie peut débiter à n’importe quel âge avec une fréquence d’apparition plus grande entre 10 et 30 ans (17). La rétinite pigmentaire débute par une héméralopie (gêne à la vision nocturne), des difficultés d’adaptation à l’obscurité et une photophobie à l’adolescence puis par un rétrécissement du champ visuel périphérique donnant une impression de « vision en tunnel » chez le jeune adulte. La vision centrale, dépendante des cônes, est généralement conservée jusqu’à des stades tardifs de la maladie. L’atteinte de la vision centrale se manifeste

par des difficultés à réaliser des activités minutieuses puis une diminution progressive de l'acuité visuelle aboutissant à la cécité totale chez l'adulte (17).

Les symptômes visuels ne sont que le reflet de la dégénérescence des photorécepteurs : initialement des bâtonnets qui permettent la vision périphérique et la vision crépusculaire puis des cônes qui sont responsables de la vision des couleurs et la vision des détails, concentrés au centre de la rétine. Les personnes peuvent être inconscientes de l'atteinte de la vision nocturne car les activités quotidiennes peuvent être réalisées avec une quantité suffisante de lumière qui permet la vision avec les cônes. Par ailleurs, des patients peuvent perdre jusqu'à 90% des cônes dans leur fovéa avant une diminution de leur acuité visuelle.

Il existe également une maladie appelée dystrophie cône-bâtonnets (*cone-rod dystrophy*) faisant partie de la famille des rétinites pigmentaires. Cette maladie ne présente pas les mêmes manifestations que la rétinite pigmentaire en elle-même : la vision centrale est affectée avant la vision périphérique.

La rétinite pigmentaire est une maladie confinée à l'œil. Cependant dans 15-20% des cas, elle peut être associée à des manifestations multisystémiques et est appelée rétinite pigmentaire syndromique. Une vingtaine de syndromes ont été décrits parmi lesquels le syndrome de Usher et le syndrome de Bardet-Biedl sont les plus fréquents. Le syndrome de Usher associe une surdité et une rétinite pigmentaire. La surdité peut être présente à la naissance et profonde (type I), modérée et non progressive (type II) ou apparaître à l'âge adulte (type III). Le syndrome de Bardet-Biedl associe la RP à une obésité, une déficience intellectuelle, une polydactylie, des malformations génitales et rénales.

B. Diagnostic

A l'examen du **fond d'œil**, on décrit des lésions bilatérales (figure 8) : une dépigmentation de l'épithélium pigmentaire au début de la maladie. Puis le déplacement des cellules pigmentées va donner une pigmentation périphérique de la rétine, formant des amas que l'on a comparés à des ostéoblastes (*bones spicules*), des artères grêles sur tout le fond d'œil et une pâleur papillaire. Chez de nombreux patients atteints de rétinite pigmentaire, une cataracte postérieure, des drusens papillaires, une interface vitro-rétinienne anormale (membrane épitréinienne) , un œdème maculaire cystoïde ou une atrophie maculaire peuvent se manifester.



Figure 8: Fond d'œil au stade avancé d'un patient atteint de rétinite pigmentaire

D'après Meunier et al ; 2014 (7)

L'examen du champ visuel montre un scotome dans la moyenne périphérie, rétrécissement du champ visuel périphérique qui s'accroît avec l'évolution de la maladie jusqu'à ne laisser qu'une vision tubulaire (centrale).

L'**OCT (Optical Coherence Tomography)** mesure de façon non invasive l'épaisseur de la rétine qui diminue lorsque l'on est face à une véritable rétinite pigmentaire. Il existe une discontinuité et/ou une perte de la ligne des photorécepteurs, avec une altération de la ligne de jonction des articles externes et internes. . La perte des photorécepteurs se traduit par un amincissement progressif de la couche nucléaire externe. (noyaux des photorécepteurs)

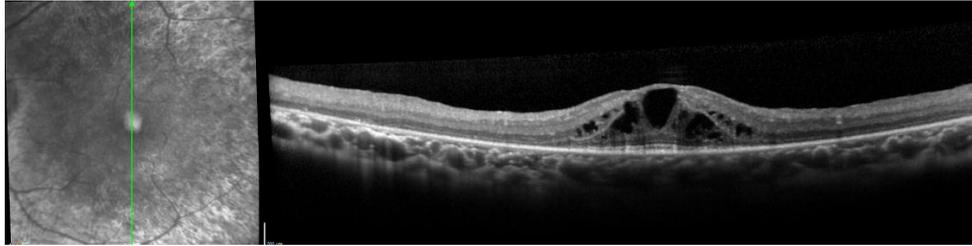


Figure 9 : OCT maculaire : œdème maculaire compliquant une rétinite pigmentaire
fourni par le Docteur Lam

L'**électrorétinogramme (ERG)** mesure l'activité électrique de la rétine lors d'une stimulation lumineuse. Les réponses issues des bâtonnets sont diminuées et les réponses des cônes sont dans la limite de la normale au début de la maladie puis l'altération des systèmes photopiques et scotopiques aboutit à un ERG éteint avec des réponses non discernables.

L'**imagerie en auto fluorescence** utilise les propriétés fluorescentes d'un indicateur métabolique appelé lipofushine (produit du métabolisme- dégradation des photorécepteurs) pour étudier la viabilité de l'épithélium pigmentaire. L'augmentation de l'autofluorescence est liée à la disjonction entre segments externe et interne avec une accumulation anormale de la lipofushine dans l'épithélium pigmentaire, l'hyperautofluorescence signe la souffrance des photorécepteurs. Les zones atrophiques, correspondant à la disparition des photorécepteurs, sont hypoautofluorescentes.

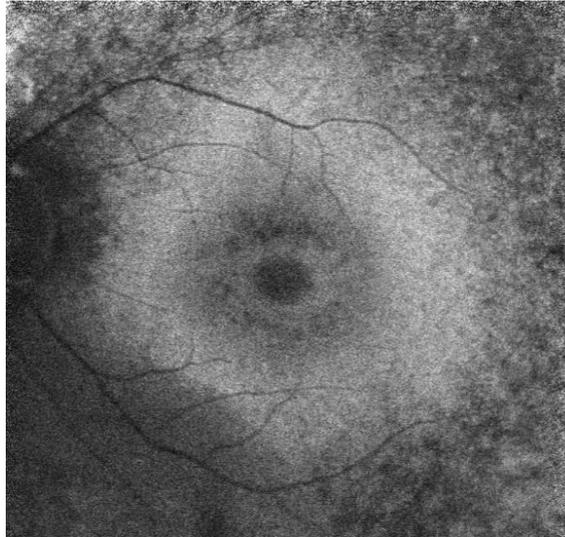


Figure 10 : Imagerie en autofluorescence :

ostéoblastes (aspect de spicules) et atrophie (hypoautofluorescence) périphériques, anneau hyper autofluorescent au pôle postérieur, fourni par le Docteur Lam

L'Angiographie à la fluorescéine a été remplacée par l'imagerie en auto fluorescence et n'est indiquée qu'en cas de doute, de complications néovasculaires, de télangiectasies maculaires ou périphériques.

IV. Le séquençage haut débit dans le diagnostic moléculaire de dystrophies rétiniennes

298 gènes et locus chromosomiques ont été associés aux dystrophies rétiniennes, mais il persiste encore des gènes à identifier (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>) . Le séquençage Sanger a longtemps été considéré comme la technique de référence pour la détection de mutations génétiques, mais c'est une technique longue et coûteuse. Elle produit une séquence de lecture de 500 à 1000 paires de bases par réaction. Le séquençage haut débit (ou séquençage de 2^{ème} génération) a donc été développé afin d'augmenter les capacités de séquençage et de réduire les coûts et les délais. Son principe repose sur un séquençage massif en simultané de plusieurs régions du génome, voire du génome complet, et de plusieurs patients en une seule réaction.

A. Séquençage haut-débit: panel ciblé, exome et génome

Le génome humain comporte environ 3×10^9 bases ; l'ensemble des parties codantes des gènes (exome) ne compte que pour 1%, les 99% de bases restantes correspondent à des régions introniques et intergéniques.

Les technologies de séquençage haut-débit permettent d'identifier rapidement des variations causales dans un nombre sans cesse croissant de gènes de dystrophie rétinienne. Ces technologies séquençent de multiples petits fragments d'ADN provenant de différentes régions du génome en une seule réaction. En attribuant un code barre moléculaire à l'ADN de chaque patient, elles permettent également de séquencer des échantillons provenant de plusieurs patients en parallèle. Les petites séquences sont ensuite reconstruites en comparant leur séquence à celle du génome de référence. On peut décrire 3 approches de séquençage haut-débit :

- cibler des séquences de gènes d'intérêt : on parle de capture d'exons ou de panels ciblés. Les panels sont optimisés pour chaque exon et peuvent inclure la recherche de variants spécifiques et de variants d'épissage
- cibler toutes les séquences codantes du génome : on parle d'exome
- amplifier l'ensemble du génome

Ces technologies vont indubitablement faire progresser notre compréhension de la génétique moléculaire des dystrophies rétiniennes héréditaires. En effet, ce sont des maladies idéales pour le séquençage haut-débit car de nombreux gènes ont été associés aux dystrophies rétiniennes mais il reste encore des gènes à identifier. De plus, elles présentent une diversité des tableaux cliniques qui peuvent être causés par des mutations dans un seul gène. Enfin, les présentations cliniques sont chevauchantes et il devient compliqué de donner un diagnostic en ne se basant que sur le phénotype. Ainsi, Ge et al. en 2015 (19) décrit dans sa cohorte de rétinite pigmentaire trois patients porteurs de variants pathogènes pour les gènes *CEP290*, *GPR98* et *GRM6* qui sont associés respectivement à l'amaurose congénitale de Leber, au syndrome de Usher et à la cécité nocturne congénitale stationnaire. Il émet l'hypothèse que les patients ont été diagnostiqués porteur d'une rétinite pigmentaire et que le diagnostic moléculaire permet de redéfinir leur phénotype.

Cependant, le séquençage haut-débit étant basé sur des séquences courtes (*reads*), il est peu performant pour la détection d'insertions ou de délétions de grande taille et des éléments répétitifs de longueur variable. Il pose également le problème de l'analyse et la gestion des données qui nécessitent une collaboration étroite entre cliniciens, biologistes et bioinformaticiens.

D'autre part, chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients. Les panels ciblés n'étudient qu'une petite portion du génome humain que sont les exons des gènes connus et les gènes candidats ; il est nécessaire de refaire les panels pour incorporer de nouveaux gènes.

L'exome est un outil puissant pour identifier de nouveaux gènes mais se limite aux exons contrairement au génome.

Sur les 15 dernières années, le *National Human Genome Research Institute* (NHGRI) a calculé le montant du séquençage d'un génome entier. En septembre 2001, il l'estime à 95 millions de dollars US. Avec le développement du séquençage Sanger, les coûts ont été divisés par deux tous les 2 ans avec une estimation à 9 millions de dollars US en avril 2007. L'introduction du NGS à partir de 2007 a permis de réduire significativement le coût d'un génome entier estimé en octobre 2015 à 1245 dollar US.

[\(https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/\)](https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/)

B. Stratégie d'analyse des variants

Un variant (ou variation) est une séquence d'ADN différente du génome de référence à une position donnée. Il y a environ 20 000 variations exoniques chez un individu et les stratégies d'analyse de séquençage haut-débit ont pour objectif d'identifier les variants potentiellement pathogènes pour une pathologie donnée.

Bien que les technologies diffèrent selon les laboratoires, des étapes communes d'analyse sont décrites dans la littérature(20–22). Brièvement, la première étape consiste à identifier les variants par un algorithme informatique (*pipeline*) à partir de critères préétablis. Dans des panels de capture d'exons, des sous-groupes de gènes associés à un phénotype particulier sont analysés en priorité (par exemple : rétinite pigmentaire versus maculopathie versus amaurose congénitale de Leber). Si aucun variant n'est identifié dans un sous-groupe, l'analyse est réalisée sur l'ensemble des gènes des dystrophies rétiniennes car les phénotypes sont chevauchants. Dans les techniques d'exome et de génome, l'analyse est réalisée sur l'ensemble des gènes de dystrophies rétiniennes. En l'absence de variant identifié, une réanalyse porte sur l'ensemble de gènes (exome) et des régions introniques et intergéniques (génomique) afin d'identifier des nouveaux gènes ou des mutations introniques.

Des filtres de fréquence allélique dans les bases de données internationales sont également utilisés : par exemple inférieure à 5% dans la base de données dbSNP, ou inférieure à 1% dans la base de données ExAC pour une maladie autosomique dominante (13,23,24). La base ExAC (*Exome Aggregation Consortium*) fournit la fréquence allélique dans la population générale, elle contient le génotype de 60 706 individus obtenus par séquençage d'exomes de 6 groupes ethniques (Afrique, Asie du Sud, Asie de l'Est, Latino, Européenne non finlandaise, Finlandaises et Autres). La fréquence allélique peut être prise en considération selon l'origine ethnique du patient. (<http://exac.broadinstitute.org/>). La base gnomAD (*Génomique Aggregation Database*) accessible librement depuis février 2017 est également disponible et contient

123 136 exomes et 15 496 génomes des 6 groupes ethniques du groupe ExAC et de la population juive ashkénaze. Elle permet ainsi de fournir une fréquence allélique dans les régions introniques.

La seconde étape consiste à interpréter les variants et leur implication dans la pathologie :

- le génotype et la fréquence du variant est cohérente avec le mode de transmission chez le patient et le mode attendu de transmission pour le gène.

- la revue de la littérature et des banques de données publiques *Human Gene Mutation Database* (HGMD) et *ClinVar* : si le variant a été rapporté pour un phénotype identique ou qu'il existe des tests fonctionnels, le variant peut être considéré comme pathogène.

- l'effet du variant sur la protéine : les conséquences d'un changement de nucléotide s'étendent de « bénin » (il n'y a pas d'impact sur la séquence de la protéine ou l'impact est non significatif), « probablement bénin », « variant de signification indéterminée » (VSI), « probablement causal » et « causal » (codon stop ou modification de la séquence protéique). L'effet délétère de grandes délétions/insertions, des petites délétions/insertions entraînant un décalage du cadre de lecture ou de mutations non-sens (codon stop prématuré) posent peu de problèmes d'interprétation car ils impactent fortement la protéine.

L'interprétation est plus délicate pour les variants faux-sens (acide aminé substitué). Les conséquences dépendent de la nature du changement induit et de la localisation au sein de la protéine (site catalytique, site de liaison, cœur hydrophobe). Leurs effets sont prédits par des logiciels qui se basent sur la conservation du nucléotide et de l'acide aminé au sein des espèces et l'écart physico-chimique entre deux acides aminés (SIFT, Polyphen-2, a-GVGD, Mutation Taster). Plus celui-ci est conservé, plus son remplacement par un autre acide aminé

à des chances d’être délétère et ce d’autant plus que l’écart physico-chimique entre les 2 acides aminés est important

- l’effet du variant sur l’épissage les variants introniques (en position -20 à +8) peuvent être prédite *in silico* par les logiciels Human Splicing Finder, MaxEntScan, NNsplice, GeneSplicer. Ces scores calculent la perte ou la dégradation de site d’épissage.
- le variant est bien visualisé par les logiciels d’exploitation de données (Integrative Genome Viewer IGV, SeqNext), le séquençage est de bonne qualité et ne résulte pas d’un artefact de la technique, il peut dès lors être confirmé par séquençage Sanger.
- l’étude de ségrégation familiale : elle permet de confirmer l’impact du variant dans la pathologie familiale si les membres affectés sont porteurs du variant et si les membres sains ne le sont pas.

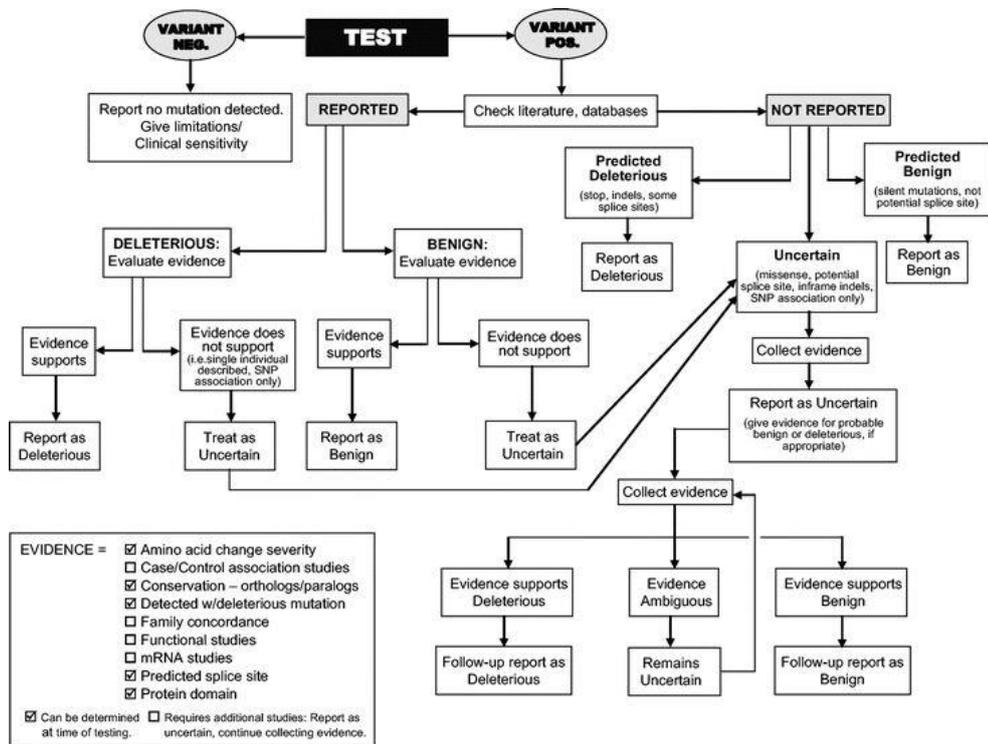


Figure 11: Arbre décisionnel d’interprétation d’un variant

Recommandations de l’American College and Medical Genetics and Genomics, 2008 (25)

Afin d'harmoniser les interprétations inter-laboratoires, *l'American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) a édité des recommandations pour l'interprétation des variants (26): les termes « mutation » et « polymorphisme » qui prêtent à confusion, sont remplacés par « variant » suivi d'un qualificatif (i) pathogène (ii) probablement pathogène (iii) de signification indéterminée (iv) probablement bénin (v) bénin. Les critères de classification reposent sur des arguments cliniques (phénotype, histoire familiale, mode de transmission), biologiques (conservation de l'acide aminé ou du nucléotide), fonctionnelles, la littérature, les banques de données et la fréquence allélique (Annexe 1 et 2). Les arguments sont ensuite combinés pour déterminer l'effet du variant. (Annexe 3)

C. Données de séquençage haut-débit dans les dystrophies rétiniennes

Le séquençage haut-débit permet de séquencer de grandes séries de patients avec des phénotypes hétérogènes sur l'ensemble des gènes. De nombreux panels de capture ciblant les gènes des dystrophies rétiniennes ont été développés. Ces tests séquent soit les gènes connus d'une pathologie donnée, soit l'ensemble des gènes des dystrophies rétiniennes (de 105 gènes à 195 gènes dans les études présentées dans le tableau 1). A chaque mise à jour du panel, la technique doit être validée et les patients éventuellement retestés.

L'exome permet d'effectuer un test diagnostique unique pour toutes les dystrophies rétiniennes. Lorsque de nouveaux gènes sont implémentés, une réanalyse bio-informatique des données déjà disponibles est suffisante.

Patients	Population	Technologie	Variations (probablement) causales	Cas irrésolus	Références
82	Irlande du Nord	Capture d'exons 186 gènes	60%	40%	Zhao et al, 2015 (27)
105	Banque eyeGENE®	Capture d'exons 195 gènes	49,5%	50,5%	Ge et al, 2015 (19)
537	Mondiale	Capture d'exons 105 gènes	51%	49%	Ellingford et al, 2016 (23)
309	Irlande	Capture d'exons	57%	43%	Carrigan et al, 2016 (28)
89	Européenne	Capture d'exons 105 gènes & Exome & Génome	61%	39%	Weischuss et al, 2016 (29)
58	Suisse	Exome	64%	36%	Tiwari et al, 2016 (30)
59	Espagnole	Exome	71%	29%	Riera et al, 2017 (31)
266	Néerlandaise	Exome	52%	48%	Haer-Wingman et al, 2017 (22)
722	Anglaise	Exome & Génome	56%	44%	Carss et al, 2017 (20)

Tableau 1: Données de séquençage haut-débit sur les patients atteints de dystrophies rétiniennes héréditaires

La technologie de capture d'exons permet d'identifier dans 50-60% des dystrophies rétiniennes une variation causale ou probablement causale. Les taux de détection sont significativement affectés par les conditions de réalisation de l'étude (sélection des patients), le nombre de gènes testés, par un screening préalable des patients et par l'origine ethnique de la population. Les études d'exome présentent des résultats similaires avec un pourcentage d'identification entre 50-65%, à l'exception de l'étude espagnole de Riera *et al.*, 2017, qui a identifié un variant dans 71% des cas (31). Les conclusions de ces études sont la redéfinition des phénotypes à partir du diagnostic génétique : dans l'étude de Haer Wingman (22), un cas de dystrophie cône-bâtonnet non syndromique et un cas de rétinite pigmentaire non syndromique ont été identifiés porteurs d'une variation pathogène dans le gène *PANK2*. Le gène *PANK2* provoque le syndrome NBIA1, avec une large gamme de symptômes neurologiques. La dystrophie rétinienne est l'un des premiers symptômes chez les patients présentant des variants *PANK2*. Les deux patients de l'étude ont présenté ultérieurement les symptômes neurologiques du syndrome NBIA1.

Enfin, entre 30-50% des cas n'ont pas de diagnostic moléculaire (21).

D. Absence de diagnostic moléculaire dans les dystrophies rétiniennes

La détection des mutations reste difficile pour plusieurs raisons (21):

- une profondeur de couverture non-uniforme et la problématique des régions riches en GC qui restent difficiles à séquencer.

- un pipeline et un filtre inappropriés des données. Le filtre de fréquence doit être adapté en fonction de la pathologie et du mode de transmission (1/100, 1/500, 1/1000). Il est nécessaire de vérifier le niveau de validation d'une variation déjà rapportée dans les banques (dbSNP).

- une variation située dans une région complexe non ciblée par la capture (exclue du design, variation non codante ou gène non identifié). L'extension du screening aux régions introniques permettra d'obtenir la prévalence des variants introniques dans les dystrophies rétiniennes. Les mutations affectant l'épissage de l'ARNm peuvent être prédites *in silico* et confirmées par une analyse de transcrit. Les analyses transcriptomiques permettront d'explorer les variants d'épissage dans les dystrophies rétiniennes.

- des variants structurels tels que les inversions, les duplications ainsi que les gènes non encore identifiées dans les dystrophies rétiniennes.

- une mauvaise hypothèse de départ sur le mode de transmission, une mosaïque germinale, un mode de transmission additif (combinaison de variations homozygotes délétères).

- la pénétrance incomplète de gènes ne permettant pas la ségrégation familiale. Un membre de la famille peut être porteur de l'allèle muté, bien que la maladie ne se soit pas encore manifestée ou parce que la mutation n'est pas pénétrante chez l'individu, tel *PRPF31* qui a une pénétrance incomplète jusqu'à 20%.

- l'absence de détection de CNV (variation du nombre de copie) qui compterait pour 3,5 à 18% des patients négatifs. De nombreux outils ont été développés pour la détection de

CNV dans les algorithmes bio-informatiques de séquençage haut-débit. L'analyse des données de couverture par exon a permis d'identifier des CNV chez 10% de patients négatifs par séquençage d'exome dans une cohorte de 60 personnes atteintes de dystrophies rétiniennes (32). D'autres technologies sont également disponibles : pcr quantitative, MLPA (*multiplex ligation-dependant probe amplification*) et CGH (*comparative genomic array*) (33).

Au-delà de cette complexité génétique, il persiste le problème des Variants de Signification Inconnue qui sont des variants rares, pour lesquels les logiciels de prédiction ne s'accordent pas et potentiellement pathogènes dans des gènes connus de rétinite pigmentaire. C'est un problème fondamental en génétique médicale étant donné le nombre important de variants rares et apparemment causaux dans la population.

V. Génétique de la rétinite pigmentaire autosomique dominante et liée à l’X

On répertorie actuellement 67 gènes et loci chromosomiques responsables de Rétinite Pigmentaire typique (*rod-cone dystrophy*) dont 23 pour les formes autosomiques dominantes, 39 pour les formes récessives et 5 pour les formes liées à l’X. Ces gènes couvrent divers aspects de la physiologie des récepteurs. La base de données HGMD recense plus de 1700 variants dans les gènes de rétinite pigmentaire, bien que certains ne soient pas causaux voire sont de signification inconnue.

Il faut souligner les variations d’expression des gènes : par exemple une mutation du gène *RHO* peut donner une rétinite pigmentaire, ou une cécité nocturne congénitale stationnaire. (tableau 1). De plus, certains gènes peuvent conduire à des formes dominantes ou des formes récessives (*RP1*, *NR2E3*) (8,9,34). Il n’y a à notre connaissance aucune anomalie épigénétique décrite dans les rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et liées à l’X.

Le tableau 2 dresse une liste des gènes impliqués dans les rétinites pigmentaires autosomiques dominantes (ADRP) et les rétinites pigmentaires liées à l’X et testés dans cette étude.

Symbole	Gène/protéine	Chromosome	Maladies alternatives	Fonction
<i>RHO</i>	Rhodopsine	3q22.1	Cécité nocturne congénitale stationnaire Rétinite pigmentaire récessive	Pigment visuel de photorécepteur Phototransduction Structure du segment membranaire externe
<i>PRPH2</i> (<i>RDS</i>)	Peripherine 2	6p21.1	Dystrophie maculaire dominante Rétinite pigmentaire digénique avec ROM1 Dystrophie maculaire vitelliforme de l'adulte Dystrophie Cone-Rod dominante Atrophie centrale aréolaire dominante Amaurose congénitale de Leber récessive	Morphogénèse des photorécepteurs Structure du segment membranaire externe
<i>PRPF3</i>	Pre-mRNA processing factor 3	1q21.2		Maturation de l'ARN
<i>PRPF8</i>	Pre-mRNA processing factor 8	17p13.3		Maturation de l'ARN
<i>PRPF31</i>	Pre-mRNA processing factor 31	19q13.42		Maturation de l'ARN
<i>IMPDH1</i>	Inosine monophosphate déshydrogénase 1	7q32.1	Amaurose congénitale de Leber dominante	Synthèse de bases nucléotidiques (adénine et guanine)
<i>RP1</i>	RP1 protéine	8q12.1	rétinite pigmentaire récessive	Structure ciliaire Fonction ciliaire (transport de protéine entre le segment interne et externe des photorécepteurs)
<i>NRL</i>	Neural retina lucine zipper	14q11.2	rétinite pigmentaire récessive	Facteur de transcription
<i>NR2E3</i>	Nuclear receptor subfamily2 group3	15q23	recessive enhanced S-cone syndrome (ESC) rétinite pigmentaire récessive (Portuguese Crypto Jews)	Facteur de transcription
<i>SnRNP</i> <i>200</i>	Small nuclear ribonucleoprotein 200kDA	2q11.2		Maturation de l'ARN (épissage de l'ARN)
<i>RP2</i>	Retinitis Pigmentosa protein 2	Xp11.23		Segment interne
<i>RPGR</i>	Retinitis pigmentosa GTPase regulator	Xp11.4	Dystrophie maculaire atrophique liée à l'X Dystrophie des cônes liée à l'X	Viabilité de photorécepteur Cil connecteur

Tableau 2: Gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante et de la rétinite pigmentaire liée à l'X

A. Fonction normale des gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante

Le tableau 2 résume brièvement le rôle des gènes impliqués dans la rétinite pigmentaire autosomique dominante. Il n'est pas étonnant que des gènes codant pour des protéines produites dans les photorécepteurs soient responsables de la pathologie. Par exemple, la rhodopsine qui est une protéine transmembranaire indispensable à la structure du disque et à la phototransduction. Cependant, la relation entre la fonction et la maladie n'est pas clairement établie pour certains gènes. Par exemple, les produits des gènes *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31* et *snRNP200* sont des éléments essentiels du spliceosome(35). Ces gènes sont exprimés dans tous les tissus et très conservés chez tous les eucaryotes. La raison pour laquelle des mutations dans ces gènes sont responsables uniquement d'ADRP n'est pas connue.

B. Prévalence des gènes dans la littérature

Vingt-deux gènes de rétinite pigmentaire autosomique dominante sont décrits dans la littérature, leur prévalence est donnée dans le tableau 3. Parmi eux, 10 gènes ont été sélectionnés dans notre panel de diagnostic moléculaire de routine. On trouve 4 gènes majeurs, *RHO*, *PRPF31*, *PRPH2* et *RPI* qui couvrent près du tiers des patients. Pour 30 à 70% des patients, le diagnostic n'est pas établi sur le plan génétique, il est donc vraisemblable que plusieurs dizaines de gènes restent à découvrir. L'identification de ces gènes est importante pour la compréhension de ces maladies et pour le conseil génétique. Concernant le dernier point, la connaissance des gènes des formes dominantes revêt une importance majeure puisque l'atteinte des descendants se pose.

Gène	Méthode	Série	Origine	%	Références
<i>RHO</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	26,9	Daiger et al., 2014
	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	14	Van Cauwenbergh et al., 2017
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	13,7	Glöckle et al., 2014
	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	21	Fernandez-San Jose et al., 2015
				16 %	
<i>PRPF31</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	8,7	Daiger et al., 2014
	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	10,5	Van Cauwenbergh et al., 2017
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	6,8	Glöckle et al., 2014
	Exome	22	Chine	13,6	Huang et al., 2017
	SSCP, Sanger + capture d'exon + exome	167	Espagne	7,6	Martin-Merida et al., 2017
	WES + MLPA+ aCGH (CNV)	167	Espagne	1,2	Martin-Merida et al., 2017
				8,4%	
<i>PRPH2</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	7,5	Daiger et al., 2014
	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	4,7	Van Cauwenbergh et al., 2017
	Sanger	310	France	10,3	Manes et al., 2015
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	1,9	Fernandez-San Jose et al., 2015
				5,9 %	
<i>RPGR</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	7,5	Daiger et al., 2014
<i>RPI</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	3,6	Daiger et al., 2014
	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	10,5	Van Cauwenbergh et al., 2017
<i>IMPDH1</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	3,2	Daiger et al., 2014
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	3,5	Glöckle et al., 2014
	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	0,6	Fernandez-San Jose et al., 2015
<i>PRPF8</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	2,4	Daiger et al., 2014
<i>NR2E3</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	2	Daiger et al., 2014

	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	2,3	Van Cauwenbergh et al., 2017
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	6,8	Glöckle et al., 2014
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	1,2	Fernandez-San Jose et al., 2015
	Sanger NR2E3 mutation G56R	201		3,5	Blanco-Kelly et al, 2016
<i>TOPORS</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	1,2	Daiger et al., 2014
<i>PRPF3</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	1,2	Daiger et al., 2014
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	3,5	Glöckle et al., 2014
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	1,8	Fernandez-San Jose et al., 2015
<i>KLHL7</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	1,2	Daiger et al., 2014
<i>SNRNP200</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,8	Daiger et al., 2014
	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	3,5	Van Cauwenbergh et al., 2017
	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	3,5	Glöckle et al., 2014
	Exome	22	Chine	9	Huang et al., 2017
<i>RP2</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,8	Daiger et al., 2014
<i>RPE65</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,4	Daiger et al., 2014
<i>RDH12</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,4	Daiger et al., 2014
	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
<i>GUCY2D</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,4	Daiger et al., 2014
<i>CRX</i>	Sanger + Capture d'exons + exome	253	USA	0,4	Daiger et al., 2014
	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
	genotyping microarray, Sanger	167	Espagne	0,6	Fernandez-San Jose et al., 2015
<i>TOPORS</i>	Sanger + Capture d'exons + exome +CGH Array	86	Belgique	1,2	Van Cauwenbergh et al., 2017
<i>RIMS1</i>	Panel 150 gènes, SOLiD	29	Allemagne-Suisse	3,5	Glöckle et al., 2014
<i>ROM1</i>	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
<i>FSCN2</i>	Exome	22	Chine	4,5	Huang et al., 2017
<i>PRPF6</i>	Exome	22	Chine	9	Huang et al., 2017

Tableau 3 : Prévalence des gènes de la rétinite pigmentaire autosomique dominante

L'avantage des maladies mendéliennes telles que la rétinite pigmentaire autosomique dominante est qu'elle ségrège au sein de famille, ce qui facilite l'identification de sa pathogénicité (18), sauf dans les gènes à pénétrance incomplète dans lesquels des porteurs de variants pathogènes sont asymptomatiques.

Bien qu'il n'y ait pas de protocole établi, chaque publication de séquençage haut-débit citée dans le tableau 3 suit la même stratégie (décrite précédemment dans le chapitre IV.2 (stratégie d'analyse des variants)). En plus de ces critères, des critères plus spécifiques à la rétinite pigmentaire peuvent être appliqués (13,14,18,19,24):

- la couverture de séquençage des gènes les plus fréquents tel que *RHO*, *PRPH2* et *PRPF31* doit être suffisante
- il faut prendre en considération une transmission liée à l'X si il n'existe pas de transmission de la pathologie d'homme à homme dans la famille
- le filtre du pipeline d'analyse tient compte des variants dont la fréquence allélique est <0,1% dans les bases de données disponibles tels que 1000 Genomes, ESP, ExAC.
- déterminer si les variants retenus sont déjà connus comme responsables de la pathologie dans la littérature, la banque de données HGMD et ClinVar. Les banques de données locales peuvent également être consultées
- si aucun variant n'a été détecté dans les gènes, rechercher les grandes délétions dans le gène *PRPF31* et/ou une mutation dans la région de l'ORF15 du gène *RPGR*
- la confirmation de ces variations par un séquençage Sanger et l'analyse de la ségrégation chez les autres membres de la famille.
- en se basant sur les critères cités précédemment et en incluant l'histoire clinique, le mode de transmission, les phénotypes possibles des gènes, il devient possible d'établir la probabilité de l'implication d'un variant dans la maladie observée chez le patient.

Dans les formes liées à l'X, les hommes porteurs de la mutation sont symptomatiques avec des signes fonctionnels, des anomalies du fond d'œil, de l'imagerie ou de l'ERG dès les stades précoces. Il est plus difficile de savoir si une femme est conductrice, mais l'examen du fond d'œil peut être évocateur d'anomalies.

VI. Objectif du travail

Ce projet a pour objectif de comparer quatre stratégies diagnostiques pour l'identification de variants responsables de rétinite pigmentaire dominante autosomique et lié à l'X, l'une des causes les plus fréquentes de maladies héréditaires de la rétine.

La connaissance de ces gènes permettra de : i) fournir un diagnostic certain et donc un conseil génétique fiable aux familles, avec pour conséquence des choix parentaux éclairés et un meilleur suivi des descendants ; ii) évaluer précisément la prévalence des gènes connus dans la population de rétinite pigmentaire autosomique dominante en France. iii) mieux reconnaître certains phénotypes particuliers afin de guider le diagnostic moléculaire et d'anticiper l'évolution de chaque cas ; iiiii) évaluer la meilleure stratégie pour le diagnostic moléculaire de rétinite pigmentaire autosomique dominant

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Sélection des patients

Les ADN étudiés proviennent de 625 patients atteints de rétinite pigmentaire (cas index) de forme familiale sur un mode autosomique dominant ou sporadique. Le diagnostic de rétinite pigmentaire était posé après un examen ophtalmologique comprenant l'examen du fond d'œil, l'examen du champ visuel, l'électrorétinographie, une tomographie en cohérence optique et une angiographie à la fluorescéine. Les ADN ont été étudiés après recueil du consentement éclairé des patients.

Le recrutement des patients est national et se répartit de la façon suivante :

- 348 patients du Centre de Référence National de Maladies Rares « Affections Sensorielles Génétiques » de Montpellier
- 95 patients du Centre de Compétence –Maladies Rares de Nantes
- 31 patients du Centre de Compétence –Maladies Ophtalmiques Rares de Lille
- 13 patients du service de Génétique, CHRU de Lille
- 138 patients d'autres régions de France

Une étude de ségrégation a été réalisée lorsque les ADN des apparentés étaient disponibles.

II. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est extrait à partir de deux tubes EDTA de 5ml de sang total sur le robot Hamilton® Chemagic Star. Le sang est d'abord mélangé à un tampon contenant des sels chaotropiques permettant la lyse des membranes cellulaires des globules blancs et de la protéinase K digérant les protéines. Un tampon de fixation permet l'accrochage de l'ADN sur des billes magnétiques. Les billes couplées à l'ADN sont lavées avec des tampons de lavage de concentrations croissantes en éthanol. L'élution de l'ADN est obtenu avec un tampon Tris HCl 10 Mm pH qui permet de rompre les liaisons billes-ADN. L'ADN extrait est ensuite dosé au spectrophotomètre Dropsense (Trinean). Un grand nombre de prélèvements provenant des Centres de référence nationaux nous parviennent déjà extraits.

III. Séquençage par méthode Sanger

La première méthode utilisée de 2008 à 2014 est le séquençage de 28 exons de 10 gènes d'ADRP par méthode Sanger. Seule l'analyse des gènes *RHO* (5 exons) et *RDS/PRPH2* (3 exons) est exhaustive. Pour les autres gènes, n'ont été étudiées que les régions décrites dans la littérature comme points chauds mutationnels :

RPI : exon 4 en 4 fragments

IMPDH1 : exon 10

PRPF31 : exons 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

NRL : exon 2

PRPF8 : exon 43

NR2E3 : exon 2

PRPF3 : exon 11

snRNP200 : exons 16 et 25

A. PCR

La PCR ou Polymerase Chain Reaction est une technique de réplication de l'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon peu abondant d'importante quantité d'un fragment de l'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur est celui du million de copies en quelques heures.

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces (primers) définissent en la bornant la séquence à amplifier. Les produits de chaque étape sont réutilisés comme matrices pour les étapes suivantes. L'amplification est donc exponentielle.

a) Mode opératoire

La composition du mélange réalisé pour effectuer les PCR est décrite dans le tableau 4. La polymérase utilisée est la TAQ (Invitrogen®). Un témoin négatif est préparé simultanément pour chaque exon en remplaçant l'ADN du patient par un volume d'eau ppi équivalent.

Réactifs	Volume par tube réactionnel (µL)
H2O	11,875
MytaqBuffer	5
Primer sens (20mM/ µL)	1
Primer anti-sens (20mM/µL)	1
Taq polymerase Invitrogen (5U/ µL)	0,125
ADN	1
Volume Total	20

Tableau 4: Mélange de PCR utilisé pour l'amplification des exons des gènes d'ADRP

La température d'hybridation des amorces a été adaptée selon le pourcentage de GC contenu dans chaque exon, elle va de 58°C à 60°C selon les exons. La programmation du thermocycleur a été réalisée selon le tableau 5 :

Etape	Température	durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 minute	1 cycle
Dénaturation	95°C	15s	} 35 cycles
Hybridation des amorces	selon les exons entre 58°C et 62°C	115s	
Elongation	72°C	10s	
Elongation finale	72°C	7 minutes	1 cycle

Tableau 5: programme de la PCR

b) Migration sur gel

Cette procédure permet de mettre en évidence le fragment d'ADN amplifié : elle contrôle le fonctionnement de l'amplification, la taille du fragment et la spécificité de la réaction. L'ADN amplifié est mélangé avec du Bleu de Bromophénol puis déposé dans un gel d'agarose 2% TAE (Trix Acétate EDTA) dans lequel a été préalablement incorporé du bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant se liant à l'ADN double brin et émettant une fluorescence lors de son exposition aux UV courts (300nm).

c) Purification des produits de PCR

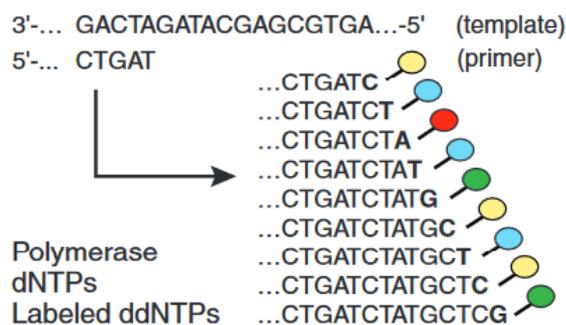
Les produits de PCR nécessitent d'être purifiés après amplification. L'exonucléase (Illustra™) élimine les amorces en excès tandis que la phosphatase alcaline (Promega™) digère les dNTP non incorporés.

B. Séquençage Sanger

a) Principe

La réaction de séquençage consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN. Celle-ci se fait à partir d'un brin recopié par une ADN polymérase à partir d'une amorce fixée spécifiquement et de façon complémentaire au brin matrice. La polymérase incorpore aléatoirement des désoxynucléotides (dNTP) par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5'phosphate du dNTP suivant. Le milieu comporte également des didéoxynucléotides (ddNTP) marqués par un fluorochrome spécifique. Les ddNTP diffèrent des dNTP par leurs extrémités 3'H qui empêchent la formation de la liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant et provoquent l'arrêt de synthèse du brin d'ADN. Le milieu réactionnel est donc le lieu d'une compétition entre les dNTP non marqués et les ddNTP fluorescents, l'incorporation aléatoire des ddNTP conduit ainsi à un mélange de fragments d'ADN de tailles différentes.

Les fragments néosynthétisés sont ensuite séparés en fonction de leur taille sur un gel de polyacrylamide contenu dans le capillaire du séquenceur. Un faisceau laser excite les fluorochromes couplés aux ddNTP. La longueur d'onde de fluorescence réémise permet d'identifier la base correspondante. Après analyse par l'algorithme du séquenceur, un électrophorégramme est obtenu composé de quatre couleurs différentes.



**Electrophoresis
 (1 read/capillary)**

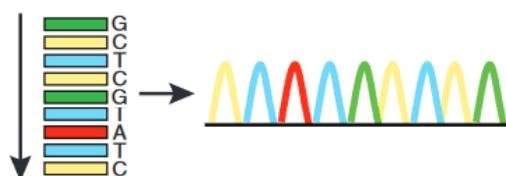


Figure 12: Principe du séquençage Sanger

d'après Shendure et al., 2008 (36)

b) Mode opératoire

La chimie utilisée pour la réaction d'extension est le BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems®). Ce mix contient les réactifs du séquençage : dNTPs, ddNTPs et ADN polymérase.

Réactifs	Volume par tube réactionnel (µL)
Master mix Big Dye Terminator	2
Tampon Big Dye Sequencing Buffer	3
Amorce sens ou antisens (5µM)	1
produits de PCR	0,5 à 4
H2O	xx
Volume Total	20

Tableau 6: Mélange réactionnel pour l'extension

Etape	Température	durée	Nombre de cycles
T1	96°C	1 minute	1 cycle
T2	96°C	10 s	} 25 cycles
T3	50°C	10 s	
T4	60°C	4 minutes	

Tableau 7: programme PCR de séquençage

L'extension est suivie d'une purification au biogel P10 (Biorad®). C'est une chromatographie d'exclusion en gel de polyacrylamide dans laquelle sont élués les produits d'extension. Les primers et le BigDye (dNTP, ddNTP) restent dans la colonne formée par le gel.

Après purification, les produits sont passés sur le séquenceur 48 capillaires 3730XL (Applied Biosystems®). L'excitation au laser des ddNTP marqués permet d'établir une succession de couleurs correspondant à l'ordre des nucléotides. Les données obtenues sont alignées et analysées sur le logiciel SeqScape Version 2.7 (Applied Biosystems®).

IV. Protocole du séquençage haut-débit

A partir de 2014, le séquençage haut-débit a été développé dans le service. Il a été appliqué au diagnostic moléculaire des rétinites pigmentaires pour remplacer le séquençage Sanger. Les 10 gènes précédemment analysés de façon partielle ont ainsi pu être étudiés de façon exhaustive. Deux gènes supplémentaires ont été ajoutés au panel, *RP2* et *RPGR*, impliqués dans les formes liées à l’X. Le premier séquenceur utilisé a été le PGM™ Ion Torrent (Life Technologies™). Puis, pour des questions de défaut de qualité et d’analyse des homopolymères, nous avons basculé sur les séquenceurs MiSeq™, et plus récemment vers le NextSeq™ d’Illumina. L’utilisation de ces séquenceurs nous a permis de développer des panels plus larges, de 18 gènes et de 150 gènes.

On peut définir un protocole général partagé en 4 étapes clés communes à toutes les techniques de séquençage haut débit.

La première étape est la préparation d’une collection de fragments recouvrant la totalité des séquences d’ADN à étudier. Cette collection est appelée « librairie ». Les ADN sont initialement fragmentés puis liés à des adaptateurs communs. On y ajoute également des séquences nucléotidiques (*barcode*) spécifiques pour chaque patient. Ce *barcode* permet d’adresser à un patient donné toutes les séquences qui auront été générées à partir de son ADN.

La seconde étape est l’amplification clonale qui permet de générer à partir d’un fragment d’ADN unique un très grand nombre de copies identiques.

La troisième étape est le séquençage de molécules nucléotidiques à l’aide de techniques de « *wash-and-scan* » (ou cycles). Elle est basée sur des polymérases et réactifs qui doivent être enlevés à chaque cycle après l’incorporation des bases à lire.

La dernière étape est l’analyse de données de séquençage par des outils bioinformatiques.

Dans notre étude, avons utilisé deux kits différents de préparation de bibliothèques

- Ion AmpliSeq™ (Life Technologies™) pour l'analyse de 12 gènes, séquencés sur le séquenceur Ion Personal Genome Machine (PGM, Life technologies).

- Haloplex™ (Agilent Technologies™) pour l'analyse de 18 gènes et de 150 gènes, séquencés sur le NextSeq™ (Illumina).

V. Séquençage haut-débit PGM 12 gènes

A. Construction des bibliothèques : technologie AmpliSeq

a) Principe

L'objectif de cette étape est d'obtenir une collection (bibliothèque) d'ADN cible, composée de fragments de taille uniforme et bornés à leur extrémité par des adaptateurs. Le panel se compose de 10 gènes de RP autosomiques dominantes (*RHO*, *PRPH2*, *RP1*, *IMPDH1*, *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPH31*, *snRNP200*, *NRL*, *NR2E3*) et 2 gènes de RP liés à l'X (*RP2* et *RPGR*).

La première étape consiste alors à effectuer une PCR multiplex en utilisant un mélange d'amorces. Après l'amplification, une enzyme de restriction, la FuPa, digère partiellement les amorces et permet de récupérer des amplicons de taille identique. Une ADN ligase va liquer de part et d'autre des amplicons un adaptateur « A » et un adaptateur « P1 ». L'adaptateur « A » possède une séquence spécifique (*barcode*) qui permettra d'identifier chaque patient au séquençage (figure 11).

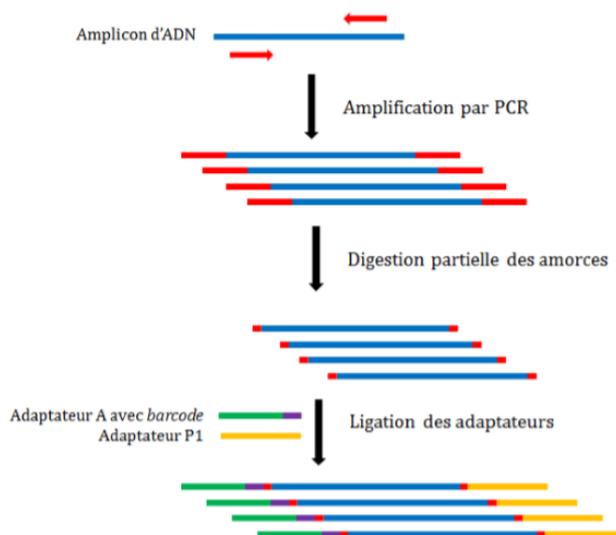


Figure 13: Préparation de la bibliothèque d'ADN par AmpliSeq

La ligation est suivie de deux étapes de purification par billes magnétiques AMPure entre lesquelles une étape de *nicktranslation* termine la liaison complète des adaptateurs aux amplicons. Chaque amplicon est ensuite dosé sur la Tape Station puis normalisé. Les échantillons sont mélangés afin de constituer la librairie. Cette dernière est quantifiée sur le Bioanalyseur (Agilent Technologies™).

b) Mode opératoire

Réactif	Volume par tube réactionnel (µl)
5X Ion AmpliSeq HiFi Master Mix	1
2X Ion AmpliSeq Primer Pool 1	2,5
ADN	1,5
volume final	5

Tableau 8: Mélange réactionnel pour l'amplification des régions cibles

Étapes	Température	Durée
Dénaturation initiale	99°C	3 min
Dénaturation	99°C	20 secondes
Hybridation des amorces	60°C	4 min
Elongation finale	10°C	xx min

Tableau 9: Programme d'amplification pour les régions cibles

Température	Durée
50°C	10min
55°C	10 min
60°C	20min
10°	60 min max

Tableau 10: Programme de digestion par la FUPA

Réactif	Volume par tube réactionnel (µl)
Ion P1 Adapter	0,125
Switch Solution	1
Eau	0,25
DNA ligase	0,5
Ion Xpress Barcode	0,125
ADN	5
Volume final	7,5

Tableau 11 : Mélange réactionnel pour l'amplification des régions cibles

Température	Durée
22°C	30 min
72°C	10 min
10°C	xx min

Tableau 12: Programme de ligation des primers

B. Préparation de la matrice de séquençage

L'objectif de cette étape est de fixer un fragment unique sur une bille (ISP ou *Ion Sphere Particle*) et d'en synthétiser un grand nombre de copies. La technologie AmpliSeq™ utilise le principe de la PCR en émulsion sur l'automate Ion OneTouch 2 (Life Technologies™). L'amplification est réalisée au sein d'une émulsion huile dans eau dans laquelle des microgouttelettes aqueuses vont constituer des microréacteurs. Dans la situation idéale, chaque gouttelette de la phase aqueuse contient une ISP unique, un fragment unique et les réactifs nécessaires pour réaliser une PCR.

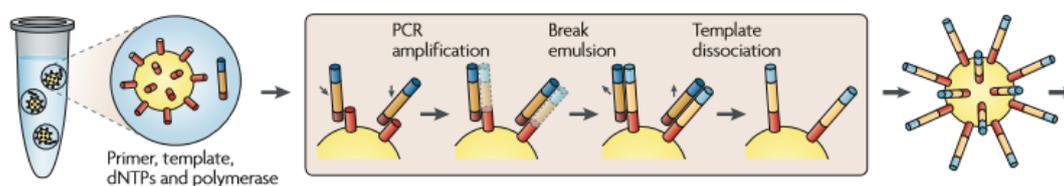


Figure 14 : Principe de la PCR en émulsion

d'après Metzker , 2010 (37)

La réaction commence par une amplification grâce à des amorces complémentaires des adaptateurs A et P1. Les amplicons obtenus après cette première PCR s'hybrident sur la bille et peuvent ensuite être amplifiés et copiés par une seconde PCR. Des amorces biotinylées complémentaires de l'extrémité libres sont aussi introduites.

Après la réaction, l'enrichissement de la librairie consiste à ne sélectionner que les ISP chargées par un fragment et d'éliminer les ISP vides. La sélection est réalisée grâce à la réaction streptavidine/biotine sur l'automate Ion OneTouch™ ES (Life Technologies™). L'enrichissement est contrôlé sur le fluoromètre Qubit® par marquage des ISP par 2 fluorochromes différents. La première sonde Alexa Fluor® 488 est complémentaire de l'amorce B (la totalité des ISP) tandis qu'une deuxième sonde Alexa Fluor® 647 s'hybride sur l'adaptateur A (ISP recouvertes de fragments d'ADN). Le rendement de la réaction est calculé par le ratio de fluorescence Alexa Fluor® 647/ Alexa Fluor® 488. La fraction enrichie

doit être supérieure à 10%.

C. Séquençage

La technologie de séquençage du système Ion Torrent est basée sur la détection d'un signal électrique généré par une variation de pH réalisée sur l'automate Ion PGM™.

Les billes obtenues après enrichissement sont déposées sur une puce de séquençage contenant des puits, de sorte que chaque puit ne contient qu'une seule bille recouverte d'ADN. Les fragments d'ADN sont initialement dénaturés et le séquençage est réalisé par des lavages successifs de solutions de nucléotides (*flow*) qui seront incorporés par l'ADN polymérase s'ils sont complémentaires au brin en cours d'élongation.

Chaque incorporation s'accompagne d'une libération d'un pyrophosphate et d'un proton H^+ spécifique du nucléotide incorporé. La libération d'un H^+ entraîne une variation locale du pH détectée par un capteur et convertie en une différence de voltage. La hauteur du signal détecté est proportionnelle au nombre d'ions H^+ libérés et de nucléotides incorporés. Si aucune variation de pH n'est détectée, cela signifie que la position sur le brin en cours n'est pas complémentaire au dNTP distribué. Les bases non incorporées sont éliminées et le nucléotide suivant est ajouté.

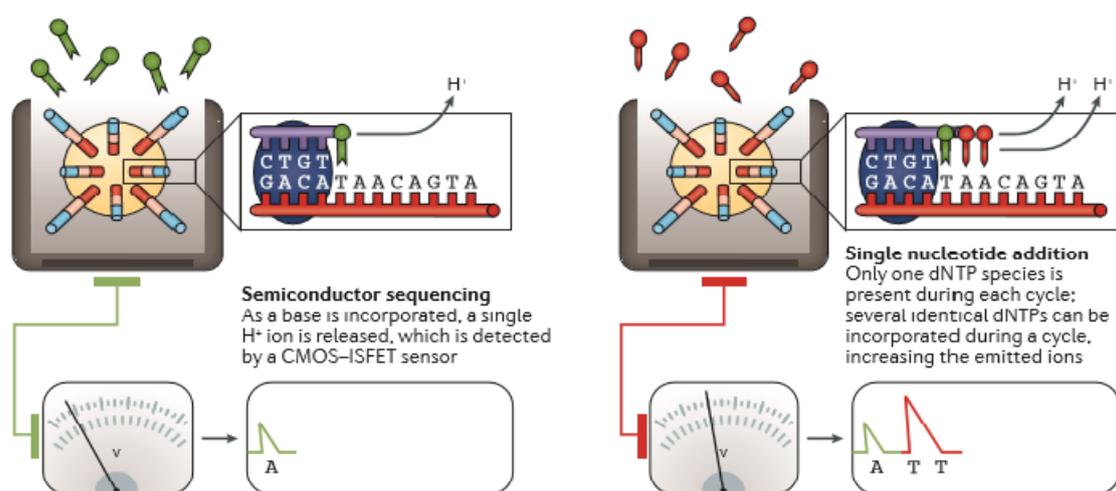


Figure 15: Principe du séquençage par la technologie Ion Torrent

d'après Goodwin et al., 2016 (38)

VI. Séquençage haut-débit 18 gènes et 150 gènes

A. Construction des bibliothèques : technologie Haloplex™

a) Principe

Les bibliothèques ont été réalisées à l'aide du kit d'enrichissement Haloplex™ (Agilent™). Les ADN des patients sont d'abord normalisés à une concentration de 5ng/ µl. La bibliothèque se construit en quatre étapes : les ADN sont digérés par 8 réactions successives réalisées par 16 enzymes de restriction, permettant d'obtenir des séquences d'ADN digérées de différentes tailles. Puis les fragments d'ADN sont hybridés avec les sondes Haloplex. Ces sondes sont conçues pour s'hybrider spécifiquement à des régions du génome grâce à leurs extrémités qui sont complémentaires aux fragments cibles d'ADN. Chaque sonde contient également un motif central composé d'un *barcode* avec des adaptateurs universels similaires (P5 et P7), des amorces de séquençage et une extrémité biotinylée. L'hybridation entraîne donc une circularisation des fragments cibles et l'incorporation du motif central dans les fragments.

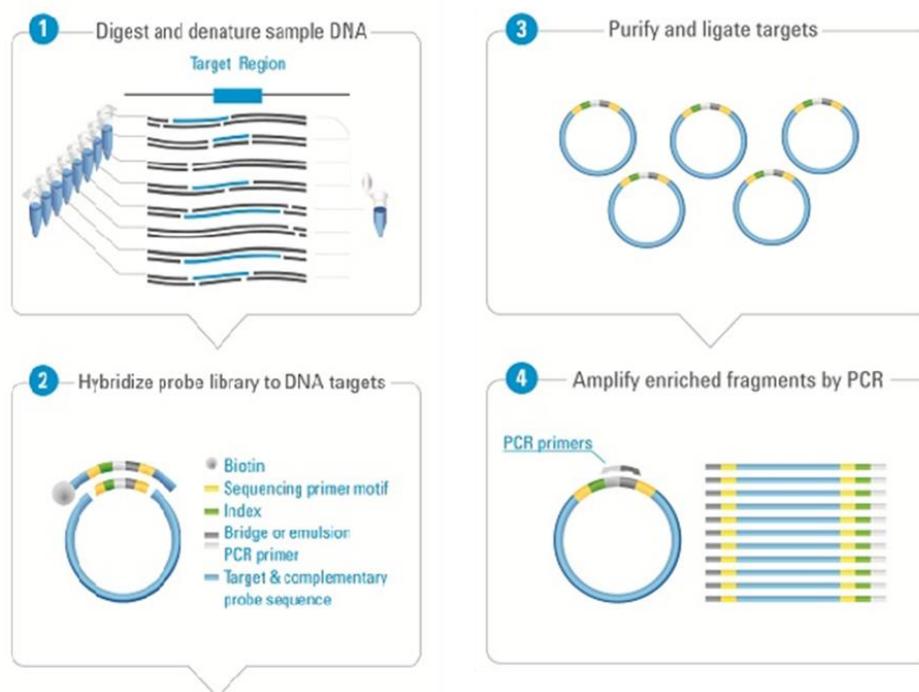


Figure 16: Préparation de la librairie d'ADN par Haloplex

(<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3061>)

Les ADN hybridés contenant de la biotine sont capturés sur des billes aimantés de streptavidine. Une ADN ligase est ajoutée afin d'obtenir une circularisation parfaite. Les ADN cibles sont ensuite éluées par l'action de la soude et sont amplifiées par PCR à partir du primer universel.

Après purification, les produits de PCR sont quantifiés sur TapeStation (Agilent). Le dosage consiste en la migration des produits de PCR mélangés avec un tampon fluorescent (SYBR GREEN). Les amplifications sont normalisées à 1000pg/microl puis multiplexées de façon équimolaire. Une analyse quantitative et qualitative de la librairie est effectuée sur Bioanalyseur (Agilent) par électrophorèse.

b) Mode opératoire

Réactif	Volume par tube réactionnel (µl)
RE buffer/BSA	4
Enzymes Strip1	0,5
Enzymes Strip2	0,5
ADN (5ng/µl)	5
Volume Total	10

Tableau 13: Mélange réactionnel pour la digestion de l'ADN

Réactif	Volume par réaction (µl)
Solution d'hybridation	50
Sondes Haloplex	20
Master Mix	70
Indexing primer	10
ADN digéré	10
Volume Final	160

Tableau 14: Mélange réactionnel pour l'hybridation de l'ADN

Étapes	Température	Durée
Dénaturation	95°C	10 minutes
Hybridation	54°C	3h si <20 000 sondes – 16h si >20 000 sondes

Tableau 15 : Programme d'hybridation de l'ADN

Réactifs	Volume par tube réactionnel (µl)
5X Herculase II reaction buffer	10
dNTP 25mM	0,4
Haloplex Primer1 (25µM)	1
Haloplex Primer2 (25µM)	1
Acide Acétique 2 M	0,5
Herculase II Fusion DNA poly	1
H2O	16,1
ADN capturé	20
Volume Total	50

Tableau 16 : Mélange réactionnel pour la réaction de séquence

Étapes	Température	Durée	cycle
Dénaturation initiale	98°C	2min	1 cycle
Dénaturation	98°C	30 secondes	} 19 cycles
Hybridation des amorces	60°	30secondes	
Elongation	72°	1 min	
Elongation finale	72°	10 min	1 cycle
	8°	xxxx	

Tableau 17 : Conditions réactionnelles pour la réaction de séquence

B. Amplification clonale par technologie Illumina

L'objectif de cette étape est la génération de clusters de séquences d'ADN sur des séquenceurs de paillasse MiSeq™/ NextSeq™ (Illumina). L'amplification clonale est réalisée par une « *bridge PCR* ». Elle commence par la fixation aléatoire des fragments d'ADN à une lame de verre appelée *flowcell* recouverte de deux types d'oligos complémentaires aux adaptateurs des fragments d'ADN P5 et P7. Il y a synthèse d'une séquence complémentaire fixée à la *flowcell* puis une étape de dénaturation et de lavage éliminent le brin original.

L'extrémité libre de chaque brin néosynthétisé est complémentaire à l'autre oligonucléotide de la surface de la *flowcell* et peut s'hybrider à celui-ci. Le brin se recourbe et forme donc un « pont » d'où le terme de « *bridge PCR* ». La polymérase synthétise un second brin d'ADN formant un pont d'ADN double brin qui sera dénaturé pour donner deux copies d'ADN simple brin. Les extrémités libres de chaque brin peuvent s'hybrider à un autre primer de la *flowcell*, les cycles d'élongation et de dénaturation se répètent de façon simultanée. L'amplification a ainsi lieu de proche en proche jusqu'à former des groupements de séquences identiques ou « clusters ».

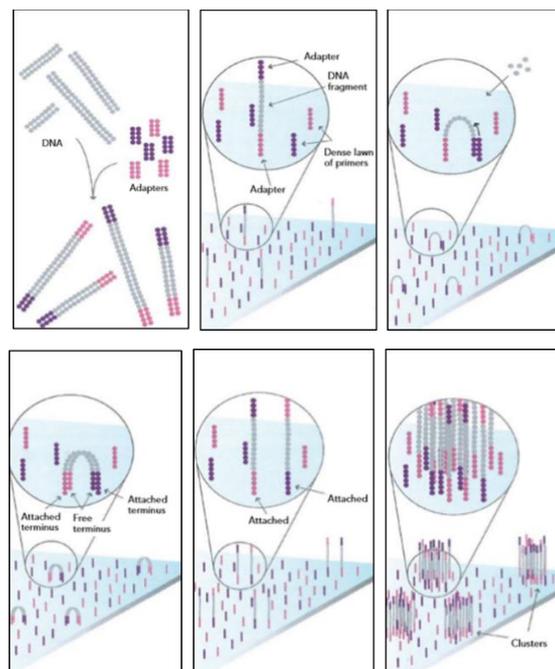


Figure 17: principe de la « bridge PCR » appliqué à la technologie Illumina
 (https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf)

C. Séquençage

La réaction de séquençage a lieu sur le même support (*flowcell*). La spécificité du séquençage Illumina réside dans le choix d'une technologie par terminaison réversible de l'élongation. Les déoxynucléotides modifiés (terminateurs de chaînes) sont marqués par un fluorophore spécifique à chaque base.

Pour s'assurer que chaque cluster ne sera séquençé que dans une direction et pour permettre une meilleure hybridation des primers de séquençage, les fragments liés aux sites P7 sont clivés et éliminés, ne laissant que les brins *forward*. Un fragment bloquant les sites P7 et l'extrémité libre de chaque brin est ajouté pour éviter leur hybridation.

Le premier cycle commence par l'ajout des 4 déoxynucléotides, mais seulement un dNTP est incorporé selon la séquence de la matrice. Les dNTP non fixés sont éliminés et les clusters sont excités par une source lumineuse permettant l'émission d'un signal caractéristique. Pour un cluster donné, les brins identiques sont lus simultanément. Après la lecture, le groupement chimique terminateur et le marquage fluorescent sont hydrolysés pour permettre le cycle suivant. Le nombre de cycle détermine la longueur des *reads* (150 pb), la longueur d'onde émise et l'intensité du signal détermine le « *base call* ».

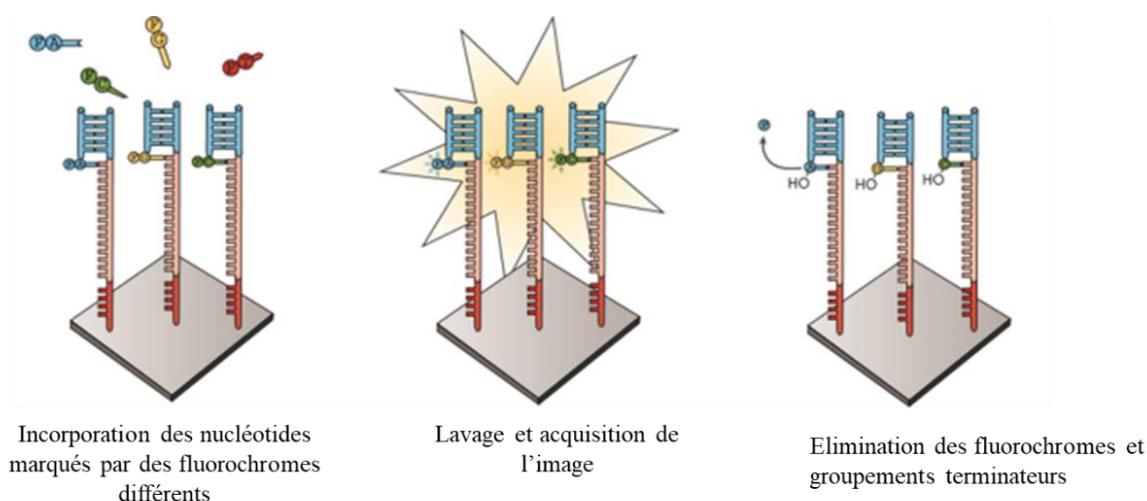


Figure 18: Principe du séquençage Illumina

d'après Goodwin et al., 2016 (38)

Après le séquençage du *read*, celui-ci est éliminé et un primer d'index est hybridé, permettant de séquencer le *barcode* de chaque cluster.

Ensuite, l'extrémité 3' de la séquence est déprotéinée et peut se rabattre sur l'adaptateur voisin P7. Une nouvelle amplification est alors possible pour obtenir le brin *reverse*. Les brins matrice fixés en P5 sont éliminés et les clusters fixés en P7 sont séquencés de façon identique.

(Séquençage *paire-end*)

L'avantage de cette technologie est l'incorporation et la détection séquentielle des bases, évitant les erreurs de séquençage sur les homopolymères.

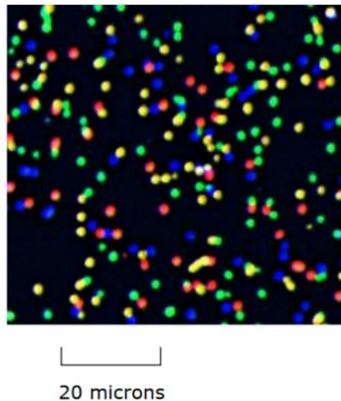


Figure 19 : Image de la *flowcell* au cours du séquençage

d'après Bentley et al 2008 (39)

VII. Panels de gènes analysés sur séquenceurs Illumina

Le kit utilisé pour le panel 18 gènes comporte les gènes précédemment testés dans le panel 12 gènes ainsi que 8 gènes impliqués dans d'autres pathologies ophtalmiques (tableau18):

- *ABCA4* : maladie de Stargardt
- *BEST1* : maladie de Best
- *ELOVL4* : dystrophie maculaire
- *PROM1* : rétinite pigmentaire récessive et dystrophie maculaire dominante
- *IMPG1* : dystrophie maculaire vitelliforme dominante
- *IMPG2* : rétinite pigmentaire récessive et dystrophie maculaire vitelliforme dominante

Le panel 150 gènes comportent les gènes du panel 18 gènes et les gènes les plus fréquemment retrouvés dans les dystrophies rétiniennes (tableau 18).

gène	NM_	exon	gène	NM_	exon	gène	NM_	exon
ABCA4	000350,2	50	GPR98	032119,3	90	PROM1	006017,2	27
ADAM9	003816,2	22	GRK1	002939,2	7	PRPF3	004698,2	16
AIPL1	014336,3	6	GRM6	000843,3	10	PRPF31	015629,3	14
ARL2BP	012106,3	6	GUCA1A	000409,3	6	PRPF4	004697,3	14
ARL6	032146,4	9	GUCA1B	002098,5	4	PRPF6	012469,3	21
BBS1	024649,4	17	GUCA2A	033553,2	3	PRPF8	006445,3	43
BBS12	001178007,1	3	GUCY2D	000180,3	20	PRPH2	000322,4	3
BBS7	176824,2	19	HK1	000188,2	18	RAB28	001017979,2	7
BEST1	004183,3	10	IDH3B	006899,3	12	RAX2	032753,3	3
C12orf65	001145199,1	6	IMPDH1	000883,3	17	RB1	000321,2	27
C1QTNF5	015645,4	15	IMPG1	001563,2	17	RBP3	002900,2	4
C21orf2	004928,2	7	IMPG2	016247,3	19	RBP4	006744,3	6
C2orf71	001029883,2	2	IQCB1	001023570,2	15	RD3	183059,2	3
C2orf86	015910,5	18	ITM2B	021999,4	6	RDH12	152443,2	9
C8orf37	025000,3	14	KCNJ13	002242,4	3	RDH5	001199771,1	5
CA4	000717,3	8	KCNV2	133497,3	2	RGR	002921,3	7
CABP4	145200,3	6	KIAA1549	001164665,1	20	RGS9	003835,3	19
CACNA1F	005183,3	48	KLHL7	001031710,2	11	RGS9BP	207391,2	1
CACNA2D4	172364,4	38	LCA5	181714,3	9	RHO	000539,3	5
CAPN5	004055,4	13	LRAT	004744,3	3	RIMS1	014989,5	34
CDH23	022124,5	70	LRIT3	198506,4	4	RLBP1	000326,4	9
CDH3	001793,4	16	LRP5	002335,3	23	ROM1	000327,3	3
CDHR1	033100,3	17	MAK	001242957,1	15	RP1	006269,1	4
CERKL	001030311,2	14	MERTK	006343,2	19	RP1L1	178857,5	4
CHM	000390,2	15	MFRP	031433,3	15	RP2	006915,2	5
CLRN1	001195794,1	4	MVK	000431,2	11	RP9	203288,1	6
CNGA1	001142564,1	10	MYO7A	000260,3	49	RPE65	000329,2	14
CNGA3	001298,2	8	NDP	000266,3	3	RPGR	000328,2	19
CNGB1	001297,4	33	NEK2	002497,3	8	RPGRIP1	020366,3	24
CNGB3	019098,4	18	NMNAT1	022787,3	5	RS1	000330,3	6
CNNM4	020184,3	7	NR2E3	014249,2	8	SAG	000541,4	16
CRB1	201253,2	12	NRL	006177,3	3	SEMA4	022367,3	15
CRX	000554,4	4	NYX	022567,2	2	SLC24A1	004727,2	10
CYP4V2	207352,3	11	OAT	000274,3	10	SLC7A14	020949,2	8
DFNB31	015404,3	12	OFD1	003611,2	23	SNRNP200	014014,4	45
DHDDS	205861,2	9	OPN1LW	020061,5	6	SPATA7	018418,4	12
DHX38	014003,3	27	OPN1MW	000513,2	6	TEAD1	021961,5	13
DMD	004011,3	51	OPN1SW	001708,2	5	TMEM67	153704,5	28
EFEMP1	001039348,2	12	OTX2	021728,3	5	TOPORS	005802,4	3
ELOVL4	022726,3	6	PCDH15	001142763,1	35	TRIM32	012210,3	2
EMC1	015047,2	23	PDE6A	000440,2	22	TRPM1	001252020,1	27
EYS	001142800,1	43	PDE6B	000283,3	22	TSPAN12	01238,3	8
FAM161A	001201543,1	7	PDE6C	006204,3	22	TTC8	144596,3	16
FLVCR1	014053,3	10	PDE6G	002602,3	4	TTLL5	015072,4	32
FSCN2	001077182,2	5	PDE6H	006205,2	4	TULP1	003322,4	15
FZD4	012193,3	2	PDZD7	001195263,1	17	UNC119	005148,3	5
GNAT1	144499,2	9	PGK1	000291,3	11	USH1C	153676,3	27
GNAT2	005272,3	8	PITPNM3	031220,3	20	USH2A	206933,2	72
GPR125	145290,2	19	PLA2G5	000929,2	5	VCAN	004385,4	15
GPR179	001004334,3	11	PRCD	001077620,2	5	ZNF513	144631,5	4

Tableau 18: Liste des gènes du panel 150 gènes, sur fond gris gènes du panel 18 gènes.

VIII. Analyse bio-informatique des données de séquençage

Les reads ou lecture générés par les séquenceurs (fichiers *fastq*) sont analysés par 2 logiciels afin de générer un fichier de variants ou « vcf » (*Variant Calling Files*) : SeqNext et Torrent Browser pour PGM™ ou MiSeqReporter pour les séquenceurs Illumina.

Les VCF obtenus sont confrontés et compilés par un programme mis en place au sein du Centre de Biologie Pathologie de Lille, la *Diagnostic Variant Database*. Ce logiciel synthétise l'ensemble des données et permet le report des annotations concernant les variants déjà rencontrés. Les paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des données :

- la couverture : zone couverte par au moins une lecture, exprimée en%
- la profondeur : nombre de lecture de chaque base
- le pourcentage de recouvrement auquel le variant a été retrouvé (nombre de reads avec le variant par rapport au nombre de reads total, il est en théorie de 50% pour un variant hétérozygote)

La technologie Ion Torrent génère des artefacts au niveau des homopolymères qu'il est nécessaire de contrôler visuellement car dans les régions répétées, plusieurs nucléotides identiques sont incorporés au cours du séquençage, conduisant à une variation du pH plus importante. Cependant la détection de cette variation est moins précise que pour l'incorporation d'un unique nucléotide et les séquences d'homopolymères plus longues constituent donc une difficulté pour le séquençage.

La pertinence clinique des variants a été évaluée en fonction de la pathogénicité prédite par les logiciels Polyphen-2, Align Grantham Variation and Grantham Deviation (a-GVGD), Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), la fréquence du variant dans la population (*ExAC*), la description dans la base de donnée *HGMD* et la comparaison à notre base de données locales.

Les variants d'intérêt sont rares avec une fréquence allélique inférieure à 1%.

L'analyse des CNV a été réalisée sur les panels 18 gènes et 150 gènes en calculant un ratio de couverture d'exon de chaque patient sur le ratio moyen de couverture de l'exon de l'ensemble des patients séquencés sur le run.

RESULTATS

I. Données obtenues par Sanger

Nous avons séquencé par méthode Sanger les exons de 10 gènes d'ADRP chez 337 patients. 240 d'entre eux ont été recrutés dans le cadre d'un projet hospitalier de recherche clinique national (PHRC) (2009-2012) qui portait sur des familles atteintes d'une forme autosomique dominante clairement établie sur le plan clinique (2 à 3 générations atteintes). Nous avons détecté 124 variants chez 122 patients et nous n'avons détecté aucun variant chez 215 patients. Parmi les 124 variants, 120 ont été classés causaux et responsables de la rétinite pigmentaire, 3 variants ont été classés de « signification indéterminée » et 1 variant a été classé « probablement bénin » aboutissant à un diagnostic moléculaire chez 119 patients (35,3%). Les patients sont présentés dans le tableau 20 et les variants sont détaillés dans le tableau de synthèse.

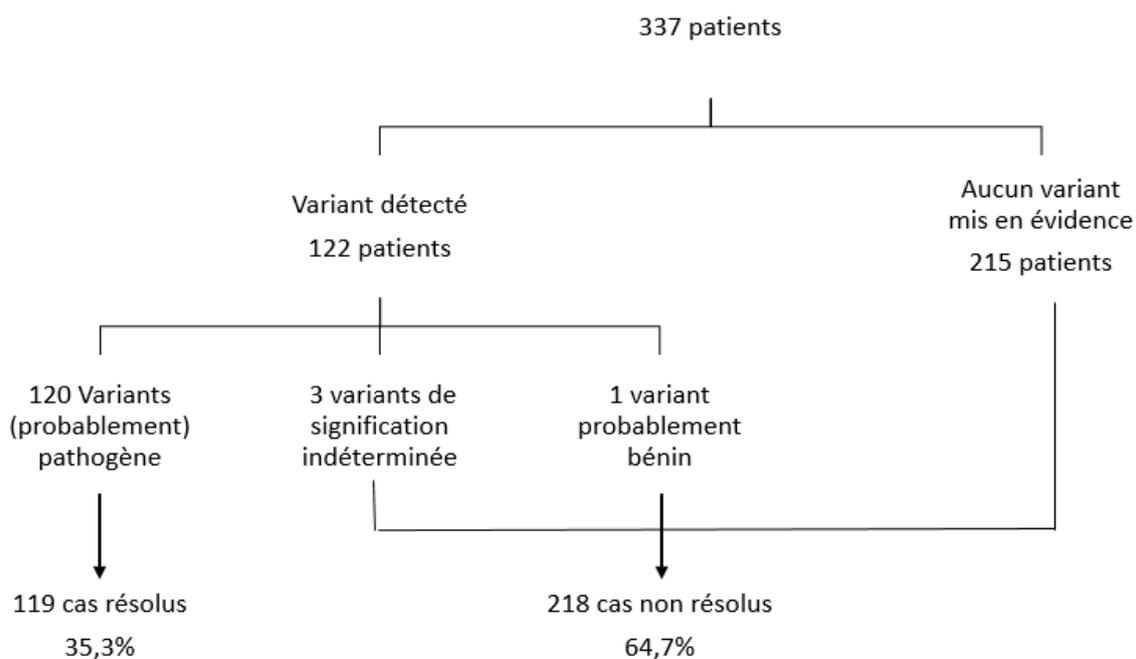


Figure 20 : Résultats obtenus par la technique Sanger

Parmi les patients pour lesquels aucun variant n'a été mis en évidence, 7 ont par la suite été testés par le panel 12 gènes et 5 sur le panel de 150 gènes.

Les gènes les plus fréquemment identifiés sont *RHO* (13,1%), *PRPH2* (5,4%) et *RPI* (5,4%) couvrant près de 24% des patients (figure 21). Les variants les plus fréquents sont la c.403C>T, p.Arg135Trp de *RHO* (7 patients), c.166G>A, p.Gly56Arg de *NR2E3* (6 patients), c.829-4 C>G de *PRPH2* (4 patients).

Au total, ce sont 86 variants différents qui ont été identifiés, parmi lesquels 32 n'ont jamais été décrits dans la littérature.

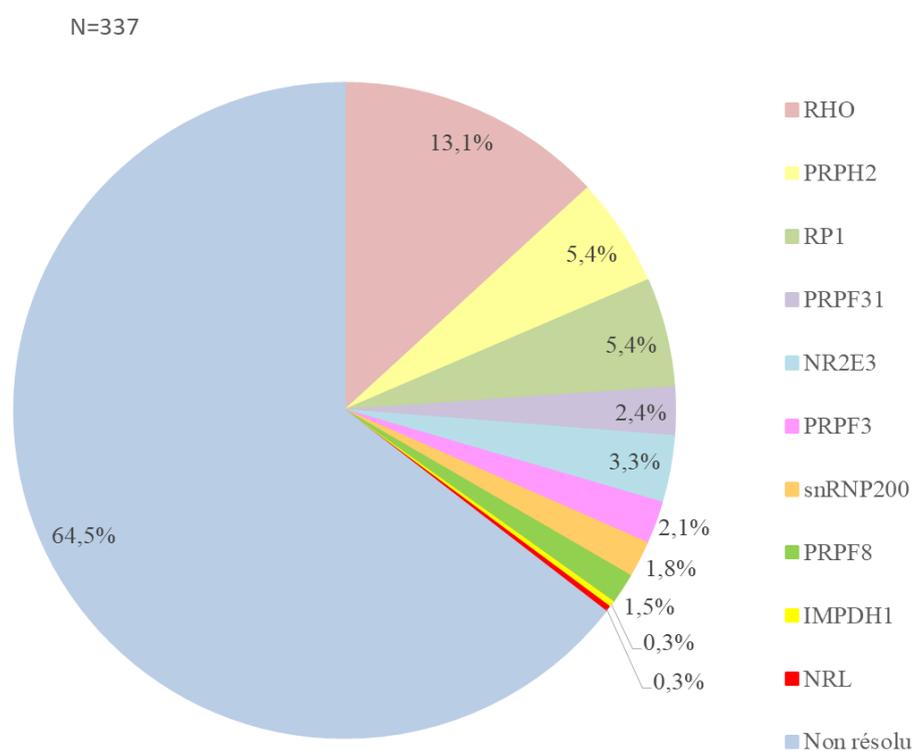


Figure 21: Prévalence des gènes identifiés dans l'ADRP par la technique Sanger

La majorité des patients n'était porteur que d'un seul variant à l'état hétérozygote à l'exception des cas suivants :

- variant c.340G>A, p.Gly114Ser du gène *RHO*

Le variant a été détecté à l'état homozygote chez le patient ADRP599. L'étude de

ségrégation n'a pas été réalisée, cependant l'histoire familiale semble évoquer une rétinite pigmentaire de forme sporadique. Ce variant n'a jamais été décrit dans la littérature, ni recensé dans la base ExAC, mais il a été considéré comme causal et impliqué dans la pathologie d'après les logiciels de prédiction.

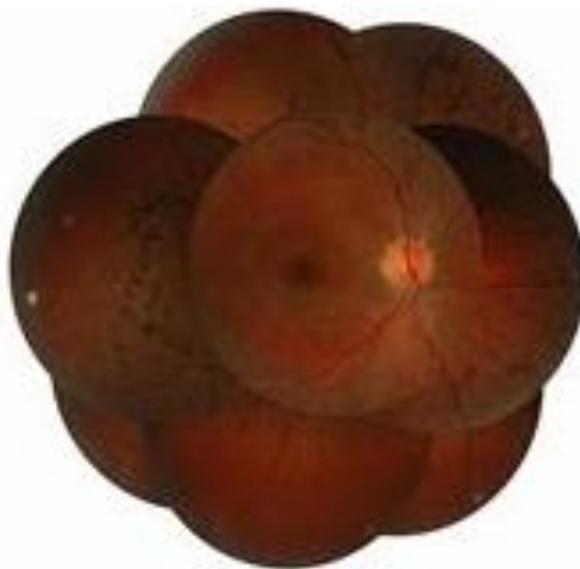


Figure 22 : Fond d'œil d'un patient homozygote pour le variant p.Gly114Ser de *RHO*

- **variant c.[164 A>G ; 251T>C], p.[(Asn55Ser ; Leu84Pro)] du gène *RHO***

L'allèle complexe c. [164 A>G ; 251T>C], p.[(Asn55Ser ; Leu84Pro)] a été identifié chez le patient ADRP097-01. Les deux variants ne sont pas connus des bases de données mais chacun est prédit probablement délétère par les logiciels de prédiction. Le caractère causal a finalement été établi après l'étude familiale qui a confirmé que les deux variations formaient un allèle complexe et que chaque membre de la famille porteur de l'allèle était atteint de rétinite pigmentaire.

-**variants c.1477C>T, p.Pro493Ser et c.1481 C>T, p.Thr494Met du gène *PRPF3***

Le patient ADRP068-01 est porteur de ces deux variants, cependant l'étude de ségrégation n'a

pas été réalisée et il n'est donc pas possible de savoir s'il s'agit d'un allèle complexe ou de deux mutations sur des allèles distincts. Ces deux variations ont été décrites par Chakarova *et al* en 2002 et sont prédites comme délétères par les logiciels de prédiction. Elles ont donc été incriminées dans la pathologie du patient.

-variants c.1477C>T, p.Pro493Ser du gène *PRPF3* et c.98T>C, p.Ile33Thr du gène *PRPH2*

Ces deux variants ont été identifiés chez le patient ADRP120-01. Le variant c.1477C>T de *PRPF3* a été décrit dans le paragraphe précédent. Le variant c.98T>C, p.Ile33Thr du gène *PRPH2/RDS* n'a jamais été décrit dans la littérature, il affecte un nucléotide et un acide aminé peu conservé mais l'écart physico-chimique est important entre l'Isoleucine et la Thréonine. Les logiciels de prédiction ne s'accordent pas non plus sur sa pathogénicité. L'étude familiale a montré que la sœur du patient, asymptomatique, n'était porteuse que du variant c.98T>C, p.Ile33Thr du gène *PRPH2/RDS*, nous avons donc classé ce variant comme probablement bénin et avons conclu que le variant c.1477C>T, p.Pro493Ser du gène *PRPF3* était responsable de la pathologie.

Tableau 19 : Résultats obtenus par séquençage Sanger

Patient	Gène	Variant (ADNe)	Variant (protéine)	Référence	Ségrégation familiale	Commentaire
ADRP023-01	PRPH2	c.-11A>C	p.?	décrit ClinVAR	Oui	Classé probablement bénin
ADRP143-01	PRPH2	c.136C>T	Arg46*	Meins et al.,1993	un apparenté asymptotique porteur	
ADRP208-01	PRPH2	c.136C>T	Arg46*	Meins et al.,1993	N.R.	
ADRP126-01	PRPH2	c.205delG	Val69Cysfs*30	Manes et al.,2015	Oui	
ADRP209-01	PRPH2	c.377T>C	Leu126Pro	Renner et al., 2009	N.R.	
ADRP218-01	PRPH2	c.494G>A	Cys165Tyr	Souied et al., 1995	N.R.	
ADRP245-01	PRPH2	c.494G>A	Cys165Tyr	Souied et al., 1995	Oui	
ADRP156-01	PRPH2	c.535T>C	Trp179Arg	Bareil et al.,2000	N.R.	
ADRP233-01	PRPH2	c.535T>C	Trp179Arg	Bareil et al.,2000	Oui	
ADRP003-01	PRPH2	c.582T>A	Asp194Glu	Manes et al.,2015	Oui	
ADRP204-01	PRPH2	c.594C>G	Ser198Arg	Sullivan et al., 2006	N.R.	
ADRP243-01	PRPH2	c.631T>C	Phe211Leu	Manes et al.,2015	Oui	
ADRP150-01	PRPH2	c.738G>C	Trp246Cys	Manes et al.,2015	cousin atteint non porteur	
ADRP069-01	PRPH2	c.761T>A	Leu254Gln	Manes et al.,2015	Oui	
ADRP057-01	PRPH2	c.761T>A	Leu254Gln	Manes et al.,2015	fils asymptotique porteur	
ADRP084-01	PRPH2	c.829-4C>G		Manes et al.,2015	Oui	
ADRP197-01	PRPH2	c.829-4C>G		Manes et al.,2015	N.R.	
ADRP276-01	PRPH2	c.829-4C>G		Manes et al.,2015	Oui	
ADRP011-01	PRPH2	c.829-4C>G		Manes et al.,2015	Oui	
ADRP 613	RHO	c.31G>A	Val11Met	non décrit	N.R.	
ADRP059-01	RHO	c.44A>G	Asn15Ser	Kranich 1993	Oui	
ADRP275-01	RHO	c.49A>G	Thr17Ala	non décrit	N.R.	
ADRP102-01	RHO	c.50C>T	Thr17Met	Sheffield et al., 1991	Oui	

ADRP224-01	RHO	c.53G>A	Gly18Asp	non décrit	Oui	
ADRP129-01	RHO	c.82C>G	Gln28Glu	non décrit	N.R.	
ADRP148-01	RHO	c.140T>C	Leu47Pro	non décrit	oui	
ADRP081-01	RHO	c.158C>G	Pro53Arg	Ingleheam et al., 1992	Oui	
ADRP106-01	RHO	c.173C>G	Thr58Arg	Dryja et al., 1990	N.R.	
ADRP154-01	RHO	c.185C>A	Thr62Asn	non décrit	Oui	
ADRP097-01	RHO	c.[164 A>G;251T>C]	Asn55Ser ;Leu84Pro	non décrit / non décrit	Oui	Allèle complexe non décrit
ADRP121-01	RHO	c.263T>C	Leu88Pro	Audo et al., 2010	N.R.	
ADRP094-01	RHO	c.289A>C	Thr97Pro	non décrit	N.R.	
ADRP184-01	RHO	c.316G>A	Gly106Arg	Ingleheam et al., 1992	N.R.	
ADRP599	RHO	c.340 G>A	Gly114Ser	non décrit	N.R.	homozygote
ADRP252-01	RHO	c.380C>T	Ser127Phe	Souied et al., 1994	Oui	
ADRP605	RHO	c.380C>T	Ser127Phe	Souied et al., 1994	Oui	
ADRP244-01	RHO	c.380C>T	Ser127Phe	Souied et al., 1994	Oui	
ADRP105-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
ADRP147-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
ADRP152-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
ADRP172-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
ADRP235-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	N.R.	
ADRP100-01	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	N.R.	
ADRP436	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
ADRP183-01	RHO	c.404G>C	Arg135Pro	Gal et al., 1997	N.R.	
ADRP141-01	RHO	c.497C>A	Ala166Asp	non décrit	Oui	
ADRP228-01	RHO	c.501C>G	Cys167Trp	Briscoe et al., 2004	N.R.	
ADRP099-01	RHO	c.501C>G	Cys167Trp	Briscoe et al., 2004	Oui	

ADRP282-01	RHO	c.541G>A	Glu181Lys	Dryja et al., 1991	N.R.	
ADRP592	RHO	c.545G>T	Gly182Val	Sheffield et al. 1991	N.R.	
ADRP272-01	RHO	c.545G>T	Gly182Val	Yang et al., 2014	N.R.	
ADRP219-01	RHO	c.562G>A	Gly188Arg	Dryja et al., 1991	Oui	
ADRP058-01	RHO	c.568G>T	Asp190Tyr	al-Maghtheh et al., 1993	Oui	
ADRP371	RHO	c.616_624del	Tyr206_Phe208del	Maubaret et al., 2012	N.R.	
ADRP369	RHO	c.616_624del	Tyr206_Phe208del	Maubaret et al., 2012	Oui	
ADRP065-01	RHO	c.647T>G	Met216Arg	Haim et al, 1996	Oui	
ADRP153-01	RHO	c.800C>G	Pro267Arg	Souied et al., 1994	Oui	
ADRP101-01	RHO	c.886A>G	Lys296Glu	Keen et al., 1991	N.R.	
ADRP125-01	RHO	c.1033G>A	Val345Met	Dryja et al., 1991	Oui	
ADRP072-01	RHO	c.1039C>T	Pro347Ser	Dryja et al., 1990	Oui	
ADRP200-01	RHO	c.1040C>T	Pro347Leu	Dryja et al., 1990	N.R.	
ADRP524	RHO	c.1040C>T	Pro347Leu	Dryja et al., 1990	N.R.	
ADRP207-01	RHO	c.1040C>T	Pro347Leu	Dryja et al., 1990	N.R.	
ADRP017-01	PRPF3	c.1465G>C	Ala489Pro	Gamundi et al., 2008	N.R.	
ADRP068-01	PRPF3	c.1477C>T	Pro493Ser	Chakarova et al., 2002	N.R.	
	PRPF3	c.1481C>T	Thr494Met	Chakarova et al., 2002	N.R.	
ADRP120-01	PRPF3	c.1477C>T	Pro493Ser	Chakarova et al., 2002	confirme la pathogénicité de PRPF3 : sœur asymptomatique porteuse uniquement du variant PRPH2	Classé VSI
	PRPH2	c.98T>C	Ile33Thr	non décrit		
ADRP107-01	PRPF3	c.1504G>C	Ala502Pro	non décrit	Oui	
ADRP124-01	PRPF3	c.1481C>T	Thr494Met	Chakarova et al., 2002	N.R.	
ADRP131-01	PRPF3	c.1465G>C	Ala489Pro	Gamundi et al., 2008	Oui	
ADRP264-01	PRPF3	c.1465G>C	Ala489Pro	Gamundi et al., 2008	N.R.	
ADRP486	RP1	c.2005G>A	Ala669Thr	Khaliq et al., 2005	Oui	

ADRP135-01	RP1	c.2018del	Lys673Argfs*9	non décrit	Oui	
ADRP018-01	RP1	c.2035C>T	Gln679*	Sullivan et al., 1999	N.R.	
ADRP116-01	RP1	c.2035C>T	Gln679*	Sullivan et al., 1999	Oui	
ADRP144-01	RP1	c.2065C>T	Gln689*	Audo et al., 2012	N.R.	
ADRP194-01	RP1	c.2065C>T	Gln689*	Audo et al., 2012	N.R.	
ADRP020-01	RP1	c.2169delA	Ile725tyrfs*13	non décrit	Oui	
ADRP212-01	RP1	c.2169delA	Ile725Tyrfs*13	non décrit	N.R.	
ADRP027-01	RP1	c.2243del	Asn748Ilefs*15	Lafont et al., 2011	Oui non concluant car manque de renseignement clinique	
ADRP283-01	RP1	c.2243del	Asn748Ilefs*15	Lafont et al., 2011	N.R.	
ADRP180-01	RP1	c.2443G>T	Glu815*	non décrit	non concluant (absence de renseignement clinique)	
ADRP250-01	RP1	c.2560_2561del	Ser854Phefs*7	non décrit	un apparenté asymptotique porteur	
ADRP278-01	RP1	c.2613dup	Arg872Thrfs*2	Payne et al.,2000	N.R.	
ADRP594	RP1	c.2563_2564del	Leu855Serfs*6	non décrit	N.R.	
ADRP491	RP1	c.2585C>A	Ser862*	Lafont et al., 2011	N.R.	
ADRP115-01	RP1	c.2585C>A	Ser862*	Lafont et al., 2011	Oui	
ADRP249-01	RP1	c.2613dup	Arg872Thrfs*2	Payne et al.,2000	N.R.	
ADRP132-01	RP1	c.2732C>G	Ser911*	Lafont et al., 2011	Oui	
ADRP016-01	NRL	c.-11C>T	p.?	non décrit (0 mutation splicing décrit)	N.R.	
ADRP170-01	PRPF8	c.6901C>T	Pro2301Ser	Ziviello et al., 2005	Oui	
ADRP029-01	PRPF8	c.6926A>C	His2309Pro	McKie et al., 2001	non concluant (absence de renseignement clinique)	
ADRP269-01	PRPF8	c.6926A>G	His2309Arg	Walia et al., 2008	frère asymptotique porteur de la mutation	
ADRP050-01	PRPF8	c.6977dup	Tyr2326*	non décrit	Oui	
ADRP073-01	PRPF8	c.6928A>G	Arg2310Gly	McKie et al., 2001	Oui	
ADRP149-01	PRPF31	c.73G>T	Glu25*	non décrit	Oui	
ADRP254-01	PRPF31	c.168_172del	Asp56Glufs*5	non décrit	N.R.	

ADRP151-01	PRPF31	c.354C>G	Tyr118*	non décrit	1 apparenté asymptotique porteur	
ADRP261-01	PRPF31	c.524del	Gln175Argfs*23	non décrit	N.R.	
ADRP089	PRPF31	c.666_668del	Ile223del	non décrit	apparentés asymptotiques porteurs	Classé VSI
ADRP234-01	PRPF31	c.757G>T	Gly253trp	non décrit	N.R.	
ADRP570	PRPF31	c.1130 G>A	Arg377His	non décrit	N.R.	
ADRP098-01	PRPF31	c.1231C>T	Gln411*	non décrit	Oui	
ADRP598	PRPF31	c. -4C>G	p.?	non décrit	N.R.	Classé VSI
ADRP262-1	PRPF31	c.698-2A>G	IVS7-2A>G	non décrit	N.R.	
ADRP185-01	NR2E3	c.131C>T	Ser44Leu	Bernal S et al., 2008	N.R.	
ADRP095-01	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	1 apparenté asymptotique porteur	
ADRP155-02	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
ADRP046-01	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
ADRP176-01	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
ADRP201-01	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
ADRP215-01	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
ADRP111-01	NR2E3	c.166G>C	Gly56Arg	Xu et al, 2014	Oui	
ADRP113-01	NR2E3	c.166G>C	Gly56Arg	Xu et al, 2014	Oui	
ADRP232-01	NR2E3	c.205G>A	Gly69Ser	non décrit	N.R.	
ADRP615	NR2E3	ivs1-2A>C	p.?	Haider et al 2000 (Enhanced S cone syndrome)	Frère et mère asymptotiques porteurs de la mutation	
ADRP060-01	snRNP200	c.2041C>T	Arg681Cys	Banaglio et al., 2011	Oui	
ADRP216-01	snRNP200	c.2041C>T	Arg681Cys	Banaglio et al., 2011	Oui	
ADRP569	snRNP200	c.2041C>T	Arg681Cys	Banaglio et al., 2011	Parents asymptotiques non porteurs	
ADRP447	snRNP200	c.3260C>T	Ser1087Leu	Zhao et al 2009	N.R.	
ADRP239-01	snRNP200	c.3260C>T	Ser1087Leu	Zhao et al 2009	Oui	
ADRP096-01	snRNP200	c.2160+1G>A	p.?	non décrit	N.R.	

ADRP246-01	IMPDH1	c.945C>A	Asn315Lys	non décrit	Oui	
------------	--------	----------	-----------	------------	-----	--

N.R : ségrégation non réalisé

II. Données obtenues par PGM 12 gènes

Nous avons étudié 193 patients par séquençage haut débit sur l'automate PGM™ avec le panel de 12 gènes. Le taux de couverture était de 40X et les régions de couverture inférieure à 40 ont été contrôlées visuellement sur le logiciel Seq Pilot. Les exons 15 et 31 de *PRPF8*, les exons 1, 4 et 6 d'*IMPDH1* et la région ORF15 du gène *RPGR* ne sont pas couverts par notre stratégie et ne sont pas séquencés par Sanger.

Nous avons détecté au moins un variant d'intérêt chez 63 patients (32,6%) et nous n'avons identifié aucun variant chez 130 patients (67,4%).

Parmi les 65 variants identifiés, 59 ont été classés causaux, 2 de « signification indéterminée » et « probablement bénin » aboutissant au diagnostic moléculaire de rétinite pigmentaire chez 57 patients.

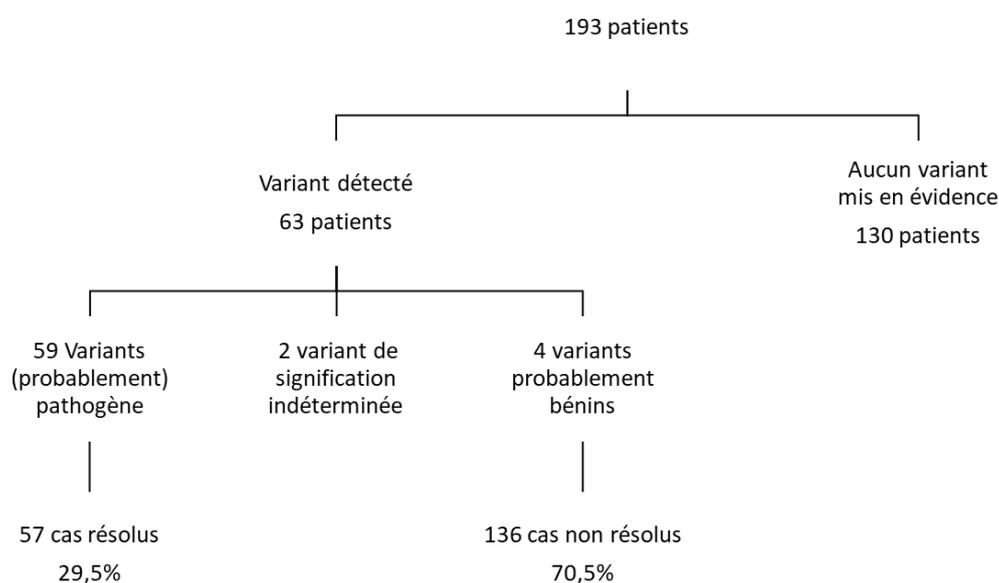


Figure 23: Résultats obtenus par la technique PGM

Au total, nous avons identifié 55 variants différents dont 36 non rapportés dans la littérature.

Les gènes les plus fréquemment identifiés parmi les 193 patients sont *RHO* (9,3%) *NR2E3*

(3,6%), *RPGR* (3,1%) et *RP1* (3,1%) (figure 23). Contrairement à la technique Sanger, nous n'avons identifié aucun variant dans les gènes *NRL* et *PRPF8* avec ce panel.

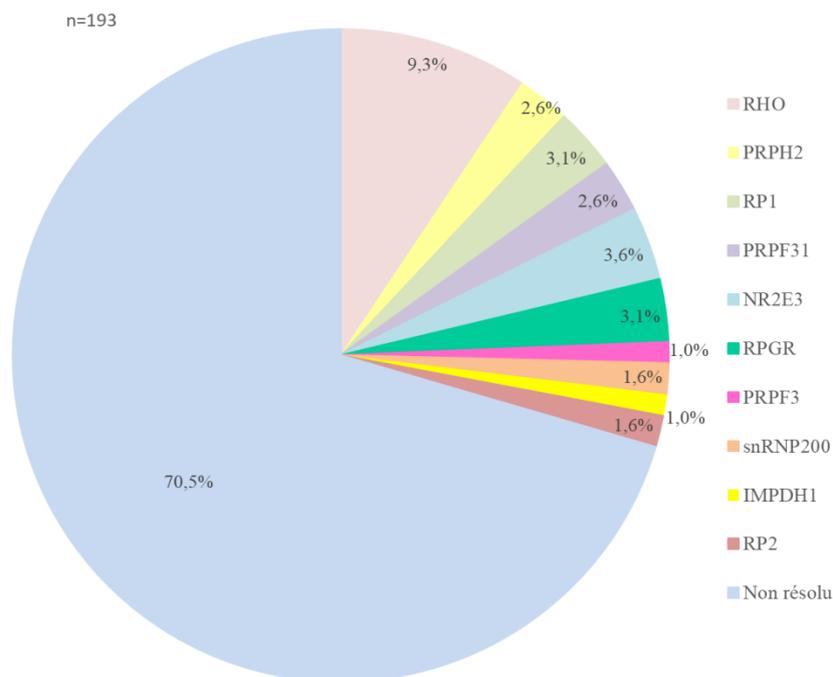


Figure 24: Prévalence des gènes identifiés dans l'ADRP par le panel 12 gènes

Parmi les patients négatifs, un patient (OPH363) s'est révélé porteur d'une mutation de l'ORF15 du gène *RPGR*, dans une région non couverte par notre technique. Une analyse de cette région avait été précédemment effectuée chez l'oncle maternel dans le laboratoire de l'hôpital des Quinze-Vingt à Paris et avait identifié le variant c.2731delG, p.Glu911Argfs*178. La mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. La présence de ce variant a par la suite été confirmée chez notre patient.

- **variants c.316G>A, p.Gly106Arg et c.439C>T, p.Arg147Cys du gène *RHO***

Ces deux variants ont été identifiés chez le patient OPH590 atteint d'une rétinite pigmentaire sporadique d'après l'histoire familiale. La ségrégation familiale n'a pas été réalisée et il n'est

donc pas possible de conclure à un allèle complexe ou à une forme de RP récessive comme cela a déjà été décrit. Néanmoins les deux variants sont prédits pathogènes par les logiciels et ont déjà été décrits dans la littérature. L'aspect au fond d'œil est évocateur d'une rétinite pigmentaire en secteur et oriente sur une mutation du gène *RHO*, confirmant ainsi notre diagnostic moléculaire.

- **variants c.659G>C, p.Arg220Pro de *PRPH2* à l'état hétérozygote et c.613G>A, p.Glu205Lys de *RP2* à l'état hémizygotte**

Ces deux variants ont été identifiés chez le patient OPH573, âgé de 43 ans pour lequel l'arbre généalogique est en faveur d'une transmission dominante et le phénotype plutôt évocateur d'une rétinite pigmentaire liée à l'X. Les deux variants ne sont pas décrits dans la littérature et sont considérés comme délétères par les logiciels de prédiction. Le codon Arg220 de *PRPH2* est également la cible de deux autres mutations connues p.Arg220Trp et p.Arg220Gln rapportés dans des cas de *pattern dystrophy*. La mère du patient, asymptomatique, est porteuse à l'état hétérozygote du variant *RP2*. Nous avons attribué la rétinite pigmentaire à *RP2* au vu du phénotype mais une révision du diagnostic serait possible avec l'examen clinique et l'analyse moléculaire d'autres apparentés.



Figure 25 : Fond d'œil du patient OPH573 porteur de variant p.Arg220Pro *PRPH2* et Glu205Lys *RP2*, présence d'ostéoblaste en extrême périphérie, fourni par le Dr Zanlonghi,

- **variant c.6370A>T, p.Ile2124Phe du gène *PRPF8***

Le variant c.6370A>T, p.Ile2124Phe de *PRPF8* (patient OPH924) est très conservé, l'écart physico-chimique peu important et les logiciels ne s'accordent pas (peu délétère d'après a-GVGD, probablement délétère d'après Polyphen2, Sift et Mutation Taster). Le variant a finalement été classé comme « variant de signification indéterminée » dans l'attente de la ségrégation familiale.

- **variant IVS4+6C>T de *IMPDH1***

Ce variant a été trouvé chez la patiente OPH322, atteinte d'une rétinite pigmentaire sporadique très évoluée avec une vision tubulaire et une cécité nocturne totale. Le variant a été classé comme « probablement bénin » car les logiciels ne s'accordent pas sur son impact et plusieurs apparentés asymptomatiques sont porteurs du variant.

Les autres hypothèses évoquées par les cliniciens sont une forme récessive ou une mutation de l'ADN mitochondrial. La recherche de mutations dans les gènes récessifs est en cours.



Figure 26 : Fond d'œil du patient OPH322 porteur du variant IVS4+ 6C>T de *IMPDH1*

- **variant c.727G>A, p.Val243Ile de *IMPDH1***

La patiente OPH27 est porteuse d'une rétinite pigmentaire périvasculaire diagnostiquée à l'âge de 52 ans avec un examen clinique évocateur d'une mutation du gène *NR2E3*. Le fond

d'œil montrait une rétine modérément atrophique, quelques pseudo-ostéoclastes en moyenne périphérie. Le fond d'œil en autofluorescence montrait une zone afluorescente autour de la papille et des gros vaisseaux réiniens, ailleurs une fluorescence quasi normale à l'exception de tâches hyperautofluorescentes de forme arrondie ; à l'OCT de l'œil droit, une rétine épaissie en nasal et à l'OCT des taches hyperautofluorescentes, la disparition de la ligne des photorécepteurs et de la limitante externe. Le séquençage n'a pas identifié d'anomalie dans le gène *NR2E3*, mais a mis en évidence une variation de signification inconnue c.727G>A, p.Val243Ile de *IMPDH1*. L'implication du variant est incertaine et seule une étude familiale nous permettrait de conclure.

- **variant IVS1-2A>C du gène NR2E3**

Le variant IVS1-2A>G du gène *NR2E3* a été rapporté dans la littérature dans des cas d'*Enhanced S cone Syndrom* et dans des rétinites pigmentaires récessives. L'étude fonctionnelle de Bernal *et al* en 2008 a montré l'apparition d'un transcrit alternatif dépourvu de l'exon 2 et générant un codon stop prématuré.

Ce variant a été identifié à l'état homozygote chez la patiente OPH780 dont l'examen clinique était évocateur d'une rétinite pigmentaire atypique ou d'*Enhanced S cone Syndrom*. Le mode de transmission semblait autosomique dominant (mère atteinte de rétinite pigmentaire). L'OCT périphérique montrait une zone atrophique avec un aspect de schisis et l'OCT maculaire une hypoplasie fovéolaire. L'angiographie montrait de larges plages d'autofluorescence supérieures. L'ERG photopique était moyennement altéré et scotopique très altéré avec aucune réponse individualisable par rapport au bruit de fond.

La variation a finalement été identifiée à l'état homozygote chez la mère, qui présentent une RP, et à l'état hétérozygote chez le père, asymptotique, les parents sont non apparentés mais issus de 2 villages proches.



Figure 27 : Fond d'œil du patient OPH780, porteuse du variant IVS1-2A>G de *NR2E3* à l'état homozygote

Une deuxième patiente âgée de 4 ans (OPH846) a été identifiée avec le même variant à l'état homozygote. Ses parents, cousins germains, étaient asymptomatiques et porteurs à l'état hétérozygote du variant. L'examen clinique évoquait une forme particulière de rétinite pigmentaire : le fond d'œil ne montrait pas de migration pigmentaire mais des tâches blanches rondes, l'examen en autofluorescence retrouvait des microtâches hyperautofluorescentes de disposition annulaire en moyenne périphérie. A l'OCT une couche nucléaire externe anormalement épaisse et préservée, à l'ERG des réponses uniformes aux stimulations photopiques et scotopiques suggérant la réponse d'un seul type de photorécepteurs.

A la reprise du dossier par les cliniciens et au vu des résultats moléculaires, le diagnostic d'*Enhanced S Cone Syndrom* a finalement été posé.

Tableau 20 : Résultats obtenus par le panel 12 gènes

Patient	Gène	Variant ADNc	Variant protéine	référence	ségrégation familiale	Commentaire
OPH274	PRPH2	c.397G>C	Gly133Arg	non décrit	N.R.	
OPH738	PRPH2	c.397G>A	Gly133Arg	non décrit	N.R.	
OPH416	PRPH2	c.514C>T	Arg172Trp	Wells et al., 1993	N.R.	
ADRP646	PRPH2	c.514C>T	Arg172Trp	Wells et al., 1993	Oui	
OPH573	PRPH2	c.659G>C	Arg220Pro	non décrit	mère hétérozygote <i>RP2</i> , non porteuse du variant <i>PRPH2</i>	
	RP2	c.613G>A	Glu205Lys	non décrit		hémizygote
ADRP621	PRPH2	c.901_902del	Ser301Argfs*90	non décrit	apparenté asymptomatiques porteurs	Classé causal, pénétrance incomplète
OPH168	RHO	c.44A>G	Asn15Ser	Kranich 1993	Oui	
OPH452	RHO	c.49A>G	Thr17Ala	non décrit	N.R.	
OPH831	RHO	c.50C>T	Thr17Met	Sheffield et al., 1991	incomplète	
OPH654	RHO	c.57_71del	Val20_Phe24del	non décrit	N.R.	
OPH183	RHO	c.311_316del	Val104_Phe105del	non décrit	N.R.	
OPH716	RHO	c.316G>A	Gly106Arg	Ingleheam et al., 1992	N.R.	
OPH590	RHO	c.[316G>A(:) 439C>T]	Gly106Arg(:)Arg147Cys	Ingleheam et al., 1992	N.R	Allèle complexe?
	RHO	c.[316G>A(:) 439C>T]	Gly106Arg(:)Arg147Cys	Carrigan et al., 2016		
OPH506	RHO	c.380C>T	Ser127Phe	Souied et al., 1994	Oui	
OPH175	RHO	c.392T>C	Leu131Pro	Fuchs et al., 1994	N.R.	
OPH187	RHO	c.403C>G	Arg135Gly	Bunge et al 1993	N.R.	
OPH180	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	N.R.	
OPH656	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	N.R.	
Y983	RHO	c.403C>T	Arg135Trp	Sung et al., 1991	Oui	
OPH503	RHO	c.404G>C	Arg135Pro	Gal et al., 1997	Oui	
OPH184	RHO	c.544G>C	Gly182Arg+/-	Sheffield et al. 1991	N.R.	
OPH167	RHO	c.568G>T	Asp190Tyr	al-Maghteh et al., 1993	N.R.	
OPH812	RHO	c.1034T>A	Val345Glu	non décrit	Oui	
OPH334	RHO	c.937-2A>G	IVS4-2A>G	non décrit	Oui	
OPH171	PRPF3	c.1427-3C>A	p.?	non décrit	apparenté asymptomatique porteur	Classé VSI

OPH179	PRPF3	c.1481C>T	Thr494Met	Chakarova et al., 2002	N.R.	
OPH525	PRPF3	c.1465G>C	Ala489Pro	non décrit	N.R.	Gamundi et el ont décrit la A489D c.1466C>T
OPH854	RP1	c.1186C>T	Arg396*	Bocquet et al 2013	N.R.	
OPH703	RP1	c.2029C>T	Arg677*	Pierce et al.,1999	Oui	
ADRP622	RP1	c.2029C>T	Arg677*	Pierce et al.,1999	N.R	
ADRP643	RP1	c.2399_2400del	Lys800Serfs*6	non décrit	Oui	
OPH649	RP1	c.2490del	Asp832Ilefs*16	non décrit	N.R.	
OPH520	RP1	c.3439C>T	Gln1147*	non décrit	N.R.	
OPH924	PRPF8	c.6370A>T	Ile2124Phe	non décrit	N.R.	Classé VSI
OPH281	PRPF31	c.330_333del	p.His111Serfs*86	non décrit	Oui	
OPH176	PRPF31	c.1205C>A	Ser402*	non décrit	Oui	
OPH323	PRPF31	c.1231C>T	Gln411*	non décrit	Oui	
OPH3	PRPF31	c.1462_1472del	p.Lys488Argfs*75	non décrit	N.R.	
OPH189	PRPF31	c.323-1G>A	p.?	non décrit	N.R.	
OPH256	PRPF31	c.259G>A	Ala87Thr	non décrit	apparentés asymptomatiques porteurs	Classé probablement bénin
OPH169	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
OPH185	NR2E3	c.166G>A	Gly56Arg	Coppieters et al., 2007	N.R.	
OPH244	NR2E3	c.170A>G	Lys57Arg	non décrit	N.R.	
OPH62	NR2E3	c.844G>A	Glu282Lys	non décrit	N.R.	
ADRP639	NR2E3	c.932G>A	Arg311Gln +/-	Haider et al 2000 dans sd de Goldman Gavre	Oui	homozygote
OPH780	NR2E3	ivs1-2A>C	p.?	Haider et al 2000 Enhanced S cone syndrome	Oui	homozygote
OPH846	NR2E3	ivs1-2A>C	p.?	Haider et al 2000 Enhanced S cone syndrome	Oui- consanguinité	homozygote
OPH382	snRNP200	c.2359G>A	Ala787Thr	Xu et al., 2014	Oui	
OPH710	snRNP200	c.2359G>A	Ala787Thr	Xu et al., 2014	Oui	sporadique
OPH177	snRNP200	c.2576C>G	Pro859Arg	non décrit	Oui	
OPH33	snRNP200	c.4165G>A	Val1389Ile	non décrit	?	Classé probablement bénin
OPH316	IMPDH1	c.1446del	p.Gly483Alafs*40	non décrit	Oui	
ADRP629	IMPDH1	c.1778C>T	Ser593Phe	non décrit	N.R.?	
OPH322	IMPDH1	IVS4+6 C>T	p.?	non décrit	apparentés asymptomatiques porteurs	Classé probablement bénin

OPH27	IMPDH1	c. 727 G>A	Val243Ile	non décrit	N.R.	Classé probablement bénin
OPH797	RP2	c.352C>T	Arg118Cys	Bader et al 2003	?	hémizygote
OPH234	RP2	c.448T>C	Trp150Arg	non décrit	Oui	hémizygote
OPH317	RPGR	c.1221_1231del +/-	Arg409Lysfs*40	non décrit	N.R.	hémizygote
OPH413	RPGR	c.1441_1442del +/-	Glu481Serfs*5	non décrit	Oui	
OPH634	RPGR	c.1441_1442del +/-	Glu481Serfs*5	non décrit	Oui	hémizygote
OPH383	RPGR	c.935-1G>T	IVS8-1G>T	non décrit	Oui	
OPH1	RPGR	c.2110A>T	Lys704*	non décrit	Oui	
OPH1159	RPGR	c.2233_2234delAG	p.ORF15+Glu161Argfs*23	Rozet et al, 2002	oui	hémizygote

N.R. : non réalisé

III. Données obtenues avec le panel 18 gènes

Le panel 18 gènes a été développé en début d'année 2017 et est utilisé pour le diagnostic de rétinite pigmentaire depuis mai. Nous avons étudié 95 patients avec ce panel sur le séquenceur NextSeq™. Les régions sont considérées non couvertes si la couverture est inférieure à 30X et sont séquencées par méthode Sanger. L'ORF15 du gène RPGR n'est pas couverte par cette stratégie.

Nous avons détecté au moins un variant chez 31 patients (32,6%) et nous n'avons identifié aucun variant chez 64 patients (67,3%). Parmi les 37 variants identifiés, 30 ont été classés causaux, 4 de « signification indéterminée » et 3 probablement bénins. Le diagnostic moléculaire a ainsi pu être établi chez 24 patients (25,2%). Contrairement aux précédentes méthodes, peu de ségrégation familiale ont été réalisées car les résultats moléculaires ont été analysés récemment.

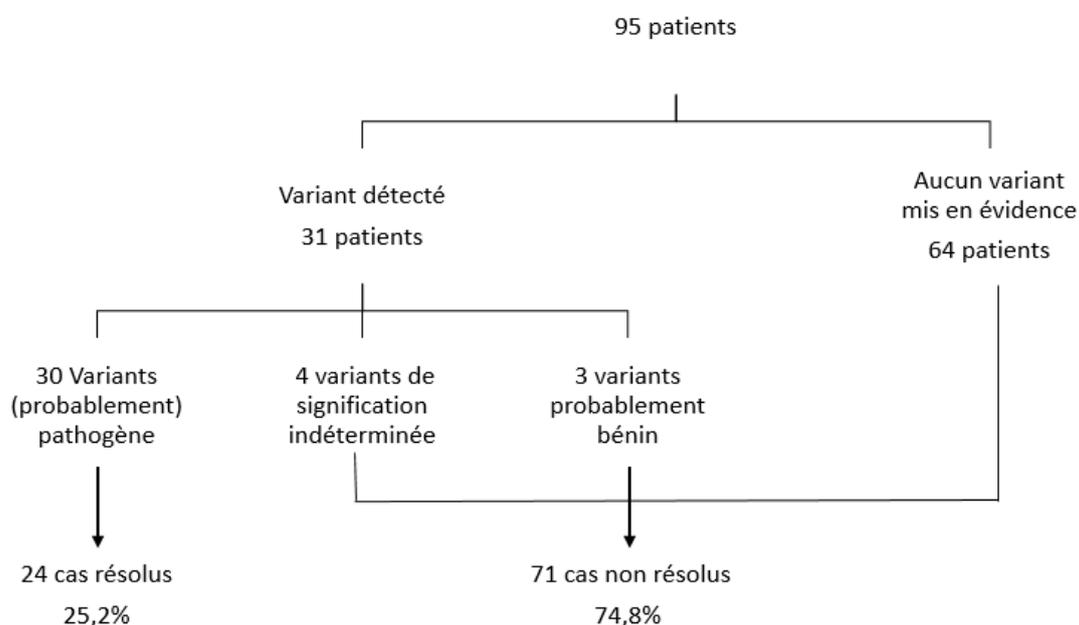


Figure 28: Résultats obtenus par le panel 18 gènes

Les gènes les plus fréquemment identifiés comme impliqués dans la rétinite pigmentaire dans

ce panel sont *PRPH2* (6,32%), *RHO* (4,21%) et de façon surprenante *ABCA4* (5,26%).

Les patients porteurs de variants causaux d'*ABCA4* seront considérés comme « non résolus », si l'étude familiale ne confirme pas la ségrégation bi-allélique qui validerait une rétinite pigmentaire récessive liée à *ABCA4*. On ne peut en effet éliminer une présence fortuite de plusieurs variants *ABCA4*, situés sur le même allèle, et sans lien avec le phénotype.

Aucun variant n'a été identifié dans les gènes *ELOVL4*, *IMPDH1*, *IMPG2*, *NRL* et *PRPF3*

- **Variant c.5603C>T, p.Asn1868Ile du gène ABCA4**

Ce variant était considéré comme probablement bénin et non impliqué dans la maladie de Stargardt du fait de sa très grande fréquence dans la population générale (ExAC : 6.7% en Europe). La publication récente de Zernant et al, en 2017, a montré que ce variant est plus fréquent chez les patients atteints de maladie de Stargardt que dans la population générale, qu'il est hypomorphe et est associé à des formes plus tardives de la maladie (40). Nous avons identifié ce variant chez deux patients :

- le patient OPH1215, porteur également du variant c.455G>A, p.Arg152Gln de *ABCA4*, dont la pathogénicité est douteuse

-le patient OPH1229 porteur aussi des variants c.2701A>G, p.Thr901Ala et c.5715-5T>C du gène *ABCA4*.

L'étude familiale permettra de vérifier si les variants ségrégent sur le même allèle.

- **Variant c.102+2T>G et c.102+5T>A de l'intron1 du gène RP2**

Ces deux variants ont été identifiés chez un patient atteint d'une rétinite pigmentaire liée à l'X. La c.102+2T>G entraîne une disparition du site donneur consensus d'épissage, son rôle délétère est donc certain alors que la c.102+5T>A n'est pas considéré comme délétère par les logiciels de prédiction.

- **Variant c.501C>G, p.Cys167Trp de *RHO* et c.344T>G, p.Leu115Arg de *PROM1***

Ces deux variants ont été identifiés chez la patiente OPH1265 et sont considérés comme pathogènes par les logiciels de prédiction. Le variant p.Cys167Trp a été décrit par Bricoes et al en 2004. La pathologie de la patiente a été attribuée à *RHO* plutôt qu'à *PROM1* car celui-ci est un gène causal dans les formes récessives de RP, bien qu'il puisse être aussi responsable de dystrophies maculaires dominantes.

Tableau 21: Résultats obtenus par le panel 18 gènes

Patient	Gène	variant (ADN)	variant (protéine)	Référence	Commentaire
OPH927	ABCA4	c.4633A>G	p.Ser1545Gly	non décrit	classé variant de signification indéterminée
OPH1099	ABCA4	c.2930C>T	p.Thr977Met	non décrit	
OPH1215	ABCA4	c.455G>A	p.Arg152Gln	Paloma et al., 2001	étude familiale pour voir si les 2 variants ségrégent sur le même allèle
		c.5603A>T	p.Asn1868Ile	Zernant et al., 2017	
OPH1229	ABCA4	c.2701A>G	p.Thr901Ala	Rivera et al. 2000	implication douteuse de la p.Thr901Ala dans la pathologie et c.5715-5T>C classé probablement bénin
		c.5715-5T>C	p.(?)	non décrit	
		c.5603A>T	p.Asn1868Ile	Zernant et al. 2017	
OPH1242	ABCA4	c.1654G>A	p.Val552Ile	Michaelides et al.,	Classé variant de signification indéterminée, recherche d'un deuxième variant sur <i>ABCA4</i>
OPH1099	ABCA4	c.2930C>T	p.Thr977Met	Zenat et al., 2014	non concluant, recherche d'un deuxième variant sur <i>ABCA4</i>
OPH932	Best1	c.256G>A	p.Val86Met	Yardley et al., 2004	saut d'exon 4
OPH1233	IMPDH1	c.833C>T	p.Thr278Met	non décrit	classé variant de signification indéterminée
OPH1185	NR2E3	IVS1-2A>C	p.(?)	Haider et al 2000 (Enhanced S cone syndrome)	
OPH1079	PRPF31	c.359dup	p.Arg121Glufs*4	non décrit	
OPH1255	PRPF31	c.238+1G>C	p.(?)	non décrit	
OPH1166	PRPF31	c.1060C>T	p.Arg354*	Sullivan et al 2013	
OPH1100	PRPF8	c.5987+3G>T	p.(?)	non décrit	
OPH978	PRPH2	c.397G>A	p.Gly133Arg	non décrit	
OPH1143	PRPH2	c.589A>G	p.Lys197Glu	Kohl et al., 1997	classé variant de signification indéterminée, étude familiale nécessaire
OPH1154	PRPH2	c.441delT	p.Gly148Alafs*5	Neveling et al., 2012	
	ABCA4	c.4457C>T	p.Pro1486Leu	Lewis et al. 1999	
OPH1161	PRPH2	c.517G>A	p.Asp173Asn	non décrit	c.518 A>T , p.Asp173Val décrite par Gruning
OPH1163	PRPH2	c.535T>C	p.Trp179Arg	Bareil et al., 2000	

OPH 1303	PRPH2	c.536G>T	p.Trp179Leu	Fernandez-San Jose et al., 2015	
OPH1097	PRPH2	c.631T>C	p.Phe211Leu	Manes et al , 2015	
OPH1010	RHO	c.328T>C	p.Cys110Arg/-	To et al, 2004	
OPH1059	RHO	c.176T>G	Leu59Arg	non décrit	
OPH1265	RHO	c.501C>G	p.Cys167Trp	Briscoe et al , 2004	
	PROM1	c.344T>G	p.Leu115Arg	non décrit	probablement causal
OPH 1392	RHO	c.568G>A	p.Asp190Asn	Keen et al., 1991	
OPH1261	RP1	c.4971T>A	p.Cys1657*	non décrit	
OPH 1374	RP2	c.102+2T>G	p.(?)	non décrit	
		c.102+5T>A	p.(?)	non décrit	classé probablement bénin
OPH1034	RPGR	c.778+5G>A	p.(?)	Buraczynska et al., 1997	
OPH1142	RPGR	c.1681C>T	p.Gln561*	non décrit	
OPH1280	RPGR	c.1547_1548delAA	p.Lys516Ilefs*4	non décrit	
OPH975	snRNP200	c.3260C>T	p.Ser1087 Leu	Zhao et al., 2009	
OPH1081	snRNP200	c.2066A>G	Tyr689Cys	Benaglio et al., 2011	

IV. Données obtenues par le panel 150 gènes

Ce panel permet de séquencer 150 gènes de dystrophies rétiniennes en une seule technique couvrant des phénotypes variés (rétinite pigmentaire sporadique et syndromique, achromatopsie, amaurose de Leber, maculopathie, cécité congénitale stationnaire etc...) et de transmission autosomique dominante, récessive ou liée à l’X.

Nous avons séquencé 32 patients sur MiSeq puis NextSeq (figure 26). Les patients sélectionnés sont principalement des patients lillois (37,5%) pour lesquels aucun diagnostic moléculaire n’a été établi par les précédentes méthodes. La rétinite pigmentaire est décrite comme « atypique » à l’examen clinique chez 9 patients (dystrophie mixte, rétinite pigmentaire cône-bâtonnet, schisis, suspicion de maladie métabolique) et l’histoire familiale évoque une forme sporadique ou récessive ou liée à l’X chez 11 patients, incriminant ainsi des gènes non testés dans nos panels classiques de 12 et 18 gènes. La recherche de grand réarrangement a été réalisée chez 9 patients sur des gènes autosomiques dominants (AD), récessifs (AR) ou liés à l’X. Les détails cliniques sont présentés dans le tableau 22.

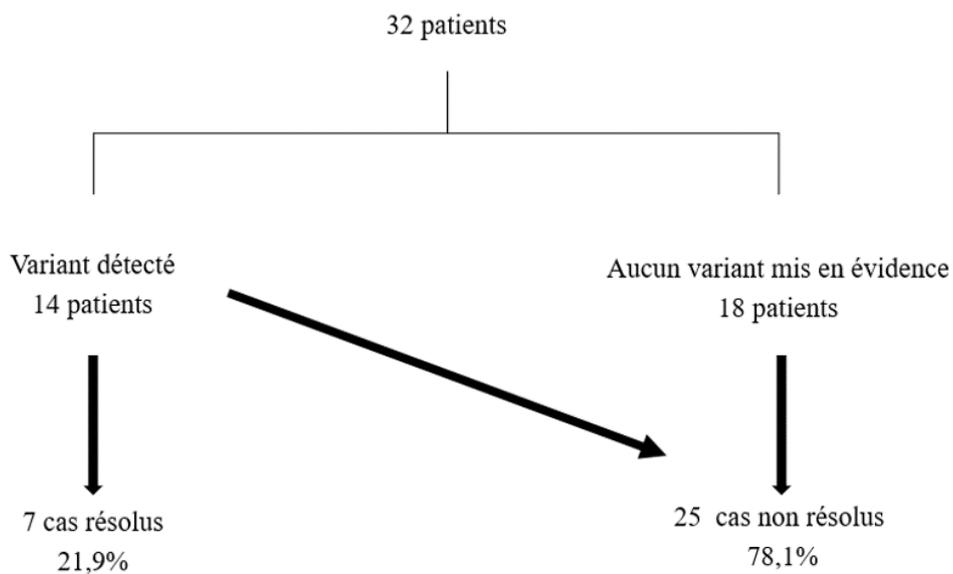


Figure 29 : Résultats obtenus par le panel 150 gènes

Nous avons identifié des variants chez 15 patients (35 SNV, 1 délétion, 1 CNV), la pathogénicité d'un variant a été attribuée selon le mode de transmission de la maladie, les phénotypes, l'effet prédit des logiciels de prédiction et la fréquence allélique fournie dans les bases de données. Au final, nous avons établi un diagnostic moléculaire chez seulement 7 patients (21,8%), les gènes incriminés sont des gènes récessifs : *ABCA4*, *CRB1*, *RPE65*, *PROM1* ou des gènes dominant ou liés à l'X non testés dans nos précédents panels : *RP2* et *CA4*.

A l'exception du patient ADRP589, pour lequel le gène *RP2* n'avait pas été séquencé à l'époque du Sanger, aucun variant n'a été identifiée dans les 12 gènes de rétinite pigmentaire testés en routine diagnostique, confortant nos techniques précédentes.

Il y a plusieurs explications pour les patients porteurs de variant mais pour lesquels nous n'avons pas pu confirmer le diagnostic moléculaire :

- les variants causaux dans des gènes récessifs n'ont pas été retenus comme impliqués dans les familles affectées sur 3 à 4 générations, évoquant donc une transmission dominante
- les logiciels de prédiction informatique ne s'accordent pas sur l'effet du variant
- un seul variant est identifié dans des gènes récessifs chez des patients atteints de rétinite pigmentaire autosomique récessive et sporadique
- le variant identifié dans un gène n'est pas cohérent avec le phénotype du patient

Tableau 22: Résultats obtenus avec le panel 150 gènes, les cas résolus sont sur fond rose

Patient	Gène identifié et phénotype associé	variant	ExAC	Référence	Pathogénicité	Analyses complémentaires
ADRP370 RP de transmission autosomique dominante sur 4 générations	NEGATIF					/
ADRP482 origine Afrique du Nord, transmission dominante ou récessive,	PITPNM3 cone ou cone rod dystrophy AD	c.1688C>T p.Thr563Met	All= 0,05%, Afr = 0,01%	non décrit	VSI	CNV négatif pour les gènes AD, CNGA1, CDH23 et PITPNM3
	CAPN5 Vitréorétinopathie néovasculaire inflammatoire, AD	c.263C>T p.Ser88Leu		non décrit	VSI	
	CDH23 Syndrome de Usher AR	c.6655G>A p.Asp2219Asn		Moteki et al, 2015	causal	
	CNGA1 rétinite pigmentaire AR	c.547G>A p.Val183Met		non décrit	VSI	
RDS598 mère et sœur atteintes en faveur d'une transmission dominante	NEGATIF					doute sur une duplication du gène RP9 (gène de rétinite pigmentaire AD)
ADRP492 Aucune information phénotypique cas sporadique	CLRN1 rétinite pigmentaire AR Syndrome de Usher AR	c.154_157delinsTGT CCAAT		Fields et al, 2002	causal	Taqman négatif, absence de deuxième mutation
ADRP112	CNGA1 Rétinite pigmentaire AR	c.1885C>T p.Arg629Ter			causal	en attente de renseignement clinique
	EYS Rétinite pigmentaire AR	c.3003T>A p.Cys1001Ter			causal	
	DHX38 Rétinite pigmentaire AR	c.2947A>G p.Ile983Val			VSI	
	GRM6 Cécité nocturne congénitale Stationnaire AR	c.713G>A p.Arg238Gln	GPR125 c.3628C>T p.Arg1210Trp		VSI	
ADRP548	NEGATIF					/
ADRP586 sœur atteinte de rétinite pigmentaire	RPE65 Rétinite pigmentaire AD/AR Amaurose congénitale de Leber AR	c.1022T>C p.Leu341Ser homozygote		Morimura et al, 1998	Causal	ségrégation familiale
ADRP589 RP typique avec une transmission dominante ou liée à l'X	RP2 Rétinite pigmentaire liée à l'X	c.896C>T p.Ala299Val		non décrit	VSI	ségrégation familiale à réaliser
ADRP608	NEGATIF					/
ADRP572	NEGATIF					/
OPH328 RP type cone rod	NEGATIF					/

OPH329 frère atteint de rétinite pigmentaire	PROM1 Rétinite pigmentaire AR	c.1354dup p.Tyr452Leufs*13		Pras et al en 2009	causal	ségrégation familiale
	Cone ou Cone rod dystrophy AD	2050C>T Arg684*		non décrit	causal	
OPH420 dystrophie rétinienne mixte, non syndromique chez une enfant de 6 ans, aucun antécédent familial	CRB1 Rétinite pigmentaire AR Amaurose congénitale de Leber AR	c.5848G>A p.Gly850Ser	All = 0,00083%	den Hollander et al., 2004	causal	ségrégation familiale
		c.4142C>G p.Pro1381Arg		non décrit	causal	
OPH70	NEGATIF					/
OPH191	ABCA4 Dégénération maculaire, Cone ou cone-rod dystrophy rétinite pigmentaire AR	c.3871C>T p.Glu1291*		non décrit	causal	ségrégation familiale à réaliser
		c.2461G>A p.Trp821*		Boulangier-Scemama et al., (cone-rod dystrophy)	causal	
OPH1152	NEGATIF					analyse des gènes de rétinite pigmentaire AR
OPH255 Rp dominant avec pénétrance incomplète ou X car cousin atteint	CACNA1F Cone / Cone-rod dystrophy X Cécité congénitale Stationnaire nocturne X	c.1903G>A p.Val635Ile	All = 0,31% NFE : 0,56%	Weber, 2002	probablement bénin	CNV AD et X , MERTK et RDH5 négatif
	MERTK Rétinite pigmentaire AR	c.2467G>C p.Glu823Gln	ALL0,098% NFE: 0,16%	non décrit	VSI	
	MFSD8 dégénération maculaire AR	c.1205 C>T p.Ser402Leu	All =0,0041%, NFE= 0,006%	non décrit	probablement bénin	
	NEK2 Rétinite pigmentaire AR	c.68A>G p.Gln23Arg	nd	non décrit	probablement bénin	
	RDH5 Cone / Cone-rod dystrophy AR Cécité congénitale stationnaire nocturne AR	c.223C>T p.Arg75Cys	All = 0,0017%	non décrit	VSI	
OPH611 RP sectoriel , sporadique ou AR	CRB1 Rétinite pigmentaire AR Amaurose congénitale de Leber AR	c.3037C>T p.Gln1013*		Henderson et al , 2011	probablement pathogène	CNV négatif pour les gènes AD, CRB1 et GUCY2D
		c.498_506del Ile167_Gly169del		Corton et al., 2013	probablement pathogène	
	GUCY2D Cone or cone rod dystrophy AD Amaurose congénitale de Leber AR	c.74C>T p.Ser25Phe		Wang et al., 2011	probablement pathogène	
OPH524 RP atypique, héméralopie depuis l'enfance (atteinte métabolique ou dysfonction précoce?) préservation de la macula	CTNNA1 dégénération maculaire AD	c.2219C>T p.Ser740Leu		non décrit	probablement bénin	CNV négatif pour les gènes AD et CNGB1
	CNGB1 Rétinite pigmentaire AR	c.2492+5G>A p.(?)	nd	non décrit	VSI:	
OPH300 RP en secteur évocateur d'une mutation RHO mode de transmission AR ou sporadique	NEGATIF					CNV Négatif pour les gènes AD
OPH217 RP typique, sporadique	TULP1 Amaurose congénitale de Leber AR Rétinite pigmentaire AR	c.1210G>T p.Ala404Ser	nd	non décrit	VSI douteux	CNV négatif pour les gènes AD et Tulp1
		c.1496-6C>A p.(?)	All = 0,0094%	décrit douteux Ge 1998	VSI	

OPH1566 RPAR ou sporadique, suspicion d'anomalie métabolique avec nombreuse plage d'atrophie	RPGRIPI Cone cone rod dystrophy AR , Amaurose congénitale de LeberAR syndromic disease with	c.1753C>T p.Pro585Ser	nd	Ge et al, 2015 (cas de RP de 3 variants dont 1 stop)	VSI douteux	CNV Négatif pour les gènes AD
		c.491-4T>C p.(?)	nd	non décrit	VSI douteux	
	VAN Ocular retinal developmnt disease AD	c.1045A>G p.Lys349Glu,	nd	non décrit	VSI	
OPH2003 RP atypique de transmission autosomique dominante car père et sœur atteints,	KCNV2 Cône/cône -rod dystrophie AR	c.989T>C p.Phe330Ser	nd	Wissinger et al 2011 (cone dystrophy)	non cohérent avec le mode de transmission	CNV Négatif pour les gènes AD
OPH22 RP transmission autosomique dominante, 4 générations atteintes	GPR125 Rétinite pigmentaire AR	c.1582G>A Gly258Ser	All=0,15%	nd	non cohérent avec le mode de transmission	CNV Négatif pour les gènes AD
	CNGB1 Rétinite pigmentaire AR	c.2209C>T p.Arg737Cys	All=0,07%	non décrit		
	KCNV2 Cone ou cone -rod dystrophy AR	c.441C>A p.Asp147Glu	All= 0,025%	non décrit		
OPH128 Pas d'information clinique	CA4 Rétinite pigmentaire AD	c.679C>T p.Pro227Ser	nd	Non décrit		/
OPH203 dystrophie rétinienne mixte avec œdème maculaire cystoïde et rétinoshisis de transmission autosomique récessive	NEGATIF					Exome en cours
OPH204 apparenté de OPH 203	NEGATIF					Exome en cours
Y1209 rétinite pigmentaire liée à l'X	NEGATIF					ORG15 à faire
Y1377 rétinite pigmentaire liée à l'X	CHM choroidémie lié à l'X	c.525_526del hémizygote p.Glu177Lysfs*6		Van Bokhoven et al., 1994	causal	ségrégation familiale
Y1384 rétinite pigmentaire liée à l'X ou dominant	ADAMTS18 dystrophie rétinienne récessive	c.438G>A p.Glu146Glu	nd	non décrit		ORG15 à faire
ADRP596 rétinite pigmentaire liée à l'X	NEGATIF					ORG15 à faire
ADRP497 rétinite pigmentaire liée à l'X	NEGATIF					ORG15 à faire

RP : rétinite pigmentaire

AD : autosomique dominant

AR : autosomique récessif

VSI : variant de signification indéterminée

V. Prévalence des gènes de Rétinite Pigmentaire en France

Au total, ce sont 625 patients atteints de rétinite pigmentaire qui ont été analysés entre 2008 et 2017. Les 265 variants identifiés, parmi lesquels 106 n'ont jamais été décrits dans la littérature, se répartissent sur 41 gènes. Nous avons conclu à un diagnostic moléculaire chez 207 patients (33.12%) lorsque le variant identifié est causal, c'est-à-dire selon son impact sur la protéine (codon stop), les données de la littérature, la ségrégation familiale et les prédictions *in silico* (figure 27).

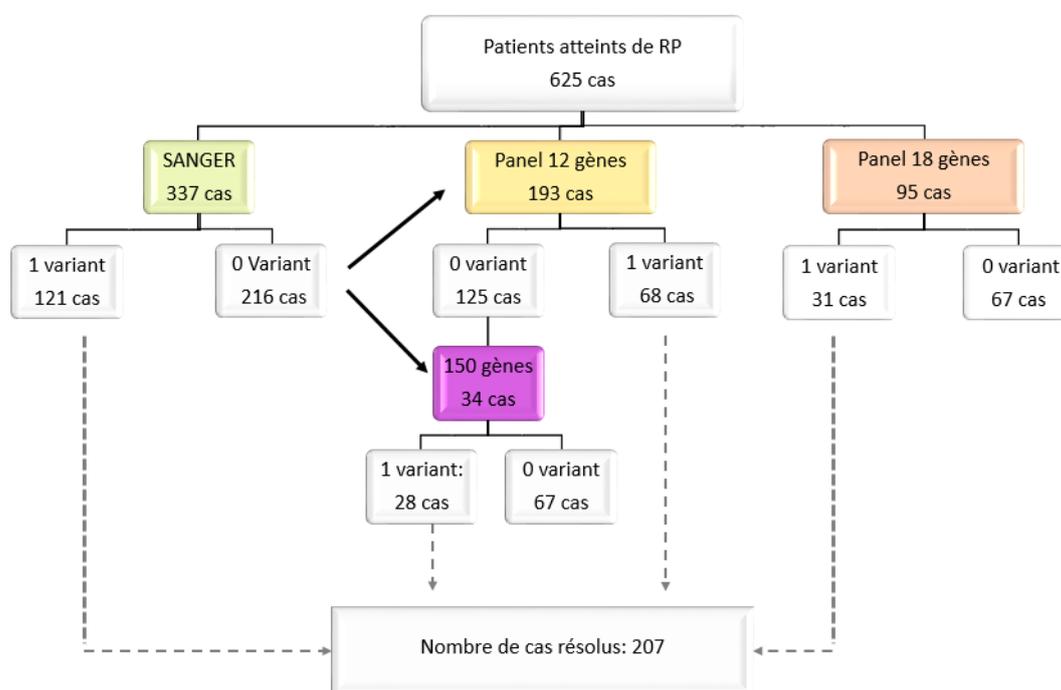


Figure 30: Workflow d'analyse des patients atteints de rétinite pigmentaire

Pour calculer la prévalence finale des gènes de rétinite pigmentaire (tableau 23), nous avons inclus les variants causaux et les variants de signification indéterminée de gènes autosomiques dominants du séquençage Sanger et des panels 12 et 18 gènes. Concernant le panel 150 gènes, nous avons incriminé i) des gènes autosomiques dominants lorsque le variant est causal, ii) des gènes autosomiques récessifs lorsque 2 variants causaux d'un même gène sont présents.

Nous n'avons donc pas pris en compte le cas où un unique variant causal ou de signification indéterminée est trouvé dans un gène récessif.

Nous avons donc incriminé 18 gènes dont les plus fréquents sont : *RHO* (10,56%), *PRPH2* (4,96%) et *RPI* (4%). On compte 64% de variants faux sens, 14% de frameshift, 11% de non-sens, 8,5% de variant d'épissage et 2,5% de délétions respectant le cadre de lecture. Aucune variation du nombre de copie (CNV) n'a été détectée.

Gènes	Total	prévalence
<i>RHO</i>	66	10,56%
<i>PRPH2</i>	31	4,96%
<i>RPI</i>	25	4,00%
<i>NR2E3</i>	19	3,04%
<i>PRPF31</i>	18	2,88%
<i>snRNP200</i>	11	1,76%
<i>PRPF3</i>	10	1,60%
<i>RPGR</i>	9	1,44%
<i>PRPF8</i>	7	1,12%
<i>RP2</i>	5	0,80%
<i>IMPDH1</i>	4	0,64%
<i>ABCA4</i>	2	0,32%
<i>CRB1</i>	2	0,32%
<i>NRL</i>	1	0,16%
<i>Best</i>	1	0,16%
<i>CA4</i>	1	0,16%
<i>RPE65</i>	1	0,16%
<i>PROM1</i>	1	0,16%
TOTAL	214	34,24%

Tableau 23 : Prévalence des gènes de rétinite pigmentaire en France

VI. Comparaison des techniques

Les taux de variant positif (causal ou de signification indéterminée) sont : par la technique Sanger de 36,2%, par le panel 12 gènes de 30,5%, par le panel 18 gènes de 27,3%, par le panel 150 gènes de 22%. Il n'y a pas de différence significative entre les quatre stratégies.

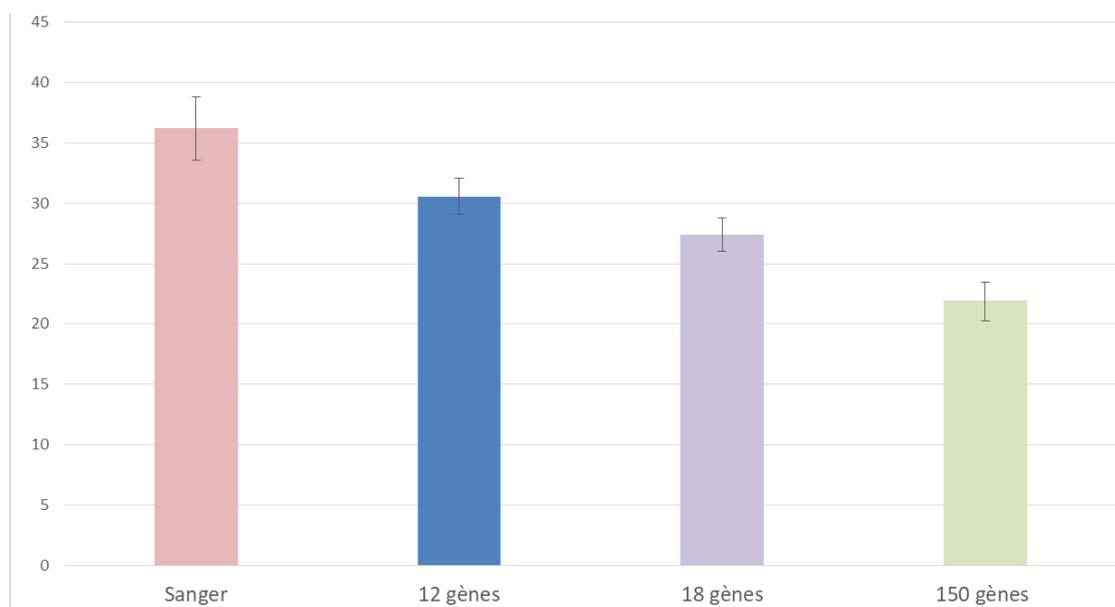


Figure 31: Taux de diagnostic positif par séquençage Sanger et par séquençage haut débit 12, 18 et 150 gènes.

Nous avons obtenu le meilleur taux diagnostique avec la technique Sanger bien qu'elle ne cible que les exons hot-spot des gènes de rétinite pigmentaire. Nous expliquons cette différence par le recrutement des patients de la série Sanger qui sont majoritairement issus d'un PHRC National de familles de rétinite pigmentaire bien caractérisées sur le plan phénotypique avec 2 à 3 générations atteintes par la maladie.

Le développement du séquençage haut débit permet de séquencer un grand nombre de gènes simultanément à des coûts raisonnables. L'analyse des résultats sur le panel 12 gènes est longue et fastidieuse car la technologie Ion Torrent produit de nombreux artefacts au niveau des homopolymères et nécessite un contrôle visuel des variants sur des logiciels bio-

informatiques. Le panel 18 gènes a été développé récemment dans le laboratoire, il couvre des gènes de rétinite pigmentaire et de maculopathie permettant de tester des patients dont le phénotype est chevauchant ou atypique. L'analyse des données par rapport au panel de 12 gènes est plus rapide car la technologie Illumina produit moins d'artefacts. De plus des outils bioinformatiques ont été développés sur les séquenceurs Illumina permettant l'analyse des CNV.

Gènes	SANGER		12 gènes		18 gènes		150 gènes		Total
<i>RHO</i>	44	13,06%	18	9,33%	4	4,21%			66
<i>PRPH2</i>	19	5,64%	5	2,59%	7	7,37%			31
<i>RP1</i>	18	5,34%	6	3,11%	1	1,05%			25
<i>PRPF31</i>	10	2,97%	5	2,59%	3	3,16%			18
<i>NR2E3</i>	11	3,26%	7	3,63%	1	1,05%			19
<i>RPGR</i>			6	3,11%	3	3,16%			9
<i>PRPF3</i>	7	2,08%	3	1,55%	0	0,00%			10
<i>snRNP200</i>	6	1,78%	3	1,55%	2	2,11%			11
<i>PRPF8</i>	5	1,48%	1	0,52%	1	1,05%			7
<i>IMPDH1</i>	1	0,30%	2	1,04%	1	1,05%			4
<i>RP2</i>			3	1,55%	1	1,05%	1	3,13%	5
<i>NRL</i>	1	0,30%	0	0,00%	0	0,00%			1
<i>ABCA4</i>					1	1,05%	1	3,13%	2
<i>BEST1</i>					1	1,05%			1
<i>CA4</i>							1	3,13%	1
<i>RPE65</i>							1	3,13%	1
<i>PROM1</i>							1	3,13%	1
<i>CRB1</i>							2	6,25%	2
Positif	122	36,20%	59	30,56%	26	27,37%	7	21,88%	214
Négatif	215		134		69		25		

Tableau 24: Prévalence des gènes selon le séquençage Sanger et le séquençage haut débit sur un panel de 12, 18 et 150 gènes.

Aucun patient n'a été testé en première intention par le panel 150 gènes rendant la comparaison avec les autres techniques plus délicate. Néanmoins ce panel a permis d'élucider 7 cas atypiques ou des formes récessives sur des gènes non testés en routine diagnostique contribuant au diagnostic moléculaire final de 1,12% de la cohorte. En couvrant de nombreux

gènes de dystrophies rétiniennes, elle permet une analyse plus large lorsque le diagnostic clinique est précoce ou peu précis. Du fait du nombre important de gènes testés et de variants détectés, le temps consacré à l'analyse des résultats est considérablement allongé. La majorité des variants de cette étude ne sont pas décrits dans la littérature et peu d'études fonctionnelles sont disponibles compliquant leur interprétation. Une autre limite de ce panel est la description précise du phénotype du patient sans laquelle l'interprétation moléculaire ne peut être réalisée.

En ce qui concerne les couvertures de séquençage, le séquençage Sanger ne cible que les exons hot spot et ne permet qu'une analyse partielle des gènes. Les grands panels ne couvrent pas totalement les gènes mais permettent une analyse plus complète, les exons hot spot non couverts par les panels de 12 et 18 gènes sont donc séquencés par Sanger pour éviter les faux-négatifs. Le panel 150 gènes couvrent plus de gènes mais la profondeur de lecture est moins importante et très variables d'un amplicon à un autre sur un même exon d'un gène (tableau 25).

	SANGER	12 gènes	18 gènes	150 gènes	
<i>RHO</i>	100%	100%	100%	100%	100%
<i>PRPH2</i>	100%	100%	100%	100%	80-99%
<i>RP1</i>	100%	100%	100%	60-79%	60-79%
<i>IMPDH</i>	40-59%	40-59%	100%	40-59%	40-59%
<i>NR2E3</i>	40-59%	100%	100%	100%	20-39%
<i>NRL</i>	1-19%	100%	60-79%	60-79%	1-19%
<i>PRPF3</i>	1-19%	100%	100%	100%	1-19%
<i>PRPF31</i>	60-79%	40-59%	100%	100%	60-79%
<i>PRPF8</i>	40-59%	40-59%	100%	40-59%	40-59%
<i>SnRNP200</i>	40-59%	40-59%	100%	40-59%	40-59%
<i>RPGR</i>	0	40-59%	100%	1-19%	0
<i>RP2</i>	0	100%	100%	60-79%	0
<i>BEST</i>	0	0	100%	40-59%	0
<i>ELOVL4</i>	0	0	100%	60-79%	0
<i>ABCA4</i>	0	0	100%	40-59%	0
<i>PROM1</i>	0	0	100%	0	0
<i>IMPG1</i>	0	0	100%	0	0
<i>IMPG2</i>	0	0	100%	0	0

Tableau 25: Comparaison des couvertures selon les méthodes de séquençage

Nous avons comparé les coûts d'analyse des 4 stratégies qui sont des critères essentiels dans le choix de la technique de diagnostic moléculaire. Ces coûts prennent en compte le prix des réactifs et consommables mais pas les coûts personnels (temps technique et médical) par patient (tableau 26). Le temps d'analyse par le biologiste est la durée estimée pour caractériser complètement l'anomalie moléculaire chez chacun des patients. Nous n'avons pas pris en compte le temps consacré par les techniciens pour le traitement des fichiers *fastq* et *vcf* sur les logiciels d'analyse, ni le temps dédié à la vérification des variants trouvés par séquençage haut débit avec le séquençage Sanger. Ce temps peut être de plusieurs semaines. Le nombre maximal de patients par série (*run*) sur les panels 18 gènes et 150 gènes est de 96 patients, mais pour l'ergonomie de la technique, nous réalisons 2 *runs* de 48 patients.

Technique	Coût en Euros/patient	Temps Technique	Nombre de patients par <i>run</i>	Temps d'Analyse biologique
Sanger 26 exons	136	2 jours	2	30 min
12 gènes	99	4 jours	20	1h
18 gènes	170	2 jours	2 x 48	15 min
150 gènes	275	2 jours	2 x 48	1h30

Tableau 26: Coûts médico-économique et temps d'analyse par technique

Le temps consacré à l'analyse par le biologiste sur le panel 12 gènes est plus long que sur le panel 18 gènes en raison des nombreux artefacts de séquençage de la technologie Ion Torrent (homopolymères). Le temps consacré à l'analyse du panel 150 gènes est considérablement allongé du fait du nombre de gènes testés et des nombreux variants détectés.

Tableau 27 : Résumé des variants identifiés dans l'étude**Les variants probablement bénins sont sur fond bleu, les variants de signification indéterminée sont sur fond violet**

Exon	variant (ADNc)	variant protéine	Familles (n)	Exac	Référence	conservation du nucléotide/acide aminé	Ecart physico-chimique	a-GVGD	SIFT	Mutation Taster	Polyphen	Effet sur l'épissage
<i>PRPH2</i>												
1	c.-11A>C	p.(?)	1	0.009977	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.98T>C	p.Ile33Thr	1	0.000008239	non décrit	moyenne/faible	important	C0	Deleterious	polymorphism	Benign	0
1	c.136C>T	p.Arg46*	2	0.00002472	Meins et al.,1993	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.205delG	p.Val69Cysfs*30	1	N.R.	Manes et al.,2015	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.377T>C	p.Leu126Pro	1	N.R.	Renner et al., 2009	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.397G>A	p.Gly133Arg	2	0.000008237	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	0
1	c.397G>C	p.Gly133Arg	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	0
1	c.441delT	p.Gly148Alafs*5	1	0.000008236	Neveling et al., 2012	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.494G>A	p.Cys165Tyr	2	N.R.	Souied et al., 1995	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	0
1	c.514C>T	p.Arg172Trp	2	N.R.	Wells et al., 1993	faible/très conservé	important	C35	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	0
1	c.517G>A	p.Asp173Asn	1	N.R.	non décrit	très conservé	peu important	C15	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	N.A.
1	c.535T>C	p.Trp179Arg	3	N.R.	Bareil et al.,2000	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	0
1	c.536G>T	p.Trp179Leu	1	N.R.	Fernandez-San Jose 2015	très conservé	peu important	C55	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	N.A.
2	c.582T>A	p.Asp194Glu	1	N.R.	Manes et al.,2015	non conservé/très conservé	peu important	C35	Deleterious	Disease-causing	Benign	N.A.
2	c.589A>G	p.Lys197Glu	1	N.R.	Kohl et al 1997 (cone rod dystrophy)	moyenne/très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Possibly damaging	N.A.
2	c.594C>G	p.Ser198Arg	1	N.R.	Sullivan et al., 2006	moyennement/très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.631T>C	p.Phe211Leu	2	N.R.	Manes et al.,2015	très conservé/très conservé	peu important	C15	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.

2	c.659G>C	p.Arg220Pro	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.738G>C	p.Trp246Cys	1	N.R.	Manes et al.,2015	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.761T>A	p.Leu254Gln	2	N.R.	Manes et al.,2015	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.829-4C>G	p.(?)	4	N.R.	Manes et al.,2015	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent -19%
3	c.901_902del	p.Ser301Argfs*90	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
RHO												
1	c.31G>A	p. Val11Met	1	N.R.	non décrit	faiblement/moyenn e	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	possibly damaging	N.A.
1	c.44A>G	p.Asn15Ser	2	N.R.	Kranich 1993	très conservé/très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.49A>G	p.Thr17Ala	2	N.R.	non décrit	très conservé/très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Benign	N.A.
1	c.50C>T	p.Thr17Met	2	N.R.	Sheffield et al., 1991	très conservé/très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.53G>A	p.Gly18Asp	1	0.00003298	non décrit	très conservé/très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.57_71del	p.p.Val20_Phe24del	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.82C>G	p.Gln28Glu	1	N.R.	non décrit	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.140T>C	p.Leu47Pro	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.158C>G	p.Pro53Arg	1	N.R.	Ingleheam et al., 1992	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
	c.176T>G	Leu59Arg	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C35	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	
1	c.[164 A>G ;251T>C]	p.Asn55Ser(;Leu84 Pro	1	N.R.	non décrit / non décrit	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.[164 A>G ;251T>C]	p.Asn55Ser(;Leu84 Pro		N.R.	non décrit / non décrit	faiblement/très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.173C>G	p.Thr58Arg	1	N.R.	Dryja et al., 1990	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.185C>A	p.Thr62Asn	1	0.00001647	non décrit	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.263T>C	p.Leu88Pro	1	N.R.	Audo et al., 2010	moyennement/faibl e	important	C35	Deleterious	polymorphism	possibly Damaging	N.A.
1	c.289A>C	p.Thr97Pro	1	N.R.	non décrit	moyennement/très conservé	peu important	C35	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.

1	c.311_316del	p.Val104_Phe105del	1	N.R.	non décrit	perte de 2 résidus/	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
1	c.316G>A	p.Gly106Arg	2	0.00001653	Ingleheam et al., 1992	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.328T>C	p.Cys110Arg	2	N.R.	To et al, 2004	très conservé	très important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
1	c.340 G>A +/+	p. Gly114Ser	1	N.R.	non décrit	très conservé	peu important	C55	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.380C>T	p.Ser127Phe	4	N.R.	Souied et al., 1994	très conservé	tres important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.392T>C	p.Leu131Pro	1	N.R.	Fuchs et al.,1994	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.403C>G	p.Arg135Gly	1	N.R.	Bunge et al 1993	faiblement/très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.403C>T	p.Arg135Trp	10	N.R.	Sung et al., 1991	faiblement/très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.404G>C	p.Arg135Pro	2	N.R.	Gal et al., 1997	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
2	c.[316G>A(;) 439C>T]	p.Gly106Arg(;) Arg147Cys	1	0.00001653	Carrigan et al.,2016	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	Probably Damaging
	c.[316G>A(;) 439C>T]	p.Gly106Arg(;) Arg147Cys		0.00004943	To et al, 2004	moyenne / très conservé	important	C66	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	Probably Damaging
2	c.497C>A	p.Ala166Asp	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	possibly Damaging	N.A.
2	c.501C>G	p.Cys167Trp	3	N.R.	Briscoe et al., 2004	non conservé/très conservé	très important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.541G>A	p.Glu181Lys	1	N.R.	Dryja et al., 1991	très conservé	peu important	C55	Deleterious	Disease-causing	possibly Damaging	N.A.
3	c.544G>C	p.Gly182Arg+/-	1	N.R.	Sheffield et al. 1991	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.545G>T	p.Gly182Val	2	N.R.	Yang et al., 2014	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.562G>A	p.Gly188Arg	1	N.R.	Dryja et al., 1991	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.568G>A	p.Asp190Asn	1	N.R.	Keen et al. 1991	très conservé	peu important	C15	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.568G>T	p.Asp190Tyr	2	N.R.	al-Magtheth et al., 1993	très conservé	très important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
3	c.616_624del	p. Tyr206_Phe208del	2	N.R.	Maubaret et al., 2012	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
3	c.647T>G	p.Met216Arg	1	N.R.	Haim et al, 1996	très conservé/moyenne	important	c45	Deleterious	Disease-causing	Benign	N.A.
4	c.800C>G	p.Pro267Arg	1	N.R.	Souied et al., 1994	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.

4	c.886A>G	p.Lys296Glu	1	N.R.	Keen et al., 1991	très conservé	tres important	C55	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
5	c.1033G>A	p.Val345Met	1	N.R.	Dryja et al., 1991	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
5	c.1034T>A	p.Val345Glu	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
5	c.1039C>T	p.Pro347Ser	1	N.R.	Dryja et al., 1990	très conservé	tres important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
5	c.1040C>T	p.Pro347Leu	3	0.000008263	Dryja et al., 1990	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
intron4	c.937-2A>G	p.IVS4-2A>G	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Mx Ent, Nnsplce, HSF: -100%
PRPF3												
11	c.1465G>C	p.Ala489Pro	4	N.R.	non décrit	très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
11	c.1477C>T	p.Pro493Ser	2	N.R.	Chakarova et al., 2002	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
11	c.1481C>T	p.Thr494Met	3	N.R.	Chakarova et al., 2002	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
11	c.1504G>C	p.Ala502Pro	1	N.R.	non décrit	très conservé/moyenne	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
	c.1427-3C>A	p.1427-3C>A	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	MaxEnt - 50.9% .Nnsplce - 89.5% HSF -10,4%
RPI												
4	c.1186C>T	p.Arg396*	1	0.00004948	Bocquet et al 2013	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2005G>A	p. Ala669Thr	1	0.0001427	Khaliq et al., 2005	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2018del	p.Lys673Argfs*9	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2029C>T	p.Arg677*	2	N.R.	Pierce et al.,1999	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2035C>T	p.Gln679*	2	N.R.	Sullivan et al., 1999	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2065C>T	p.Gln689*	2	N.R.	Audo et al., 2012	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2169delA	p.Ile725tyrfs*13	2	N.R.	Lafont et al., 2011	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

4	c.2243del	p.Asn748Ilefs*15	2	N.R.	Lafont et al., 2011	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2399_2400del	p.Lys800Serfs*6	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2443G>T	p.Glu815*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2490del	p.Asp832Ilefs*16	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2560_2561del	p.Ser854Phefs*7	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2563_2564del	p.Leu855Serfs*6	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2585C>A	p.Ser862*	2	N.R.	Lafont et al., 2011	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2613dup	p.Arg872Thrfs*2	2	N.R.	Payne et al.,2000	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.2732C>G	p.Ser911*	1	N.R.	Lafont et al., 2011	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.3439C>T	p.Gln1147*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.4971T>A	p.Cys1657*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
NRL												
2	c.-11C>T	p.(?)	1	0.0002621	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
PRPF8												
	c.5987+3G>T	p.(?)	1	0.00004139	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	MaxEnt:100%, Nnsplce - 69%, HSF -8%
40	c.6370A>T	p.Ile2124Phe	1	N.R.	non décrit	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
43	c.6901C>T	p.Pro2301Ser	1	N.R.	Ziviello et al., 2005	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
43	c.6926A>C	p.His2309Pro	1	N.R.	McKie et al., 2001	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
43	c.6926A>G	p.His2309Arg	1	N.R.	Walia et al., 2008	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
43	c.6928A>G	p.Arg2310Gly	1	N.R.	McKie et al., 2001	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
43	c.6977dup	p.Tyr2326*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

<i>PRPF31</i>												
2	c.168_172del	p.Asp56GluFs*5	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2	c.73G>T	p.Glu25*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	c.259G>A	p.Ala87Thr	1	N.R.	non décrit	très conservé/moyene	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	benign	N.A.
5	c.330_333del	p.His111Serfs*86	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
ivs3	c.238+1G>C	p.(?)	1	0.000008239	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max En HSF et NNsplice - 100%
5	c.354C>G	p.Tyr118*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
5	c.359dup	p.Arg121GluFs*4	1	N.R.	non décrit	N.A./N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
6	c.524delA	p.Gln175Argfs*23	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
7	c.666_668del	p.Ile223del	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
8	c.757G>T	p.Gly253trp	1	N.R.	non décrit	moyenne/très conservé	très important	C65	Deleterious	disease causing	probably damaging	N.A.
10	c.1060C>T	p.Arg354*	1	N.R.	Sullivan et al., 2013	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
11	c.1130 G>A	p. Arg377His	1	0,00005353	non décrit	moyenne/très conservé	peu important	C25	Deleterious	disease causing	probably damaging	N.A.
12	c.1205C>A	p.Ser402*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
12	c.1231C>T	p.Gln411*	2	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
14	c.1462_1472del	p.Lys488Argfs*75	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
5'UTR	c. -4C>G	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent/HSF Nnsplice - 0,5%
intron 4	c.323-1G>A	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	maxent, Nnsplice, HSF -100%
intron7	c.698-2A>G	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	maxent, Nnsplice, HSF -100%
<i>NR2E3</i>												

2	c.131C>T	p.Ser44Leu	1		Bernal S et al., 2008	faible/faible	très important	C0	toléré	0	Begnin	N.A.
2	c.166G>A	p.Gly56Arg	8		Coppieters et al., 2007	très conservé	important	C15	délétère	0	Probably damaging	N.A.
2	c.166G>C	p.Gly56Arg	2		Xu et al, 2014	très conservé	important	C15	délétère	0	Probably damaging	N.A.
2	c.170A>G	p.Lys57Arg	1		non décrit	très conservé	peu important	C0	délétère	0	possibly damaging	N.A.
2	c.205G>A	p.Gly69Ser	1		non décrit	moyenne/très conservé	peu important	C0	délétère	0	Probably damaging	N.A.
6	c.844G>A	p.Glu282Lys	1		non décrit	moyenne/moyenne	peu important	C15	délétère	0	benign	N.A.
6	c.932G>A	p.Arg311Gln	1		Haider et al , 2000 (Goldmann Favre)	moyenne/faible	peu important	C0	délétère	0	benign	N.A.
intron1	ivs1-2A>C	p.(?)	4		Haider et al 2000 (Enhanced S cone syndrome)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Maxent Nnsplise HSF -100%
snRNP200												
16	c.2041C>T	p.Arg681Cys	3	N.R.	Banaglio et al., 2011	très conservé	très important	C0	délétère	disease causing	Probably damaging	N.A.
16	c.2066A>G	p.Tyr689Cys	1	N.R.	Banaglio et al., 2011	très conservé	très important	C0	délétère	disease causing	possibly damaging	N.A.
16	c.2160+1G>A	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
18	c.2359G>A	p.Ala787Thr	2	N.R.	Xu et al., 2014	très conservé	peu important	C0	délétère	disease causing	Probably damaging	N.A.
20	c.2576C>G	p.Pro859Arg	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C0	délétère	disease causing	Probably damaging	N.A.
25	c.3260C>T	p.Ser1087Leu	3	0.000008238	Zhao et al 2009	moyenne/très conservé	très important	C0	délétère	disease causing	Probably damaging	N.A.
31	c.4165G>A	p.Val1389Ile	1	0.005349	non décrit	moyenne/très conservé	peu important	C0	Tolerated	disease causing	benign	N.A.
IMPDH1												
10	c.945C>A	p.Asn315Lys	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C0	délétère	disease causing	benign	N.A.
14	c.1446del	p.Gly483Alafs*40	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
16	c.1778C>T	p.Ser593Phe	1	0.00004137	non décrit	très conservé	très important	C15	délétère	délétère	possibly Damaging	N.A.
8	c.727G>A	p. Val 243 Ile	1	0,0000175	non décrit	faible/très conservé	peu important	C0	Tolerated	disease causing	benign	N.A.

9	c.833C>T	p.Thr278Met	1	0,000124	non décrit	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	N.A.
intron4	IVS4+6 C>T	p.(?)	1		non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent +35%, Nnsplce +0,4% HSF +2,5%
RP2												
2	c.352C>T	p.Arg118Cys	1	N.R.	Bader et al 2003	très conservé	très important	C65	Deleterious	disease causing	possibly damaging	N.A.
2	c.448T>C	p.Trp150Arg	1	N.R.	non décrit	moyenne/moyenne	important	C15	Deleterious	disease causing	possibly damaging	N.A.
2	c.613G>A	p.Glu205Lys	1	N.R.	non décrit	moyenne/très conservé	peu important	C55	Deleterious	disease causing	Benign	N.A.
	c.896C>T	p.Arg299Val	1	N.R.	non décrit	moyenne / très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease Causing	probably damaging	N.A.
ivs1	c.102+2T>G	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max En HSF et NNsplice - 100%
ivs1	c.102+5T>G	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Maxent : 0%, Nnsplce +4% HSF +0%
RPGR												
intron7	c.778+5G>A	p.(?)	1	N.R.	Buraczynska et al 1997	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	MaxEnt -50%, NNSPLICE - 46% HSF - 14%
intron8	c.935-1G>T	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Maxent Nnsplce HSF -100%
10	c.1221_1231del	p.Arg409Lysfs*40	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
12	c.1441_1442del	p.Glu481Serfs*5	2	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
13	c.1547_1548del	p.Lys516Ilefs*4	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
14	c.1681C>T	p.Gln561*	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
14	c.1600C>T	p.Gln534*	1	N.R.	non décrit	(variant identifié dans un autre laboratoire) N.A	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
orf15	c.2110A>T	p.Lys704* +	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

orf15	c.2233_2234del	p.Glu746Argfs*23	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
orf15	c.2731del	p.Glu911Argfs*178	1	N.R.	non décrit	(variant identifié dans un autre laboratoire) N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
ABCA4												
31	c.4633A>G	p.Ser1545Gly	1	N.R.	non décrit	moyenne/très conservé	peu important	C55	Deleterious	Disease-causing	Benign	N.A.
	c.2930C>T	p.Thr977Met	1	0.0001565	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
5	c.455G>A	p.Arg152Gln	1	0.002399	Paloma et al 2001	faiblement conservé/moyenne	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Benign	N.A.
40	c.5603A>T	p.Asn1868Ile	2	0.04456	Zernant et al. 2017	très conservé	important	C65	Deleterious	Polymorphism	Benign	N.A.
18	c.2701A>G	p.Thr901Ala	1	0.001748	Rivera et al. 2000	moyenne/très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Benign	N.A.
intron 40	c.5715-5T>C	p.(?)	1	0.00003295	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max Ent: -10%, HSF et NNSplice -1%
1	c.1654G>A	p.Val552Ile	1	N.R.	Michaelides 2007 dystrophy maculaire	faiblement conservé/très conservé	peu important	C25	Deleterious	Disease-causing	Benign	N.A.
20	c.2930C>T	p.Thr977Met	1	0.0001565	Zenat et al. 2014	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
30	c.4457C>T	p.Pro1486Leu	1	0.0001425	Lewis et al. 1999	très conservé	important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
	c.3871C>T	p.Glu1291*	1	0.000008506	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	c.2461T>A	p.Trp821*	1	0.000008241	Boulangier-Scemama et al., (cone-rod dystrophy)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
BEST1												
4	c.256G>A	p.Val86Met	1	N.R.	Yardley et al 2004	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	Probably Damaging	N.A.
PROM1												
4	c.344T>G	p.Leu115Arg	1	N.R.	non décrit	très conservé /moyenne	important	C0	Deleterious	Disease-causing	probably Damaging	N.A.
	c.1354dup	p.Tyr452Leufs*13	1	0.0001549	Pras et al en 2009	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	2050C>T	p.Arg684*	1	0.00001401	non décrit	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

ADAMTS18												
	c.438G>A	Glu146Glu	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CHM												
	c.525_526del	Glu177Lysfs*6	1	N.R.	Van Bokhoven et al., 1994	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
PITPNM3												
	c.1688C>T	Thr563Met	1	All= 0,05%, Afr = 0,01%	non décrit	très conservé / moyenne	important	C15	Deleterious	Disease-causing	probably damaging	N.A.
CAPN5												
	c.263C>T	Ser88Leu	1	0.00003497	non décrit	très conservé/ moyenne	très important	C0	Deleterious	Disease-causing	probably damaging	N.A.
CDH23												
	c.6655G>A	Asp2219Asn	1	N.R.	Moteki et al, 2015	très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease-causing	probably damaging	N.A.
CNGA1												
	c.547G>A	Val183Met	1	N.R.	non décrit	faible	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	benign	N.A.
	c.1885C>T	p.Arg629*	1	0.00001656	Non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CLRN1												
	c.154_157delin sTGTCCAAT		1	N.R.	Fields et al, 2002	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
EYS												
	c.3003T>A	p.Cys1001*	1	N.R.	Audo et al, 2010	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DHX38												
	c.2947A>G	p.Ile983Val	1	0,0006353	Non décrit	Moyenne/très conservé	peu important	C15	Deleterious	Disease-causing	benign	N.A.
GRM6												
2	c.713G>A	p.Arg238Gln	1	0,000008513	Non décrit	très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease-causing	Possibly damaging	N.A.
GPR125												

19	c.3628C>T	p.Arg1210Trp	1	0,000008241	non décrit	Moyenne/ très conservé	important	C35	Deleterious	Disease Causing	Possibly damaging	N.A
RPE65												
	c.1022T>C homozygote	p..Leu341Ser	1	N.R.	Morimura et al, 1998	très conservé	très important	C65	Deleterious	Disease Causing	probably damaging	N.A.
CRB1												
	c.5848G>A	p.Gly850Ser	1	0,000008253	den Hollander et al., 2004	très conservé	peu important	C55	Deleterious	Disease Causing	Probably Damaging	NA
	c.4142C>G	p.Pro1381Arg	1	N.R.	non décrit	très conservé	important	C65	Deleterious	Disease Causing	Probably Damaging	N.A.
	c.3037C>T	p.Gln1013*	1	0,000008265	Henderson et al , 2011	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	c.498_506del	p.Ile167_Gly169del	1	0,0005712	Corton et al., 2013	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
GUCY2D												
	c.74C>T	p.Ser25Phe	1	0,0008092	Wang et al., 2011	faible / moyenne	très important	C0	Deleterious	polymorphism	Probably Damaging	N.A.
CTNNA1												
	c.2219C>T	p. Ser740Leu	1	N.R.	non décrit	très conservé / moyenne	très important	C0	Tolerated	Disease causing	benign	N.A.
CNGB1												
	c.2209C>T	p.Arg737Cys	1	0,000008280	non décrit	moyenne	très important	C0	Deleterious	Disease causing	Probably Damaging	N.A.
	c.2492+5G>A	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent -42%, Nnsplice - 39,7%, HSF : - 12,6%
TULP1												
	c.1210G>T	p.Ala404Ser	1	N.R.	non décrit	moyenne / très conservé	important	C0	Tolerated	Disease causing	Probably Damaging	N.A.
	c.1496-6C>A	p.(?)	1	0,00009383	Ge et al. 1998	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent -26%, Nnsplice - 90%, HSF : - 4%
RPGRIP												
	c.1753C>T	p.Pro585Ser	1	0,001605	Ge et al, 2015 (douteux)		important	C0	Deleterious	Disease causing	possibly Damaging	N.A.

c.491-4T>C	p.(?)	1	N.R.	non décrit	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Max ent: -5,1%,Nnsplce, -7,3%, HSF 0,8%,
VAN												
c.1045A>G	p.Lys349Glu,	1	N.R.	non décrit	moyenne / très conservé	peu important	C55	Deleterious	polymorphism	possibly Damaging	N.A.	
KCNV2												
c.989T>C	p. p.Phe330Ser	1	N.R.	Wissinger 2011 (cone dystrophy)	très conservé	très important	C65	Deleterious	Disease causing	probably damaging	N.A.	
c.441C>A	p.Asp147Glu	1	0,0002537	non décrit	non conservé/ moyenne	peu important	C0	Deleterious	Disease causing	probably damaging	N.A.	
GPR125												
c.1582G>A	p.Gly258Ser	1	0,001663	N.R.	faible/faible	peu important	C0	Tolerated	polymorphism	benign	N.A.	
CA4												
c.679C>T	p.Pro227Ser	1	N.R.	non décrit	moyenne / très important	important	C65	Deleterious	N.A.	probably damaging	N.A.	
CACNA1F												
c.1903G>A	p.Val635Ile	1	0,003051	Weber, 2002	moyenne/moyenne	peu important	C0	Tolerated	N.A.	possiby damaging	N.A.	
MERTK												
c.2467G>C	p.Glu823Gln	1	0,0009804	non décrit	faible / très conservé	peu important	C0	Deleterious	Disease causing	possiby damaging	N.A.	
MFSD8												
c.1205 C>T	p.Ser402Leu	1	0,00004122	non décrit	très conservé / faible	très important	C0	Tolerated	Disease causing	benign	N.A.	
NEK2												
c.68A>G	p.Gln23Arg	1	N.R.	non décrit	moyenne / très conservé	peu important	C0	Tolerated	Disease causing	benign	N.A.	
RDH5												
c.223C>T	p.Arg75Cys	1	N.R.	non décrit	faible / moyenne	très important	C0	Deleterious	Disease causing	probably damaging	N.A.	

N.R : non rapportée dans la base ExAC

N.A : non applicable

VII. Etude de corrélation génotype/phénotype et comparaison aux données de la littérature

Nous ne présenterons dans ce chapitre que les cas positifs pour lesquels nous disposons d'une description des signes cliniques suffisamment détaillée. Nous nous sommes restreints aux 5 gènes les plus fréquemment identifiés dans notre cohorte à savoir *RHO*, *PRPH2*, *RPI*, *PRPF31* et *NR2E3*. Le nombre limité de patients présentés ne permet pas une analyse statistique fine, mais cette partie a pour objectif principal de décrire les particularités phénotypiques attribuables à un gène donné et de les comparer aux cas de la littérature.

A. Patients porteurs d'une mutation *RHO*

L'héméralopie est le premier symptôme révélateur d'une RP. Pour les 8 patients avec une mutation *RHO*, nous constatons un âge de début de cette héméralopie entre 13 et 65 ans, avec une moyenne à 27.3 ans. **L'acuité visuelle (AV)** est très variable, de 5/10 à 10/10 et semble diminuer avec l'âge. A noter que la réduction concentrique du **champ visuel (CV)** précède la baisse d'acuité visuelle (BAV). **Au fond d'œil (FO)**, on constate une atteinte en secteur, ou régionale, caractéristique des mutations du gène *RHO*, plus souvent dans la zone inférieure de la rétine, avec une épargne maculaire le plus souvent. La notion de RP péricentrale est rapportée chez un patient. Les papilles sont décrites habituellement pâles dans toutes les RP et les vaisseaux rétiniens grêles (24,41), mais cela n'est retrouvé chez aucun de nos 8 patients. L'atrophie en périphérie n'est observée que dans un cas sur deux, tout comme la présence d'ostéoblastes en périphérie (cellules de l'épithélium rétinien pigmentées) ou d'un œdème maculaire. A **l'autofluorescence**, on observe souvent un anneau d'hyperautofluorescence périmaculaire et une hypoautofluorescence au-delà de la macula. A **l'OCT** (tomographie en cohérence optique), on constate fréquemment une perte de la ligne ellipsoïde à partir de la

zone périfovéolaire. **L'ERG** (électro-rétinogramme) photopique, qui évalue la fonction des cônes, est altéré et le plus souvent, l'ERG scotopique, qui évalue la fonction des bâtonnets, est très diminué voire non enregistrable. Autres signes observés, une dyschromatopsie chez un jeune patient de 13 ans, et une photophobie décrite par un patient de 19 ans. Tous nos cas présentent donc une **rétinite pigmentaire en secteur, modérée, d'évolution lente et progressive**, comme il est décrit dans la littérature.

Les 8 patients portent des variants faux-sens, deux ne sont pas décrits mais sont prédits délétères.

A.



B.

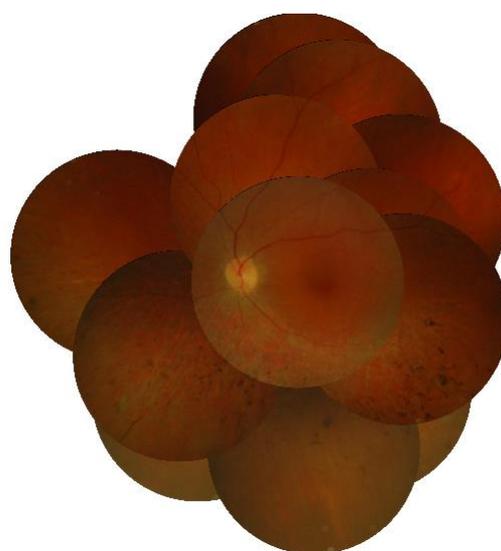


Figure 32: Fond d'œil de patients avec variant *RHO*.

A) patiente avec RP en secteur et porteuse de deux variant *RHO* décrites, p.[(Gly106Arg(;);Arg147Cys)]. La ségrégation n'est pas confirmée. B) patiente avec RP en secteur et mutation p.Val11Met non décrite.

B. Patients porteurs d'un variant *PRPH2*

Comme précédemment, l'héméralopie est le signe inaugural, apparaissant cette fois plus tardivement entre 18 et 69 ans, avec une moyenne à 42.8 ans chez nos 8 patients *PRPH2*. A noter que l'un d'entre eux ne présente pas d'héméralopie. Manes et al., 2015 (42) ont décrit l'ensemble des patients porteurs d'une mutation *PRPH2* testés dans le cadre du PHRC 2008. Nos 8 patients ne font pas partie de cette grande cohorte. Les auteurs ont rapporté de façon très proche, un âge moyen de début à 45.2 +/- 17.5 ans (de 13 à 78 ans, n=44). Ils montrent que la BAV est corrélée positivement à l'âge, tout comme la réduction du CV, et l'absence de réponses à l'ERG (ERG scotopique non enregistrable au-delà de 54.2 ans, et au-delà de 52.4 ans pour l'ERG photopique). Chez nos patients, l'AV est modérément diminuée et en tout cas très variable (de 1/20 à 10/10). Un scotome central ou en moyenne périphérie est observé. On retrouve au **fond d'oeil** des ostéoblastes en périphérie, mais pas toujours, et parfois des logettes d'œdème maculaire. La papille est pâle et les vaisseaux sont grêles chez presque tous les patients. Manes et al., décrivent la présence de dépôts pigmentaires chez 73% des cas à 45 ans +/- 18 ans (42). L'**autofluorescence** montre une alternance de zones d'hyper et d'hypoautofluorescence, en anneau, donnant un aspect en œil de bœuf (anneaux autofluorescents et spots atrophiques en périphérie chez 62.5% des cas à 47 +/- 18 ans d'après Manes et al., (42)). Chez nos patients, l'**OCT** montre des anomalies de la macula et parfois de la périphérie, ainsi que des logettes d'œdème maculaire : œdème cystoïde dans 14.3% et préservation de la zone ellipsoïde en fovéa dans 70.4% des cas). L'ERG est altéré et plus spécialement en scotopique. Le diagnostic évoqué était une **rétinite pigmentaire modérée, péricentrale**, ou une **dystrophie mixte de type cônes-bâtonnets**. Dans la cohorte du PHRC, il avait été observé une grande variabilité interindividuelle et intrafamiliale. L'atteinte de la macula pouvait être absente, modérée ou sévère. Différents cas étaient possibles : 1) une RP modérée avec quelques spots d'atrophie en périphérie avec épargne maculaire, 2) la présence

d'ostéoblastes typiques avec une atrophie étendue dans la moyenne périphérie, 3) une atteinte péricentrale et enfin, 4) des cas asymptomatiques ou paucisymptomatiques.

Sept de nos patients présentent un variant faux-sens dont trois sont des VSI prédits délétères. Un patient porte une délétion avec décalage du cadre de lecture. Deux des patients portent la très largement décrite p.Arg172Trp. L'un a présenté un début des signes à 18 ans, il a une AV à 5/10, n'a pas de pigments en périphérie et présente un remaniement maculaire. L'autre a débuté sa maladie à 50 ans, il a une AV à 1/20, une atrophie focalisée à la macula mais pas d'atteinte périphérique. Ces deux cas illustrent ainsi la variabilité interindividuelle. Le patient porteur de la délétion ne présente pas de forme plus sévère : l'héméralopie a débuté à 50 ans, l'atrophie est concentrée à la macula, il n'y a pas d'ostéoblastes en périphérie mais on y observe de fines lésions hyperautofluorescentes. L'ERG montre une altération de la réponse des bâtonnets. Le diagnostic de dystrophie mixte a été évoqué chez lui.



Figure 33 : Fond d'œil d'un patient porteur du variant p.Arg172Trp de PRPH2

Remaniements myopiques péripapillaires, remaniement maculaire avec un aspect pigmenté, moyenne périphérie sans particularité, pas de zone atrophique, pas d'ostéoblaste.

Fourni par le Dr Zanlonghi

C. Patients porteurs d'un variant *RPI*

Cinq patients porteurs d'un variant délétère *RPI* étaient bien caractérisés sur le plan phénotypique. L'âge de début de l'héméralopie est compris entre 18 et 55 ans (moyenne à 36.6 ans ; n=5). L'AV n'est connue que pour 1 cas : 5/10, mais l'atteinte centrale du CV et un scotome annulaire sont présents chez plusieurs patients. Au FO, on note une atrophie de l'épithélium pigmentaire, quelques ostéoblastes en périphérie dans la moitié des cas, une rétine dépigmentée en périphérie, les papilles sont pâles et les vaisseaux sont grêles. L'AF montre une hyperautofluorescence en anneau maculaire et une hypoautofluorescence en 2^{ème} couronne. La périphérie est hypoautofluorescente. A l'OCT on observe en périphérie une perte de la ligne éllipsoïde et un œdème maculaire dans 2 cas sur 5. L'ERG montre une atteinte en photopique et une absence de réponse en scotopique (réponse des bâtonnets). Tous les cas sont des formes modérées, lentes, touchant les cônes et les bâtonnets (atteinte mixte). En plus des 5 cas décrits ci-dessus, Audo et al., 2011 a rapporté 7 autres patients avec mutations *RPI*, également analysés au laboratoire dans le cadre du PHRC (43). Ils rapportent aussi une pénétrance variable, un âge moyen d'apparition de l'héméralopie à 23 ans, une AV allant de 20/25 à 20/800, une cataracte chez quelques patients et une vision centrale relativement préservée. Le CV était concentrique, avec une atteinte de la rétine globale avec parfois préservation de la fonction maculaire centrale. Au FO, on constate des pigments à la périphérie, des vaisseaux grêles, des papilles pâles. La FAF objective une atrophie avec perte de l'AF en perifovéolaire et en dehors de l'arcade vasculaire. Un cas présentait un œdème cystoïde maculaire. A l'OCT, on retrouve une conservation relative de la ligne au niveau de la fovéa, une macula plus fine avec parfois une perte des PR. Enfin, une dyschromatopsie était présente dans la moitié des cas.

Concernant nos 5 patients précédemment décrits, tous portent des variants non-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture situés dans l'exon 4 comme classiquement retrouvé

dans les formes dominantes liées au gène *RPI*. Deux délétions avec décalage du cadre de lecture ne sont pas décrites dans la littérature et sont identifiées chez deux patients avec un début plus tardif à 48 et 55 ans contre 13, 18 et 19 ans pour les variants connues qui elles sont des variants faisant apparaître un codon stop prématuré.



Figure 34 : Fond d'œil d'un patient porteur du variant *RPI* p.Arg677*.

Au FO, atrophie de l'épithélium pigmentaire périphérique avec des multiples ostéoblastes, papille bien colorée et calibre vasculaire préservé, fourni par le Dr Zanlonghi

A.

B.

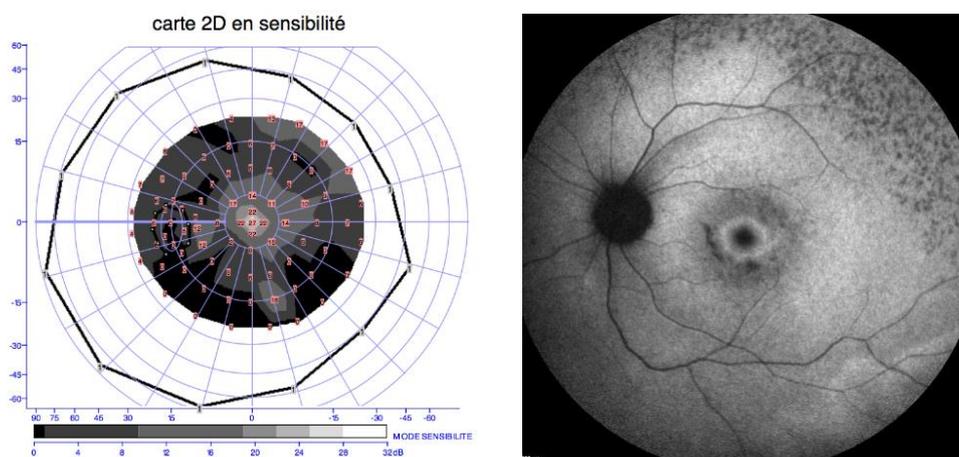


Figure 35 : Champ visuel (A) et autofluorescence révélée par l'angiographie (B) d'une patiente avec un variant *RPI* p.Arg396*.

CV avec scotome central mais pas d'atteinte de la périphérie. A l'autofluorescence anneau d'hyperautofluorescence périfovéolaire serré. Plus en périphérie on retrouve des patches arrondis d'hypoautofluorescence plus marquée en supérieur qu'en inférieur, et au-delà de ces petites tâches d'hypoautofluorescence discret liseré hyperautofluorescent sur pratiquement 360°.

D. Patients porteurs d'une mutation *PRPF31*

Seulement trois patients seront décrits partiellement dans ce paragraphe, leur héméralopie a débuté à 6, 15 et 45 ans. L'**AV** est conservée (10/10) dans 2/3 des cas mais avec une réduction du **CV** périphérique. En plus de l'héméralopie, une photophobie est présente chez le patient de 15 ans. On observe des ostéoblastes en périphérie sauf chez le plus jeune patient. Chez ce dernier, les vaisseaux sont normaux mais on note une anomalie du reflet fovéolaire. Une atrophie péripapillaire est rapportée dans un cas, chez qui l'atteinte des bâtonnets est confirmée à l'ERG.

Les 3 cas présentés portent respectivement une délétion d'un nucléotide (début à 6 ans), un variant non sens (début à 15 ans) et un variant faux-sens (début à 45 ans).

E. Patients porteurs d'une mutation *NR2E3*

NR2E3 est également responsable à l'état muté homozygote de formes particulières comme le syndrome de Goldmann Favre. Nous avons identifié 3 patients avec un Goldmann Favre. Tous sont des cas très précoces. Nous décrirons plutôt les trois cas bien documentés, avec une mutation hétérozygote de *NR2E3* (RP dominante).

Le premier cas porte une mutation d'épissage connue. Sa pathologie a débuté à 13 ans, son **AV** est de 10/10, le **CV** est tubulaire, il présente un début de cataracte et une anomalie du vitré. Au **FO**, on observe de nombreux dépôts à 360° en périphérie mais la macula est préservée. Certaines zones de la rétine périphérique sont épargnées. Le calibre des vaisseaux est diminué et les papilles bien colorées. A la **FAF**, on note des plages d'atrophie en moyenne périphérie avec un anneau en périphérie maculaire. A l'**OCT**, il existe un épaissement de la fovéa et en périfovéolaire en nasal. Il n'y a pas d'œdème maculaire. La ligne ellipsoïde reste visible bien que fine. L'**ERG** scotopique n'est pas enregistrable à stimulation faible mais il le devient à de plus fortes intensités. L'ERG photopique est à 10% de la normale. L'implication

de *RDH12* était suspectée chez ce jeune patient (*NR2E3* étant positif, *RDH12* n'a pas été analysé). Le second patient ayant présenté son héméralopie à 4 ans porte un VSI prédit délétère. Son AV est à 5/10 avec un CV central correct et sa RP est d'évolution lente et progressive. Enfin, le troisième cas porte un VSI prédit non délétère. Il débute ses symptômes à 58 ans. Son AV est de 6/10 avec un scotome annulaire absolu. Au FO, les papilles sont pâles, les vaisseaux grêles, la macula est correcte mais on note des plages d'atrophie chorioretinienne à l'emporte-pièce ainsi que des ostéoblastes en périphérie. L'OCT montre une disparition de la ligne des photorécepteurs en périphérie et un ERG photopique altéré avec un scotopique effondré. Le diagnostic évoqué était celui d'une rétinite pigmentaire en secteur.

Un article de Blanco Kelly et al., en 2016 rapportent la description de 7 cas positifs *NR2E3* sur 201 testés, indiquant une prévalence de 3.5% dans la population espagnole (44). La seule mutation identifiée est la p.Gly56Arg. A noter que cette mutation a fréquemment été retrouvée chez les patients de la cohorte du PHRC. Dans la population décrite, le début de l'héméralopie est à 15.9 +/- 10.0 ans (de 3 à 57 ans). Le CV diminue de façon variable, la vision tubulaire apparaît à 30 ans et reste stable. La BAV apparaît vers 50 ans. Trois patients étaient aveugles vers 53, 60 et 71 ans. La moitié des cas présentait une cataracte vers 30 ans. Au FO, on observe une grande variabilité intrafamiliale, une RP typique, la macula est parfois touchée (47.4%) avec une AV préservée. Les vaisseaux et les papilles sont normaux. On observe fréquemment des anomalies du vitré (corps flottants). L'ERG est altéré dès le début de la maladie (vers 10 ans) et n'est plus enregistrable vers 50 ans.

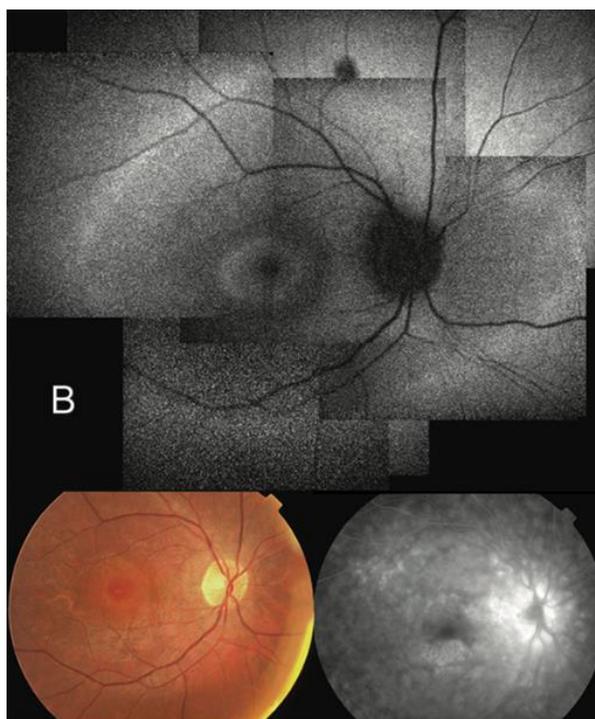


Figure 36: Phénotype d'un patient de 13 ans, d'après Coppierters F et al., 2007.

En haut, la FAF, en bas, le fond d'œil et l'angiographie à une phase tardive du pôle postérieur. A noter la présence de deux anneaux d'hyperAF, un autour de la fovea en oeil de boeuf et l'autre en moyenne périphérie au-delà de l'arcade vasculaire temporale et en nasal par rapport au disque optique (oeil droit). On observe une atrophie chorio-rétinienne diffuse dans les aires correspoN.R.ant aux anneaux d'hyper AF visibles au FO et à l'angiographie. Discret rétrécissement des vaisseaux rétiniens



Figure 37: Fond d'œil d'une patiente avec un Goldmann Favre,

Présence d'ostéoblastes en périphérie. La patient est porteuse homozygote de la mutation *NR2E3* IVS1-2A>C, fourni par le Dr Zanlonghi

DISCUSSION

625 patients ont bénéficié au moins d'une recherche de variant de rétinite pigmentaire de transmission autosomique dominante, faisant de cette étude la plus grosse cohorte internationale.

I. Comparaison aux études internationales

Nous avons identifié un variant (probablement) pathogène chez 34,24% de notre cohorte, alors que les prévalences de la littérature varient entre 27% à 70% des populations étudiés. La différence de résultats positifs peut s'expliquer par plusieurs raisons.

La première explication est le mode de recrutement de nos patients ; Daiger en 2014 a établi un diagnostic moléculaire chez 69,2% des patients mais les familles étaient sélectionnées si la maladie affectait au moins 3 générations ou 2 générations avec une transmission paternelle en faveur d'un mode autosomique dominant (45). Parmi nos patients testés par séquençage Sanger, 240 étaient issus d'un PHRC national avec un phénotype bien caractérisé et de transmission autosomique dominante. Le reste de la cohorte correspond aux demandes de diagnostic moléculaire du laboratoire incluses au fil de l'eau. Pour certains de ces patients, le mode de transmission était peu clair en raison de l'absence de renseignement clinique et donc probablement lié à l'X ou récessif. Le recrutement plus strict du PHRC explique également notre meilleur taux diagnostique par Sanger.

Dans l'analyse du panel 150 gènes, nous avons choisi de ne pas attribuer de causalité aux variants si le gène n'avait jamais été décrit dans la rétinite pigmentaire. A l'inverse, Ge et al.,

(19) et Huang et al., (46) estiment que 2,8% à 13% de leurs cohortes portent des variants dans des gènes associés à d'autres rétinoopathies (dégénération maculaire, dystrophie cornéo-rétinienne cristalline de Bietti, rétinoopathies dans le cadre syndromique ou systémique, amaurose congénitale de Leber) et contribueraient ainsi à l'hétérogénéité génétique de la maladie. Nous sous-estimons donc probablement à tort notre taux diagnostique dans le panel 150 gènes mais il paraît complexe d'incriminer des gènes non décrits dans la littérature et pour lesquels aucun modèle animal n'a été étudié. Nous avons donc été plus stricts sur nos critères de validation.

Les techniques utilisées expliquent également notre taux plus faible de positif. Les études ayant établi des taux diagnostiques plus élevés ont recours à l'analyse de l'exome ou du génome (19,31,46).

Sur le plan clinique, nos cas sont conformes aux descriptions de la littérature. Il serait intéressant de poursuivre la collecte des renseignements cliniques des patients positifs afin de confirmer ces observations préliminaires. Néanmoins, jusqu'à présent, le nombre de cas décrits dans la littérature reste très modeste, excepté pour *PRPH2* (42) et *NR2E3* (44).

On ne constate pas de différences dans la sévérité des signes cliniques en fonction du type de variant ou de sa localisation, sauf pour *PRPF31* pour lequel on observe une atteinte plus précoce avec un variant entraînant un décalage du cadre de lecture, qui génère une protéine tronquée et/ou une absence de synthèse de protéine, que la forme liée à un codon stop, qui elle ne permet pas la synthèse de protéine.

II. Prévalence des gènes

RHO

La prévalence de *RHO* dans notre étude est de **10,56%**, elle est proche de la prévalence des autres populations européennes (Allemagne –Suisse : 13,7%, Belgique : 14%) plus élevée que dans la population chinoise (4,5%) mais plus basse que dans la population espagnole (21%) et américaine (26,9%) (13,18,46–48). Les variants sont en majorité des faux-sens (96%) et 16 d'entre eux n'ont jamais été décrits dans la littérature. Les variants les plus fréquemment identifiés dans notre cohorte sont p.Arg135Trp (n=10), p.Ser127Phe (n=4), p.Cys167Trp (n=3) et p.Pro347Leu (n=3) qui est le variant le plus fréquent en Europe. Nous avons également trouvé un variant à l'état homozygote p.Gly114Ser, deux variants à l'état hétérozygote chez un patient p.[(Gly106Arg(;);Arg147Cys)] et un allèle complexe p.[(Asn55Ser;Leu84Pro)] pour lequel la pathogénicité a été confirmée par une étude familiale. A notre connaissance, il n'y a aucun allèle complexe décrit pour *RHO* dans la littérature.

PRPH2

La prévalence de *PRPH2* dans la littérature est variable selon l'origine de la population : Espagne 1,2%, Belgique 4,7% et Etats-Unis 7,5% (13,24,45). Nous l'avons estimé à **4,96 %** dans notre cohorte qui se répartit en variant faux-sens à 71%, épissage 13%, frameshift 9,5% et non-sens 6,5%. Les variants se concentrent sur les exons 1 et 2 du gène. Les variants les plus fréquents sont c.829-4C>G (n=4) et p.Trp179Arg (n=3).

RPI

Les variants dans le gène *RPI* sont estimés à **4%** dans notre population, proche de la prévalence de la population espagnole (3,5%), américaine (3,6% à 5,6%) italienne (5%) mais inférieure à la prévalence de la population belge (10,5%). *RPI* se compose de 4 exons et code

pour une protéine de 2156 acides aminés localisée dans le cil connecteur du photorécepteur. L'interprétation des variants de *RPI* est plus complexe qu'elle n'y paraît car le gène serait responsable de rétinite pigmentaire dominante ou récessive selon la localisation et le type de variant. Berson et al., (9) ont suggéré que les variants non-sens du hot-spot de l'exon 4 échapperaient au système NMD (Nonsense-Mediated Decay) et produirait une protéine tronquée dont les effets délétères conduiraient à la dégénérescence rétinienne (effet dominant négatif) des formes dominantes de la maladie. Le système NMD est un mécanisme de surveillance visant à éliminer les ARN messager portant des variants non sens (codon stop prématuré) afin d'éviter la production de protéine tronquée, potentiellement néfaste à la cellule. Chen et al. a proposé de classer les mutations en 4 catégories (8). Les variants de classe I sont localisés dans les exons 2 et 3 et sont sensibles au système NMD. Ils entraînent une perte de fonction de la protéine et sont impliqués dans les formes récessives. Les variants de classe II sont les plus fréquents, ils se situent dans un hot-spot de l'exon 4 entre les acides aminés 500 et 1053. Les variants sont en majorité des délétions entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré, insensibles au système NMD et produisant une protéine tronquée. Les variants de classe III sont localisés dans l'exon 4 en dehors du hot spot mutationnel (p.264 à 499 et p.1054 à 1751), ils entraîneraient une perte de fonction et seraient responsables de formes récessives. Les variants de classe IV sont situés dans l'exon 4 après l'acide aminé 1816, ils seraient insensibles au système NMD et n'impactent pas la fonction de la protéine.

Sur les 25 variants identifiés, la majorité (n=22) se localise dans le hot-spot mutationnel de l'exon 4 entre les acides aminés 500 et 1053. Les 3 autres variants sont situés sur l'exon 4 en dehors du hot-spot et seraient classés en catégorie III : la p.Arg396* a été identifiée chez une patiente atteinte d'une rétinite pigmentaire de forme sporadique, les variants p.Gln1147* et p.Cys1657* chez deux patients dont nous ne disposons pas d'information clinique, aucune

étude familiale n'a été réalisée chez ces patients.

PRPF31

La prévalence de *PRPF31* dans notre étude est de **2,88%**, elle est inférieure aux prévalences rapportées dans la littérature : Espagne 7,6%, Etats-Unis 8,7%, Belgique 10,5%, (13,45,49). Dix-huit variants, répartis sur l'ensemble du gène, ont été identifiés : 5 variants frame-shift (27,8%), 5 variants non-sens (27,8%), 4 variants d'épissage (22,2%), 3 variants faux sens (16,6%) et 1 délétion (5,6%). Chaque mutation a été trouvée 1 fois à l'exception de la p.Gln411* (n=2). La majorité des variants de la littérature et de notre étude entraîne une perte de fonction provoquée par un codon stop prématuré ou des transcrits alternatifs susceptibles d'être dégradés par le système NMD. Nous observons un biais de sexe, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature (46), avec plus de femmes (77,8%) porteuses d'anomalies sur le gène *PRPF31* que d'hommes (22,2%). Enfin, une pénétrance incomplète a été observée dans 17% des familles de notre cohorte. La pénétrance incomplète chez les porteurs asymptomatiques serait liée à la surexpression de l'allèle wild-type pour compenser l'allèle muté. Une autre hypothèse proposée par Rose et al serait la présence d'éléments modulateurs MSR1 localisés en amont du promoteur qui régulerait l'activité transcriptionnelle de *PRPF31* (49). Par ailleurs, nos techniques ne permettaient pas jusqu'à présent de détecter les grandes délétions ou duplications, décrites dans *PRPF31*, ce qui pourrait expliquer notre faible prévalence.

Gènes de l'X

Le gène *RP2* a été identifié chez **0,8%** de notre cohorte avec une prévalence identique à la population américaine. Le gène *RPGR* a été incriminé chez **1,44%** de notre cohorte, un taux bien inférieur à ceux rapportés dans la littérature de 8,3% dans une cohorte américaine (45) de rétinite pigmentaire autosomique dominante et 13,5% dans une cohorte de patients

sporadique (50).

Churchill et al., a identifié des variants dans des gènes liées à l’X chez 8,5% de ses patients étiquetés initialement autosomiques dominants (51). Les rétinites pigmentaires liées à l’X touchent les hommes mais de nombreux cas ont été décrits dans la littérature avec des femmes conductrices aux phénotypes variables allant d’une forme asymptomatique à des atteintes sévères similaires aux hommes, faisant déduire à tort à des formes dominantes.

La première explication de la faible prévalence dans notre cohorte est l’absence de séquençage dans les gènes de rétinite pigmentaire lié à l’X par le séquençage Sanger chez 337 patients. Le taux de détection de gènes liés à l’X calculé sur les patients testés par les panels 12 et 18 gènes est cette fois de **4,5%**.

La seconde raison est l’absence de séquençage complet de la région ORF15 du gène *RPGR*. Le transcrit ubiquitaire de *RPGR* est constitué de 19 exons mais une dizaine de transcrits alternatifs codant pour différents isoformes de protéine ont été rapportés. L’isoforme *RPGR-ORF15* est largement produit dans la rétine, elle ne se compose que des 15 premiers exons de la forme ubiquitaire et d’une portion de l’intron 15 donnant un exon terminal ORF15 propre à l’isoforme. La protéine *RPGR-ORF15* se localise dans le cil connecteur des photorécepteurs et interagirait avec d’autre protéine pour réguler la fonction ciliaire et faciliter le transport des protéines le long du cil. L’ORF15 est une région hautement répétitive et riche en purines (base adénine et guanine) qui provoque l’arrêt ou glissement (dérapage) (*slippage*) de l’ADN polymérase au cours de la réplication, rendant cette région un hot-spot de mutations. La région est difficile à séquencer et peu couverte par le séquençage haut-débit dans la littérature (52). Au cours de notre étude, nous avons partiellement étudié cette région et nous avons détecté 2 variants de l’ORF15 parmi les 9 patients porteur d’un variant *RPGR* soit 22,2% alors que les mutations de l’ORF15 compteraient pour 57 à 73% des mutations du gène *RPGR* (51,53) Il est donc fort probable que nous sous-estimions la prévalence de *RPGR* dans

notre cohorte par l'absence de séquençage complet de l'ORF15. Plusieurs méthodes sont proposées dans la littérature pour améliorer la détection de variants : séquençage complémentaire par Sanger avec de multiples primers chevauchant la région (52), sous-clonage de la région (51), ou amplification spécifique de l'ORF15 avec une DNA polymérase Takara suivi d'un séquençage haut débit (54)

NR2E3 et NRL

Les deux gènes sont impliqués dans les formes récessives et dominantes de rétinite pigmentaire. Ce sont des facteurs de transcription qui agissent dans la différenciation des photorécepteurs en bâtonnets en réprimant l'expression de gènes spécifiques aux cônes et en activant des gènes propres aux bâtonnets.

Le gène *NR2E3* représente **3,04%** de notre cohorte, la prévalence est évaluée à 1,2% à 6,8% (13,24,44,45,47) des formes dominantes de rétinites pigmentaires dans la littérature. Le variant le plus fréquent dans la littérature est c.166G>A, p.Gly56Arg qui par un effet dominant négatif est impliqué dans la rétinite pigmentaire autosomique dominante. Le variant c.166G>A, p.Gly56Arg a été retrouvé chez 8 patients et le variant c.166G>C, p.Gly56Arg chez 2 patients. Les autres variants les plus cités dans les études sont c.199-2A>C et p.Arg311Gln, mais ils sont souvent identifiés à l'état homozygote ou hétérozygote composite dans le syndrome de Goldmann-Favre ou Enhanced S-Cone Syndrome. Le variant p.Arg311Gln a été identifié chez une patiente à l'état homozygote. Le variant c.199-2A>C a été trouvé deux fois à l'état hétérozygote et deux fois à l'état homozygote pour des patients dont la révision du phénotype est plus évocateur d'un syndrome de Goldman-Favre.

Les mutations de *NRL* contribueraient à moins de 1% des rétinites pigmentaires autosomiques dominantes (45) et nous n'avons identifié qu'un patient porteur d'un variant de ce gène.

Autres facteurs de transcription *snRNP200*, *PRPF3* et *PRPF8*

La prévalence du facteur d'épissage *snRNP200* est de **1,76%** dans notre étude, sa prévalence a été rapportée entre 0,8% à 3,5% dans les populations caucasiennes et jusqu'à 9% dans la population chinoise (13,45–47). Parmi les variants de notre étude, 10 sont des faux sens (91%) et le variant restant est un variant d'épissage. Les exons 16 et 25 sont le siège de 2 variants récurrents p.Arg681Cys (n=3) et p.Ser1087Leu (n=3).

Les variants de *PRPF3* est estimé à **1,6%**, les taux dans les autres populations sont de 1,2 à 3,5% (18,24,47). Le hot-spot mutationnel se situe dans l'exon 11 avec deux mutations récurrentes p.Ala489Pro (n=4) et p.Thr494Met (n=3).

La prévalence de *PRPF8* est de **1,12%** dans notre population, inférieure au 2, à 5,8% de la littérature (13,44). La majorité des mutations se situe dans l'exon 43 et sont des variants faux sens (71%). Chaque variant a été identifié une fois et la pénétrance est incomplète dans 28,5% des cas. Contrairement à *PRPF31*, nous n'observons pas de biais de sexe dans les gènes *snRNP200*, *PRPF3* et *PRPF8*.

Variations du nombre de copie (CNV)

Depuis 2017, il nous est possible de rechercher les CNV sur le panel 18 gènes et 150 gènes. Les CNV du gène *PRPF31* ont été décrits et compteraient pour 1,9% des rétinites pigmentaires (49). Nous n'avons trouvé aucun CNV sur le panel 18 gènes et nous suspectons une duplication du gène *RP9* chez un patient analysé par le panel 150 gènes, pour lequel une vérification par Taqman est nécessaire.

TOPORS

Nous n'avons identifié aucun variant dans le gène *TOPORS* parmi les patients testés sur le panel 150 gènes, la prévalence du gène dans la littérature est pourtant de 1,2% (13,45).

III. Stratégie d'analyse au laboratoire du CHRU de Lille

Les techniques de séquençage haut débit permettent donc de séquencer un grand nombre de gènes plus rapidement et à moindre coût. Le panel 12 gènes a été employé entre 2014 et 2017 et depuis mai 2017, le panel 18 gènes est utilisé pour le diagnostic moléculaire en routine diagnostique. Le panel 18 gènes présente l'avantage d'une analyse des données plus rapide et l'étude des CNV. De plus, en séquençant des gènes de rétinite pigmentaire et de maculopathie, il permet d'étudier en une seule technique les phénotypes chevauchants. Le panel 150 gènes n'est réalisé qu'en seconde intention chez des patients dont le diagnostic n'a pu être établi. Enfin, le séquençage Sanger est utilisé pour la confirmation de variants identifiés par le séquençage haut débit.

Le panel 150 gènes, en screenant des gènes de dystrophies rétiniennes a permis d'élucider des cas atypiques, mais aucun diagnostic moléculaire n'a pu être établi chez 2 familles de rétinite pigmentaire autosomique dominante très caractérisées sur le plan phénotypique, nous faisant suspecter que le gène responsable de la maladie ne soit pas sur notre panel.

Une part importante des rétinites pigmentaires reste inexplicée dans notre étude et dans la littérature (28 à 73%). Parmi les gènes connus de rétinite pigmentaire, des régions restent difficiles à séquencer (ORF15) et des variants peuvent être complexes à identifier car localisés dans des régions non codantes ou des régions régulatrices. Il existe très probablement des gènes de rétinites pigmentaires non décrits, le séquençage d'exome ou de génome serait une bonne stratégie car il couvre plus de régions et met en évidence des variants dans des gènes sans se limiter à un panel restreint, la détection des grands réarrangements et les mutations introniques profondes. L'analyse d'exomes ou de génomes autorisent aussi la ré-analyse de données en incrémentant les gènes à étudier.

CONCLUSION

La rétinite pigmentaire est une maladie rare pour laquelle aucun traitement curatif n'existe à l'heure actuelle. L'identification de l'anomalie moléculaire facilite la compréhension du mécanisme de dégénérescence et permettra probablement d'inclure les patients dans des essais thérapeutiques dans les années futures.

Notre étude porte sur 625 patients atteints de rétinites pigmentaires de forme dominante ou liée à l'X et a établi un diagnostic moléculaire chez 33,12% d'entre eux. Nous avons montré que le séquençage haut débit permet de séquencer un grand nombre de gènes pour un coût réduit. Le grand panel de gènes a élucidé des formes atypiques mais l'interprétation complexe des variants identifiés ne peut se faire sans une description précise du phénotype.

Enfin une part importante des rétinites pigmentaires reste inexpliquée, probablement liée à l'hétérogénéité génétique et aux gènes non encore décrits. L'analyse des CNV et l'amélioration du séquençage de l'ORF15 du gène *RPGR* permettront d'augmenter notre rendement diagnostique, mais dans le cas de familles négatives dont la clinique est très évocatrice le recours à l'analyse de l'exome ou du génome semble indispensable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *The Lancet*. 2006 Nov 18;368(9549):1795–809.
2. Sung C-H, Chuang J-Z. The cell biology of vision. *J Cell Biol*. 2010 Sep 20;190(6):953–63.
3. Behar-Cohen F, Kowalczyk L, Keller N, Savoldelli M, Azan F, Jeanny J-C. Anatomie de la rétine. EMC - Ophtalmol. 2009 Jan;6(1):1–14.
4. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*. 2010 Mar 9;11(4):273–84.
5. Salesse C. [Physiology of the visual retinal signal: From phototransduction to the visual cycle]. *J Fr Ophtalmol*. 2017 Mar;40(3):239–50.
6. Bocquet B, Lacroux A, Surget M-O, Baudoin C, Marquette V, Manes G, et al. Relative frequencies of inherited retinal dystrophies and optic neuropathies in Southern France: assessment of 21-year data management. *Ophthalmic Epidemiol*. 2013;20(1):13–25.
7. Meunier I. Hérédodégénérescences rétinienne (volume 2 - coffret rétine). Lavoisier; 2014. 243 p.
8. Chen LJ, Lai TYY, Tam POS, Chiang SWY, Zhang X, Lam S, et al. Compound Heterozygosity of Two Novel Truncation Mutations in RP1 Causing Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Apr 1;51(4):2236–42.
9. Berson EL, Grimsby JL, Adams SM, McGee TL, Sweklo E, Pierce EA, et al. Clinical Features and Mutations in Patients with Dominant Retinitis Pigmentosa-1 (RP1). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Sep 1;42(10):2217–24.
10. Loewen CJ, Moritz OL, Molday RS. Molecular characterization of peripherin-2 and rom-1 mutants responsible for digenic retinitis pigmentosa. *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22388–96.
11. Dryja TP, Hahn LB, Kajiwarra K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997 Sep;38(10):1972–82.
12. Gao F-J, Zhang S-H, Chen J-Y, Xu G-Z, Wu J-H. Digenic heterozygous mutations in EYS/LRP5 in a Chinese family with retinitis pigmentosa. *Int J Ophthalmol*. 2017 Feb 18;10(2):325–8.
13. Van Cauwenbergh CV, Coppieters F, Roels D, Jaegere SD, Flipts H, Zaeytijd JD, et al. Mutations in Splicing Factor Genes Are a Major Cause of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Belgian Families. *PLOS ONE*. 2017 Jan 11;12(1):e0170038.

14. Zhang Q, Xu M, Verriotto JD, Li Y, Wang H, Gan L, et al. Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 35 Hispanic retinitis pigmentosa probands. *Sci Rep.* 2016 Sep 6;6:srep32792.
15. Maubaret CG, Vaclavik V, Mukhopadhyay R, Waseem NH, Churchill A, Holder GE, et al. Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa with Intrafamilial Variability and Incomplete Penetrance in Two Families Carrying Mutations in PRPF8. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Dec 1;52(13):9304–9.
16. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Sep 1;29(5):335–75.
17. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Oct 11;1:40.
18. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Oct 10;5(10).
19. Ge Z, Bowles K, Goetz K, Scholl HPN, Wang F, Wang X, et al. NGS-based Molecular diagnosis of 105 eyeGENE® probands with Retinitis Pigmentosa. *Sci Rep.* 2015 Dec 15;5:srep18287.
20. Carss KJ, Arno G, Erwood M, Stephens J, Sanchis-Juan A, Hull S, et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am J Hum Genet.* 2017 Jan 5;100(1):75–90.
21. Farrar GJ, Carrigan M, Dockery A, Millington-Ward S, Palfi A, Chadderton N, et al. Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Hum Mol Genet* [Internet]. [cited 2017 Jul 14]; Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/doi/10.1093/hmg/ddx185/3828555/Toward-an-elucidation-of-the-molecular-genetics-of>
22. Haer-Wigman L, van Zelst-Stams WA, Pfundt R, van den Born LI, Klaver CC, Verheij JB, et al. Diagnostic exome sequencing in 266 Dutch patients with visual impairment. *Eur J Hum Genet.* 2017 May;25(5):591–9.
23. Ellingford JM, Barton S, Bhaskar S, O’Sullivan J, Williams SG, Lamb JA, et al. Molecular findings from 537 individuals with inherited retinal disease. *J Med Genet.* 2016 Nov 1;53(11):761–7.
24. Jose PF-S, Corton M, Blanco-Kelly F, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Sanchez-Navarro I, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Improves the Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in Spanish Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Apr 1;56(4):2173–82.
25. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med.* 2008 Apr;10(4):294–300.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405–23.

27. Zhao L, Wang F, Wang H, Li Y, Alexander S, Wang K, et al. Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of 82 retinitis pigmentosa probands from Northern Ireland. *Hum Genet.* 2015 Feb;134(2):217–30.
28. Carrigan M, Duignan E, Malone CPG, Stephenson K, Saad T, McDermott C, et al. Panel-Based Population Next-Generation Sequencing for Inherited Retinal Degenerations. *Sci Rep.* 2016 Sep 14;6:srep33248.
29. Weisschuh N, Mayer AK, Strom TM, Kohl S, Glöckle N, Schubach M, et al. Mutation Detection in Patients with Retinal Dystrophies Using Targeted Next Generation Sequencing. *PLOS ONE.* 2016 Jan 14;11(1):e0145951.
30. Tiwari A, Bahr A, Bähr L, Fleischhauer J, Zinkernagel MS, Winkler N, et al. Next generation sequencing based identification of disease-associated mutations in Swiss patients with retinal dystrophies. *Sci Rep.* 2016 Jun 29;6:srep28755.
31. Riera M, Navarro R, Ruiz-Nogales S, Méndez P, Burés-Jelstrup A, Corcóstegui B, et al. Whole exome sequencing using Ion Proton system enables reliable genetic diagnosis of inherited retinal dystrophies. *Sci Rep.* 2017 Feb 9;7:srep42078.
32. Khateb S, Hanany M, Khalaileh A, Beryozkin A, Meyer S, Abu-Diab A, et al. Identification of genomic deletions causing inherited retinal degenerations by coverage analysis of whole exome sequencing data. *J Med Genet.* 2016 Sep 1;53(9):600–7.
33. Van Cauwenbergh C, Van Schil K, Cannoodt R, Bauwens M, Van Laethem T, De Jaegere S, et al. arrEYE: a customized platform for high-resolution copy number analysis of coding and noncoding regions of known and candidate retinal dystrophy genes and retinal noncoding RNAs. *Genet Med.* 2017 Apr;19(4):457–66.
34. Schorderet DF, Escher P. NR2E3 mutations in enhanced S-cone sensitivity syndrome (ESCS), Goldmann-Favre syndrome (GFS), clumped pigmentary retinal degeneration (CPRD), and retinitis pigmentosa (RP). *Hum Mutat.* 2009 Nov 1;30(11):1475–85.
35. Liu MM, Zack DJ. Alternative splicing and retinal degeneration. *Clin Genet.* 2013 Aug 1;84(2):142–9.
36. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008 Oct;26(10):1135–45.
37. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):31–46.
38. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 Jun;17(6):333–51.
39. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):53–9.
40. Zernant J, Lee W, Collison FT, Fishman GA, Sergeev YV, Schuerch K, et al. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of ABCA4 disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J Med Genet.* 2017 Jun 1;54(6):404–12.

41. Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, et al. RHO Mutations (p.W126L and p.A346P) in Two Japanese Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa [Internet]. *Journal of Ophthalmology*. 2014 [cited 2017 Sep 24]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/joph/2014/210947/>
42. Manes G, Guillaumie T, Vos WL, Devos A, Audo I, Zeitz C, et al. High Prevalence of PRPH2 in Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in France and Characterization of Biochemical and Clinical Features. *Am J Ophthalmol*. 2015 Feb 1;159(2):302–14.
43. Audo I, Mohand-Saïd S, Dhaenens C-M, Germain A, Orhan E, Antonio A, et al. RP1 and autosomal dominant rod-cone dystrophy: novel mutations, a review of published variants, and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat*. 2012 Jan;33(1):73–80.
44. Blanco-Kelly F, García Hoyos M, Lopez Martinez MA, Lopez-Molina MI, Riveiro-Alvarez R, Fernandez-San Jose P, et al. Dominant Retinitis Pigmentosa, p.Gly56Arg Mutation in NR2E3: Phenotype in a Large Cohort of 24 Cases. *PloS One*. 2016;11(2):e0149473.
45. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Weinstock GM, Koboldt DC, et al. Application of Next-Generation Sequencing to Identify Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (adRP). In: *Retinal Degenerative Diseases* [Internet]. Springer, New York, NY; 2014 [cited 2017 Sep 24]. p. 123–9. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3209-8_16
46. Huang L, Zhang Q, Huang X, Qu C, Ma S, Mao Y, et al. Mutation screening in genes known to be responsible for Retinitis Pigmentosa in 98 Small Han Chinese Families. *Sci Rep*. 2017 May 16;7(1):1948.
47. Glöckle N, Kohl S, Mohr J, Scheurenbrand T, Sprecher A, Weisschuh N, et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jan 1;22(1):99–104.
48. Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, Corton M, Trujillo-Tiebas M-J, Gimenez A, Avila-Fernandez A, et al. Prevalence of Rhodopsin mutations in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa in Spain: clinical and analytical review in 200 families. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 2015 Feb 1;93(1):e38–44.
49. Martin-Merida I, Sanchez-Alcudia R, Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, Perez-Carro R, Rodriguez-Jacy da Silva L, et al. Analysis of the PRPF31 Gene in Spanish Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa Patients: A Novel Genomic Rearrangement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Feb 1;58(2):1045–53.
50. Branham K, Othman M, Brumm M, Karoukis AJ, Atmaca-Sonmez P, Yashar BM, et al. Mutations in RPGR and RP2 Account for 15% of Males with Simplex Retinal Degenerative Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Dec 1;53(13):8232–7.
51. Churchill JD, Bowne SJ, Sullivan LS, Lewis RA, Wheaton DK, Birch DG, et al. Mutations in the X-Linked Retinitis Pigmentosa Genes RPGR and RP2 Found in 8.5% of Families with a Provisional Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Feb 1;54(2):1411–6.

52. Huang X-F, Wu J, Lv J-N, Zhang X, Jin Z-B. Identification of false-negative mutations missed by next-generation sequencing in retinitis pigmentosa patients: a complementary approach to clinical genetic diagnostic testing. *Genet Med*. 2015 Apr;17(4):307–11.
53. Bellingrath J-S, Ochakovski GA, Seitz IP, Kohl S, Zrenner E, Hanig N, et al. High Symmetry of Visual Acuity and Visual Fields in RPGR-Linked Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Sep 1;58(11):4457–66.
54. Li J, Tang J, Feng Y, Xu M, Chen R, Zou X, et al. Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn JMD*. 2016 Nov;18(6):817–24.

ANNEXES

Annexe 1 : Critères proposés par l'ACMG pour la classification de variant pathogène (26)

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) • Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene • Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact • Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

Annexe 2 : Critères proposés par l'ACMG pour la classification de variant bénin (26)

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see Table 6)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

Annexe 3: Combinaison de critères proposée pour la classification de variants (26)

Pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> <li style="padding-left: 20px;">(a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) <i>OR</i> <li style="padding-left: 20px;">(b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> <li style="padding-left: 20px;">(c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> <li style="padding-left: 20px;">(d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) (ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) <i>OR</i> (iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> <li style="padding-left: 20px;">(a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> <li style="padding-left: 20px;">(b) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> <li style="padding-left: 20px;">(c) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Very strong (PVS1) <i>AND</i> 1 moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> (ii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> 1–2 moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> (iii) 1 Strong (PS1–PS4) <i>AND</i> ≥ 2 supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> (iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) <i>OR</i> (v) 2 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 2 supporting (PP1–PP5) <i>OR</i> (vi) 1 Moderate (PM1–PM6) <i>AND</i> ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Stand-alone (BA1) <i>OR</i> (ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) <i>OR</i> (ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	<ul style="list-style-type: none"> (i) Other criteria shown above are not met <i>OR</i> (ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

AUTEUR : CHUNE

Valérie

Date de Soutenance : mardi 10 octobre 2017

Titre de la Thèse : Apport du Séquençage Haut Débit dans le diagnostic moléculaire de rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et liées à l'X : comparaison de quatre stratégies diagnostiques.

Thèse - Médecine - Lille 2017

Cadre de classement : Médecine

DES + spécialité : Biologie Médicale

Mots-clés : rétinite pigmentaire – séquençage haut débit- prévalence-diagnostic moléculaire

Contexte : La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie rare, caractérisée par une perte progressive de la vision, pour laquelle plus d'une cinquantaine de gènes ont été identifiés. Le laboratoire du CHRU de Lille est recours national pour le diagnostic moléculaire de ces pathologies depuis 2008, et utilise dorénavant le séquençage haut débit (SHD), qui permet une analyse étendue et non plus séquentielle et partielle des gènes. L'objectif de notre étude est d'évaluer la prévalence des gènes responsables de rétinites pigmentaires autosomiques dominantes et liés à l'X en France et de comparer quatre stratégies de diagnostic génétique développées pour leur identification.

Méthode : 625 patients issus de l'ensemble du territoire et atteints de RP ont été analysés entre 2008 et 2017, tout d'abord par séquençage ciblé des points chauds mutationnels par technique Sanger (n=337) puis par séquençage haut débit selon 3 modalités : i) un panel de 12 gènes le séquenceur PGM (Life Technologies) (n=193) ii) par un panel de 18 gènes (n=95) et iii) un panel de 150 gènes (n=32) sur séquenceurs Illumina.

Résultats : Un diagnostic moléculaire a été établi chez 33,12% des patients analysés. Les gènes les plus fréquemment identifiés sont *RHO* (10.56%) *PRPH2* (4.96%) et *RP1* (4%). Parmi les 265 variants identifiés, 106 n'ont jamais été décrits dans la littérature. Nous montrons que l'analyse par SHD, bien que permettant l'analyse de toutes les régions codantes des gènes, n'améliore pas significativement le nombre de diagnostics positifs par rapport au séquençage ciblé par méthode Sanger. Enfin les grands panels de gènes ont surtout permis d'élucider des formes récessives et atypiques sur le plan phénotypique. Le SHD offre également l'avantage d'une analyse simultanée d'un grand nombre de gènes pour un grand nombre de patients à moindre coût.

Conclusion : Nous rapportons l'analyse de la plus grande cohorte de rétinite pigmentaire sur le plan international. Ce travail a permis d'identifier un grand nombre de variants non décrits et de réaliser une corrélation génotype/phénotype. Une meilleure connaissance de ces pathologies et l'identification des gènes en cause est un prérequis pour de futures inclusions de ces patients dans des essais médicamenteux ou de thérapie génique

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Franck BROYLY

Assesseurs : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, Madame le Docteur Catherine VINCENT- DELORME, Madame le Docteur Sabine DEFOORT-DHELLEMES

Directrice de thèse : Madame le Docteur Claire-Marie DHAENENS

