

Mémoire de Maîtrise en médecine No 197

Comparaison des coûts du diagnostic  
moléculaire des rétinites pigmentaires entre  
le séquençage selon Sanger et un  
séquençage à haut débit

Cost comparison of molecular diagnosis of  
retinitis pigmentosa between Sanger and  
high-throughput sequencing

**Etudiant**

Bernasconi Maude

**Tuteur**

Prof. Daniel Schorderet  
Institut de Recherche en Ophtalmologie, Sion

Lausanne, décembre 2012

## **Abstract et mots-clés :**

La rétinite pigmentaire (RP) et l'amaurose congénitale de Leber (LCA) sont deux maladies héréditaires classées dans le groupe des rétinopathies pigmentaires. Plus de 100 gènes ou loci ont été identifiés dans les RP (comptant pour 60% des patients) et 14 gènes pour les LCA (responsables de 70% des cas). A elles-deux et en ne prenant que les plus fréquentes, ces maladies représentent 948 exons à analyser lorsqu'on recherche une mutation chez un patient. La recherche de mutations au moyen du séquençage génomique classique (séquençage selon Sanger) de tous les gènes de ces deux maladies implique des délais d'analyse importants et des coûts très élevés. La méthode de séquençage à haut débit (avec le séquenceur Roche GS Junior) permet grâce à une puce à ADN le séquençage simultané des 948 exons.

Le but de mon travail de Master est de comparer ces deux approches afin de déterminer celle qui est la plus économique et la plus efficiente en temps. Pour cela, j'ai d'abord établi la liste de tous les gènes impliqués dans les RP et LCA, puis identifié tous les exons ainsi que les promoteurs et séquences 3' non traduites. J'ai ensuite calculé le coût théorique d'une analyse de tous les gènes avec chacune des méthodes. J'ai également estimé les coûts à facturer à l'assurance concernant le séquençage à haut débit sur la base des coûts facturables à l'assurance de la méthode Sanger et des bénéfices du laboratoire.

Le séquençage des 948 exons par le séquençage à haut débit (avec le GS Junior) représente la technique de séquençage la plus économique et la plus efficiente en temps et constitue donc la méthode de choix dans le screening diagnostique des gènes impliqués dans les RP et LCA. Cette méthode est plus rapide, les réactifs et la machine sont moins coûteux et la laborantine peut analyser un nombre plus important d'exons en un temps moindre, donc elle coûtera moins cher au laboratoire. Cette méthode est donc d'un grand intérêt pour les patients, les assurances et le laboratoire. Cette nouvelle technique de séquençage soulève de nouvelles interrogations telles que la décision de savoir quelle information doit être donnée aux médecins, aux assurances et aux patients. Interrogations auxquelles il devient de plus en plus pressant de répondre.

Mots-clés : *rétinite pigmentaire, amaurose congénitale de Leber, Sanger, puce à ADN, GS Junior*

### Introduction:

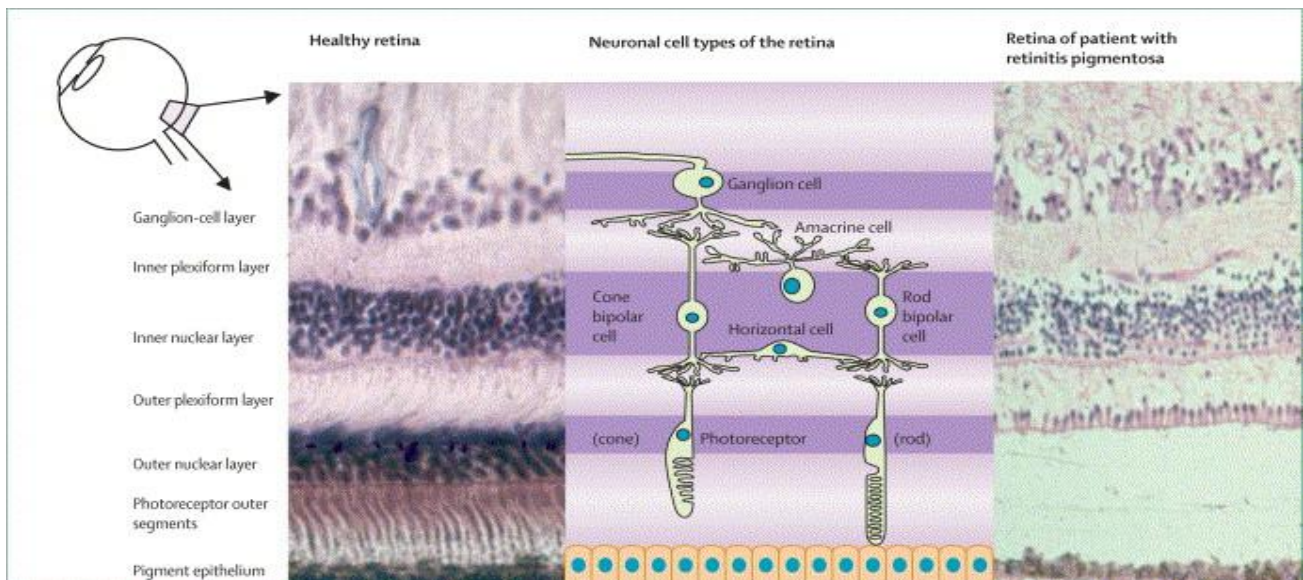


Figure 1 : Apparence histologique d'une rétine humaine saine (à gauche) et d'une rétine d'un patient avec rétinite pigmentaire à un stade moyen (à droite).

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0140673606697407-gr1.jpg>

La dénomination « rétinite pigmentaire » (RP) est le nom donné à un ensemble de maladies héréditaires de la rétine se caractérisant par une dystrophie de la rétine, des dépôts pigmentaires rétiniens et une dégénération des photorécepteurs par apoptose (figure 1). La forme la plus fréquente de RP (9 cas sur 10) est une dystrophie dite à bâtonnets prédominants (rod cone dystrophy) dans laquelle la dégénération de la rétine débute de la périphérie pour progresser en direction centrale. Cela se traduit cliniquement par la perte de la vision nocturne durant l'adolescence (les bâtonnets étant touchés en premier), la perte de la vision latérale durant le jeune âge adulte (vision en tunnel) et vers 60 ans, la perte de la vision centrale et diurne pouvant amener à une cécité complète (perte des cônes secondaire aux bâtonnets) (1). Dans un cas sur 10 la dégénération commence au centre de la rétine et se présente comme une dystrophie à cônes prédominants (cone rod dystrophy) ou dystrophie maculaire. Le déroulement de la maladie

se fera donc en sens inverse: premièrement une baisse de l'acuité visuelle, une photophobie, une dyschromatopsie, des champs visuels centraux diminués puis des troubles visuels périphériques et une perte de la vision nocturne (2). Cette forme de RP est en général plus sévère et plus rapide que celle à bâtonnets prédominants. Les relations entre les gènes impliqués, les mutations et la clinique sont très complexes: des mutations différentes peuvent avoir des conséquences phénotypiques similaires, des mutations dans un même gène peuvent se traduire par un phénotype différent et certaines mutations peuvent être à la fois récessives et dominantes (3). Les RP peuvent être héritées sous une forme autosomique dominante (30-40% des cas), autosomique récessive (50-60%) ou récessive liée à l'X (5-15%), ce qui renforce encore l'hétérogénéité génétique (4). La RP est en générale mono-génique mais quelques cas de transmissions digéniques et mitochondriales ont été rapportés (5). En prenant compte de tous ces facteurs il est donc très difficile d'assigner un phénotype particulier à un génotype spécifique (6). La forme dominante est généralement la forme la moins sévère et se manifeste vers 50 ans. Les formes récessives et liées à l'X apparaissent durant la première décade et sont plus sévères (7). Plus de 100 gènes ou loci ont été identifiés dans les RP et comptent pour 60% des patients (5). Les gènes impliqués sont exprimés surtout dans les bâtonnets et l'épithélium pigmentaire et ont des fonctions très diverses qui peuvent être groupées en 5 catégories : photo-transduction, métabolisme rétinien, développement et entretien du tissu rétinien, structure cellulaire et épissage (8). Dans le cas des RP à bâtonnets prédominants les mutations les plus souvent retrouvées concernent le gène Rhodopsine (RHO) (25%) pour les formes dominantes, le gène USH2A (20%) pour les formes récessives et le gène Retinitis Pigmentosa GTPase regulator (RPGR) (70-80%) pour les formes liées à l'X (5). Concernant les RP à cônes prédominants les 4 gènes principalement impliqués sont : ABCA4, CRX, GUCYD et RPGR (2). La RP est une maladie habituellement confinée à l'œil (non syndromique). Mais dans 20-30% des cas, celle-ci est associée à une maladie non-oculaire. Le Syndrome de Usher, dans laquelle la RP est associée à une surdité est le syndrome le plus fréquent : il compte pour 10-20% de tous les cas de RP (5). La prévalence de la RP non syndromique est estimée à environ 1/4'000 (5). Les RP sont la cause héréditaire la plus commune de déficience visuelle dans tous les groupes d'âges (9). Le diagnostic des RP se base sur

l'histoire clinique, l'examen du fond d'œil et l'électrorétinogramme (ERG). Dans les formes à bâtonnets prédominants le diagnostic clinique se base sur la présence d'une cécité nocturne, d'une diminution des champs visuels périphériques, d'une couche nucléaire externe rétinienne amincie (atrophie), de dépôts pigmentaires rétiniens ressemblants à des ostéoblastes (concentrés surtout en périphérie), d'une atténuation de la vascularisation rétinienne, d'une pâleur du disque optique et d'un ERG hypovolté (la vision scotopique, nocturne, est touchée avant la vision photopique, diurne) (1). Concernant les formes maculaires les dépôts sont localisés dans la région maculaire, la perte de la vision est centrale et l'ERG (la vision photopique est touchée en premier (7)) est souvent quasiment plat dès la fin de la première décennie de vie (10). L'approche thérapeutique est limitée à diminuer le processus de dégénération de la maladie par une protection de la lumière du soleil, un régime riche en vitamine A et E, traiter les complications (cataracte et œdème maculaire) et aider les patients à faire face à l'impact social et psychique de la cécité (1).

L'amaurose congénitale de Leber (LCA), qui appartient aussi au groupe des rétinoopathies pigmentaires doit être différenciée des RP. En effet, les gènes RPE65, CRB1, CRX, TULP1 sont diagnostiqués à la fois chez les LCA ou les RP (11). La LCA est la plus précoce et la plus sévère de toutes les dystrophies rétiniennes héréditaires responsables d'une cécité congénitale avant l'âge de 1 an (8). La description de la maladie comprend une perte sévère de la vision dès ou peu après la naissance, des pupilles amaurotiques (le réflexe photomoteur est aboli), un nystagmus sensoriel, une rétinoopathie pigmentaire et un ERG sévèrement réduit ou aboli (en vision photopique et scotopique) (12). D'autres caractéristiques associées peuvent inclure un kératocône (altération de la courbure de la cornée qui prend une forme conique), une cataracte, un phénomène oculodigitale (les enfants tentent de déclencher des perceptions lumineuses en pressant un doigt sur le globe oculaire), une atténuation des vaisseaux rétiniens, un œdème du disque optique, une nyctalopie (cécité nocturne), une photo aversion et un phénotype rétinien variable (13). 14 gènes différents ont été identifiés à ce jour. Ces gènes sont responsables de 70% des cas de LCA (14) et codent une variété de protéines impliquées dans des fonctions cellulaires variées telles que: structure ciliaire et transport, cycle visuel, métabolisme de la vitamine A, développement de photorécepteurs et photo

transduction. Ces gènes sont exprimés préférentiellement dans les photorécepteurs ou l'épithélium pigmentaire. Les gènes les plus fréquemment mutés dans la LCA sont CEP290 (15%), GUCY2D (12%), CRB1 (10%) (12). La LCA est une maladie génétiquement hétérogène (15), transmise le plus souvent sous une forme autosomique récessive mais peut dans quelques cas l'être sous une forme autosomique dominante ou sporadique (16). Il existe néanmoins une forte corrélation génotype-phénotype dans la LCA : la sévérité et la progression de la perte de l'acuité visuelle, ou l'apparence rétinienne sont corrélées avec chaque génotype (12). Sa fréquence se situe autour des 1/50'000 (8). Elle compte pour plus de 5% de l'ensemble des dystrophies rétiniennes héréditaires (17) et est la cause la plus fréquente de handicap visuel chez les enfants. Pour l'instant aucun traitement n'est disponible pour guérir la LCA.

De nouvelles stratégies thérapeutiques telles que la thérapie génique, la transplantation de rétine ou de cellules souches, l'usage de prothèses rétiniennes ou de facteurs de croissance sont en train d'émerger pour la RP tout comme la LCA (18) (8). La connaissance du génotype du patient est donc essentielle à la fois pour l'aspect thérapeutique ainsi que pour poser un diagnostic final. En effet, les différentes formes de RP sont impossibles à distinguer les unes des autres par l'ophtalmologue sur une base clinique et sur le phénotype de la rétine du patient. Pour la LCA, il est difficile de dépister précocement cette maladie sur la base de la clinique, car la dystrophie rétinienne débute avant l'âge d'une année (15). 14 gènes sont impliqués dans la LCA et plus de 100 gènes ou loci dans la RP. A elles-deux, ces maladies représentent donc 948 exons à analyser si l'on veut couvrir toutes les mutations connues actuellement. Cette diversité génétique ainsi que les multiples modes de transmissions (autosomique dominant, récessif ou lié à l'X) et le nombre élevé de mutations par gène (plus de 100 mutations pour le gène Rhodopsine par exemple (3)) posent un problème de diagnostic. La recherche de mutations au moyen du séquençage génomique classique (séquençage selon Sanger) de tous les gènes de ces deux maladies implique une trop grande perte de temps et des coûts très élevés. Une méthode de diagnostic rapide, fiable et peu chère doit donc être disponible pour pallier à ces problèmes.

Mon projet de Master consiste en la création d'une puce à ADN pouvant analyser en une seule fois tous les gènes des RP et des LCA et à comparer le temps et le coût des

deux techniques. Une puce est constituée de fragments d'ADN (sondes) immobilisées sur une plaque de verre selon une disposition ordonnée. Dans un premier temps, j'établirai la liste de tous les gènes impliqués dans les RP et LCA, identifierai tous les exons ainsi que les promoteurs et séquences 3' non traduites. Dans un deuxième temps, je calculerai le coût théorique d'une analyse de tous les gènes par séquençage selon la méthode Sanger et par celle du séquençage à haut débit. Enfin, je comparerai les deux approches pour déterminer celle qui est la plus économique et la plus efficiente en temps. L'intérêt clinique de la méthode de séquençage à haut débit est grand. Si elle se révèle la plus économique et efficiente en temps, elle pourrait constituer à l'avenir la méthode de diagnostic de choix des rétinopathies pigmentaires. La pose d'un diagnostic de RP ou de LCA pourrait être fortement écourtée, ce qui améliorerait la prise en charge et le pronostic des patients. La question de la facturation à l'assurance se posera également. C'est donc sur la base des données que je récolterai, des coûts facturables à l'assurance de la méthode Sanger et des bénéfices du laboratoire que j'estimerai ensuite les coûts à facturer concernant le séquençage à haut débit.

### **Méthode et matériel:**

Dans un premier temps, j'ai pris connaissance de l'état des recherches actuelles concernant les RP et les LCA. Une recherche de littérature a été menée sur le site Pubmed (19) avec pour mots-clefs MESH *Leber Congenital Amaurosis* et *Retinitis Pigmentosa* et une limitation des articles aux dix dernières années. A l'aide des ces articles la liste de tous les gènes impliqués dans les RP et LCA a été établie. Le site internet RetNet (20) m'a également été d'une grande utilité, recensant tous les gènes impliqués dans les différentes rétinopathies. A l'aide du site internet Ensembl (21), j'ai recensé les exons des différents gènes, leurs promoteurs ainsi que leurs séquences 3' non traduites. Je me suis ensuite rendue à plusieurs reprises à l'Institut de Recherche en Ophtalmologie (IRO, Sion) où les échantillons sont séquencés selon la méthode Sanger et au laboratoire de l'EPFL appartenant à l'IRO, où les échantillons sont séquencés selon le séquençage à haut débit. Les étapes de chaque technique, le temps pris par les laborantines pour chaque étape et les réactifs utilisés m'ont été donnés et expliqués par

ces dernières puis ils ont été répertoriés. Le nombre de réactions possibles avec chaque réactif, leurs quantités ainsi que de leurs prix ont ensuite été listés. Tous les protocoles et informations nécessaires au calcul des coûts des réactifs et du temps pris par étape pour chaque technique m'ont été fournis par les laborantines du laboratoire de l'EPFL (Lausanne) et de l'IRO (Sion). Une liste de coûts indirects a été établie grâce aux informations fournies par mon tuteur, Mr. Prof. med. Daniel Schorderet. Ces coûts indirects représentent le temps pris par lui-même pour vérifier le travail et le résultat de l'analyse, le coût de la laborantine, l'amortissement du matériel et le contrat de maintenance. Un coût total pour chaque technique a ainsi été calculé et une comparaison des coûts a pu être réalisée.

Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides le composant. La méthode de séquençage Sanger séquence l'ADN exon par exon. Les exons représentent la partie codante de l'ADN. Une analyse pré-analytique du sang du patient (réception de l'ADN et contrôle de l'ADN) est tout d'abord effectuée, puis l'ADN en est extrait. Ces deux étapes sont communes avec le séquençage à haut débit (tableau 2). Pour chaque exon, une première réaction en chaîne par polymérase (PCR) spécifique de l'ADN du patient est effectuée. Une PCR permet d'amplifier l'ADN du patient afin d'en avoir une quantité suffisante pour le séquencer. Les deux brins complémentaires de l'ADN sont d'abord séparés (dénaturés) pour obtenir de l'ADN matrice simple brin. Des amorces (petit morceau d'ADN dont la séquence est complémentaire à l'extrémité 3' du fragment à amplifier) sont ajoutées, ainsi qu'une polymérase à ADN (complexe enzymatique permettant la réplication de l'ADN), des désoxyribonucléotides (unité de composition de l'ADN, dNTP, A-T-C-G) et du tampon. Les amorces s'apparient aux brins matrices et la réplication des brins matrices s'effectue. Cette réaction d'élongation est répétée en boucle et permet d'obtenir une amplification exponentielle de l'ADN de base, car les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. Cette PCR est effectuée dans un volume total de 20 µl, contenant 1 µl (100 ng) d'ADN du patient, 2 µl à 10 µmol de chaque amorce (Eurogentec, Liège, Belgique), 5 µl d'eau distillée et 10 µl de peqGold PCR Master Mix (PepqLab, Erlangen, Allemagne) (22,23). L'amplification est effectuée dans un thermocycleur (machine à PCR) Genamp 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) dans les conditions suivantes: 1min à 95 °C, 35 cycles de: 1 min à 94



60 °C, 1 min à 60 °C, 1 min à 72 °C et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. A la fin de la réaction l'on obtient des fragments d'ADN de différentes tailles. La vérification de la réaction est effectuée en faisant migrer les copies d'ADN selon leur taille au moyen d'une électrophorèse sur un gel d'agarose. L'ADN est chargé négativement et migre sous l'effet d'un champ électrique en direction de la charge positive, l'anode. Les fragments de petites tailles migrent plus rapidement et se déplacent plus loin sur le gel que les fragments de plus grandes tailles (figure 2).

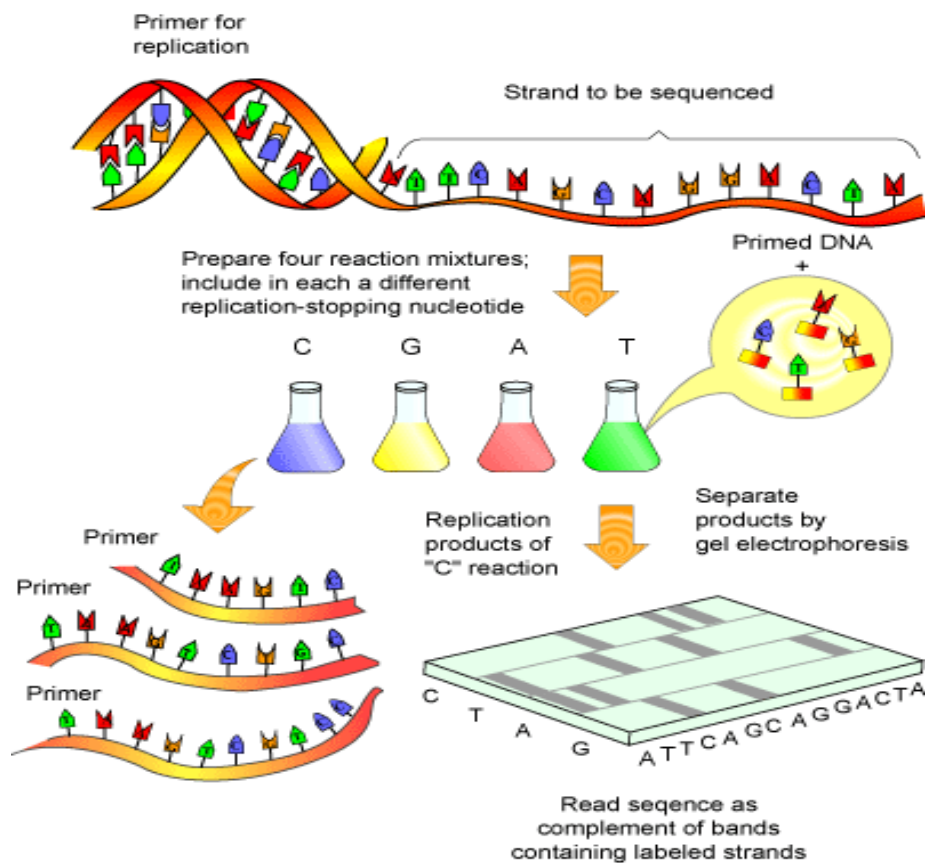


Figure 2 : Séquençage selon Sanger : PCR de séquençage et migration des fragments au moyen de l'électrophorèse sur gel d'agarose.

<http://medicalab.blogspot.ch/2012/08/nxg-technologies-in-dna-sequencing-intro.html>

Les produits PCR amplifiés sont purifiés avec 200 µl d' Invitex MSB®Spin PCRapace kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Allemagne) puis dosés à l'aide d'un spectrophotomètre en nanodrope (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) (24). Le

spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée, ce qui nous permet de connaître sa concentration. Une PCR de séquençage est ensuite initiée selon le protocole ABI (25). Pour cela le fragment qui doit être séquencé est mélangé avec des amorces, du tampon, une polymérase à ADN, des désoxyribonucléotides ainsi que des didésoxyribonucléotides (ddNTP). Ces nucléotides, à la différence des désoxyribonucléotides ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose (figure 3).

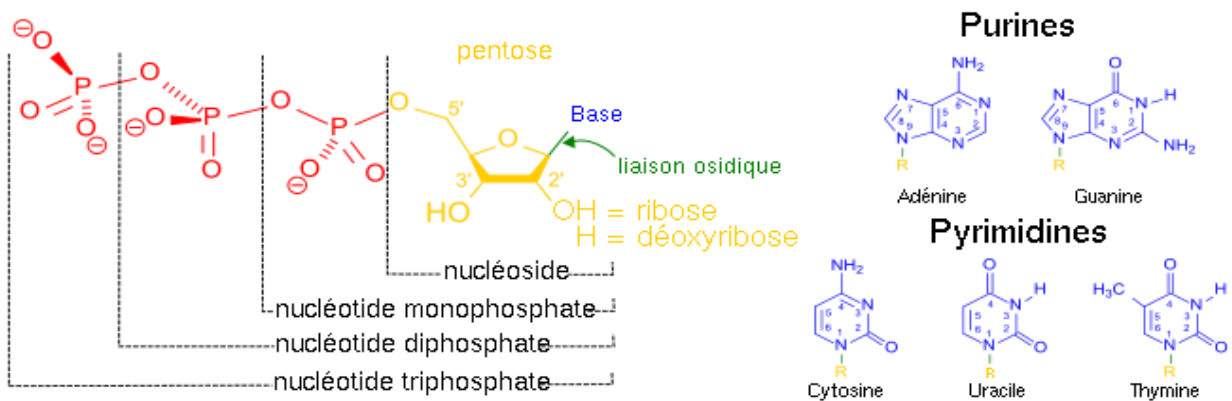


Figure 3 : Structures des nucléotides.

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Nucleotides\\_1\\_FR.svg](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Nucleotides_1_FR.svg)

Ce sont les didésoxyribonucléotides qui seront reconnus par le séquenceur car ils sont fluorescents, chaque type de didésoxyribonucléotide émettant une couleur différente en fluorescence. Les amorces s'hybrident sur les brins matrices et la synthèse des brins complémentaires commence. Lorsqu'un didésoxyribonucléotide est intégré la synthèse s'arrête du fait de l'absence du groupement OH en position 3'. L'élongation du brin ne peut plus continuer, elle s'arrête, et à la fin de la réaction, un ensemble de brins d'ADN de tailles variables est obtenu. Selon l'endroit où la synthèse a été stoppée par insertion d'un didésoxyribonucléotide, le nucléotide du brin matrice peut être connu car les deux brins sont complémentaires. Les A s'apparient avec les T, les C avec les G. Par exemple, si la synthèse du brin complémentaire s'arrête avec l'insertion d'une guanine (G) (ddGTP), c'est que qu'il y a présence d'une cytosine (C) sur la séquence d'ADN du patient. Cette PCR de séquençage est faite pour une réaction finale de 10µl, en utilisant 1µl de tampon BigDye® Terminator V1.1 (Applied Biosystems) avec 1µl d'amorces à 3.3 µmol, 6µl d'ADN

précédemment préparé, 2µl de tampon 5x et 1µl d'eau distillée. Le séquençage est ensuite purifié avec le kit de purification Qiagen, selon le protocole Qiagen (25). Le séquençage est transféré sur une plaque contenant 96 puits, chaque puits pouvant contenir 1 exon. Les fragments sont séparés sur un séquenceur par électrophorèse capillaire 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) (figure 4). Les fragments d'ADN migrent par électrophorèse suivant leur taille le long de capillaires et passent à travers un laser. Le laser excite les molécules fluorescentes et un système de détection optique mesure la quantité et la couleur émise par fluorescence, ce qui détermine quel

Figure 4 : Séquenceur par électrophorèse capillaire 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems).

<http://www.labexchange.com/fr/acheter-des-appareils/d/?sn=19025>



didésoxyribonucléotide a été inséré en dernier et la taille des fragments obtenus. Les séquences sont analysées en utilisant le programme informatique Chromas 2.23 (Technelysium, Tewantin, QLD, Australie) (23). Une laborantine procède ensuite à l'interprétation des résultats (figure 5).

Le séquençage à haut débit (avec le séquenceur Roche GS Junior) (figure 6) (26) ne comporte que deux étapes communes avec la méthode Sanger: l'analyse pré-analytique et l'extraction de l'ADN à partir du sang du patient (tableau 2).

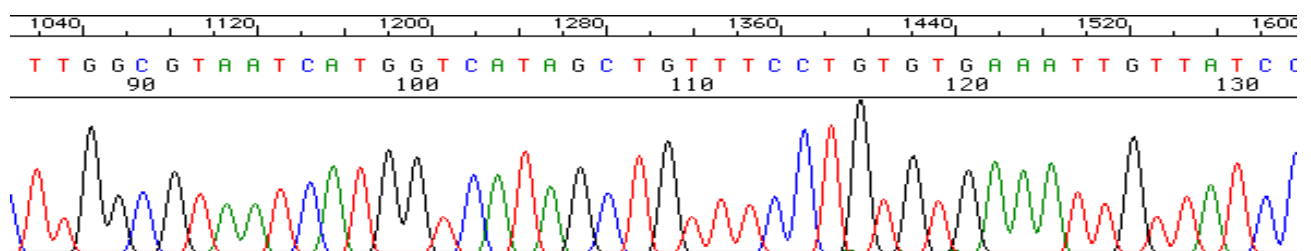


Figure 5 : Résultat d'un séquençage selon Sanger.

<http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/5MethEtudGenFonc/1MethodeSEQUENGAGE/1SEQUENGAGE.htm>

Figure 6 : Séquenceur Roche GS Junior.

[http://www. Roche.com/media/media\\_releases/med\\_dia\\_2009-11-19.htm](http://www. Roche.com/media/media_releases/med_dia_2009-11-19.htm)

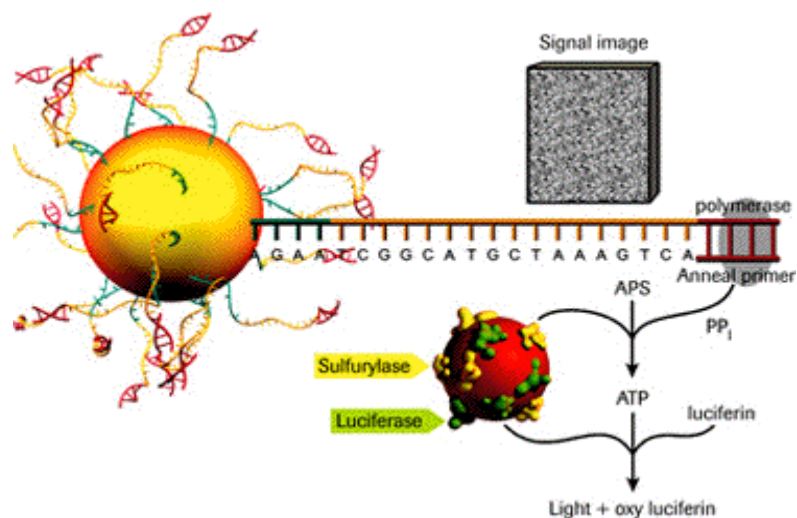


Si le séquençage selon Sanger séquence l'ADN exon par exon, la puce à ADN permet le séquençage simultané des 948 exons impliqués dans les RP et LCA. Une puce à ADN est constituée de fragments d'ADN (sondes) immobilisées sur une plaque de verre selon une disposition ordonnée. Ces sondes sont des copies d'ADN synthétiques des 948 exons des RP et LCA. Pour développer la puce à ADN, les sondes sont commandées auprès de la société Roche (Bâle, Suisse). 500 ng d'ADN du patient est fragmenté par nébulisation et est sélectionné par taille à l'aide des billes Agencourt®AMPure®XP afin d'obtenir des fragments d'une taille entre 500 et 1200 paires de bases. Les concentrations d'ADN sont mesurées grâce au spectrophotomètre à NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Des adaptateurs contenus dans le GS Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche, Bâle, Suisse) sont liés à l'ADN fragmenté et le tout est quantifié par fluorométrie (QuantiFluor, Promega, Madison, WI) (23,27). La fluorométrie permet de quantifier la quantité d'une substance par la mesure de la longueur d'onde qu'elle émet en fluorescence. Cet ADN fragmenté est ensuite amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques 454 (Roche). Ensuite, 1 µg du produit de cette amplification est mélangée avec de l'ADN-COT (Roche) et des amorces « 454-Hybridation Enhancing Primer » dans une centrifugeuse Speedvac. Le tout est ensuite resuspendu dans un tampon d'hybridation NimbleGens et hybridé sur la puce à ADN SeqCap EZ Choice (28) (NimbleGen, Roche) avec les sondes spécifiques pour les RP et LCA (SeqCap EZ Choice library, nommée IROme) (tableau 3a et 3b) le tout pendant 70 heures à 47 °C dans un thermocycleur. L'ADN du patient s'hybride si les brins sont complémentaires afin de

reformer un ADN double brin. Ainsi ne seront hybridés et sélectionnés que les 948 exons recherchés. L'ADN du patient ainsi hybridé est ensuite lié à des billes de streptavidine « M-270 Beads » (Invitrogen Dynal, Oslo, Norvège) pendant 45 minutes à 47 °C et en utilisant un support magnétique il est lavé avec 4 tampons NimbleGen différents selon les instructions du fabricant. L'ADN capturé avec les sondes et lié aux billes est amplifié par PCR en utilisant les mêmes amorces spécifiques 454. Cette PCR est ensuite quantifiée à l'aide du « Lightcycler480II » (Roche, Bâle, Suisse) qui mesure l'enrichissement des séquences cibles. Les échantillons avec un enrichissement plus grand que 200 fois vont continuer à être traités (23,29). Puis selon le protocole 454 GS Junior (Roche) une PCR en émulsion « EM-PCR » est effectuée (23,30). La PCR en émulsion permet d'effectuer la PCR dans des gouttelettes d'une émulsion. Les gouttelettes jouent le rôle de microréacteurs. A la fin de ces étapes, chaque bille comporte donc des millions de copies du fragment original (figure 7). Après la PCR, les billes sont collectées, lavées et liées à des billes magnétiques d'enrichissement. L'ADN ainsi enrichi est ensuite élué et quantifié à l'aide d'un compteur de billes fourni. En résumé, une grande quantité d'ADN identique est fixée à chaque bille. Le séquençage est ensuite effectué suivant le protocole 454 GS Junior avec le kit « GS Junior Titanium Sequencing Kit » et le « PicoTiterPlate Kit » (PTP) (23,31). Des amorces, du tampon, une polymérase à ADN ainsi que des désoxyribonucléotides fluorescents sont mélangés au produit PCR. Lors du séquençage sur le 454 GS Junior, une copie complémentaire des brins matrices situés dans les billes s'effectue.

Figure 7 : Chaque bille comporte des millions de copies du fragment original.

[www.454.com](http://www.454.com)



Le mélange est chargé sur le 454 GS Junior Sequenceur et le programme est démarré. Le GS Junior lit les séquences en se basant sur l'intensité du signal lumineux émit par les désoxyribonucléotides pour déterminer s'ils sont des A, des T, des C ou des G. Les résultats sont ensuite analysés par une laborantine avec le programme informatique « Roche 454 Reference Mapper program », qui détecte si une séquence présente une mutation. Les séquences potentiellement mutées sont validées avec un séquençage selon la méthode Sanger (voir ci-dessus) et une lecture de validation effectuée par la laborantine.

Les coûts facturables aux assurances de la méthode Sanger ont été calculés à partir du nombre de points attribués au séquençage d'un exon selon la liste des analyses (LA) éditée par l'office fédéral des assurances sociales (OFAS). Cette liste est disponible sur leur site internet (32). Les bénéfices revenant au laboratoire ont été calculés à partir du coût de revient de la technique, coût que j'ai calculé à partir de mes données récoltées précédemment. Sur ces bases, un coût à facturer concernant la méthode Junior a été évalué par similitude.

### **L'analyse des données (tableau 1):**

Afin de rendre la comparaison des deux méthodes possible, les prix et les temps pour la méthode Sanger ont été calculés par échantillon d'un exon, la taille de l'exon ayant été fixée à 600 paires de bases. Pour le séquençage à haut débit, les prix et les temps ont été calculés par patient. Cela représente une analyse de 948 exons, la puce à ADN pouvant analyser les 948 exons impliqués dans les RP et LCA en une seule fois. Les coûts des réactifs pour l'analyse d'un exon par la méthode Sanger peuvent ainsi être mis en comparaison avec ceux du séquençage à haut débit, en multipliant le coût total des réactifs par exon par un facteur de 948. Pour comparer le temps pris pour l'analyse des 948 exons par la laborantine, le temps pris par exon pour la méthode Sanger n'a pas été multiplié par un facteur de 948, la laborantine travaillant sur l'analyse de plusieurs exons à la fois avec la méthode Sanger. Il a donc fallu comparer le nombre d'exons analysés par jour avec la méthode Sanger avec le nombre de patients analysés par semaine avec le

Junior. Les temps ont été calculés par jour de travail, une journée représentant 8h30 de travail effectif et une semaine de travail étant constituée de 5 jours. Le temps pris par le superviseur pour vérifier les séquençages a également été calculé par exon pour la méthode Sanger et par patient pour la méthode Junior. Les coûts de la laborantine ont été calculés en considérant un salaire mensuel pour 20 jours effectifs de travail (5 jours sur 7) divisé par le nombre de jours pris pour l'analyse des 948 exons. Le coût total du séquençage d'un exon par chaque méthode a été calculé en additionnant le coût des réactifs pour le nombre d'exons séquencés par mois avec le coût de la laborantine par mois, le contrat de maintenance et l'amortissement du matériel par mois et en divisant ensuite le tout par le nombre d'exons analysés par mois afin d'avoir le prix total par exon.

Selon la liste des analyses (LA) éditée par l'office fédéral des assurances sociales (OFAS) (32) le séquençage d'un exon par la méthode Sanger est facturé 215.00 SFr. aux assurances. Sur la base de ce montant et du coût de revient par exon calculé précédemment, le bénéfice qui revient au laboratoire a pu être calculé. En multipliant le coût de revient d'un séquençage à haut débit de 948 exons par le facteur bénéfice calculé pour la méthode Sanger, un coût à facturer aux assurances pour le Junior a pu être estimé. Les coûts communs aux deux méthodes se limitent à l'analyse pré-analytique (réception de l'ADN et contrôle de l'ADN) et à l'extraction de l'ADN du patient à partir du sang (tableau 2). Ces frais peuvent être ignorés dans la comparaison car ce sont des frais fixes présents dans les deux méthodes.

### **Résultats:**

*Le séquençage des 948 exons par le séquençage à haut débit (avec le GS Junior) représente la technique de séquençage la plus économique et la plus efficiente en temps.*

La puce à ADN permet de séquencer les 948 exons impliqués dans les RP et LCA simultanément. Comme nous pouvons le voir dans le tableau 1, la laborantine séquence un total de 5 patients par semaine de travail avec le GS Junior, ce qui revient à dire qu'il faut entre 1 jour et 2 jours et demi de travail pour séquencer les 948 exons d'un patient. Ceci représente environ le quart du temps pris par le séquençage génomique classique pour effectuer le même travail (10 jours). Le séquençage Sanger ne peut analyser que 96

exons par jour ce qui est moins efficient en temps. Puisque la laborantine effectue le séquençage d'un patient plus rapidement avec la méthode Junior, cette dernière coûtera moins au laboratoire: pour le même travail, le coût de la laborantine revient entre SFr. 300.00 et SFr. 750.00 avec le séquençage Junior contre SFr. 3'000.00 avec la méthode Sanger.

Les coûts des réactifs pour 948 exons s'élèvent à SFr. 2'540.65 pour la méthode Junior, contre SFr. 64'938.00 pour un séquençage génomique classique. Enfin, le temps pris par le superviseur pour vérifier le séquençage de 948 exons est de 3h pour la méthode Junior contre 20h pour le Sanger, ce qui représente aussi un gain de temps.

Le coût total du séquençage d'un exon, en considérant le prix des réactifs, le coût de la laborantine, le contrat de maintenance et l'amortissement du matériel revient à SFr. 75.00 pour le séquençage selon Sanger et à SFr. 3.20 pour le séquençage Junior.

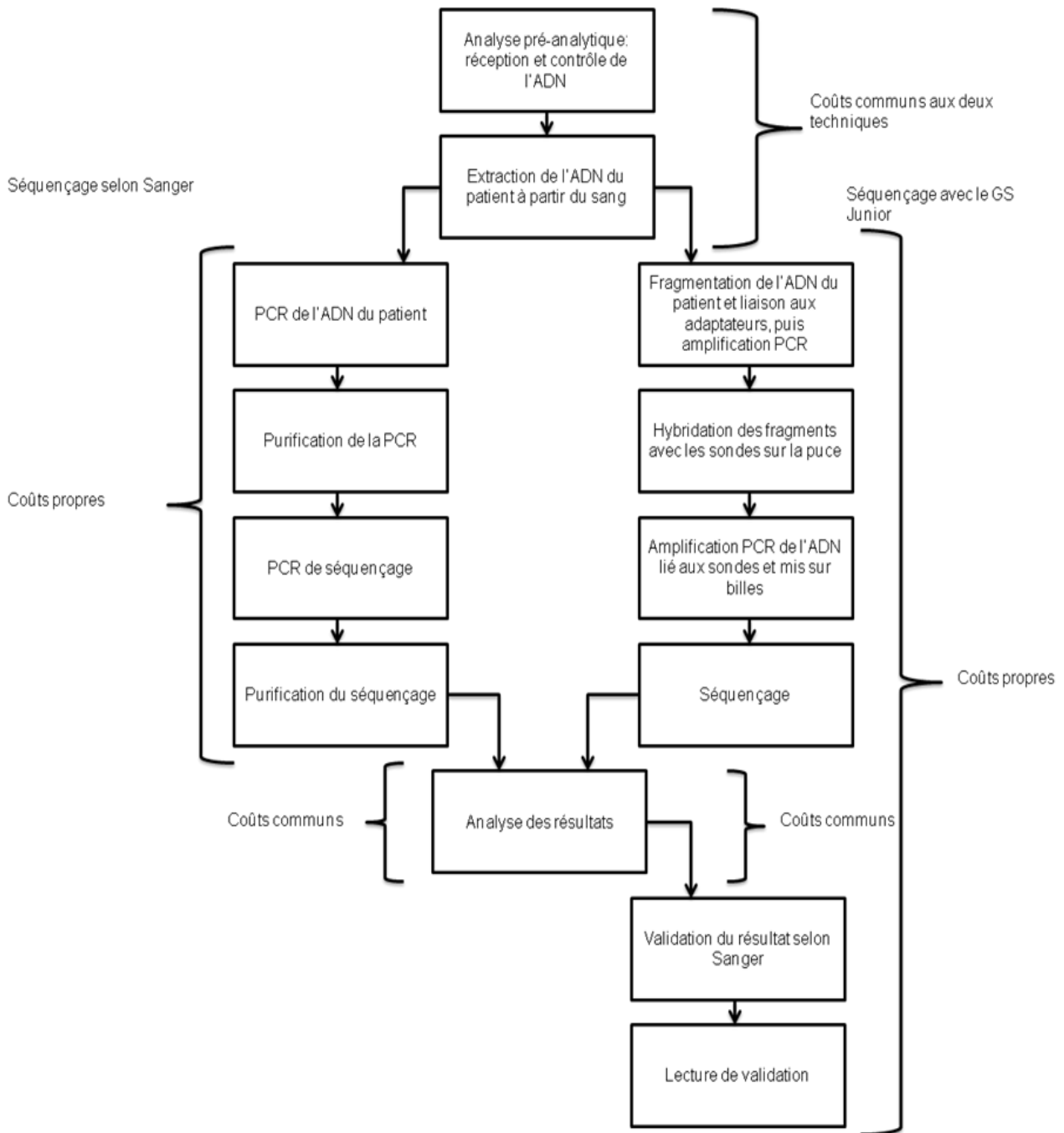
Le séquençage à haut débit est donc plus économique et plus rapide.



Tableau 1 : Comparaison des coûts et des temps pris pour l'analyse de 948 exons par la méthode Sanger et séquençage à haut débit (Junior).

	Séquençage selon la méthode Sanger	Séquençage avec le GS Junior
Coûts des réactifs pour un exon (Sanger) / par patient, 948 exons (Junior)	sFr. 68.50	sFr. 2'540.65
Coûts des réactifs pour 948 exons	sFr. 64'938.00	sFr. 2'540.65
Nombre d'exons analysables par jour (1 semaine = 5 jours de travail)	96 exons par jour	5 patients par semaine, 948 exons par jour
Maximum de patients analysables par année	22 patients par année (10 jours par patients, 220 jours de travail en une année)	220 patients par année (1 patient par jour, 220 jours de travail en une année)
Jours de travail (8h30 par journée de travail, 5 jours sur 7) pris par la laborantine pour analyser 948 exons	10 jours	1-2.5 jours
Temps pris par le superviseur pour vérifier le séquençage de 948 exons	20h (1/4h par exon)	3h
Prix des machines	sFr. 555'000.00	sFr. 250'000.00
Amortissement du matériel (10% du prix initial par année)	sFr. 55'500.00	sFr. 25'000.00
Contrat de maintenance par année	sFr. 12'500.00	sFr. 12'500.00
Coût de la laborantine par mois, pour 42 semaines de travail par année	sFr. 6'000.00	sFr. 6'000.00
Coût de la laborantine pour un patient (948 exons)	sFr. 3'000.00	sFr. 300.00 – 750.00
Coût du séquençage d'un exon (réactifs + laborantine + contrat de maintenance + amortissement)	SFr. 75.00	sFr. 3.20

Tableau 2 : Différentes étapes des deux techniques.



## **Discussion :**

La méthode de séquençage à haut débit constitue la méthode de choix dans le screening diagnostique des gènes impliqués dans les RP et LCA. Cette méthode est plus rapide pour analyser les 948 exons connus de ces deux maladies. Les réactifs et la machine sont aussi moins coûteux. La laborantine peut analyser un nombre plus important d'exons en un temps moindre et coûtera donc moins cher au laboratoire (tableau 1). Tester des gènes particuliers avec le Sanger revient plus cher qu'avec le Junior. Prenons l'exemple d'un patient qui vient consulter son ophtalmologue pour des problèmes de vue. Son examen suggère une rétinopathie pigmentaire. Comment faire pour savoir quel gène est muté ? Comment poser un diagnostic rapidement, de manière fiable et peu chère? Le gène ABCA4, impliqué dans les RP récessives, se trouve sur le premier chromosome. Il contient 50 exons. En prenant mes résultats exposés précédemment l'analyse seule de ce gène en Sanger coûterait Sfr. 3'750.00 (le coût théorique d'un exon par la méthode Sanger s'élevant à Sfr. 75.00) ce qui dépasse déjà le coût de revient pour 948 exons analysés avec le GS Junior (Sfr. 3033.60). De plus, grâce à cette technique une réponse diagnostique fiable peut être donnée au patient: les 948 exons connus des RP et LCA sont tous passés en revue et une mutation est détectée ou non. Si les 948 exons se révèlent non mutés, le diagnostic moléculaire ne peut aller plus loin pour l'instant, à moins de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans ces maladies. Cette technique permet donc à un nombre plus grand de patients d'obtenir un diagnostic. Comme le séquençage Sanger séquence les exons un par un, jusqu'où continuer l'analyse pour avoir un diagnostic si l'on ne trouve rien dans les premiers exons? Cette question ne se pose pas avec la méthode Junior, qui interroge d'emblée les 948 exons des deux groupes de pathologies.

Les résultats de mon étude représentent un apport clinique très important pour les patients: la pose d'un diagnostic de RP ou de LCA pourrait être fortement écourtée par l'utilisation de la méthode de séquençage à haut débit. Pour les laboratoires, cette comparaison de coûts et de temps pourrait influencer la méthode diagnostique de choix pour ces deux maladies. La question qui se pose donc ensuite est la question de la facturation de la méthode de séquençage à haut débit à l'assurance. Cette technique est

récente et ne figure pour l'instant pas dans la liste des analyses (LA) de l'OFAS (32). Ce montant ne doit pas être trop élevé, car la méthode doit être acceptée par les assurances. Mais il ne peut pas être trop bas, car la méthode doit être rentable pour les laboratoires. Dans le cas contraire aucun laboratoire ne voudra mettre en pratique cette technique. Selon la liste des analyses (LA) (32), le séquençage Sanger d'un exon est facturé SFr. 215.00 aux assurances. Le coût théorique du séquençage d'un exon revient à SFr. 75.00, le laboratoire touchant donc un bénéfice de SFr. 140.00. En se basant sur le coût de revient du séquençage de 948 exons par Junior et sur ce facteur bénéfice, le coût à facturer aux assurances par le laboratoire pour le Junior s'estime à SFr. 8696.00. Le bénéfice du laboratoire s'élève donc à SFr. 5'662.70. Ce prix est-il supportable par les assurances? Ou faut-il attendre que la firme Roche, sous pression d'autres méthodes concurrentes baisse le prix des machines et réactifs?

Cette étude comparative présente toutefois quelques limites théoriques et méthodologiques. Les temps consacrés à chaque technique pour effectuer les différentes étapes présentent des variations suivant les laborantines et le jour où la mesure a été effectuée. Nous ne sommes pas des machines et il est difficile de calibrer un temps précis, reproductible chaque jour entre les différentes laborantines. Il existe donc une différence entre la théorie et la pratique. Par exemple, selon mes calculs théoriques, l'analyse de 948 exons avec le séquençage à haut débit nécessite 2 jours et demi de travail par la laborantine. Dans les faits, la laborantine peut analyser ces 948 exons en 1 jour de travail. Le même problème se pose pour le séquençage Sanger : selon les calculs théoriques l'analyse d'un exon est possible en 1h55 minutes. L'analyse des 948 exons nécessiterait donc 218 jours de travail. Ce calcul est purement théorique, car la laborantine travaille sur plusieurs exons en même temps et peut analyser les 948 exons en 10 jours seulement. Pour le séquençage Sanger, je suis partie du fait qu'un exon représente une longueur de 600 paires de base. Ceci afin d'avoir une mesure de comparaison avec la méthode Junior. Cela revient à dire que tous les gènes sont de la même taille mais cela n'est pas correct car parfois, le gène est plus gros.

Cette étude m'a menée à de nouvelles interrogations et réflexions. En premier lieu, comment l'information et quelles informations peuvent être communiquées au patient? Interpréter l'analyse de 948 exons n'est pas une chose facile. Beaucoup de

variations dans le génome demeurent peu comprises à ce jour (33). Il faut donner un sens à cette masse d'informations que constituent les résultats pour que les cliniciens puissent ensuite les transmettre de manière compréhensible aux patients. Si un patient se révèle porteur d'une mutation que faire de cette information? Doit-on dire à un enfant qu'il est porteur de la mutation est donc présente une plus grand risque de maladie une fois adulte, même si l'on ne sait pas si le gène va s'exprimer ? Ou ne rien dire et risquer de tomber dans la malfaisance? Ces résultats peuvent être une source de stress et avoir un fort impacte négatif sur le patient, surtout si la maladie est incurable, comme dans le cas de RP et LCA. Dans cette situation le principe d'autonomie prévaut: il faut laisser le choix aux patients et aux médecins de décider quelles informations ils ont envie de connaître. Il est donc essentiel lors de la consultation médicale de présenter au patient l'état des possibilités et techniques actuels, des risques de faux positifs et négatifs et de l'utilité de les analyser pour soi et pour ses descendants. La communication du résultat de l'analyse ne se fait que si le patient le souhaite, il a le droit de changer d'avis et de ne pas vouloir être informé. Ce résultat sera donné après un temps de réflexion adéquat (33).

Une autre question est soulevée: il n'existe pour l'instant pas de thérapies, pourquoi donc trouver la mutation causant la maladie? Il existe plusieurs raisons pour lesquelles le diagnostic moléculaire est utile pour la clinique. Tout d'abord, même s'il n'existe pour l'instant pas de moyens thérapeutiques, cette information pose un diagnostic et préserve la famille et le patient d'un tourisme médical inutile, en faisant d'autres tests diagnostiques qui ne mèneront à rien (33). La pose d'un diagnostic peut se révéler problématique sans le diagnostic moléculaire, comme dans le cas des RP et LCA ou leurs différentes formes ne peuvent aisément être différenciées sur une base clinique seule (6). Ceci est particulièrement important pour les rétinopathies pédiatriques, pour lesquelles un diagnostic peut changer la prise en charge future du patient. Connaître la mutation est également essentiel pour le conseil génétique, pour prédire le risque de récurrence au sein d'une famille et enfin pour le pronostic (34). Chaque nouvelle mutation détectée par le séquençage à haut débit permet aux chercheurs d'obtenir progressivement une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des RP et LCA. Une meilleure compréhension de ces maladies permettra à son tour de mieux conseiller et prendre en charge les patients. Finalement, un jour des traitements spécifiques pour chaque gène

muté ainsi que des stratégies de prévention basées sur nos connaissances des mutations seront disponibles. Il est donc essentiel de poursuivre la découverte des gènes encore inconnus impliqués dans les RP et LCA et de continuer le diagnostic des mutations connues. Le conseil génétique et la prise en charge des patients analysés doivent être revus et adaptés à cette nouvelle technique de diagnostic. Nous devons être capables de comprendre, d'interpréter et d'expliquer l'information moléculaire.

La question de la communication des résultats aux assurances se pose également. Les résultats d'un tel séquençage constituent une quantité d'informations importantes sur le patient. Les données d'un test génétique sont confidentielles et ne peuvent être communiquées sans l'accord du patient. Selon la loi fédérale sur l'analyse génétique humaine du 8 octobre 2004 (35) il est interdit que des informations génétiques soient livrées aux caisses maladie de base. Les assureurs ne sont pas autorisés à demander un test génétique comme condition pour la conclusion d'un contrat. Les assurances sociales de base ne peuvent exiger ou utiliser les résultats d'une analyse déjà effectuée. En revanche, les assurances privées peuvent demander les résultats d'une analyse génétique déjà effectuée. C'est une exception qui n'est valable qu'à la conclusion d'une assurance vie d'une certaine importance (400'000 SFr.) ou d'une assurance invalidité de 40'000 SFr. annuels. Les données issues de ces séquençages doivent être maniées avec prudence. Ces informations génétiques ont une importance personnelle privée, mais également familiale et communautaire.

### **Conclusion:**

Nous pouvons voir que les RP et LCA sont toutes deux des maladies très hétérogènes cliniquement et génétiquement. Les différentes formes de RP et de LCA ne sont pas distinguables sur une base clinique, le diagnostic moléculaire est donc essentiel. Un nombre important d'exons, 948 au moins (tableau 3a et 3b) sont impliqués dans ces maladies. Un séquençage de tous ces exons par séquençage génomique classique implique une trop grande perte de temps et des coûts trop élevés. La création d'une puce à ADN permet de séquencer ces 948 exons en une seule fois et constitue une solution plus économique et plus efficiente en temps que la méthode Sanger. Par cette méthode,

le diagnostic de RP et de LCA est posé plus rapidement et à moindre frais, ce qui est d'un grand intérêt pour les patients, les assurances et le laboratoire. De plus, une meilleure analyse de ces gènes va permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de ces maladies, et ainsi la prise en charge et le pronostic des patients va se voir amélioré. Cette nouvelle technique de séquençage soulève de nouvelles interrogations telles que la décision de savoir quelles informations doivent être données aux médecins, aux assurances et aux patients. Interrogations auxquelles il devient de plus en plus pressant de répondre.

*Tableau 3a : Liste des 63 gènes, 948 exons responsables des dystrophies rétiniennes : l'IROme.*

ABCA4	01:	94'458'391-94'586'688 (rs)	50	ADRP,ARRP,ARCRD,ARMD
AIPL1	17:	6'327'057-6'338'519 (rs)	6	ARLCA,ADCRD
BEST1	11:	61'717'293-61'732'987 (fs)	11	ADRP,ARRP,ADMD
C2ORF71	02:	29'284'556-29'297'127 (rs)	2	ARRP
CA4	17:	58'227'302-58'236'902 (fs)	8	ADRP
CABP4	11:	67'219'877-67'226'699 (fs)	7	ARLCA,ARCSNB
CLRN1	03:	150'643'950-150'690'786 (rs)	3	ARRP
CEP290	12:	88'442'794-88'535'993 (rs)	53	ARLCA,ARBB
CERKL	02:	182'401'403-182'545'392 (rs)	14	ARRP,ARCRD
CNGA1	04:	47'937'994-48'018'689 (rs)	13	ARRP
CNGA2	X:	150'906'923-150'913'776 (fs)	6	
CNGB1	16:	57'917'847-58'005'020 (rs)	33	ARRP
CRB1	01:	197'170'592-197'447'585 (fs)	12	ARRP,ARLCA
CRX	19:	48'325'087-48'364'769 (fs)	4	ADRP,ADLCA,ARLCA,ADCRD
DHDDS	01:	26'758'773-26'797'785 (fs)	9	ARRP
EYS	06:	64'429'876-66'417'118 (rs)	43	ARRP
FAM161A	02:	62'051'989-62'081'278 (rs)	6	ARRP
FSCN2	17:	79'495'422-79'504'156 (fs)	5	ADRP,ADMD
GUCA1B	06:	42'152'139-42'162'694 (rs)	4	ADRP,ADMD
GUCY2D	17:	7'905'988-7'923'658 (fs)	20	ARLCA,ADCRD
IMPDH1	07:	128'032'331-128'050'306 (rs)	17	ADRP,ADLCA
IMPG2	03:	100'945'570-101'039'404 (rs)	20	ARRP
IQCB1	03:	121'488'610-121'553'926 (rs)	15	ARLCA
KLHL7	07:	23'145'353-23'215'040 (fs)	12	ADRP
LCA5	06:	80'194'708-80'247'175 (rs)	8	ARLCA
LPCAT1	05:	1'456'595-1'524'092 (rs)	14	ARLCA
LRAT	04:	155'548'097-155'674'270 (fs)	4	ARRP,ARLCA
MERTK	02:	112'656'056-112'787'138 (fs)	19	ARRP
NR2E3	15:	72'084'977-72'110'559 (fs)	8	ADRP,ARRP,ARESCS
NRL	14:	24'549'316-24'584'223 (rs)	3	ADRP,ARRP,ARESCS
OSBPL1A	18:	21'742'008-21'977'823 (rs)	29	ADRP



Tableau 3b : Liste des 63 gènes, 948 exons responsables des dystrophies rétiniennes : l'IROme.

OTX2	14:	57'267'426-57'277'197 (rs)	5	ADLCA
PDE6A	5:	149'237'519-149'324'356 (rs)	22	ARRP
PDE6B	4:	619'373-664'571 (fs)	23	ARRP, ADCSNB
PDE6G	17:	79'617'489-79'623'607 (rs)	4	ARRP
PRCD	17:	74'523'871-74'541'458 (fs)	5	ARRP
PROM1	4:	15'964'699-16'086'001 (rs)	28	ARRP, ADCRD, ADMD
PRPF3	1:	150'293'925-150'325'671 (fs)	16	ADRP
PRPF6	20:	62'612'488-62'664'453 (fs)	21	ADRP
PRPF8	17:	1'553'923-1'588'154 (rs)	43	ADRP
PRPF31	19:	54'618'837-54'635'140 (fs)	14	ADRP
PRPH2	6:	42'664'340-42'690'312 (rs)	3	ADRP, ADMD, ADCRD
RBP3	10:	48'381'487-48'390'991 (rs)	4	ARRP
RDH12	14:	68'168'603-68'201'169 (fs)	8	ADRP, ARLCA
RGR	10:	86'004'809-86'019'716 (fs)	7	ADRP, ARRP, ADCA
RHO	3:	129'247'483-129'254'012 (fs)	5	ADRP, ARRP, ADCSNB
RLBP1	15:	89'753'098-89'764'922 (rs)	9	ARRP
ROM1	11:	62'379'194-62'382'592 (fs)	3	ADRP
RP1	8:	55'471'729-55'682'531 (fs)	4	ADRP, ARRP
RP2	X:	46'696'375-46'741'793 (fs)	5	XRP
RP9 (PAP-1)	7:	33'134'409-33'149'013 (rs)	7	ADRP
RPE65	1:	68'894'505-68'915'642 (rs)	14	ARRP, ARLCA
RPGR	X:	38'128'424-38'186'817 (rs)	19	XRP, XCRD, XMD
RPGRIP1	14:	21'756'098-21'819'460 (fs)	24	ARLCA, ARCRD
SAG	2:	234'216'309-234'255'701 (fs)	16	ARRP, ARCSNB
SEMA4A	1:	156'117'157-156'147'543 (fs)	16	ADRP, ARRP, ADCRD
SNRNP200	2:	96'940'074-96'971'297 (rs)	45	ADRP
SPATA7	14:	88'851'268-88'936'694 (fs)	12	ARLCA
TOPORS	9:	32'540'542-32'552'551 (rs)	3	ADRP
TUB	11:	8'040'791-8'127'659 (fs)	13	ADRP
TULP1	6:	35'465'651-35'480'715 (rs)	15	ARRP, ARLCA
USH2A	1:	215'796'236-216'596'738 (rs)	73	ARRP
ZNF513	2:	27'600'098-27'603'657 (rs)	4	ARRP

## **Bibliographie**

1. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1:40.
2. Hamel CP. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:7.
3. Saleem RA, Walter MA. The complexities of ocular genetics. *Clin. Genet.* févr 2002;61(2):79-88.
4. Wang DY, Chan WM, Tam POS, Baum L, Lam DSC, Chong KKL, et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin. Chim. Acta.* janv 2005;351(1-2):5-16.
5. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 18 nov 2006;368(9549):1795-1809.
6. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* févr 2007;125(2):151-158.
7. Petzold A, Plant GT. Clinical disorders affecting mesopic vision. *Ophthalmic Physiol Opt.* mai 2006;26(3):326-341.
8. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* sept 2010;29(5):335-375.
9. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet.* mars 2010;11(4):273-284.
10. Maubaret C, Hamel C. [Genetics of retinitis pigmentosa: metabolic classification and phenotype/genotype correlations]. *J Fr Ophtalmol.* janv 2005;28(1):71-92.
11. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Hamel C, Dufier J-L, et al. [Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of genetic heterogeneity. A clinical definition update]. *J Fr Ophtalmol.* janv 2005;28(1):98-105.
12. Den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FPM. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res.* juill 2008;27(4):391-419.
13. Perrault I, Rozet J, Gerber S, Ghazi I, Leowski C, Ducroq D, et al. Leber Congenital Amaurosis. *Molecular Genetics and Metabolism.* oct 1999;68(Issue 2):200-208.

14. Goodwin P. Hereditary retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* mai 2008;19(3):255-262.
15. Allikmets R. Leber congenital amaurosis: a genetic paradigm. *Ophthalmic Genet.* juin 2004;25(2):67-79.
16. Cremers FPM. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Human Molecular Genetics.* mai 2002;11(10):1169-1176.
17. Chung DC, Traboulsi EI. Leber congenital amaurosis: clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update, and future directions. *J AAPOS.* déc 2009;13(6):587-592.
18. Ahmed E, Loewenstein J. Leber Congenital Amaurosis: Disease, Genetics and Therapy. *Semin Ophthalmol.* janv 2008;23(1):39-43.
19. Home - PubMed - NCBI: biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books. [Internet]. [cité 17 sept 2012]. Disponible sur: <https://crypto.unil.ch/,DanaInfo=www.ncbi.nlm.nih.gov+pubmed>
20. RetNet - Retinal Information Network: Summaries of Genes and Mapped Loci Causing Retinal Diseases [Internet]. [cité 17 sept 2012]. Disponible sur: <https://sph.uth.edu/retnet/>
21. Ensembl Genome Browser: The Ensembl project produces genome databases for vertebrates and other eukaryotic species [Internet]. [cité 17 sept 2012]. Disponible sur: <http://www.ensembl.org/index.html>
22. Tiab L. Protocole PCR Sanger: documentation non publiée.
23. Favez T, Escher P. Matériel et méthode Junior et Sanger: documentation non publiée.
24. Tiab L. Protocole de purification du séquençage Sanger: documentation non publiée.
25. Agosti C. Protocole de séquençage Sanger: documentation non publiée.
26. Roche, [www.454.com](http://www.454.com). GSJunior ShotgunTraining.
27. Favez T. 1Rapid library preparation protocol: documentation non publiée.
28. Roche, [www.454.com](http://www.454.com). NG\_SeqCapEZChoiceLR\_Guide\_v1p1.

29. Favez T. 2Liquid sequence capture for General library preparation: documentation non publiée.
30. Favez T. 3emPCR Amplification: documentation non publiée.
31. Favez T. 4Sequencing: documentation non publiée.
32. Office fédéral de la santé publique - Liste des analyses (LA) [Internet]. [cité 8 juin 2012]. Disponible sur:  
<http://www.bag.admin.ch/themen/krankenversicherung/00263/00264/04185/index.html?lang=fr>
33. Hayden EC. Sequencing set to alter clinical landscape. *Nature*. 16 févr 2012;482(7385):288.
34. Koenekoop RK, Lopez I, Den Hollander AI, Allikmets R, Cremers FP. Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 1 juill 2007;35(5):473-485.
35. RS 810.12 Loi fédérale du 8 octobre 2004 sur l'analyse génétique humaine (LAGH) [Internet]. [cité 1 oct 2012]. Disponible sur: [http://www.admin.ch/ch/f/rs/c810\\_12.html](http://www.admin.ch/ch/f/rs/c810_12.html)