

Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2024

Par Séléna TEILLAUD

Née le 31 octobre 1995 à La Rochelle (17)

Décrypter les répertoires d'immunoglobulines dans la néphropathie à IgA : approches innovantes en séquençage haut débit et protéomique

Thèse dirigée par Dr Virginie PASCAL

Examineurs :

Pr Sylvie ROGEZ, PU-PH, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, CHU de Limoges

Dr David RIZZO, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Dr Amélie BONAUD, MCU, laboratoire CRIBL, Université de Limoges

Pr Fatouma TOURE, PU-PH, service de néphrologie, CHU de Limoges

Pr Jean-Claude ALDIGIER, Pr émérite, Néphrologie, laboratoire CRIBL, Université de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 14 octobre 2024

Par Séléna TEILLAUD

Née le 31 octobre 1995 à La Rochelle (17)

Décrypter les répertoires d'immunoglobulines dans la néphropathie à IgA : approches innovantes en séquençage haut débit et protéomique

Thèse dirigée par Dr Virginie PASCAL

Examineurs :

Pr Sylvie ROGEZ, PU-PH, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, CHU de Limoges

Dr David RIZZO, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Dr Amélie BONAUD, MCU, laboratoire CRIBL, Université de Limoges

Pr Fatouma TOURE, PU-PH, service de néphrologie, CHU de Limoges

Pr Jean-Claude ALDIGIER, Pr émérite, Néphrologie, laboratoire CRIBL, Université de Limoges



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} janvier 2024

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIOUX Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIOUX Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie



Mme POUGET Christelle Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. TROUILLAS Patrick Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Élise (*) Pharmacologie

M. JOST Jérémie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle (*) Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David (*) Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	-------------------------------------------------------

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	-------------------------------------------------------

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. HAMION Guillaume	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie
Mme SONDA Amar	Chimie analytique et bromatologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Aux membres de ce jury,

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, je vous remercie vivement de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse d'exercice. Je tiens également à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien, vos conseils avisés et votre bienveillance tout au long de mes années d'internat. Soyez assurée de mon estime sincère et de ma reconnaissance profonde.

Monsieur le Docteur David RIZZO, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer mon travail de thèse et pour l'attention que vous porterez à sa lecture. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre bienveillance et votre pédagogie, qui ont marqué mon passage au laboratoire d'hématologie. Soyez assuré de tout mon respect et de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Amélie BONAUD, je te remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury et pour l'expertise scientifique que tu apporteras à mon travail. Tes conseils et ta bienveillance durant mon stage de Master 2 m'ont beaucoup apporté. Je te remercie sincèrement pour cela et te témoigne toute ma gratitude.

Madame le Professeur Fatouma TOURE, je vous suis sincèrement reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour l'expertise clinique que vous apportez à l'évaluation de ce travail. Recevez mes sincères remerciements ainsi que l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Claude ALDIGIER, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en jugeant mon travail de thèse. Je suis reconnaissante pour l'expertise que vous apportez à ce sujet, ainsi que pour vos futurs retours éclairés. Veuillez recevoir l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon respect.

À ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Virginie PASCAL,

Je tiens à te remercier sincèrement pour la confiance que tu m'as témoignée dans la réalisation de ce travail. Merci pour ta disponibilité, tes relectures, et tes encouragements dans ces nombreux moments de doutes. Merci également pour ta gentillesse, ta pédagogie et ton soutien, peu importe mes choix. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, et je savais que je ne le regretterais pas. Mais l'aventure continue, prépare-toi à devoir travailler, encore, avec moi quelques années. Merci sincèrement et infiniment pour tout !

À mes collègues limougeauds,

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler depuis le début de mon internat, en particulier le laboratoire d'immunologie de Limoges.

Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU, merci de m'avoir accueilli dans votre service et pour la confiance que vous m'avez accordée. Je vous suis reconnaissante pour le partage de vos connaissances en auto-immunité, ainsi que pour votre écoute et vos encouragements qui m'ont aidé à prendre confiance en moi.

Dr Matthieu FILLOUX, Ahmed BOUMEDIENE et Guillaume OLOMBEL, merci pour vos enseignements, votre sympathie et votre bienveillance. Travailler avec vous a été un réel plaisir.

Les technicien(ne)s et secrétaires du service d'immunologie, merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous et vous avoir à mes côtés lorsque j'en avais besoin. Un merci tout particulier à Alice et Cécile pour le temps que vous m'avez consacré sur le répertoire.

Merci à l'**unité de recherche CRIBL** de m'avoir accueilli et permis de travailler sur des sujets aussi passionnants. Un merci particulier à tous les membres de l'équipe **BioPic**, qui ont grandement participé à ce travail. Et merci à Emilie pour ta grande aide sur la spectrométrie.

Un très grand merci à **Paco**, sans toi tout ce travail n'aurait jamais vu le jour.

À mes collègues toulousains,

Professeur Yves RENAUDINEAU, merci de m'avoir accueilli dans votre service et pour ce semestre particulièrement enrichissant.

Merci également aux **Dr Bénédicte PUISSANT, Emmanuel TREINER, Paul-André APOIL et toute l'équipe du HLA** pour m'avoir fait découvrir vos secteurs avec passion.

Dr Françoise FORTENFANT, Chloé BOST et Caroline CARLE, un grand merci pour tout ce que vous m'avez transmis. J'ai énormément appris à vos côtés. Je vous suis reconnaissante pour l'accueil chaleureux et la confiance que vous m'avez accordée.

Aux techniciennes d'auto-immunité, merci pour votre bonne humeur, nos discussions (surtout sur le flankie !), les pauses café, et les fous rires. Merci également de m'avoir soutenu pendant l'écriture de cette thèse, en veillant à ce que je pense à manger et dormir ! J'avoue qu'en arrivant, je pensais qu'à repartir, et maintenant, je suis triste à l'idée de vous quitter ! Vous êtes une équipe formidable, ne changez rien, vous allez me manquer !

À mes co-internes,

Alice, sur qui je peux toujours compter pour me plaindre et surtout pour aller au fitness (trop facile le body pump quand on met des poids de 2Kg). J'ai apprécié chaque moment passé avec toi et je sais qu'il y en aura encore pleins d'autres. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Marie-Sarah, ma partenaire événementielle de choc ! A toutes nos soirées, nos week-ends et nos moments sportifs (je suis désormais prête pour le tour de France). Cet internat aurait été bien moins fun sans toi. Merci pour ta douceur, tes conseils et surtout ta folie. Merci d'être tout simplement toi.

Lucie avec qui j'ai commencé cet internat et avec qui je partage la même passion pour la bactério ! Je suis ravie d'avoir pu partager, pas un, mais deux semestres avec toi pendant lesquelles j'ai découvert une personne drôle, attentionnée et attachante. J'espère sincèrement que du haut de ton grand nord Dunkerquois, on réussira à ne pas se perdre de vue.

Alix, j'ai appris à te connaître au fur et à mesure de ces années et aujourd'hui je peux te compter parmi mes amis. J'ai découvert une belle personne, qui a toujours su être là pour moi et je t'en remercie.

Ines, ma co-équipière de ski (ou plutôt de luge, c'est plus facile). Merci pour toutes ces discussions qu'on a eues, ces repas et ces bons moments qu'on a pu partager. Je suis heureuse de t'avoir rencontré lors de ce court mais intense semestre de biochimie, tu es une personne d'une grande bienveillance, ne perds jamais ça.

Lucas, le roi de la danse, merci pour tous ces moments que ce soit au labo, en soirée ou autour d'un bon repas, tu m'as beaucoup fait rire !

Franck et à notre partenariat VP soirée qui n'a malheureusement pas perduré, à notre week-end ski (enfin luge), à notre week-end parisien rempli de postillons et à tous les autres à venir j'espère. Mais n'oublies pas que pour moi tu resteras toujours le petit jeune du groupe.

Juliette et Rémy, merci pour ce semestre d'immuno qui, sans vous, n'aurait pas été le même. Merci pour la transmission de vos connaissances en immuno et pour les petits cours d'anglais improvisés. On a formé un sacré trio que j'ai hâte de reformer pour de nouveaux week-ends.

A ma 2^{ème} team immuno, **Sarah**, la reine des immunofixations, merci de m'avoir préparé à la vie toulousaine en m'apprenant certaines expressions, j'étais moins dépaysée en arrivant et surtout merci d'avoir pris le temps de me faire découvrir cette jolie ville. **Nisrine** ou électro-girl, toujours partante pour un petit lindt accompagné de son café (en laissant toujours un fond dans la tasse). C'était un plaisir de partager ce semestre avec toi et surtout la formation lame des externes. **Timothy**, qui a dû supporter toutes nos conversations dans ce petit bureau mais qui a quand même su beaucoup nous apprendre en allerge !

Et à toutes les personnes avec qui j'ai partagés de bons moments au labo ou en dehors : **Paul-Henri, Quang, Benjamin, Valentin, Emilien, Manon, Maxime R., Cassandra, Sarah N., Thibaut, Augustin, Maxime L., Etienne, Sarah M., Intissar, Léa**, et à tous ceux que j'ai oublié.

À mes amis,

Robinou, qui as toujours été à mes côtés dans les meilleurs comme dans les pires moments ! Même si quelques lignes ne suffiront pas tout te dire, je tiens à te remercier d'avoir toujours su trouver les mots, de m'avoir autant fait rire et d'avoir été sûrement l'une des personnes les plus fière de moi. Je suis tellement chanceuse de t'avoir, tout le monde mérite une amie comme toi, jamais je ne te lâcherais ! Je t'aime

Tiffany, le collègue c'était il y a bien longtemps et pourtant tu es toujours là. Merci pour toutes ces folles soirées, même si tu dois avoir les pires photos et vidéos de moi et que ton chat à plus attaqué mes cils que ses jouets. J'espère faire partie de ta vie et de celle de tes deux merveilles encore bien longtemps.

Awa, après vingt ans, tu es le genre d'amie qui devient un membre de la famille. Je n'oublierai jamais tout ce qu'on a vécu ensemble, quelle adolescence ! Merci de faire partie de ma vie depuis aussi longtemps, quoi qu'il arrive, on restera toujours Awa et Séléna.

Khady, ma partenaire culinaire grâce à qui j'ai découvert tant de restaurants, après lesquelles il a fallu faire de nombreuses fois le tour du port pour pouvoir digérer ! Vite, vite qu'on se retrouver, on doit terminer notre liste de restaurants à tester ! Mais surtout merci pour tous ces moments qu'on a partagés un peu partout en Europe, merci de toujours avoir eu le mot pour me faire rire, ne changes rien.

Sarah, ma petite pharmacienne en herbe grâce à qui j'ai pu faire pleins de pique-niques sur la plage (et manger le bon poulet de ta maman). Je suis très contente d'avoir pu te rencontrer, sinon je n'aurais jamais vécu la scène du bus à Nantes et ça aurait été bien dommage (je rigole juste en l'écrivant). Je suis fière de pouvoir te compter parmi mes amies, j'ai hâte de pouvoir venir te voir dans le sud.

Suzanne, la reine du barbecue. On a passé de sacrés bons moments, toujours le mot pour redonner le sourire et rebooster ! Tu es une superbe personne, ne changes rien. On se retrouve très vite à Paris.

Nono, mon binôme de TP (sauf celui sur les rats sorry !). Merci pour tous ces moments de folies qu'on a partagés, pour ces soirées à refaire le monde et pour ces week-ends parfois un peu trop enneigés. J'espère encore pouvoir passer de nombreux moments comme ça avec toi.

A mon p'tit Ben et tous nos projets qui ne verrons jamais le jour ! Merci d'être qui tu es, de m'avoir autant fait rire toutes ces années de pharma (et parfois un peu crier). Même si on arrive à se voir qu'une fois par an, ceux sont des moments que je ne veux pas perdre.

La team pharma, Olivia, Camille, Quentin, Louise, Alarie, Selin... et à toutes ces soirées à base de « Teq paf sans RIEN ! », à notre brevet de Rhum-pompompom qui ne verra jamais le jour, à nos week-ends et à tous les moments qu'on a pu partager. Merci pour ces années et ces vendredis matin difficiles.

À mon chéri,

Antoine, ça y est tu as enfin ton paragraphe rien que pour toi !

Merci d'avoir supporté mon humeur exécrationnelle de ces dernières semaines, merci pour ton aide sur excel et pour la relecture de ce manuscrit, merci d'avoir passé des vacances et des week-ends nuls à cause de moi, merci de m'avoir réconforté et encouragé quand je pensais que jamais je n'y arriverais. Merci d'avoir fait de moi la mère de deux merveilleux furets (enfin un seul pour le moment). Et surtout, merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et de faire tout simplement partie de ma vie, je t'aime.

Et merci à toute ta famille qui m'a accueilli avec bienveillance et qui m'a soutenu pendant cette période.

À ma famille,

Papa, merci pour avoir cru en moi et m'avoir toujours soutenu.

Ma sœur, merci pour m'avoir si bien appris la bagarre étant petite ! Merci d'avoir fait de moi une tata de deux petits monstres qui ne savent toujours pas si je suis une adulte ou une enfant car je suis une vieille qui va encore à l'école et qui n'a pas d'enfants. Mais surtout merci pour ton soutien notamment lors de cette dernière ligne droite. Je serais toujours là pour toi.

Maman, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as été à la fois une mère, une sœur, une amie et un père. Tu as tellement assuré ! Sans tes encouragements, tes messages, tes conseils, sans toi tout simplement, je n'en serais sûrement jamais arrivée là. Sois aussi fière de toi que tu ne l'aies de moi. Je t'aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

5'RACE: *5'Rapid Amplification of cDNA Ends*

AID: *Activation Induced cytidine Deaminase*

Ac : Anticorps

Ag : Antigènes

BCR : *B-cell Receptor*

CDR : *Complementarity Determining Region*

CH : Domaine constant des chaînes lourdes d'immunoglobulines

CL : Domaine constant des chaînes légères d'immunoglobulines

FR : *Framework Region*

GalNac : *N*-acétylgalactosamine

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue* ou Tissu lymphoïde associé à la muqueuse digestive

Gd-IgA : Immunoglobuline A déficiente en Galactose

Gd-IgA1 : Immunoglobuline A1 déficiente en Galactose

HC : *Heavy Chain* ou Chaînes lourdes d'immunoglobulines

Ig : Immunoglobulines

IgAp : Immunoglobuline A polymérique

IgA1p : Immunoglobuline A1 polymérique

IgAs : Immunoglobuline A sécrétoire

IgAN : Néphropathie à immunoglobulines A

IGH : Locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines

IGK : Locus des chaînes légères kappa d'immunoglobulines

IGL : Locus des chaînes légères lambda d'immunoglobulines

LC : *Light Chain* ou Chaîne légère des immunoglobulines

LB : Lymphocytes B

MALT : *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* ou Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MS : *Mass Spectrometry* ou spectrométrie de masse

NGS : *Next Generation Sequencing*

NHEJ : *Non-Homologous End Joining*

pIgR : Récepteur des Immunoglobulines polymériques

RAG : *Recombination Activating Gene*

VH : Domaine variable des chaînes lourdes d'immunoglobulines

VL : Domaine variable des chaînes légères d'immunoglobulines

Table des matières

Introduction	18
I. Le système immunitaire.....	19
I.1. Le lymphocyte B	19
I.1.1. Structure des immunoglobulines.....	19
I.1.2. Organisation et réarrangement des gènes d'immunoglobulines.....	20
I.1.2.1. Loci des chaînes lourdes d'immunoglobulines	20
I.1.2.2. Loci des chaînes légères d'immunoglobulines	22
I.2. Activation et différenciation du lymphocyte B	23
I.2.1.1. Hypermutation somatique	23
I.2.1.2. Commutation isotypique.....	24
I.2.2. Différenciation terminale des lymphocytes B	25
I.3. L'immunoglobuline A.....	25
I.3.1. Structure.....	25
I.3.1.1. IgA monomérique.....	26
I.3.1.2. IgA polymérique	26
I.3.1.3. IgA sécrétoire.....	26
I.3.1.4. Glycosylation.....	27
I.3.2. Production	28
I.3.3. Rôle.....	29
I.4. Néphropathie à IgA.....	30
I.4.1. Définition et épidémiologie.....	30
I.4.2. Clinique	30
I.4.3. Physiopathologie	31
I.4.3.1. Hypothèse du « multi-hit ».....	31
I.4.3.2. Processus inflammatoire et répercussion rénale	32
I.4.3.3. Origine des IgA néphritogènes	33
I.4.4. Diagnostic	34
I.4.5. Prise en charge	35
I.5. Etude du répertoire des immunoglobulines par biologie moléculaire	36
I.6. Etude du répertoire des immunoglobulines par spectrométrie de masse	40
I.6.1. Principe de la spectrométrie de masse	41
I.6.1.1. La chromatographie liquide haute performance	41
I.6.1.2. La spectrométrie de masse	42
I.7. Objectifs.....	44
II. Partie expérimentale.....	45
II.1. Matériel et méthodes	45
II.1.1. Matériel	45
II.1.1.1. Echantillons sériques	45
II.1.1.2. Reliquats de biopsies rénales	45
II.1.2. Méthodes	45
II.1.2.1. Séquençage par la technologie Illumina ®	45
II.1.2.1.1. Préparation de la librairie	45
II.1.2.1.2. Séquençage	48
II.1.2.1.3. Analyse bio-informatique	48
II.1.2.2. Séquençage par la technologie Oxford Nanopore®	50



II.1.2.2.1. Préparation de la librairie	50
II.1.2.2.2. Séquençage et analyse bio-informatique	51
II.1.2.3. Etude protéomique.....	52
II.1.2.3.1. Préparation des échantillons.....	52
II.1.2.3.1.1. Protocole de décellularisation.....	52
II.1.2.3.1.2. Préparation à la spectrométrie de masse	53
II.1.2.3.2. Chromatographie liquide haute performance	53
II.1.2.3.3. Spectrométrie de masse.....	53
II.1.2.3.4. Analyse protéomique	53
II.1.2.4. Statistique	54
III. Résultats	55
III.1. Etude comparative des technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore®	55
III.1.1. Comparaison des coûts financiers et des durées d'exécution.....	55
III.1.2. Comparaison des résultats d'analyse des répertoires d'Ig sériques obtenus par Illumina® et Oxford Nanopore®	56
III.1.2.1. Comparaison clonotypique.....	56
III.1.2.2. Comparaison de la répartition isotypique et de la représentation des sous-classes d'Ig.....	58
III.1.2.3. Comparaison des caractéristiques des domaines variables des chaînes lourdes d'Ig	59
III.2. Etude comparative des répertoires d'Ig circulantes de patients IgAN avec ceux des volontaires sains	63
III.2.1. Comparaison clinique et biologique des patients et volontaires sains inclus dans notre étude.....	63
III.2.2. Comparaison des répertoires d'Ig circulantes et recherche de « signatures » de la IgAN.....	64
III.2.2.1. Proportion des isotypes et des sous-classes d'Ig	65
III.2.2.2. Domaines variables des chaînes lourdes d'Ig	66
III.2.2.3. Caractérisation des propriétés physico-chimiques des chaînes lourdes d'immunoglobulines	69
III.2.2.4. Analyse des clonotypes communs entre les patients IgAN.....	72
III.2.2.5. Domaines constants des chaînes lourdes d'Ig	74
III.3. Etude protéomique de ponctions biopsies rénales de patients atteint de IgAN et de contrôles	76
III.3.1.1. Analyse par spectrométrie de masse des protéines identifiées sur reliquats de biopsies rénales.....	77
III.3.1.1.1. Identification des protéines associées aux dépôts d'IgA	77
III.3.1.1.2. Corrélation avec les Ig du sérum	79
IV. Discussion	80
Conclusion	84
Références bibliographiques	85
Annexes	93
Serment De Galien.....	97

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline, modifiée d'après (4)	20
Figure 2 : Locus IgH (chromosome 14q32), modifiée d'après (6)	21
Figure 3 : Loci des chaînes légères d'immunoglobulines, modifiée d'après (6)	22
Figure 4 : Répartition des hypermutations somatiques sur la région variable des Ig, modifiée d'après (14)	24
Figure 5 : Commutation isotypique, modifiée d'après (16)	24
Figure 6 : Représentation des différentes structures d'IgA, modifiée d'après (20).....	26
Figure 7 : Transport de l'IgA par le pIgR vers la lumière des muqueuses (23).....	27
Figure 8 : Sites de glycosylation sur l'IgA1 et l'IgA2 (27).....	28
Figure 9 : Physiopathologie de la IgAN, hypothèse du "multi-hit" (43)	31
Figure 10 : Analyse anatomopathologique de la ponction biopsie rénale d'un patient atteint de IgAN (74).....	34
Figure 11 : Principe du séquençage par la technologie Illumina® (87)	37
Figure 12 : Principe du séquençage par la technologie Oxford nanopore ® sur l'appareil MinION, modifiée d'après (89).....	38
Figure 13 : Représentation des différentes méthodes de génération d'une librairie pour le séquençage par la technologie Oxford Nanopore®, modifiée d'après (89)	39
Figure 14 : Principe de la chromatographie liquide haute performance, modifiée d'après (107)	42
Figure 15 : Principe général de spectrométrie de masse	42
Figure 16 : Etape de reverse transcription par 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	46
Figure 17 : Etape de PCR semi-nichée (PCR1).....	46
Figure 18 : Orientation R1-R2 et R2-R1 de la librairie pour le séquençage asymétrique (PCR2)	47
Figure 19 : Insertion des index et des adaptateurs Illumina® (PCR3).....	47
Figure 20 : Séquençage asymétrique	48
Figure 21 : Correction des erreurs de PCR par consensus des UMI, modifiée d'après (96)..	48
Figure 22 : Assemblage bio-informatique des séquences de 400pb basé sur un même UMI	49
Figure 23 : Représentation des clonotypes d'un répertoire d'Ig (G, A et M) sur « Iglook »	50
Figure 24 : Etape de préparation d'une librairie avec le kit « Native Barcoding Kit 24 V14 » (113).....	51
Figure 25 : Comparaison du nombre moyen de clonotypes obtenus par répertoire d'Ig.....	57
Figure 26 : Diagrammes de Venn représentant les clonotypes communs pour chaque patient (PA) lors de la comparaison des répertoires issus des deux technologies.....	57

Figure 27 : Comparaison de la répartition moyenne des isotypes d'Ig (IgG, IgA et IgM) obtenue par les technologies Illumina® et Oxford Nanopore®	58
Figure 28 : Comparaison de la répartition moyenne des sous-classes d'Ig.....	59
Figure 29 : Comparaison de la longueur moyenne des domaines variables et des régions <i>CDR3</i> (en AA).	60
Figure 30 : Comparaison du taux moyen d'hypermutation somatique obtenus par répertoire d'Ig	60
Figure 31 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH et JH des chaînes lourdes d'Ig	61
Figure 32 : Comparaison du nombre moyen de clonotypes dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains.....	65
Figure 33 : Comparaison de la fréquence moyenne des isotypes d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains	65
Figure 34 : Comparaison de la fréquence moyenne des sous-classes d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains	66
Figure 35 : Comparaison de la longueur moyenne des domaines variables et des régions <i>CDR3</i> d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains ..	67
Figure 36 : Comparaison des taux d'hypermutation somatique des chaînes lourdes d'Ig dans les répertoires des patients atteints de IgAN et des volontaires sains.....	67
Figure 37 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH et JH dans les répertoires d'Ig des patients atteints de patients atteints de IgAN et des volontaires sains ...	68
Figure 38 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH spécifiquement dans les répertoires IgA1 dans les répertoires des patients atteints de patients atteints de IgAN et des volontaires sains	69
Figure 39 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des segments variables des chaînes lourdes VH et des régions <i>FR</i> et <i>CDR</i>	71
Figure 40 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des régions <i>FR1</i> spécifiquement sur les IgA1	72
Figure 41 : Répartition des isotypes d'Ig au sein des clonotypes partagés	73
Figure 42 : Répartition des allèles VH au sein des clonotypes partagés des répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN.....	73
Figure 43 : Répartition des allèles VH au sein des répertoires d'Ig de volontaires sains	74
Figure 44 : Images de microscopie à épifluorescence de coupes rénales d'un patient atteint de IgAN et d'un contrôle avant et après décellularisation.....	76
Figure 45 : Abondance moyenne des chaînes lourdes et légères d'Ig dans les deux groupes étudiés	77
Figure 46 : Abondance moyenne de la chaîne J et du pIgR dans les deux groupes étudiés.	78

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des coûts financiers par échantillon pour les deux technologies de séquençage.....	55
Tableau 2 : Données clinico-biologiques des patients et des volontaires sains inclus dans notre étude	63

Introduction

La reconnaissance des antigènes (Ag), par le système immunitaire adaptatif humoral, met en jeu des glycoprotéines exprimées par la lignée lymphocytaire B. Ces glycoprotéines sont des immunoglobulines (Ig), qui constituent un répertoire polyclonal, caractérisé par une grande diversité de récepteurs, chacun représentant une affinité particulière pour un Ag donné. Cette diversité résulte de plusieurs processus de réarrangements génétiques qui modifient le génome des lymphocytes B (LB) au cours de leur maturation, conduisant à l'expression d'une Ig unique pour chaque lymphocyte. Récemment, l'exploration de ces répertoires d'Ig a été facilitée par les avancées des technologies de séquençage haut débit. L'un des aspects les plus prometteurs de ces études est la possibilité d'identifier des « répertoires signatures », caractéristiques d'un profil immunitaire particulier.

De telles études pourraient s'avérer particulièrement pertinentes dans le contexte de la néphropathie à immunoglobuline A (IgAN), où des variations dans les répertoires d'Ig au cours des réponses immunitaires sont susceptibles de moduler la propension des IgA à se déposer. Cette pathologie, marquée par des dépôts d'IgA dans les glomérules rénaux, est la forme la plus courante de néphropathie glomérulaire primitive et peut entraîner une insuffisance rénale chronique terminale, nécessitant des dialyses ou une transplantation rénale.

Étant donné sa prévalence, son impact sur la fonction rénale et la compréhension partielle de sa physiopathologie, il est crucial d'élucider les mécanismes sous-jacents à la néphrotoxicité des IgA dans cette néphropathie. Au sein de notre laboratoire, l'analyse des répertoires d'IgA est actuellement réalisée à l'aide d'une technique innovante, la RACE-RepSeq sur matrice ARN, développée par l'unité de recherche CRIBL (Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations) en collaboration avec le centre de référence des amyloses AL et d'autres maladies liées aux dépôts d'Ig monoclonales. Cette approche permet d'explorer en détail les répertoires immunitaires, y compris dans des contextes où les techniques classiques d'immunobiologie se montrent limitantes.

Parallèlement, l'émergence de nouvelles technologies de séquençage haut débit de troisième génération, capables de séquencer de longues séquences en un temps réduit, offrent une alternative prometteuse aux technologies établies comme Illumina®, limitées par la taille des fragments séquencés. Ces nouvelles plateformes permettent, notamment, de séquencer les Ig dans leur intégralité, un atout majeur pour l'étude approfondie de répertoires complexes.

Conjointement aux avancées technologiques du séquençage à haut débit, la spectrométrie de masse (MS) s'impose également comme un outil clé en immunologie. Cette technologie, déjà utilisée pour caractériser les dépôts rénaux d'Ig de patients porteurs d'une gammopathie monoclonale, pourrait s'avérer complémentaire à la biologie moléculaire dans l'étude des pathologies polyclonales comme la IgAN.

L'objectif de ce travail a donc été de comparer les technologies de séquençage de deuxième et troisième génération, respectivement Illumina® et Oxford Nanopore®, afin d'améliorer la caractérisation des répertoires d'Ig sériques chez les patients atteints de IgAN. En parallèle, nous avons exploré l'utilisation de la MS pour corrélérer les IgA néphritogènes des biopsies rénales avec les séquences d'IgA circulantes identifiées par NGS. Bien que cette approche soit encore en développement, l'identification des IgA néphritogènes pourrait fournir un biomarqueur sanguin pour le suivi des patients. Enfin, la combinaison de ces approches pourrait améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies liées aux Ig néphrotoxiques, comme la IgAN.

I. Le système immunitaire

Le système immunitaire se définit comme un ensemble complexe d'organes, de tissus, de cellules et de molécules, dont la fonction principale est d'assurer la défense de l'organisme contre les agressions exogènes provenant des microorganismes pathogènes et les agressions endogènes pouvant mener, par exemple, à la formation de tumeurs. Il se compose de deux systèmes de défense : l'immunité innée, présente chez tous les organismes pluricellulaires, et l'immunité adaptative provenant de l'évolution des vertébrés. Ces deux systèmes collaborent étroitement lors d'une réponse immunitaire.

L'immunité innée, constitue la première ligne de défense face aux situations de danger auxquelles est confronté l'organisme. Elle mobilise notamment des cellules et des molécules pro-inflammatoires, mais elle ne possède pas de mémoire immunitaire, ce qui conduit à une réponse uniforme, indépendamment de l'agent pathogène rencontré, la rendant ainsi peu spécifique.

A l'inverse, l'immunité adaptative se distingue par sa capacité d'apprentissage et de mémorisation, permettant une réponse ciblée à un Ag spécifique. Son activation, plus lente, se manifeste plus tardivement par rapport à l'immunité innée. La diversité des molécules effectrices de ce système dépend des pathogènes rencontrés par l'hôte au cours de sa vie. Les lymphocytes B et T, qui sont les cellules clés du système immunitaire adaptatif, produisent des récepteurs antigéniques spécifiques aux Ag du non-soi tout en épargnant les Ag du soi.

I.1. Le lymphocyte B

Les LB représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes circulants (1) et se caractérisent par la présence d'Ig à leur surface appelées BCR (*B-cell Receptor*). Le répertoire lymphocytaire B est constitué par l'ensemble des LB d'un individu, chacun étant caractérisé par une Ig de surface unique à l'égard de la spécificité antigénique. Cette immense diversité résulte de recombinaisons des segments de gènes codant les chaînes lourdes et légères qui composent ces molécules, offrant, en théorie, la possibilité de créer plus de 10^{15} séquences différentes d'Ig chez l'Homme (2).

I.1.1. Structure des immunoglobulines

Également dénommées BCR ou anticorps (Ac) selon qu'elles soient membranaires ou sécrétées, les Ig sont des hétérodimères protéiques formées par l'assemblage de deux chaînes lourdes (HC pour *Heavy Chain*) identiques, reliées entre elles par des ponts disulfures et associées à deux chaînes légères (LC pour *Light Chain*) également identiques entre elles. Les chaînes légères sont de deux types ; kappa (κ) ou lambda (λ), alors qu'il existe cinq grandes classes de chaînes lourdes (IgM, IgG, IgA, IgD et IgE) codées respectivement par les gènes $C\mu$, $C\gamma$, $C\alpha$, $C\delta$ et $C\epsilon$, avec quatre isotypes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et deux isotypes d'IgA (IgA1 et IgA2) (1).

Chaque chaîne HC et LC est composée d'un domaine constant et d'un domaine variable. Le domaine constant des chaînes légères est composé d'un segment unique (CL) alors que celui des chaînes lourdes (CH) comporte plusieurs segments (CH1, CH2, CH3, et CH4 pour $C\mu$ et $C\epsilon$), à l'origine des fonctions effectrices de l'Ig.

Chaque chaîne HC et LC est également composée d'un domaine variable (VH/VL), résultat de réarrangement géniques complexes se produisant tout au long du développement des cellules B et responsables de la spécificité de l'Ig (3). Chaque domaine variable est composé de trois régions hypervariables appelées *complementarity determining region* ou *CDR* séparées par quatre régions charpentes *framework region* ou *FR*, plus conservées (Figure 1). L'association spatiale des régions *CDR* des chaînes lourdes et légères, définit le site de fixation à l'Ag.

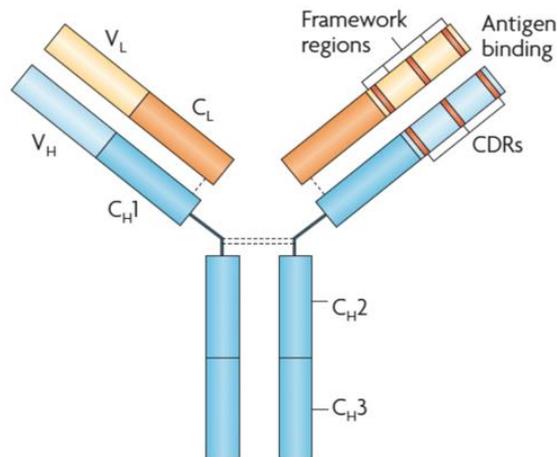


Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline, modifiée d'après (4)

I.1.2. Organisation et réarrangement des gènes d'immunoglobulines

La production des chaînes lourdes (locus IgH) et des chaînes légères (locus Igk et Igλ) des Ig humaines résulte de réarrangements géniques complexes au sein des trois loci IgH Igk et Igλ situés sur trois chromosomes différents.

I.1.2.1. Loci des chaînes lourdes d'immunoglobulines

Le locus IgH humain, localisé sur le chromosome 14, se compose d'environ 100 segments de gènes organisés en trois familles : 123 à 129 segments VH (pour variabilité) dont environ 45 sont fonctionnels, répartis en sept sous-groupes (V1 à V7), 27 segments DH (pour diversité) et 9 segments JH (pour jonction), dont 6 sont fonctionnels (5). Ce locus inclut également 9 régions codant pour les domaines constants (CH) des 9 classes et sous-classes d'Ig, disposées dans l'ordre suivant : Cμ, Cδ, Cγ3, Cγ1, Cα1, Cγ2, Cγ4, Cε, et Cα2 (Figure 2).

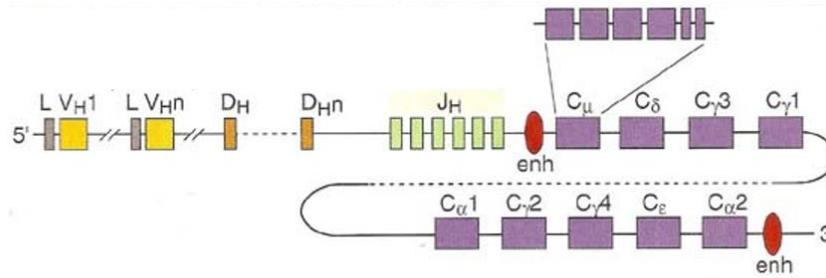


Figure 2 : Locus IgH (chromosome 14q32), modifiée d'après (6)

Dans sa configuration germinale, ce locus n'est pas fonctionnel et nécessite des réarrangements géniques complexes permettant l'association aléatoire d'un segment VH avec un segment DH et un segment JH aboutissant à la formation d'un exon VDJ. Au sein du locus IgH, cette recombinaison génique nécessite deux grandes étapes : l'association initiale d'un segment JH avec un segment DH, suivie d'un réarrangement de cette association DH-JH avec un segment VH. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles et les multiples combinaisons possibles entre ces éléments constituent la première base de la diversité des Ig dite « combinatoire ».

Ce processus de recombinaison VDJ est initié par l'action du complexe enzymatique RAG (*Recombination Activating Gene*), spécifiquement exprimé par les cellules lymphoïdes et rigoureusement régulé durant le développement des LB (1). Le complexe RAG permet la formation d'une structure en épingle à cheveux et le clivage de l'ADN double brin au niveau de sites spécifiques appelés RSS (séquence signal de recombinaison) localisés en aval des segments V, de part et d'autre des segments D et en amont des segments J.

La résolution des cassures induites par le complexe RAG, est assurée par un mécanisme ubiquitaire de réparation de l'ADN, appelé NHEJ (*Non-Homologous End Joining*), qui permet la jonction d'extrémités non homologues et la ligation des différents segments codants (7). Cependant, lors des processus de recombinaison VDJ, les imprécisions de coupure induites par le complexe RAG, ainsi que l'action ultérieure d'exonucléases, engendrent une variabilité dans les zones de jonction entre les segments associés (5). On parle alors de diversité jonctionnelle qui contribue à accroître la diversité des Ig générées par les mécanismes de recombinaison.

Ces réarrangements se déroulent au cours du développement des LB dans la moelle osseuse de manière indépendante de l'Ag. Ils sont initiés sur l'un des deux allèles IgH. Si le segment VDJ est productif, c'est-à-dire avec une région variable fonctionnelle, il permet la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique et le second allèle n'est alors pas recombiné ni exprimé (8). En revanche, si la tentative échoue, un nouveau réarrangement est tenté sur l'autre allèle et si là encore cela aboutit à un réarrangement non productif, la cellule est éliminée par apoptose. Le réarrangement productif d'une chaîne lourde est essentiel à la survie de la cellule B et à ce stade, une seule séquence recombinaisonnée sur trois est susceptible de coder pour une protéine fonctionnelle (8). L'ensemble de ces processus garantissent que chaque cellule B exprime une chaîne lourde d'Ig unique.

I.2. Activation et différenciation du lymphocyte B

Les LB « immatures » ayant réussi la sélection négative dans la moelle osseuse quittent cette dernière pour se diriger vers les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate, les ganglions lymphatiques et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Cette étape d'activation et de maturation des LB en périphérie dépend de la présence d'Ag et conduit à leur différenciation en plasmocytes ou en cellules B mémoires spécifiques d'un Ag (11). La manière dont cette différenciation se produit varie en fonction de la sous-population B, du contexte de la rencontre avec l'Ag et de la nature de celui-ci. Par exemple, certains LB participent à des réponses humorales indépendantes des lymphocytes T, se différenciant rapidement et principalement en plasmocytes à IgM de courte durée de vie. D'autres LB, dans le cadre d'une réponse humorale dépendante des lymphocytes T, contribuent à la formation de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires, au sein de structures appelées follicules. Dans ces zones hautement organisées, les loci des Ig subissent d'autres processus de diversification, que sont l'hypermutation somatique et la commutation isotypique, afin d'améliorer l'affinité des Ig pour les Ag.

I.2.1.1. Hypermutation somatique

Cette étape de diversification des gènes a pour but de moduler l'affinité de l'Ig pour l'Ag afin d'en augmenter sa spécificité. Elle résulte de l'activité de l'enzyme AID (*Activation Induced cytidine Deaminase*), décrite pour la première fois en 1999 (12). Cette enzyme « attaque » les régions variables des trois locus d'Ig en désaminant les cytidines en uraciles sur un ADN simple brin, à l'origine d'un mésappariement guanidine:uracil. Par la suite, les différents systèmes de réparation peu fidèles, qui interviennent pour résoudre ces mésappariements, introduisent des mutations ponctuelles, des insertions et/ou des délétions dans les séquences nucléotidiques codant les régions variables des Ig à un taux de 10^{-3} à 10^{-4} modification par base par division cellulaire (13), modifiant l'affinité de l'Ac pour un Ag donné.

A la suite de ce phénomène, un système de sélection des LB exprimant une Ig d'affinité augmentée pour l'Ag se met en place. A l'inverse, si les modifications des régions variables entraînent une diminution de l'affinité de l'Ig pour l'Ag ou une altération de la structure de l'Ig, le lymphocyte est éliminé par apoptose. Bien que l'enzyme AID agit de manière homogène sur les gènes codants les parties variables de l'Ig, ce mode de sélection permet de comprendre la localisation préférentielle des mutations au sein des régions CDR des chaînes lourdes et légères d'Ig qui forment les sites de fixation à l'Ag (Figure 4).

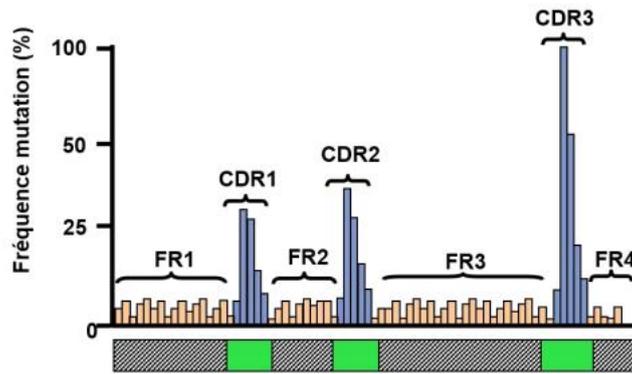


Figure 4 : Répartition des hypermutations somatiques sur la région variable des Ig, modifiée d'après (14)

I.2.1.2. Commutation isotypique

La commutation isotypique concerne les domaines constants des chaînes lourdes d'Ig dont dépendent les fonctions effectrices de l'Ig sécrétée ou Ac. A l'issue de la différenciation médullaire, tous les LB expriment une Ig d'isotype «M» codée par la région constante $C\mu$. En fonction de la nature de l'Ag activateur, de l'environnement cytokinique et de divers signaux cellulaires, la cellule B peut exprimer une classe d'Ig différente, c'est la « commutation de classe » ou « commutation isotypique ». Au cours de ce processus, le gène réarrangé VDJ se rapproche d'un nouveau segment génique codant pour le domaine constant d'une classe d'Ig différente ($C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\alpha1$, $C\gamma2$, $C\gamma4$, $C\epsilon$, ou $C\alpha2$) par une recombinaison médiée, elle aussi, par l'enzyme AID. Cette dernière initie la recombinaison en générant une désamination des cytosines en uraciles au niveau de sites particuliers appelées « régions switch », constitués de séquences homologues répétitives et situés en amont de tous les domaines constants. Par la suite, différentes enzymes de réparation de l'ADN agissent en cascade pour achever le processus. Il en résulte une perte irréversible de tout l'ADN intermédiaire et notamment du segment $C\mu$ (Figure 5) (15).

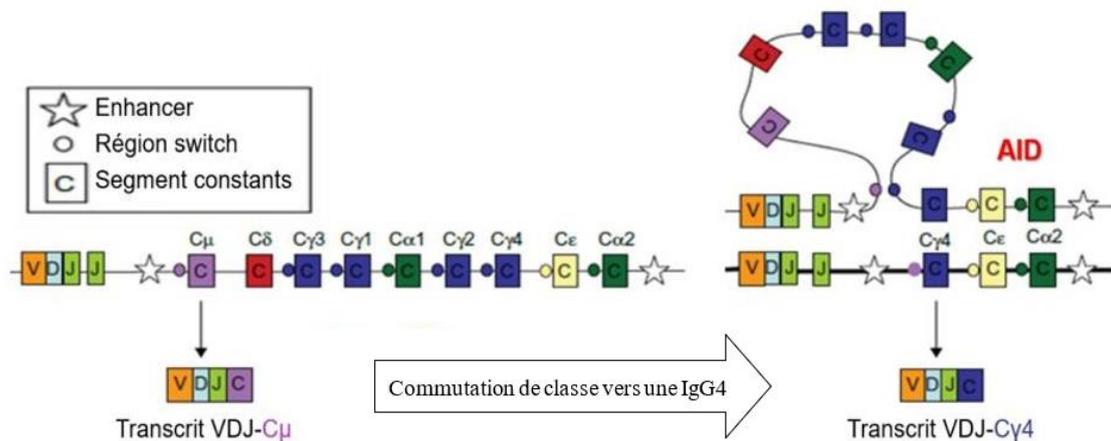


Figure 5 : Commutation isotypique, modifiée d'après (16)

Ce réarrangement permet l'expression d'une Ig aux fonctions effectrices mieux adaptées à l'Ag rencontré et au site anatomique de la réponse humorale mis en jeu.

Dans le cadre d'une réponse humorale T-dépendante, un LB ayant subi une hypermutation somatique et une éventuelle commutation de classe achève sa maturation en plasmocyte à longue durée de vie ou en cellule B mémoire.

I.2.2. Différentiation terminale des lymphocytes B

Les cellules B mémoires sont un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie capable de persister à l'état quiescent, plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années. Elles sont à l'origine d'une réponse humorale dite « secondaire », caractérisée par une production d'Ig, majoritairement d'isotype « G » et d'affinité améliorée. Dans le cadre d'une réponse secondaire à un Ag, les cellules mémoires ont la capacité de reformer des centres germinatifs dans lesquels elles vont subir de nouveaux cycles d'hypermutation somatique, augmentant encore l'affinité de l'Ig pour l'Ag.

Les plasmocytes, quant à eux, sont spécialisés dans la sécrétion d'Ac avec des taux de sécrétion élevés, estimés entre 2000 et 10000 molécules /seconde (17). Dans ces cellules, le passage de la forme d'Ig membranaire à la forme sécrétée résulte d'une modification de la maturation des ARN messagers. A la suite de ces processus de diversification, une partie des plasmocytes à longue durée de vie retourne se nicher dans la moelle osseuse.

I.3. L'immunoglobuline A

Largement représentée au niveau sérique et prédominante dans les sécrétions muqueuses, l'IgA joue un rôle essentiel dans la protection et le maintien de l'homéostasie des muqueuses. Chez l'Homme, l'IgA se divise en deux sous-classes : IgA1 et IgA2. La distinction entre ces deux sous-classes réside principalement dans la région charnière (partie liant les domaines CH1 et CH2 de la chaîne lourde) de l'IgA1, qui contient une séquence de deux répétitions de huit acides aminés, riche en proline, sérine et thréonine (18). Cette caractéristique confère à l'IgA1 une flexibilité accrue, mais la rend également plus vulnérable à la dégradation protéolytique, notamment par l'action de protéases bactériennes (19).

I.3.1. Structure

L'IgA existe sous différentes formes moléculaires : monomériques, polymériques et sécrétoires (Figure 6).

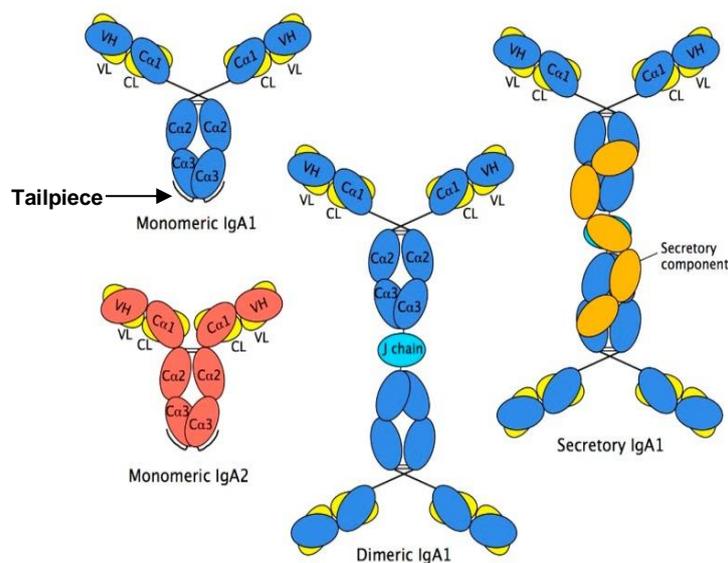


Figure 6 : Représentation des différentes structures d'IgA, modifiée d'après (20)

I.3.1.1. IgA monomérique

L'IgA monomérique, un hétérodimère protéique d'une masse moléculaire de 160 kDa, présente une structure similaire à celle des autres classes d'Ig, comme précédemment décrit. Cette forme d'IgA prédomine dans la circulation sanguine, avec une proportion d'environ 90 % d'IgA1 pour 10 % d'IgA2 (20).

I.3.1.2. IgA polymérique

L'extrémité C-terminale du domaine CH3 des chaînes lourdes $C\alpha$ est caractérisée par la présence d'une séquence peptidique de dix-huit acides aminés désignée sous le nom de "tailpiece", qui confère à l'IgA sa capacité à polymériser, via une liaison avec un petit polypeptide de 15 kDa appelé chaîne J. Cette dernière, identifiée chez l'Homme en 1970 (21), comporte huit cystéines hautement conservées, dont seulement deux participent à la formation de ponts disulfure avec la tailpiece (22). La polymérisation des IgA est initiée sous la forme de dimères, l'association des deux monomères d'IgA étant stabilisée grâce à leur liaison à la chaîne J. Cette liaison est à l'origine de degrés supplémentaires d'association avec d'autres monomères d'IgA pour former des tétramères ou des pentamères, que l'on désigne sous le terme générique d'IgA polymériques (IgAp).

I.3.1.3. IgA sécrétoire

Les IgAp possèdent la capacité de se lier au récepteur des Ig polymériques (pIgR), qui est exprimé à la surface basale des cellules épithéliales des muqueuses. Ce récepteur joue un rôle dans le transport spécifique des Ig polymériques à travers l'épithélium muqueux, facilitant

leur libération dans les sécrétions. Lors de l'interaction entre l'IgAp et le pIgR, une modification conformationnelle de ce dernier se produit, permettant l'internalisation du complexe IgAp-pIgR et le transport des IgAp à travers l'épithélium jusqu'à la surface apicale de la cellule épithéliale (processus de transcytose). Le pIgR est alors clivé au niveau de sa portion juxta-membranaire qui est sensible à la protéolyse. Sa partie extracellulaire, glycosylée, reste liée à l'IgAp (en tant que « pièce sécrétoire », un complexe de 80 kDa) et constitue avec elle, dans la lumière intestinale, la forme sécrétoire de l'IgA (ou IgAs) (Figure 7).

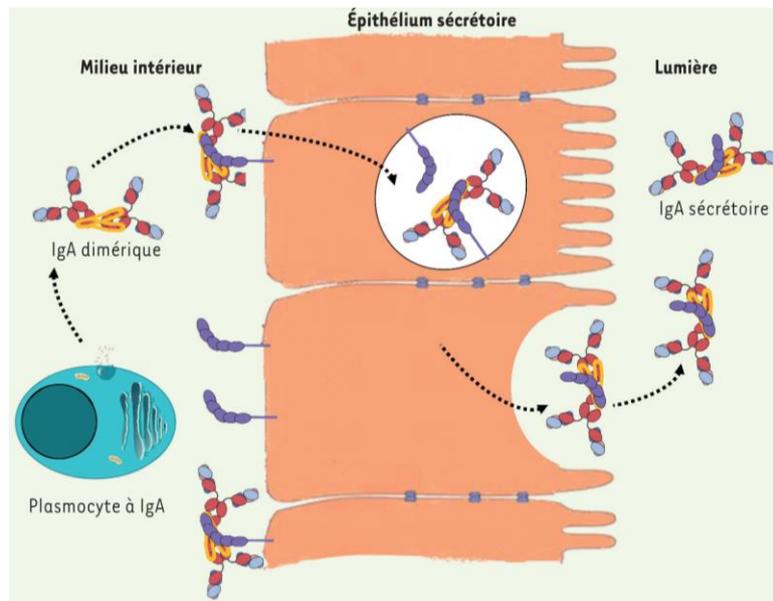


Figure 7 : Transport de l'IgA par le pIgR vers la lumière des muqueuses (23)

De plus, après la formation d'un complexe IgAs-Ag dans la lumière des muqueuses, une transcytose inverse peut se produire à travers les cellules M intestinales (microfold cells). Ce mécanisme, qui permet ainsi un convoyage des complexes IgAs-Ag vers les tissus lymphoïdes sous-muqueux, est essentiel pour la fonction immuno-régulatrice des IgA (24). Il est à noter que l'IgA polymérique, et en particulier l'IgAs, constitue la forme prédominante dans les muqueuses, avec une répartition d'environ 40 % d'IgA1 pour 60 % d'IgA2, bien que cette proportion puisse varier selon les sites anatomiques (20).

I.3.1.4. Glycosylation

La glycosylation est l'une des modifications post-traductionnelles les plus courantes et les plus diversifiées, exerçant toujours un impact fonctionnel significatif sur les protéines auxquelles elle est associée. Les IgA se distinguent des autres Ig, par un niveau élevé de glycosylation, ce qui influence leur stabilité, leur clairance et leurs fonctions biologiques (25,26). Les IgA portent des glycosylations de type O-glycanes et N-glycanes (Figure 8).

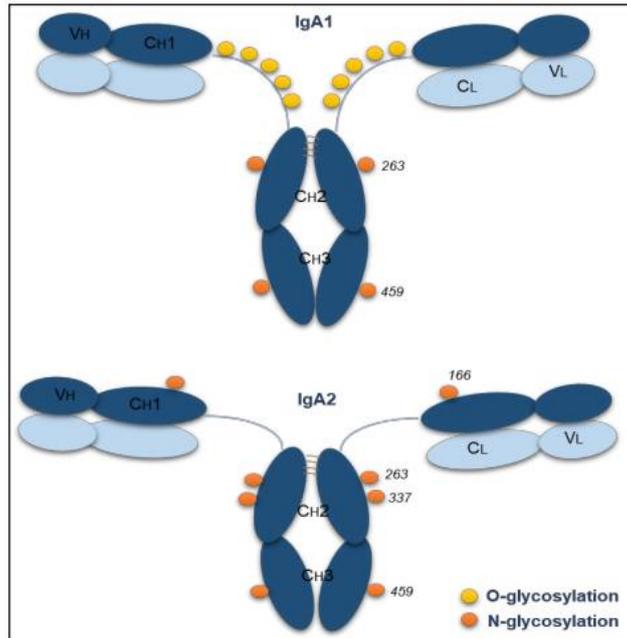


Figure 8 : Sites de glycosylation sur l'IgA1 et l'IgA2 (27)

Les *N*-glycosylations se localisent au niveau de la chaîne lourde des deux sous-classes d'IgA, sous la forme de résidus glucidiques attachés à l'atome d'azote de la chaîne latérale de l'asparagine. L'IgA1 comporte quatre sites de *N*-glycosylations sur ses chaînes lourdes contre huit sur les chaînes lourdes de l'IgA2. Un site de *N*-glycosylation est également retrouvé sur la chaîne J et sept sites au niveau de la pièce sécrétoire (26).

Les *O*-glycosylations, quant à elles, se trouvent exclusivement dans la région charnière des IgA1, et consistent en l'ajout d'un glucide à l'atome d'oxygène des résidus de sérine et/ou thréonine (26). Ce processus commence par l'addition d'une *N*-acétylgalactosamine (GalNac) liant une sérine ou une thréonine. À cette structure peut s'ajouter du galactose ou de l'acide sialique. L'IgA1 comporte neuf sites potentiels de *O*-glycosylation sur sa région charnière mais tous ne sont pas occupés (3 à 5 généralement). Compte tenu de la corrélation de plus en plus évidente entre les défauts de glycosylation de l'IgA et diverses maladies inflammatoires ou auto-immunes, telles que la néphropathie à IgA (IgAN), la vascularite à IgA, le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde, la glycosylation de l'IgA constitue depuis longtemps un axe central de la recherche en immunopathologie (26).

I.3.2. Production

Les IgA sont synthétisées dans les tissus lymphoïdes secondaires par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des cellules T. Les IgA sériques sont principalement produites par des plasmocytes médullaires, issus de réactions immunitaires enclenchées dans la rate ou dans les ganglions lymphatiques. Les IgA présentes dans les muqueuses, proviennent principalement de cellules sécrétrices d'IgA, résultant de l'activation des cellules B au sein des MALT. En prenant l'exemple de la muqueuse intestinale, qui constitue un site

clé de production des IgA, on parle de tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT, pour *Gut-Associated Lymphoid Tissues*). Dans ce contexte, les IgA sont synthétisées par des plasmocytes localisés dans le GALT (au niveau des plaques de Peyer, des ganglions lymphatiques mésentériques, des follicules lymphoïdes isolés et de l'appendice cæcal) qui se logent de manière privilégiée dans la *lamina propria* de la muqueuse de l'intestin grêle (28).

I.3.3. Rôle

L'IgA exerce de nombreuses fonctions essentielles au sein de l'organisme. Au niveau des muqueuses, l'IgA joue un rôle crucial dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes, notamment par le biais de mécanismes tels que l'exclusion immunitaire. Ce mécanisme repose sur la présence d'IgAs dans la lumière des muqueuses, empêchant ainsi la colonisation et l'invasion par des microorganismes pathogènes. Ce processus peut être à la fois dépendant et indépendant de la spécificité antigénique. Dans ce dernier cas, les IgA se lient, via leurs glycanes, à des lectines d'origine microbienne ou végétale, inhibant leur adhésion à l'épithélium par un effet d'encombrement stérique et facilitant ainsi leur élimination via le mucus (29,30). De plus, les IgA modulent le microbiote commensal, contribuant à maintenir une communauté bactérienne adaptée à chaque site (31).

En ce qui concerne les IgA sériques, elles sont capables de former des complexes immuns avec des Ag étrangers circulants facilitant leur élimination par le système phagocytaire (32). Elles possèdent également des propriétés immunomodulatrices, notamment par l'induction d'un signal inhibiteur après leur fixation au récepteur CD89 présent sur cellules myéloïde telles que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (33). Par ailleurs, plusieurs études ont révélé que les individus présentant une déficience sélective en IgA ont une incidence accrue de réactions allergiques et de maladies auto-immunes (34).

Enfin, il a été démontré que l'IgA joue un rôle significatif dans la régulation de la prolifération des érythroblastes. L'interaction des IgA1 polymériques avec le récepteur de la transferrine CD71, augmente la sensibilité des érythroblastes à l'érythropoïétine, accélérant ainsi le processus d'érythropoïèse (35).

Cependant, pour des raisons qui demeurent encore mal comprises, les IgA peuvent développer des propriétés pathogènes, entraînant ainsi diverses pathologies. Par exemple, elles peuvent être responsables de maladies caractérisées par des dépôts d'IgA dans les tissus, comme c'est le cas pour la vascularite à IgA et la IgAN. Cette dernière est une glomérulonéphrite primitive, qui se distingue histologiquement par la présence de dépôts mésangiaux d'IgA dans les glomérules rénaux et elle est abordée en détail dans la section suivante de ce manuscrit.

I.4. Néphropathie à IgA

I.4.1. Définition et épidémiologie

La IgAN a été décrite pour la première fois en 1968 par les français J. Berger et N. Hinglais, à la suite de l'observation de « *dépôts inter-capillaires d'immunoglobulines A* » sur biopsies rénales (36). Cette pathologie se caractérise histologiquement par la présence de dépôts d'IgA, dominants ou co-dominants, et des quantités variables d'IgG et d'IgM, dans les zones mésangiales glomérulaires. Elle présente des manifestations cliniques variées et sa pathophysiologie reste, à l'heure actuelle, encore partiellement incomprise. Dans la majorité des cas, la IgAN est considérée comme une maladie sporadique primaire (37). Cependant, elle peut également survenir en tant que manifestation secondaire d'autres affections, telles que des maladies hépatiques, auto-immunes ou intestinales. Il est également important de différencier la IgAN de la vascularite à IgA, notamment lorsque cette dernière est associée à une atteinte rénale.

Actuellement, la IgAN est reconnue comme la glomérulonéphrite chronique primitive la plus courante à l'échelle mondiale, touchant plus fréquemment les hommes que les femmes, en particulier les jeunes adultes (37). La prévalence de cette maladie, qui est généralement exprimée en pourcentage de cas de glomérulopathies primitives ou en pourcentage de biopsies rénales, varie selon les régions géographiques. Elle est plus répandue dans les populations asiatiques et dans une moindre mesure dans les populations caucasiennes par rapport aux populations africaines. En Europe, la IgAN représente environ 22 % de toutes les maladies glomérulaires diagnostiquées par biopsie rénale, tandis qu'en Asie, ce chiffre atteint 40 % (38). En Amérique du Nord, la prévalence est estimée entre 5 et 10 %, et elle est inférieure à 5 % en Afrique centrale (39). En Europe, on estime l'incidence de cette maladie entre 15 et 40 nouveaux cas par million d'habitants par an (40). Ces variations dans la distribution mondiale de la IgAN peuvent être expliquées par des facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que par des différences dans les pratiques de prescription des biopsies rénales.

I.4.2. Clinique

Il est estimé que plus d'un tiers des patients atteints de IgAN sont asymptomatiques. Ainsi, le diagnostic est souvent posé lors de l'exploration d'une hématurie microscopique isolée ou associée à une protéinurie, généralement découverte de manière fortuite (41).

Lorsque des symptômes sont présents, ils sont souvent peu spécifiques. Le signe clinique classique est une hématurie macroscopique récidivante, qui apparaît généralement 24 à 48 heures après une infection des voies respiratoires supérieures ou, moins fréquemment, après une infection gastro-intestinale.

Une protéinurie de degrés variable peut également être observée, mais la survenue d'un syndrome néphrotique ou d'une insuffisance rénale aiguë reste rare (5% des patients) (41). L'hypertension artérielle est couramment retrouvée, même en l'absence d'une atteinte rénale avancée. Ces signes et symptômes cliniques peuvent fluctuer, avec des périodes d'exacerbation souvent corrélées à des infections.

Certains patients évoluent lentement vers une insuffisance rénale chronique. La présence d'une protéinurie élevée (> 1 g/jour) et d'une hypertension sont généralement considérées comme des marqueurs de risque pour une évolution défavorable.

I.4.3. Physiopathologie

La IgAN semblent être multifactorielles impliquant des perturbations du microbiote, des altérations de l'immunité des muqueuses, une activation des cellules B et du complément, ainsi que des réponses inflammatoires locales. Ces mécanismes sont également influencés par des facteurs génétiques et environnementaux.

I.4.3.1. Hypothèse du « multi-hit »

À la suite des recherches menées sur la physiopathologie de la néphropathie à IgA, l'hypothèse du « multi-hit » a été formulée, identifiant quatre mécanismes principaux (Figure 9) (42).

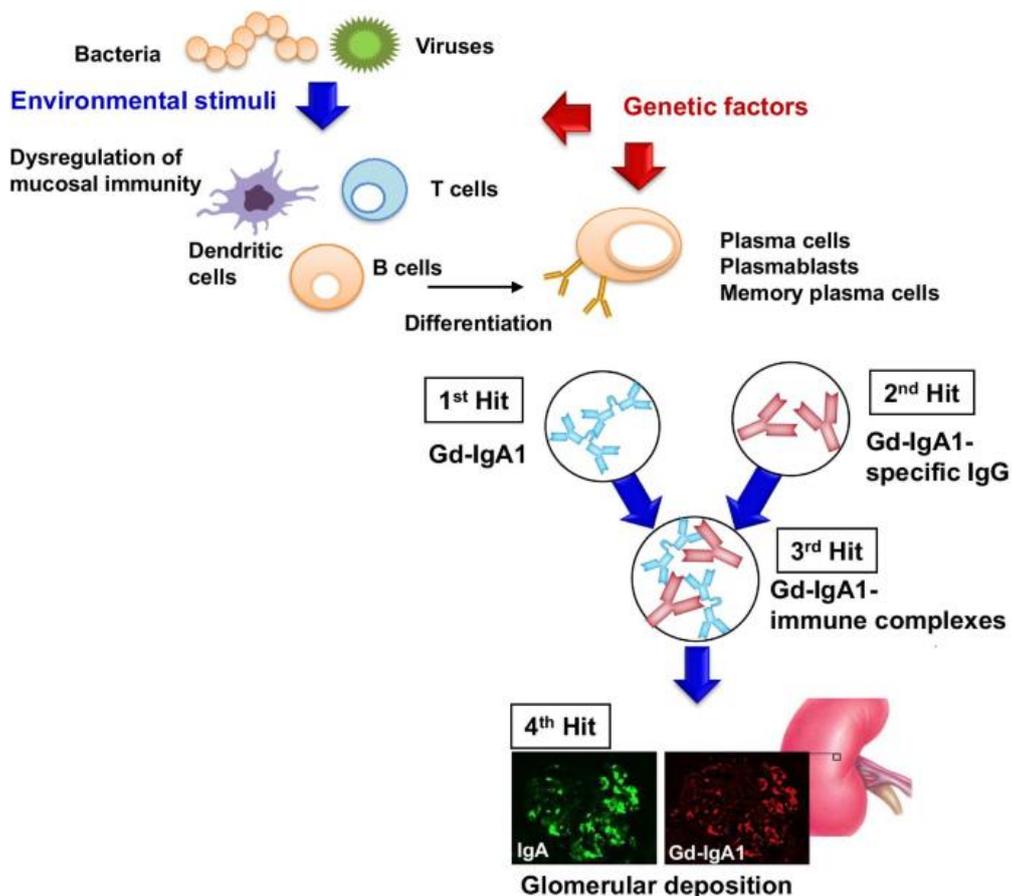


Figure 9 : Physiopathologie de la IgAN, hypothèse du "multi-hit" (43)

Chez les patients atteints de cette maladie, une production accrue d'IgA1 polymériques (IgA1p) circulantes, associée à un défaut de O-glycosylation (hit 1), a été observée (44,45). Ce défaut entraîne une hypogalactosylation, et dans une moindre mesure, une hyposialylation des IgA1. Ces IgA hypogalactosylées (Gd-IgA) ont la capacité de s'auto-agréger et de former

des complexes IgA1-IgA1 (46), ainsi que des complexes immuns avec des IgG ou des IgA. En effet, les anomalies dans la biosynthèse des O-glycanes exposent les résidus terminaux de GalNAc, reconnus comme des épitopes du non-soi qui favorisent la production d'auto-anticorps anti-glycanes (hit 2) (47,48), conduisant à la formation de complexes immuns circulants (hit 3).

Ces complexes peuvent inclure des IgG et IgA, générées en réponse naturelle aux glycoprotéines présentes à la surface des pathogènes et contenant des résidus GalNAc, qui peuvent également réagir de manière croisée en tant qu'anticorps anti-Gd-IgA1(IgA1 hypogalactosylées) (49). De plus, des complexes immuns peuvent se former avec le CD89 soluble. Un défaut de glycosylation des IgA1 altère l'interaction avec ce récepteur qui, lorsqu'il est clivé, peut donner lieu à un complexe immun CD89soluble-Gd-IgA1 (50), dont le rôle potentiel dans la maladie a été démontré dans des modèles murins transgéniques exprimant le CD89 humain (51).

Ces complexes immuns ont la capacité de se déposer au niveau rénal (hit 4). Ces dépôts résultent probablement d'interactions spécifiques entre les épitopes de ces complexes et les protéines de la membrane basale glomérulaire ainsi que de la matrice mésangiale, bien que les protéines directement impliquées demeurent mal connues. Néanmoins, dans ce contexte, deux récepteurs clés ont été impliqués : CD71 (le récepteur de la transferrine) et la β -1,4-galactosyltransférase-1. Des études ont montré que le CD71 est surexprimé dans les cellules mésangiales des patients atteints de IgAN et semble jouer un rôle crucial en liant les Gd-IgA1. Cette interaction pourrait amplifier l'inflammation et la prolifération des cellules mésangiales (52). La β -1,4-galactosyltransférase-1 agit également comme un récepteur d'IgA, contribuant au dépôt et à la clairance de l'IgA (53). Il faut cependant noter que d'autres mécanismes physiopathologiques ont été explorés, notamment une étude récente suggérant que des auto-anticorps IgA dirigés contre la β II-spectrine, présents dans les cellules mésangiales, pourraient jouer un rôle direct dans l'initiation de la maladie (54).

Quoi qu'il en soit, le dépôt de ces complexes néphritogènes déclenche des cascades de signalisations inflammatoires et prolifératives, favorisant l'inflammation locale, l'expansion de la matrice mésangiale et la prolifération des cellules mésangiales. Ces processus aboutissent à une augmentation de la perméabilité glomérulaire et aux atteintes rénales observées chez les patients atteints d'IgAN (55).

I.4.3.2. Processus inflammatoire et répercussion rénale

Les dépôts de complexes immuns entraînent la production de médiateurs pro-inflammatoires et fibrotiques par les cellules mésangiales, contribuant à l'inflammation et à la fibrose dans la IgAN. Parmi ces médiateurs figurent le TNF α , l'IL-6 et le TGF β . Le TNF- α agit de manière autocrine, stimulant sa propre production ainsi que celle de l'IL-6 par les podocytes, créant une boucle inflammatoire (56). De plus, l'activation des cellules mésangiales par les IgAp déclenche des voies de signalisations, notamment via la tyrosine kinase Syk, qui favorise leur prolifération et la production d'IL-6 (57). Les dépôts activent également le facteur de transcription nucléaire NF- κ B, attirant des cellules pro-inflammatoires (56). Par ailleurs, l'activation du système rénine-angiotensine par les cellules mésangiales, en réponse aux dépôts, perturbe l'adhésion des podocytes (58).

Les voies alterne et des lectines du complément sont également activées, entraînant la production de médiateurs inflammatoires supplémentaires. L'intensité de cette activation, mesurée par le dépôt glomérulaire de la fraction C3, est corrélée à la gravité et à la progression de la maladie (59,60) .

En résumé, ces événements, bien que non exhaustifs, augmentent la perméabilité glomérulaire, provoquant protéinurie et hématurie, et évoluent souvent vers une cicatrisation généralisée, se manifestant cliniquement par une hypertension et un déclin de la fonction rénale.

I.4.3.3. Origine des IgA néphritogènes

L'origine de l'augmentation des IgAp néphritogènes dans la circulation des patients atteints de IgAN reste incertaine. Cependant, la survenue typique d'une hématurie macroscopique après une infection ORL et/ou intestinale, suggère l'implication de réponses immunitaires et d'IgAp d'origine muqueuse. Une hypothèse propose que les cellules B, migrent vers des sites systémiques, notamment la moelle osseuse, et libèrent des IgAp dans la circulation (61). Dans ce contexte, des études ont montré une diminution des plasmocytes sécrétant des IgA1p dans les muqueuses, alors qu'une augmentation de ces plasmocytes a été observée dans les sites systémiques en particulier dans la moelle osseuse (62,63).

Le rôle des récepteurs Toll-Like (TLR), impliqués dans les réponses immunitaires innées aux Ag exogènes, a été mis en évidence. La stimulation de ces récepteurs peut induire la sécrétion du facteur d'activation des cellules B (BAFF), favoriser l'infiltration des lymphocytes et augmenter la production d'IgA. Une activation excessive des TLR peut conduire à une surproduction de Gd-IgA1 ainsi que d'autoanticorps (43). De plus, l'inducteur de prolifération APRIL, un ligand apparenté à BAFF, est capable de favoriser la commutation isotypique des cellules B vers la production d'IgA (64). Des niveaux sériques élevés d'APRIL sont observés chez certains patients atteints de IgAN, et les cellules sécrétrices d'IgA1, stimulées par APRIL, produisent des quantités accrues de Gd-IgA1 (65). Par ailleurs, l'activation des TLR9 peut amplifier la production d'APRIL et d'IL-6, entraînant ainsi une surproduction de Gd-IgA1 (65).

Plus récemment, une étude a mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans cette anomalie de glycosylation (66). Il a été observé une abondance accrue de bactéries dégradant la mucine dans le microbiote intestinal des patients IgAN, capables de déglycosyler les IgA1 et de créer des néo-épitopes reconnus par des IgG. Ces bactéries semblent contribuer au développement du phénotype IgAN chez des souris exprimant l'IgA1 humanisée et le récepteur CD89. Une fois déglycosylées dans la lumière intestinale, les IgA1 traversent, à nouveau, l'épithélium par transcytose inverse, rejoignant ainsi la circulation avant de se déposer dans les glomérules rénaux de ces souris.

Toutefois, les Gd-IgA1 peuvent également être retrouvées dans la circulation d'individus sains dans le cadre d'une réponse immunitaire muqueuse, ce qui suggère que la pathologie ne réside pas uniquement dans un défaut de glycosylation des IgAp, mais dans leur passage massif dans le sérum (67).

De plus, le simple défaut de glycosylation ne suffit pas à expliquer la physiopathologie de l'IgAN. Par exemple, dans un modèle de souris $\alpha 1KI$, produisant des IgA polyclonales humanisées, il a été montré que la capacité des IgA à se déposer dépend principalement de la structure de leurs régions variables, modulées par la réponse antigénique

environnementale, la polymérisation des IgA et leur degré de glycosylation (68). Une autre étude sur un modèle de souris $\alpha 1\text{KI- AID-/-}$ (souris exprimant des IgA humanisées et déficientes vis-à-vis des mécanismes de maturation de l'affinité des Ig) a révélé qu'un défaut de maturation d'affinité des IgA pouvait favoriser leur précipitation rénale (69). Ainsi, les changements du répertoire des Ig au cours des réponses immunitaires modulent la propension des IgA à se déposer. Une autre hypothèse évoque également un défaut génétique dans le mécanisme de la O-glycosylation des IgA puisque près de la moitié des parents au premier degré des patients atteints de IgAN présentent des niveaux élevés de Gd-IgA1 (70).

I.4.4. Diagnostic

La IgAN peut être suspectée sur la base de la présentation clinique, mais le diagnostic définitif repose exclusivement sur l'analyse anatomopathologique de la biopsie rénale. Une analyse biologique des urines est également nécessaire pour détecter la présence d'une hématurie (souvent microscopique) et/ou protéinurie, qui sont des marqueurs courants de la maladie. En revanche, les tests immunologiques sériques apportent généralement peu d'informations. Le dosage du complément est habituellement normal et une élévation des IgA sériques n'est observée que dans environ 50% des cas (71,72).

L'examen de la biopsie rénale inclut l'utilisation de la microscopie optique et de l'immunohistochimie. L'analyse immunohistochimique permet d'identifier des dépôts granuleux ou filamenteux caractéristiques, souvent décrits sous forme de « branche d'arbre » ou « doigts de la main » (figure 10a), principalement situés dans la région mésangiale. Ces dépôts sont constitués majoritairement d'IgA1 (73), fréquemment associés à la fraction C3 du complément, et parfois accompagnés d'IgG ou plus rarement d'IgM.

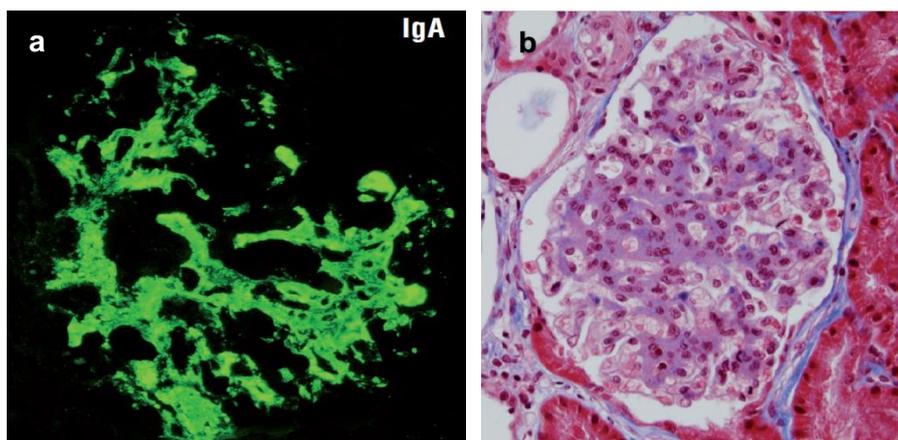


Figure 10 : Analyse anatomopathologique de la ponction biopsie rénale d'un patient atteint de IgAN (74)

- a. Immunofluorescence : dépôts d'IgA sur le mésangium rénal ;
- b. Microscopie optique : hypertrophie mésangiale

Ces dépôts d'IgA, dont l'abondance varie d'un individu à l'autre, peuvent également se retrouver dans la paroi des capillaires glomérulaires (37).

Morphologiquement, les lésions observées en microscopie optique sont très variées. Elles peuvent aller d'une hypertrophie de la matrice cellulaire mésangiale (Figure 10b) à une hypercellularité mésangiale, soit segmentaire et focale, soit diffuse. Ces lésions peuvent être associées à une prolifération cellulaire endo ou extra-capillaire (entraînant la formation de croissants épithéliaux), et/ou à une atteinte tubulo-interstitielle. Dans les cas avancés, ces lésions peuvent évoluer vers une sclérose glomérulaire irréversible (75). Nous pouvons souligner qu'il n'existe généralement pas de corrélation entre l'abondance des dépôts d'IgA et l'intensité des lésions glomérulaires. Cela signifie qu'un patient peut présenter d'importants dépôts d'IgA sans pour autant présenter des lésions sévères, et réciproquement.

En raison de la grande hétérogénéité des lésions histologiques observées dans la IgAN, plusieurs classifications ont été proposées pour prédire l'évolution de la maladie. Parmi elles, la classification d'Oxford, introduite en 2009 et révisée en 2016, s'est imposée comme une méthode à la fois simple, reproductible et bien corrélée au pronostic clinique (76).

I.4.5. Prise en charge

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour la IgAN. Les stratégies thérapeutiques disponibles visent principalement à freiner ou à ralentir la progression de l'atteinte rénale par des mesures de néphro-protection qui incluent le contrôle de la pression artérielle. L'objectif est de maintenir une tension inférieure à 130/80 mmHg (ou 125/75 mmHg en cas de protéinurie supérieure à 1g/24h). La réduction de la protéinurie à moins de 0,5g/24h est également une cible importante dans la prise en charge (77).

Pour atteindre ces objectifs, des mesures hygiéno-diététiques peuvent être mises en œuvre, telles que l'arrêt du tabac, l'adoption d'un régime alimentaire approprié et l'éviction de médicaments néphrotoxiques, tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Sur le plan médicamenteux, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, sont utilisés pour bloquer le système rénine-angiotensine afin de contrôler la pression artérielle et de réduire la protéinurie. Dans les cas où ces mesures s'avèrent insuffisantes ou en présence d'une glomérulonéphrite d'évolution rapide, des traitements plus agressifs comme les corticoïdes ou des immunosuppresseurs peuvent être envisagés.

D'autres approches ont été explorées pour réduire la production d'IgA, comme l'amygdalectomie, l'adoption d'un régime sans gluten, ainsi que certains médicaments, bien que leur efficacité n'ait pas été démontrée de manière concluante (72,77).

Enfin, en cas d'évolution vers une insuffisance rénale terminale, la dialyse ou la transplantation rénale devient nécessaire.

Avec l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de la IgAN, plusieurs nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées. De nombreuses approches sont actuellement à l'étude, notamment l'utilisation d'antagonistes du complément, des régulateurs de l'immunité humorale des muqueuses ou encore des inhibiteurs de l'inflammation. Par exemple, l'hydroxychloroquine, en bloquant l'activité des récepteurs de type Toll, peut moduler la réponse immunitaire, tandis que des anticorps ciblant APRIL visent à réduire la différenciation des cellules B productrices d'IgA pathologiques. Des agents comme le bortezomib, qui cible les cellules plasmocytaires, ainsi que des inhibiteurs du SGLT2 ou du

système rénine-angiotensine, déjà utilisés en néphrologie, sont également en cours d'évaluation. Par ailleurs, l'utilisation du budésonide encapsulé et d'inhibiteurs spécifiques du complément, montrent un potentiel prometteur pour réduire l'inflammation et la progression des lésions rénales. Ces approches innovantes pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la gestion de la maladie (78).

I.5. Etude du répertoire des immunoglobulines par biologie moléculaire

Pendant de nombreuses années, l'analyse des répertoires d'Ig était principalement réalisée par le biais du séquençage Sanger, qui permettait l'étude des jonctions V(D)J de la région variable des Ig, avec une capacité d'analyse limitée à quelques centaines de jonctions par expérience (79). Toutefois, le débit restreint de cette méthode ne permettait pas une exploration exhaustive des répertoires B.

Plus récemment, les techniques de séquençage à haut débit, ou *Next Generation Sequencing* (NGS), ont transformé le domaine de la biologie moléculaire. Dans le contexte de l'immunité humorale, ces méthodes ont permis la génération de répertoires d'Ig à grande échelle, comprenant plusieurs millions, voire des milliards de séquences, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans l'exploration moléculaire de l'immunité adaptative. Cette approche, qui consiste à séquencer les segments V(D)J des Ig d'un individu, améliore la compréhension des mécanismes des réarrangements géniques mis-en-jeu dans l'adaptation du système immunitaire humorale. Elle présente également un intérêt clinique significatif avec un large éventail d'applications en biologie médicale (80,81) et permet la détermination de « répertoires signatures » propres à un contexte immunitaire particulier (82–84).

Au début des années 2000, plusieurs technologies NGS ont été mises au point. On peut citer les systèmes 454 GS FLX et GS Junior de Roche® (désormais abandonnés), ainsi que les plateformes Genome Analyzer, HiSeq, MiSeq et NextSeq d'Illumina®, et les technologies SOLiD et Ion Torrent de Life Sciences®, qui diffèrent, notamment, par la technologie mise en œuvre pour le séquençage en lui-même (85).

Si on prend l'exemple de la technologie Illumina®, actuellement leader du marché, il s'agit d'un séquençage par nucléotides terminateurs de chaînes réversibles couplés à un fluorochrome. La mise en œuvre de cette méthode nécessite d'abord la génération d'une librairie. Après extraction de la matrice (ADN ou ARN), les fragments d'intérêts sont capturés ou amplifiés par PCR avant d'être ligaturés à des adaptateurs spécifiques de la technologie. Une fois cette préparation achevée, la librairie est déposée sur la flowcell (ou puce), un support constitué de puits microscopiques où se déroule le séquençage. Des oligonucléotides, complémentaires des adaptateurs ajoutés lors de la préparation de la librairie, sont fixés à sa surface. L'hybridation de la librairie à ces adaptateurs est suivie d'une amplification par PCR produisant 1000 à 2000 copies d'un même fragment d'ADN regroupées en « clusters », qui seront séquencées simultanément. Ce processus amplifie le signal de fluorescence émis lors de l'incorporation des nucléotides au sein de chaque cluster pendant le séquençage (86) (Figure 11).

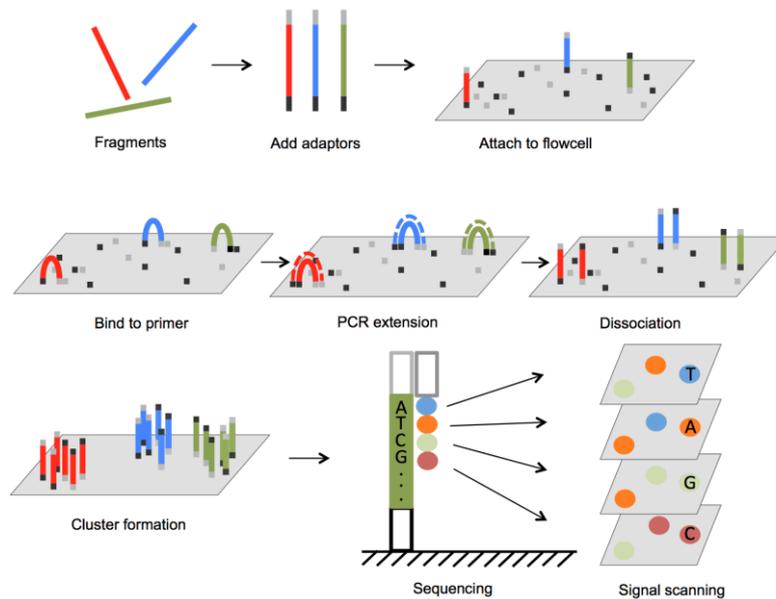


Figure 11 : Principe du séquençage par la technologie Illumina® (87)

Les séquences obtenues avec ce type de technologie sont de petites tailles, allant de 36 à 300 paires de base (pb) pour un séquençage à partir d'une seule extrémité (single-end). Lors d'un séquençage en « paired-end », les fragments sont lus séquentiellement à partir de leur deux extrémités et l'association des lectures « read 1 » et du « read 2 » permet de générer des séquences pouvant atteindre 600 pb.

Cette technologie est réputée pour la profondeur de son séquençage (définie par le nombre de lectures obtenues lors de l'analyse), sa grande précision (taux d'erreur de 0,1-1%) et sa diversité d'applications. Cependant, comme toutes les technologies de séquençage haut débit de deuxième génération, elle présente une limite liée à la taille réduite des fragments séquencés, ce qui restreint l'analyse des génomes complexes, notamment ceux contenant de longs éléments répétitifs (88).

Plus récemment, de nouvelles technologies de séquençage ont émergé, telles que SMRT de PacBio® ainsi que MinION, GridION et PromethION d'Oxford Nanopore Technologies®. Ces technologies adoptent une approche de séquençage en temps réel des molécules uniques. Elles permettent, ainsi, d'obtenir des lectures de plusieurs kilobases en une seule séquence continue, sans nécessiter l'étape d'amplification clonale de l'ADN pour la formation des clusters sur la flowcell. Ces caractéristiques définissent ce qu'on appelle les technologies de séquençage « long-read » ou de troisième génération (88).

Le séquenceur MinION d'Oxford Nanopore Technologies® utilise des nanopores, c'est-à-dire des pores protéiques à l'échelle nanométrique. Cette configuration permet la circulation d'un courant ionique à travers les nanopores. Les molécules d'ADN ou d'ARN monocaténares, chargées négativement, sont attirées à travers le nanopore du côté « *cis* » (négatif) vers le côté « *trans* » (positif). Une enzyme motrice, dotée d'une activité hélicase, est utilisée pour dérouler l'ADN double brin et contrôler la vitesse de passage des acides nucléiques à travers le nanopore, assurant ainsi une lecture progressive. Lors de la translocation des bases à

travers le pore, chaque nucléotide provoque une perturbation unique du courant ionique, permettant le séquençage en temps réel par mesure de ces variations (Figure 12) (89).

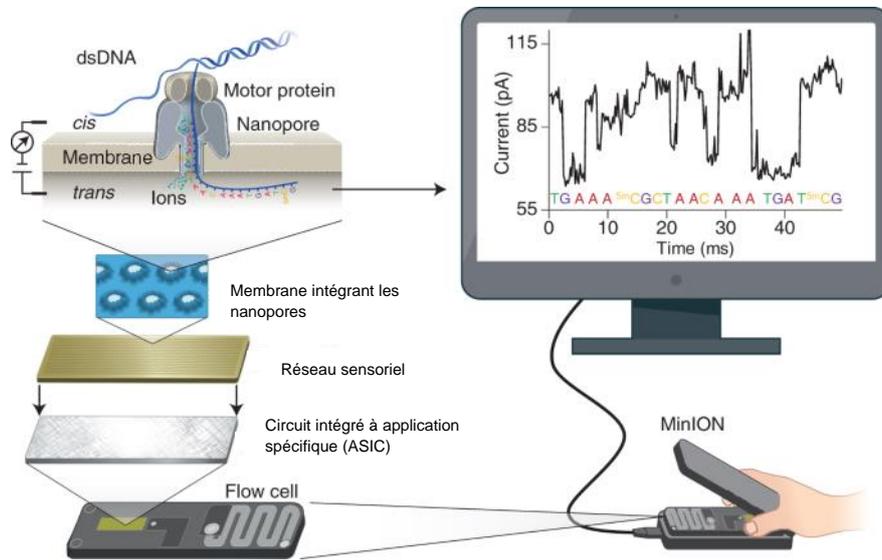


Figure 12 : Principe du séquençage par la technologie Oxford nanopore[®] sur l'appareil MinION, modifiée d'après (89)

Comme pour les technologies de deuxième génération, la préparation d'une librairie est nécessaire (Figure 13a, b et c). Après extraction de la matrice (ADN ou ARN), une ligature d'adaptateurs en forme de « Y » est effectuée. Ces adaptateurs portent à la fois la protéine motrice et une séquence permettant l'interaction avec la membrane pour concentrer les fragments près des pores (90). Plusieurs méthodes de préparation de librairie existent pour améliorer la précision du séquençage : la méthode « 2D » permet de lire les deux brins d'une molécule d'ADN bicaténaire consécutivement (Figure 13d, à gauche), tandis que la méthode « 1D² » augmente la probabilité que le brin complémentaire soit capturé juste après le premier (Figure 13d, à droite). Enfin, la méthode « 1D », actuellement la seule méthode disponible sur le marché, séquence chaque brin indépendamment, bien qu'il y ait une chance que le brin complémentaire soit séquençé juste après (Figure 13d, au milieu).

Ces différentes approches offrent des précisions variables, les lectures 2D et 1D² atteignant des précisions de 94 % et 95% contre 86% pour les lectures 1D (89).

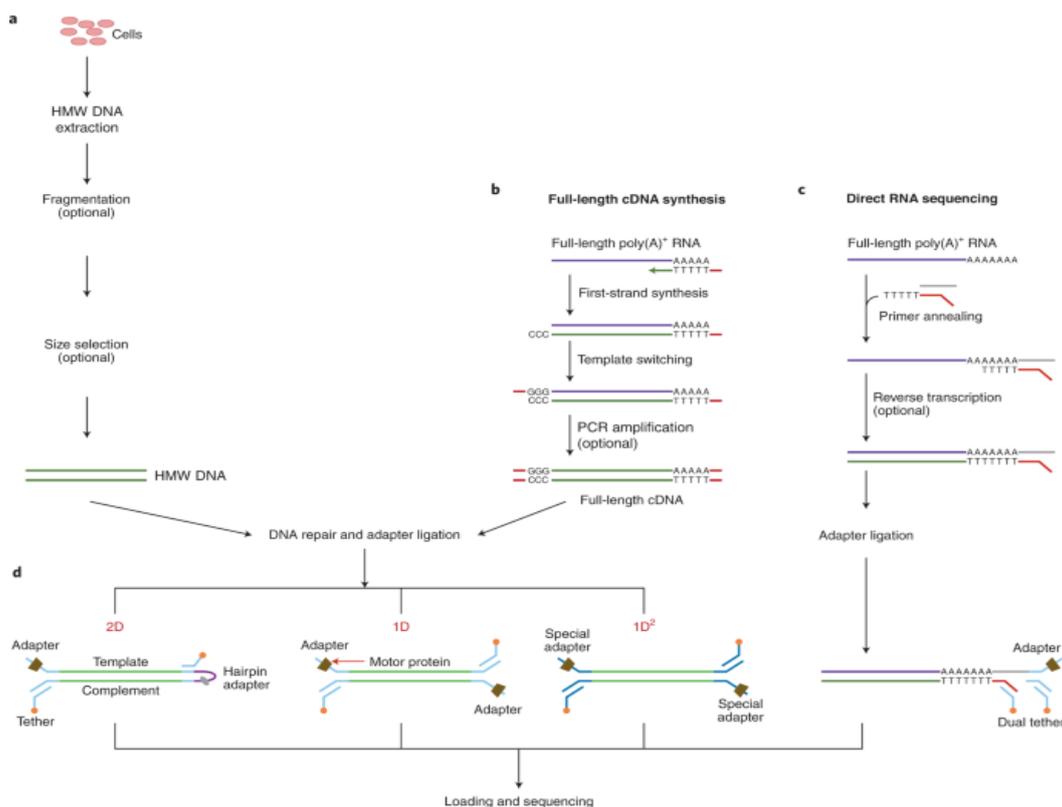


Figure 13 : Représentation des différentes méthodes de génération d'une librairie pour le séquençage par la technologie Oxford Nanopore®, modifiée d'après (89)

Une fois la librairie obtenue, le séquençage peut commencer, et grâce à l'utilisation limitée de réactifs, le processus peut se prolonger de manière efficace jusqu'à l'obtention des données souhaitées. La flowcell peut être lavée et réutilisée pour d'autre librairie, mais sa durée d'utilisation est limitée à 72 heures.

Les signaux bruts des variations de courant sont envoyés à un ordinateur, où ils sont stockés au format FAST5 et traduits en séquences nucléotidiques lors de l'étape de « basecalling ». Les séquences générées sont enregistrées au format FASTQ avec un score de qualité (Phred Quality score) pour chaque base et un Qscore global pour chaque lecture.

Bien que le séquençage par nanopores présente un taux d'erreurs initial plus élevé (de 6 à 15 %), les améliorations continuent de la chimie des réactifs, du type de nanopores, du système de lecture et des logiciels de basecalling, réduisent ces erreurs (89).

En revanche, le principal avantage de cette technologie réside dans sa capacité à séquencer des fragments extrêmement longs en temps réel, sans besoin d'amplification préalable, évitant ainsi les biais et préservant des informations précieuses telles que les modifications des bases, comme la méthylation (91,92). De plus, le MinION se distingue par son faible coût, sa portabilité et sa taille compacte, ce qui en fait une technologie révolutionnaire (93).

A Limoges, l'analyse des répertoires d'Ig est, actuellement, réalisée à l'aide d'une technique de séquençage haut débit sur matrice ARN, sur le principe de la « Race RepSeq », développée par l'équipe de recherche CRIBL en collaboration avec le centre de référence amylose AL.

Utilisant la technologie Illumina®, cette méthode est employée en routine au laboratoire d'immunologie du CHU de Limoges, notamment pour détecter des Ig monoclonales lorsque les techniques immuno-biologiques classiques se révèlent peu ou pas contributives. L'utilisation de l'ARN comme matrice confère à cette technique une sensibilité élevée, particulièrement utile pour identifier des clones de faible abondance, comme dans certains cas de gammopathie monoclonale de significations clinique (MGCS) (94). Cette approche a également permis d'identifier des signatures moléculaires spécifiques dans des formes rares de MGCS, comme le syndrome POEMS (95).

Bien que cette méthode offre une sensibilité et une profondeur de séquençage élevée, elle est limitée par la longueur maximale des fragments séquencés. En séquençage paired-end classique, il est possible d'atteindre 600pb alors que les domaines V(D)J des régions variables des chaînes lourdes d'Ig peuvent s'étendre jusqu'à 640pb. Pour étendre ces lectures et couvrir également une petite partie de la région constante, le protocole a été adapté en s'inspirant des lectures asymétriques imaginées par M.A. Turchaninova dans l'équipe de D.M. Chudakov, qui permet d'obtenir des séquences allant jusqu'à 750 pb (96). Toutefois, bien que cette approche permette de séquencer les régions variables dans leur intégralité, elle réduit considérablement la profondeur des répertoires, reste techniquement laborieuse, et ne permet pas de couvrir l'intégralité des domaines constants des Ig. L'émergence des technologies de troisième génération représente donc une alternative intéressante à la technologie Illumina® dans ce domaine d'application. En effet, plusieurs études récentes montrent que ces nouvelles technologies présentent de nombreux avantages, tels que la collecte de données en temps réel, des délais d'exécution réduits et des longueurs de lecture significativement plus longues à partir d'ADN natif ou d'ARN, permettant une évaluation plus directe et complète des séquences (97–100).

Une étude récente, portant sur l'analyse des répertoires d'Ig à partir d'ADN, a démontré que la technologie Oxford Nanopore® offre un bon compromis entre couverture et profondeur de séquençage, en comparaison avec la technologie BioPac®, dont la profondeur est limitée, et avec Illumina® dont la couverture est restreinte (101). Ainsi, la technologie Oxford Nanopore® semble constituer un outil prometteur pour l'analyse des répertoires d'Ig, permettant d'obtenir des séquences de pleine longueur, d'élargir l'étude de ces répertoires aux domaines constants des Ig, tout en réduisant les délais techniques et les coûts d'analyse.

I.6. Etude du répertoire des immunoglobulines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS pour *Mass Spectrometry*), largement utilisée en pharmacologie et biochimie, s'ouvre à d'autres domaines d'applications, notamment en immuno-hématologie. Elle permet, entre autres, d'étudier les répertoires d'Ig en identifiant les fragments peptidiques des Ig sériques. Cette technologie représente une approche prometteuse pour détecter les composantes pathologiques des gammopathies monoclonales, ayant déjà prouvé son efficacité chez des patients dont les techniques de diagnostics classiques se sont révélées négatives. En plus d'identifier l'isotype de la chaîne impliquée, la MS fournit des informations supplémentaires, telles que la présence de chaînes légères libres sous forme monomérique ou dimérique ainsi que les modifications post-traductionnelles (comme la glycosylation) affectant les composantes monoclonales (102,103). Plusieurs fournisseurs, dont Binding Site et Sebia, développent actuellement des outils basés sur la MS pour analyser les Ig sériques, dans l'optique de remplacer l'électrophorèse des protéines et

l'immunofixation pour la détection des protéines monoclonales, offrant une meilleure sensibilité et des analyses plus précises.

Cette analyse peut également être réalisée sur des échantillons tissulaires. La Mayo Clinic, pionnière dans l'utilisation de cette méthode pour l'amylose, l'a exploitée pour typer cette pathologie à partir de biopsies permettant d'identifier plus de vingt types d'amylose (104). Ces dernières années, cette technique est d'ailleurs, considérée comme la référence en anatomopathologie pour le typage de l'amylose (105).

I.6.1. Principe de la spectrométrie de masse

La MS est une méthode analytique permettant de mesurer le rapport masse sur charge (m/z) des ions. Elle est utilisée pour des analyses qualitatives et quantitatives. Cette technique offre la possibilité d'identifier des composés inconnus en déterminant leur composition isotopique en atomes et hétéroatomes, ainsi que leur structure via l'analyse de leur profil de fragmentation. De plus, la MS permet la quantification précise de composés au sein d'échantillons complexes.

L'analyse par MS peut être réalisée directement sur un échantillon brut ou après une étape de purification chromatographique. Cette dernière améliore la sensibilité de la méthode en réduisant les interférences provenant de protéines de masse élevée.

I.6.1.1. La chromatographie liquide haute performance

Il existe plusieurs types de chromatographie. Par exemple, dans le cas de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Figure 14), une phase mobile polaire, est injectée et poussée à haute pression, à travers une colonne. Cette colonne est composée de silice greffée sur des chaînes alkyle, correspondant à la phase stationnaire apolaire. La phase mobile, ainsi que l'échantillon injecté, parcourent le système chromatographique jusqu'au détecteur et les analytes se séparent en fonction du degré d'interaction avec la phase stationnaire.

Il est à noter que la phase mobile correspond à un mélange de deux solvants : A (majoritairement de l'eau) et B (majoritairement de l'acétonitrile) et lors de la chromatographie, ce mélange peut rester identique (élution isocratique) ou varier au cours du temps (élution par gradient). Dans ce dernier cas, le cycle de chromatographie commence par un certain pourcentage de A par rapport à B, suivi d'un changement de ce pourcentage tout au long de l'élution. Cela augmente l'hydrophobicité de la phase mobile et permet de séparer les analytes avec une large plage d'hydrophobicité en un temps court rendant cette technique plus performante que l'élution isocratique (106).

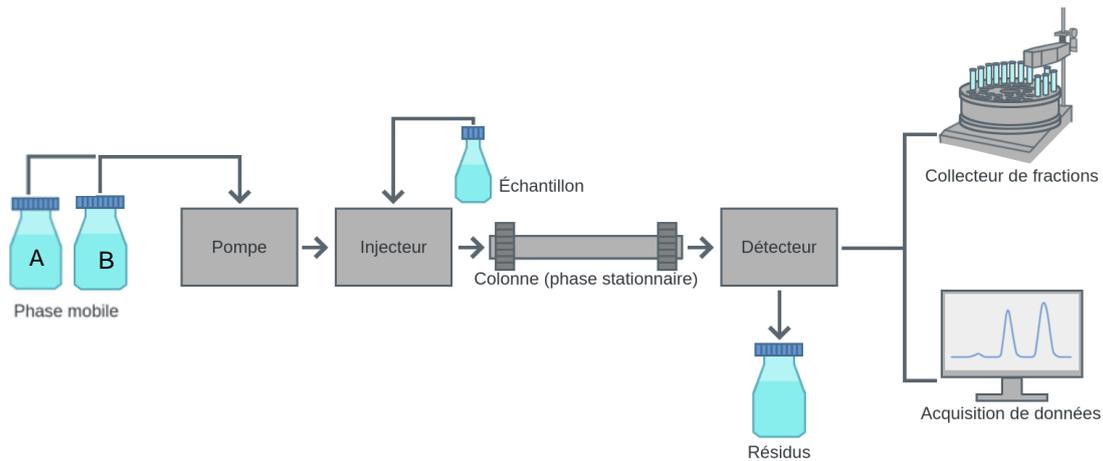


Figure 14 : Principe de la chromatographie liquide haute performance, modifiée d'après (107)

I.6.1.2. La spectrométrie de masse

Le principe général de la MS (Figure 15) repose sur une ionisation des molécules présentes dans un échantillon à l'aide d'une source d'ionisation dédiée. Les ions ainsi obtenus sont focalisés et accélérés pour accroître leur énergie cinétique, avant de passer dans un champ électrique où ils sont séparés selon leur rapport m/z à l'aide d'un ou plus analyseurs. Ces analyseurs peuvent inclure des systèmes de type quadrupole, temps de vol (TOF) ou trappe ionique. Une fois les ions captés par un détecteur, leur signal est amplifié puis converti en un spectre de masse qui représente l'intensité relative des ions en fonction de leur rapport m/z .

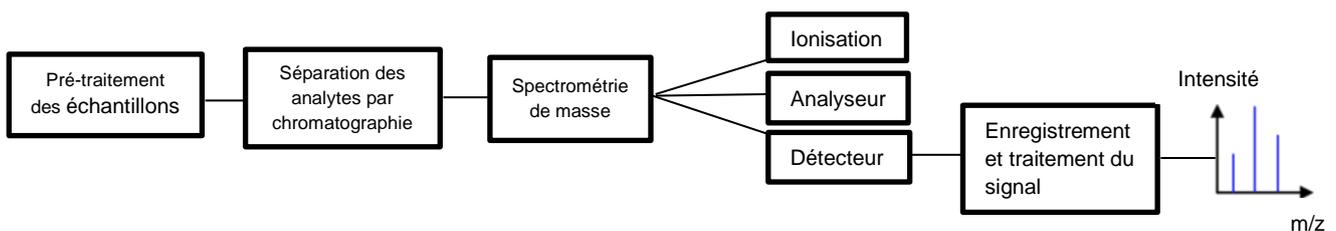


Figure 15 : Principe général de spectrométrie de masse

Il existe également des spectromètres de masse en tandem, constitués de plusieurs analyseurs en série, permettant de sélectionner un ion dans un spectre MS, de l'isoler, de le fragmenter (dans une cellule de collision) et enfin de mesurer la masse des fragments produits. Le spectre ainsi généré est appelé spectre de fragmentation ou spectre MS/MS. Pour une analyse sans *a priori* (analyse DDA pour Data Dependent Acquisition), le spectromètre de masse réalise des cycles d'une seconde pendant lesquels il acquiert un spectre MS, puis il

sélectionne les ions les plus intenses (jusqu'à 250) pour les fragmenter. Sur la durée d'une acquisition, le spectromètre de masse peut acquérir plusieurs milliers de spectres MS/MS correspondant aux composés les plus intenses.

Les données ainsi obtenues sont retraitées par des logiciels spécifiques qui reconstruisent la séquence en acides aminés des peptides à partir de tous les spectres MS/MS de l'acquisition, puis qui comparent cette liste de séquences aux bases de données protéiques (Uniprot, NCBI) pour aligner les peptides expérimentaux et théoriques. Chaque protéine identifiée est caractérisée par le nombre de peptides alignés avec sa séquence et son taux de couverture.

I.7. Objectifs

Cette étude s'inscrit dans le cadre du développement d'outils innovants pour explorer la physiopathologie de la IgAN et identifier les IgA néphritogènes impliquées dans cette maladie. La technologie NGS Illumina®, actuellement utilisée dans notre laboratoire pour l'exploration des répertoires d'Ig, présente certaines limites, notamment en ce qui concerne la taille des séquences obtenues et la profondeur des répertoires. Pour tenter de surmonter ces limites, nous nous sommes intéressés aux technologies de séquençage « long-read » et plus particulièrement à la technologie Oxford Nanopore®. En complément de ces approches génétiques, la MS apparaît, aujourd'hui, comme un outil incontournable pour la caractérisation des Ig pathologiques, directement dans les tissus, offrant ainsi une vision protéomique précise de la maladie. Le développement de cette méthode d'analyse protéomique faisait également partie de nos objectifs, afin de compléter les approches génétiques par une exploration directe des IgA dans les dépôts tissulaires.

Ainsi, nous avons structuré notre travail en trois grandes étapes. Premièrement, nous avons comparé les performances des deux technologies, Illumina® et Oxford Nanopore® pour l'analyse des répertoires d'Ig sériques des patients atteints de IgAN. Deuxièmement, nous avons recherché, à partir des données obtenues avec la technologie Oxford Nanopore®, des signatures spécifiques à la IgAN dans les répertoires d'Ig des patients en phase aiguë de la maladie, en les comparant aux répertoires de volontaires sains. Enfin, nous avons initié le développement d'une méthode d'exploration des Ig par MS, dans le but d'identifier directement les IgA néphritogènes présentes dans les tissus rénaux. À notre connaissance, aucune étude de ce type n'a encore été effectuée, bien que des études protéomiques globales de la matrice extra cellulaire des glomérulaires rénaux aient déjà été réalisées à partir de biopsies de patients atteints de IgAN ou de modèles murins de IgAN (108–110).

Ces trois étapes visent à élargir nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de l'IgAN et à évaluer le potentiel de la technologie Oxford Nanopore® pour une application clinique au laboratoire d'immunologie du CHU de Limoges. En parallèle, nous espérons que l'identification des IgA néphritogènes dans le tissu rénal permettra de rechercher ces mêmes IgA dans les répertoires circulants, ouvrant ainsi la voie à la création d'un nouvel outil diagnostique et/ou de suivi des patients atteints de IgAN, afin d'améliorer la prise en charge et l'évaluation de l'évolution de la maladie.

II. Partie expérimentale

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Matériel

II.1.1.1. Echantillons sériques

Ce travail a été effectué à partir d'échantillons de patients atteints de IgAN (groupe PA) provenant de l'étude ERINA, dont l'investigateur principal était le Pr. Aldigier. Cette étude avait pour objectif d'analyser le répertoire des Ig circulantes chez les patients souffrants de cette pathologie. La cohorte comprenait quarante patients, recrutés soit lors du diagnostic, soit au cours de leur suivi, entre janvier 2020 et mai 2021. Nous avons concentré notre analyse sur six échantillons de patients recrutés au moment du diagnostic afin d'examiner le répertoire des Ig durant la phase « active » de la maladie. Parallèlement, vingt-quatre échantillons de volontaires sains (groupe témoin VS) ont été fournis par le Centre d'Investigation Clinique (CIC) du CHU de Limoges.

Pour tous ces échantillons, nous disposons des ARN, stockés à -80°C , qui avaient été extraits des prélèvements sanguins recueillis dans des tubes TEMPUS®, conçus pour la lyse cellulaire et la stabilisation des ARN.

II.1.1.2. Reliquats de biopsies rénales

Nous avons également récupéré, en accord avec les néphrologues du service de néphrologie et du comité d'éthique de l'hôpital, des reliquats de biopsies rénales de cinq patients atteints de IgAN dont les sérums ont été analysés. Pour constituer un groupe contrôle, nous avons utilisé des reliquats de biopsies rénales de cinq patients atteints d'autres pathologies, telles que le diabète, des vascularites ou des néphropathies interstitielles. Ces échantillons, inclus en O.C.T et conservés à -80°C , ont été collectés sous réserve d'une recherche de non-opposition, permettant l'utilisation de ces prélèvements biologiques à des fins de recherche.

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Séquençage par la technologie Illumina®

II.1.2.1.1. Préparation de la librairie

L'amplification des régions d'intérêt a été réalisée à l'aide d'ADNc obtenu par rétro-transcription (technique de *5'Rapid Amplification of cDNA Ends* ou 5'RACE) de l'ARN. Cette étape de 5'RACE utilise un pool de trois amorces antisens, chacune spécifique de la région constante des chaînes lourdes d'Ig ($C\mu$, $C\gamma$ et $C\alpha$), pour générer un produit ADNc monocaténaire spécifique, couvrant l'ensemble du répertoire des chaînes lourdes d'Ig. En atteignant l'extrémité 5' du brin d'ARNm, l'enzyme (ProtoScript® II Reverse Transcriptase – NEB), qui a une activité de transférase terminale, ajoute une série de nucléotides identiques (quatre cytosines dans notre cas) à l'extrémité du brin d'ADNc nouvellement synthétisé. La présence d'une amorce universelle porteuse de quatre guanidines à son extrémité 3' permet à la

transcriptase inverse de changer de matrice et de poursuivre son extension en intégrant une séquence définie à l'extrémité 5' de l'ADNc nouvellement synthétisé (Figure 16).

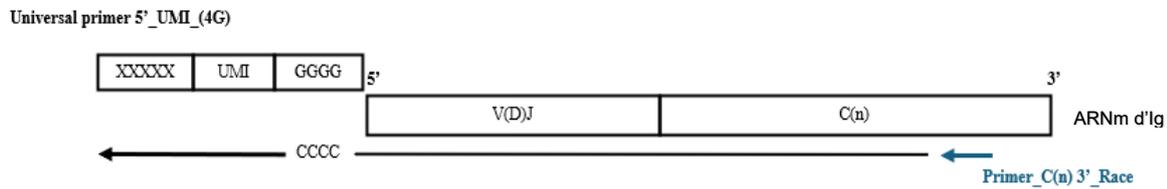


Figure 16 : Etape de reverse transcription par 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Cette séquence est ensuite utilisée comme point d'ancrage pour la PCR qui suit. Un identifiant moléculaire unique (UMI), une région nucléotidique dégénérée, est ajouté à l'amorce universelle. Cela permet d'identifier de manière unique chaque molécule d'ADNc nouvellement formée. L'utilisation d'UMI, qui a été décrite par de nombreuses équipes, est essentielle pour la qualité et la fiabilité des séquences obtenues (111,112).

Les ADNc ont ensuite été amplifiés par une PCR semi-nichée (PCR1) à l'aide d'une amorce sens (5'_PCR1) spécifique de l'amorce universelle et d'un pool d'amorce antisens (C(n) 3'_PCR1) spécifique de la première région constante (CH1). Dans cette stratégie, une partie suffisante de la région constante est conservée pour permettre l'identification ultérieure de l'isotype de l'Ig (Figure 17).

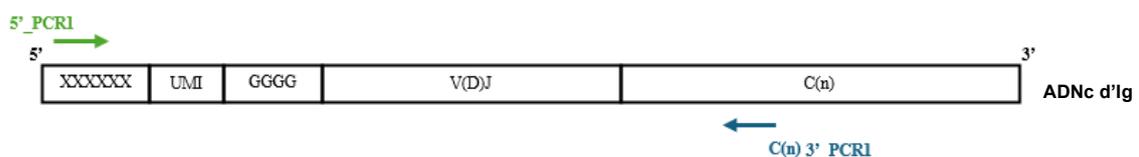


Figure 17 : Etape de PCR semi-nichée (PCR1)

Comme précédemment évoqué, nous avons utilisé une technique de lecture de séquençage « asymétrique », inspirée de la méthode développée par M.A. Turchaninova dans l'équipe de D.M. Chudakov (96), nous permettant de séquencer jusqu'à 750 nucléotides avec un kit Illumina® V2 MiSeq. Pour ce faire, nous avons généré des bibliothèques dans lesquelles chaque molécule d'ARN de départ est séquencée dans les deux orientations (50/50). Une deuxième PCR (PCR2) est donc réalisée pour introduire des linkers Illumina® (R1 et R2) de part et

d'autre de chaque fragment d'ADN généré lors de la PCR1. On obtient ainsi une librairie contenant des séquences orientées R1-R2 et R2-R1 (Figure 18). Ces linkers correspondent au site d'ancrage des amorces de séquençage et sont chacun spécifique d'un adaptateur.

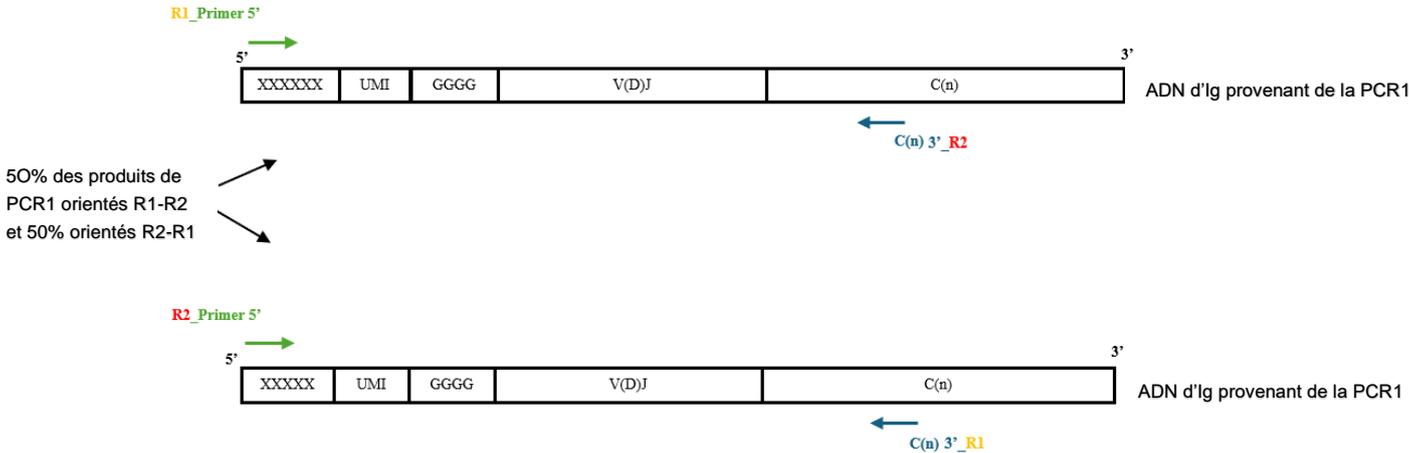


Figure 18 : Orientation R1-R2 et R2-R1 de la librairie pour le séquençage asymétrique (PCR2)

Lors d'une troisième PCR (PCR3), les adaptateurs Illumina® (P1 et P2) et un index spécifique à chaque patient (index NEXTERA XT) ont été ancrés aux deux extrémités de la librairie. Ce processus produit une librairie dans laquelle la moitié des séquences portent l'adaptateur P1 à l'extrémité 5' et l'adaptateur P2 à l'extrémité 3', tandis que l'autre moitié des séquences portent une orientation opposée (Figure 19).

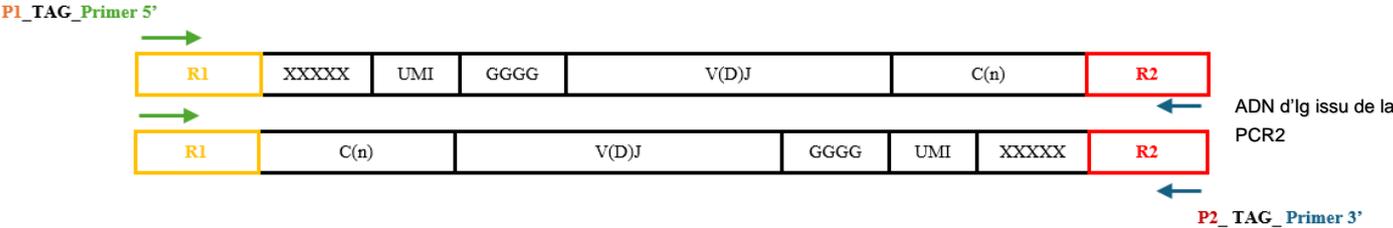


Figure 19 : Insertion des index et des adaptateurs Illumina® (PCR3)

II.1.2.1.2. Séquençage

Le séquençage haut débit a été réalisé sur le séquenceur MiSeq d'Illumina® avec un kit Illumina® V2 MiSeq pour une lecture en paired-end. De manière à réaliser le séquençage asymétrique, le séquenceur a été programmé pour lire 400 pb sur le read1 et 100 pb sur le read 2 (Figure 20).

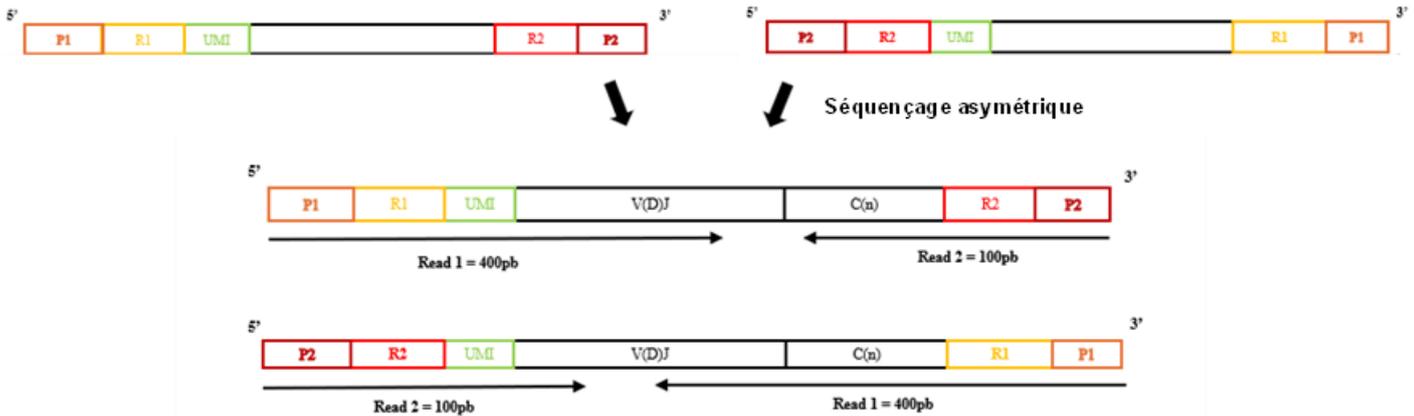


Figure 20 : Séquençage asymétrique

II.1.2.1.3. Analyse bio-informatique

Après le séquençage, une analyse bio-informatique des lectures a été effectuée. Cela implique un pré-traitement des données afin de convertir les données brutes en séquences d'Ig corrigées et annotées. Un consensus UMI minimum de 5 séquences (Molecular Identification Groups, MIG = 5) a été appliqué aux séquences 5'-3' et 3'-5' alignées sur 400 pb, en ne retenant que les séquences lues au moins cinq fois avec le même UMI. Cela permet de corriger les erreurs de PCR et de séquençage à conditions que celles-ci ne surviennent pas de manière précoce au cours des premiers cycles de PCR (Figure 21).

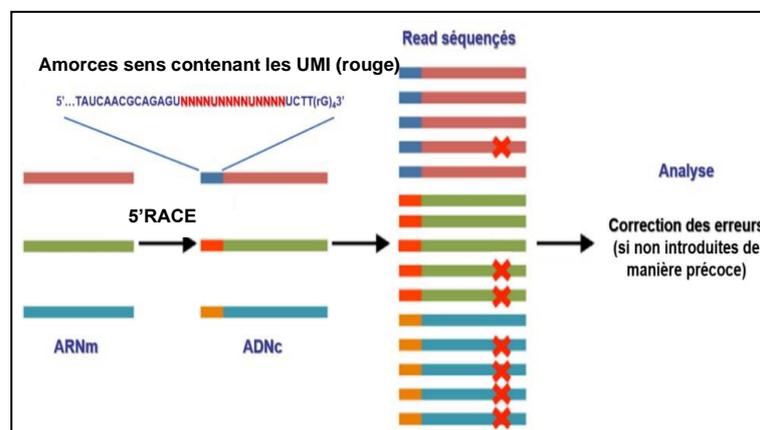


Figure 21 : Correction des erreurs de PCR par consensus des UMI, modifiée d'après (96)

Cet outil est essentiel pour étudier les séquences VDJ d'Ig, sujettes au phénomène d'hypermutation somatique. En effet, les étapes d'amplification de la librairie et de séquençage peuvent introduire des erreurs indiscernables des mutations intrinsèques au développement des Ig.

L'assemblage bio-informatique ultérieure des lectures basées sur l'UMI a généré des séquences de 400 pb de haute qualité couvrant les extrémités 3' ou 5' de l'ADNc. Dans cette configuration, la lecture de 100 pb est utilisée uniquement pour extraire la séquence UMI. Lors de l'étape d'analyse suivante, les séquences 5'-3' de 400 nucléotides ont été fusionnées avec le complément inverse des séquences 3'-5' de 400 nucléotides sur la base d'un UMI commun, avec un chevauchement de 50 pb, ce qui permettait d'obtenir des séquences paires de 400+400 nucléotides de haute qualité, issues des molécules d'ADNc originales (Figure 22).

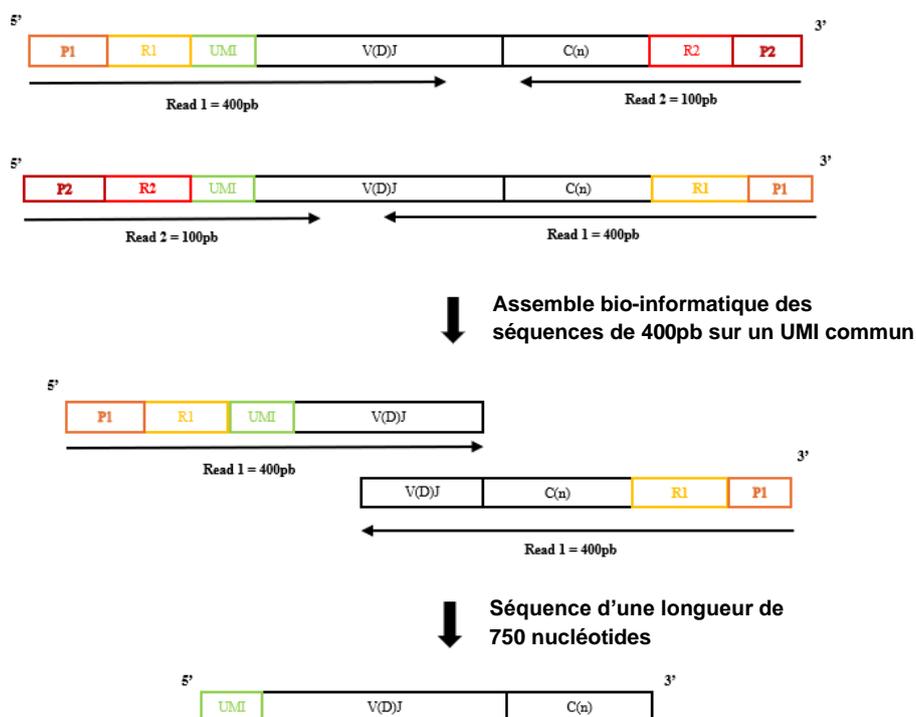


Figure 22 : Assemblage bio-informatique des séquences de 400pb basé sur un même UMI

Ces séquences fusionnées ont, par la suite, été alignées à l'aide de l'outil IgBLAST, qui compare les séquences obtenues avec des bases de données spécifiques afin d'attribuer les segments germinaux V, D et J de chaque séquence d'Ig obtenue, permettant ainsi d'évaluer les caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'ensemble du répertoire d'Ig. Des scores sur les propriétés physicochimiques de la séquence d'acides aminés, ont également été calculés, avec l'outil bio-informatique Alakazam pour chaque segment aligné (VH-JH, FR et CDR). Les propriétés analysées étaient notamment l'hydrophobicité (« gravity » pour grand average of hydrophaticity), l'encombrement stérique des chaînes latérales (« bulk »), l'indice

aliphatique, la polarité, la charge, ainsi que la teneur en résidus acides, basiques et aromatiques.

Enfin, nous avons utilisé l'outil « Iglook », le logiciel d'analyse des répertoires d'Ig créé par l'équipe de l'unité fonctionnelle de bio-informatique du CHU de Limoges, pour regrouper les séquences corrigées portant le même segment V, le même segment J ainsi qu'un *CDR3* identique, afin d'identifier et de quantifier les différents clonotypes d'un répertoire d'Ig. Dans ce logiciel, les clonotypes sont représentés sur un dot plot (avec en abscisses les segments V et en ordonnées les segments J), matérialisés par des points dont la taille est proportionnelle à la proportion du clonotype dans le répertoire global obtenu (Figure 23).

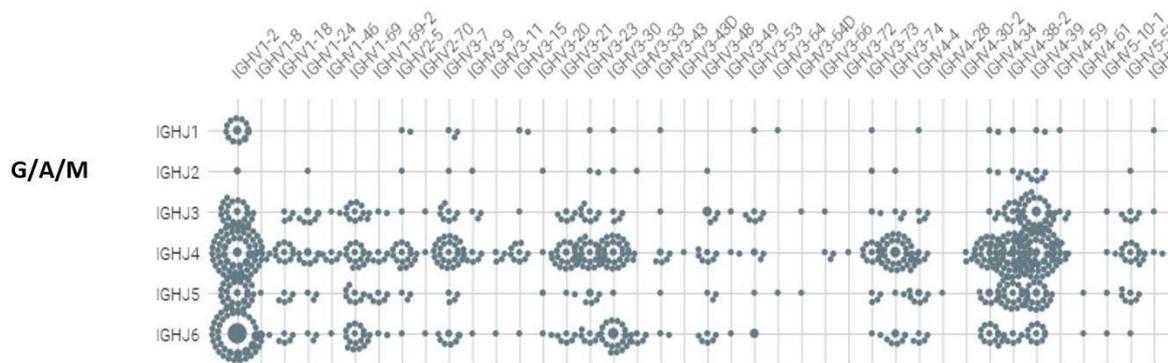


Figure 23 : Représentation des clonotypes d'un répertoire d'Ig (G, A et M) sur « Iglook »

En plus de ces étapes, plusieurs outils de contrôle qualité ont été appliqués à différentes phases de l'analyse. Cela a permis de vérifier le nombre de lectures (reads), le nombre d'UMI, le nombre de lectures par UMI, la qualité des séquences, de la longueur des lectures, ainsi que le nombre de séquences productives, entre autres.

II.1.2.2. Séquençage par la technologie Oxford Nanopore®

II.1.2.2.1. Préparation de la librairie

Comme précédemment, la génération de la librairie a commencé par l'obtention d'ADNc via 5'RACE à partir de l'ARN. Une amplification par PCR a ensuite été réalisée, similaire à la PCR1 de la librairie Illumina® mais en utilisant cette fois, un pool d'amorces spécifiques de la troisième région constante (CH3) des Ig avec un programme de PCR adapté.

Pour les étapes suivantes, nous avons suivi les instructions du protocole « Ligation sequencing amplicons V14 (SQK-LSK114) » d'Oxford Nanopore Technologie® (Figure 24).

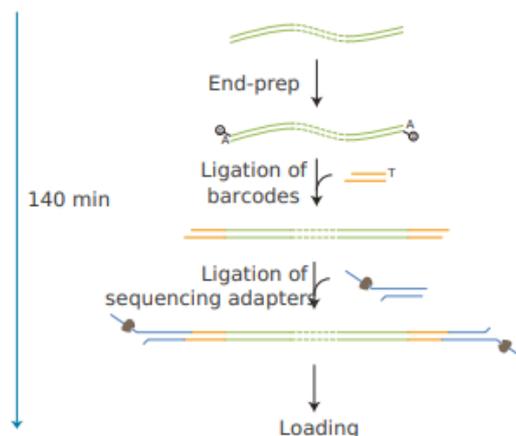


Figure 24 : Etape de préparation d'une librairie avec le kit « Native Barcoding Kit 24 V14 » (113)

Après avoir vérifié la quantité (minimum 200fmol par échantillon) et la pureté des échantillons, nous avons utilisé le kit « NEBNext® Ultra II End Repair / dA-tailing » pour préparer la ligature des adaptateurs. Cette étape consiste à ajouter un phosphore en 5' et de l'adénine en 3' de chaque brin d'ADN.

Ensuite, la ligature d'un code-barre spécifique à chaque échantillon a été réalisée à l'aide de la ligase (NEB Blunt/TA Ligase Master Mix). Cela permettait d'identifier de manière unique chaque échantillon et de séquencer plusieurs échantillons sur la même flowcell. Ces codes-barres, fournis dans le kit « Native Barcoding Kit 24 V14 » d'Oxford Nanopore® ont permis de traiter jusqu'à vingt-quatre échantillons. Dans notre cas nous avons séquencé dix échantillons par run.

Enfin, nous avons procédé à la ligature des adaptateurs de séquençage, également inclus dans le kit « Native Barcoding Kit 24 V14 », à l'aide du module « NEBNext® Quick Ligation ». Après une étape de purification, nous avons obtenu une librairie d'une quantité comprise entre 35 à 50 fmol dans un volume de 12µL, conformément aux recommandations du fournisseur pour le séquençage de fragments entre 1 et 10 kb.

Avant de charger la librairie sur la flowcell, celle-ci doit être amorcée. De plus, Oxford Nanopore® recommande de contrôler la flowcell pour évaluer le nombre de pores disponibles. En effet, si ce nombre est inférieur au nombre minimum de pores actifs couverts par la garantie (soit 800 pour le MinION), le fournisseur s'engage à remplacer la flowcell dans les trois mois suivant l'achat.

II.1.2.2.2. Séquençage et analyse bio-informatique

Une fois la librairie préparée, nous avons chargé 75µL de cette dernière sur une flowcell R10.4.1 compatible avec l'appareil MinION. Le séquençage a été effectué sur une durée de 48 heures.

Comme pour l'analyse des séquences obtenues avec la technologie Illumina®, une étape de pré-traitement des données est nécessaire. Le signal brut généré par le MinION est converti en nucléotides (« basecalling ») à l'aide de l'outil Dorado ce qui permet d'obtenir des fichiers

FASTQ correspondant aux reads. Cette conversion nécessite des processeurs de type GPU pour être effectuée de manière efficace. Le logiciel Dorado permet également de démultiplexer les reads en fonction des barcodes et donc de l'échantillon (« démultiplexage »).

Les fichiers FASTQ ainsi obtenus ont ensuite été analysés par un pipeline bio-informatique. Lors de cette étape, toutes les séquences ont été regroupées en fonction de leur UMI et le consensus MIG5 a été appliqué. Les séquences consensus ont ensuite été alignées sur les segments germinaux à l'aide d'IgBLAST, permettant d'identifier les segments V, D, et J de chaque séquence ainsi que les isotypes, les sous classes d'Ig et les différentes structures de l'Ig (*FR1*, *CDR1*, *FR2*, *CDR2*, *FR3*, *CDR3* et *FR4*). Les propriétés physico-chimiques des différents segments ont également été calculés avec le logiciel Alakazam. Enfin, les fichiers ont été chargés sur le logiciel Iglook, qui permet de regrouper les séquences en clonotypes et de les quantifier.

En parallèle de ces étapes, plusieurs outils de contrôle qualité ont été appliqués à différents moments du processus, permettant de vérifier le nombre de reads, d'UMI, de reads par UMI, la qualité des séquences, la longueur des reads, et le nombre de séquences productives.

II.1.2.3. Etude protéomique

II.1.2.3.1. Préparation des échantillons

II.1.2.3.1.1. Protocole de décellularisation

Tout d'abord, des coupes de tissus rénaux ont été réalisées au cryostat à partir des reliquats des biopsies rénales d'intérêts. Nous avons ensuite procédé à une étape de décellularisation dont l'objectif est d'éliminer les composants cellulaires tout en préservant la matrice extracellulaire. Ce processus débute généralement par la lyse des membranes cellulaires, suivie de la séparation des composants cellulaires de la matrice extracellulaire réalisé par des méthodes physique, chimique, enzymatique ou une combinaison de celles-ci.

Dans notre cas, nous avons suivi le protocole décrit par M. Narciso au sein de l'équipe de I. Almendros (114) qui permet une décellularisation directement effectuée sur des coupes de tissus fixées sur une lame de verre. Ce protocole, qui requiert peu de matériel tissulaire, est particulièrement adapté aux biopsies issues de la clinique, qui sont généralement de petites tailles.

Le processus consiste en une série de lavages et d'incubations avec différents agents décellularisants, tels que l'eau ultrapure (induisant une lyse cellulaire), le désoxycholate de sodium (un détergent) et une solution de désoxyribonucléase (pour éliminer l'ADN).

Pour vérifier l'efficacité de la décellularisation et s'assurer de la persistance des dépôts d'IgA, nous avons marqué une coupe de tissu décellularisée avec un anticorps anti-IgA humain reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FITC). Une coloration au DAPI a également été effectuée. Ces marquages ont également été réalisés sur une coupe de tissu non décellularisé issu du même échantillon. L'ensemble des lames a été analysé au microscope à épifluorescence (Nikon).

II.1.2.3.1.2. Préparation à la spectrométrie de masse

Après la décellularisation, nous avons détaché la matrice extracellulaire de la lame à l'aide d'un détergent. Les échantillons ont ensuite été incubés à 98°C pendant 30 minutes. Cette opération a été répétée trois fois. Les échantillons récoltés ont été placés dans un bain à ultrasons à 37Hz pendant 1 heure. Ils ont ensuite été incubés, toute la nuit à 37°C en présence de trypsine, une enzyme qui clive les protéines au niveau des acides aminés lysines et arginines. Enfin, les produits ont été dissous dans du DTT (dithiothréitol) qui brise les ponts disulfures.

II.1.2.3.2. Chromatographie liquide haute performance

Avant la chromatographie, les détergents présents dans les échantillons ont été éliminés à l'aide d'une colonne HiPPR (High Protein and Peptide Recovery, Thermo Scientific). Les petites molécules telles que les sels, ont également été éliminées lors d'une étape de « dessalage ».

Les échantillons ont ensuite été repris dans 50µl du solvant A de la phase mobile (98% d'eau, 2% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique) puis passés à travers un filtre de 0.22µm avant d'être injectés dans une colonne de 150µm de diamètre avec un débit de 400nL/min. La séparation des peptides a été effectuée par un gradient progressif de solvant B (100% acétonitrile et 0.1% d'acide formique) passant de 2 à 25% en 30 minutes. La chromatographie a été réalisée sur l'appareil nanoElute2, directement relié au spectromètre de masse (timsTOF Pro2 en DDA-PASEF) permettant l'analyse qualitative et quantitative des peptides.

II.1.2.3.3. Spectrométrie de masse

Le spectromètre timsTOF Pro2 est un appareil qui associe une dimension de mobilité ionique (TIMS) à la spectrométrie de masse en temps de vol (TOF) à haute résolution (HR-MS).

Les ions sont tout d'abord séparés selon leur structure tri-dimensionnelle en mobilité ionique (0,65 → 1,4 Vs/cm² - 100ms) puis analysés en mode DDA-PASEF ((Parallel Accumulation Serial Fragmentation) avec une sélection des 250 précurseurs di-chargés les plus intenses. Le temps de cycle est de 1,1 seconde.

II.1.2.3.4. Analyse protéomique

Les données obtenues ont été retraitées avec le logiciel ProteoScape® permettant d'aligner les séquences peptiques sur des banques de données protéiques, telles que Human Swissprot afin d'identifier les protéines correspondantes à chaque peptide. Cependant, étant donné que les domaines variables des Ig sont hautement diversifiés et uniques à chaque clone, ils sont presque impossibles à identifier via ces bases de données génériques, centrées sur les protéines humaines standard.

Pour pallier cette limite, nous avons créé une base de données regroupant un très grand nombre de séquences d'Ig (plus de 100 000 chaînes lourdes et légères), obtenues par NGS. Cette base inclut les séquences des patients IgAN et des volontaires sains de notre étude, ainsi que celles provenant d'autres études notamment sur les gammopathies monoclonales.

II.1.2.4. Statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R++. Tous les paramètres ne suivant pas une loi normale, nous avons utilisé le test statistique de Wilcoxon-Mann-Whitney pour évaluer s'il existait une différence significative entre les répertoires d'Ig sériques obtenus par la technologie Illumina® et ceux obtenus par Oxford Nanopore®. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney a également été utilisé pour comparer les répertoires des Ig sériques des patients IgAN et ceux des volontaires sains. Les tests ont été considérés statistiquement significatif si $p < 0,05$.

III. Résultats

III.1. Etude comparative des technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore®

Dans le cadre de cette étude, nous avons comparé les technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore® à partir des répertoires circulants issus des six échantillons sanguins des patients atteints de IgAN. Cette comparaison visait à évaluer à la fois les coûts financiers, les durées d'exécution et la qualité des répertoires d'Ig obtenus par ces deux approches.

III.1.1. Comparaison des coûts financiers et des durées d'exécution

Nous avons effectué une comparaison des coûts financiers des deux technologies. Le coût moyen par échantillon a été estimé en prenant en compte l'ensemble des étapes, depuis le prélèvement jusqu'au séquençage (Tableau 1).

	Illumina®	Oxford Nanopore®
Prélèvement (tube TEMPUS) (€)	7,88	7,88
Extraction (€)	11	11
Réactifs préparation librairie (€)	16,79	59,2
Dosage librairie (€)	45	Non réalisé
Flowcell (€)	68,75	66,5
Total coût (€)	149,42	144,58
Temps de préparation de la librairie (jours)	3	2.5
Temps de séquençage (heures)	39	48
Total temps (jours)	4,6	4,5

Tableau 1 : Comparaison des coûts financiers par échantillon pour les deux technologies de séquençage

En ce qui concerne le nombre d'échantillons analysés simultanément, nous réalisons actuellement 16 répertoires complets (chaînes lourdes et chaînes légères traitées séparément pour chaque échantillon) avec le kit V2 MiSeq Illumina®. Avec la puce R10.4.1 MinION d'Oxford Nanopore®, qui présente une capacité de séquençage légèrement plus limitée, nous avons fait le choix de restreindre ce nombre d'échantillons simultanément analysés à 10 répertoires complets. Cette limitation visait à assurer une profondeur de séquençage suffisante pour chacun des répertoires, garantissant ainsi une analyse de qualité.

Malgré cette capacité de séquençage légèrement inférieure, cette première comparaison montre que, dans notre application, la technologie Oxford Nanopore® est légèrement moins coûteuse que la technologie Illumina®, en particulier si l'on prend en compte l'économie du temps technicien liée à la durée réduite de préparation des librairies avec la technologie Nanopore®.

De plus, la technologie Oxford Nanopore® offre l'avantage d'une grande flexibilité en ce qui concerne la durée du séquençage, qui peut être déterminée par l'expérimentateur. La même flowcell peut ainsi être utilisée plusieurs fois, avec une durée maximale d'utilisation cumulée de 72 heures. Dans nos premiers essais, nous avons effectué un séquençage de 48 heures, mais il serait possible de réduire ce temps à 36 heures afin de réutiliser la flowcell une seconde fois, ce qui permettrait de diminuer le coût à 111,33 euros par échantillon, pour une durée totale de 4 jours de préparation et de séquençage.

Enfin, en termes de flexibilité et d'accessibilité, la technologie Oxford Nanopore® présente l'avantage d'une plateforme de séquençage extrêmement compacte, le MinION®, qui est à peine plus grand qu'une clé USB et fourni lors de l'achat du premier kit de séquençage. Cette portabilité permettrait de réaliser des runs plus fréquemment, ce qui se traduit par une réduction du temps de rendu des résultats, un atout majeur pour les analyses urgentes. Cependant, il convient de noter que l'analyse bio-informatique des données générées par Oxford Nanopore® nécessite des ressources supplémentaires par rapport à la technologie Illumina®, qui ne sont pas encore entièrement disponibles pour les analyses de routine au CHU de Limoges.

III.1.2. Comparaison des résultats d'analyse des répertoires d'Ig sériques obtenus par Illumina® et Oxford Nanopore®

Nous avons ensuite comparé les répertoires d'Ig obtenus avec les technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore® afin d'évaluer la qualité et la précision des séquences générées. Plus précisément, nous avons examiné le répertoire des chaînes lourdes d'Ig (IgG, IgA et IgM) des six patients atteints de IgAN, obtenu avec ces deux méthodes. Bien que le séquençage haut débit des Ig ne capture qu'une fraction limitée du répertoire total, ce qui peut induire des variations entre les expériences, notre objectif était de vérifier l'absence de biais significatifs entre les deux technologies en réalisant une analyse comparative sur divers paramètres. Pour cette comparaison, nous avons extrait, les données relatives à chaque clonotype identifié avec notre logiciel interne Iglook et calculé les moyennes pour chaque échantillon. Ces données comprenaient pour chaque clonotype de chaîne lourde d'Ig la séquence, la longueur du domaine variable et de la région *CDR3*, l'assignation des segments VH et JH, le taux d'hypermutation somatique, l'isotype et la sous-classe, ainsi que les scores correspondant aux propriétés physico-chimiques de chaque chaîne.

III.1.2.1. Comparaison clonotypique

Dans un premier temps, nous avons comparé le nombre moyen de clonotypes obtenus avec chaque technologie à l'issue de l'analyse bio-informatique. Dans notre étude, les clonotypes ont été définis par le regroupement des séquences partageant les mêmes segments VH, JH et une région *CDR3* identique. L'étape de définition bio-informatique des clonotypes permet d'obtenir une représentation plus précise et fonctionnelle du répertoire d'Ig, en corrigeant les erreurs de séquençage, en regroupant les séquences issues d'un même clone, et en fournissant un cadre standardisé pour comparer les échantillons.

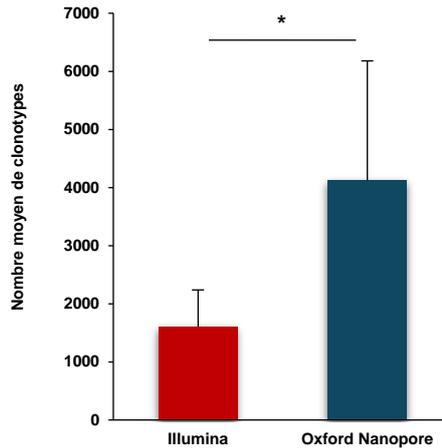


Figure 25 : Comparaison du nombre moyen de clonotypes obtenus par répertoire d'Ig

Les résultats indiquent, qu'avec les paramètres que nous avons utilisés, en termes de durée de séquençage et de nombre d'échantillon séquencés simultanément, la technologie Oxford Nanopore® permettait de détecter un nombre significativement plus élevé de clonotypes ($p < 0,05$) en moyenne (Figure 25).

Nous avons ensuite examiné le nombre de clonotypes communs entre les deux technologies pour un même échantillon (Figure 26).

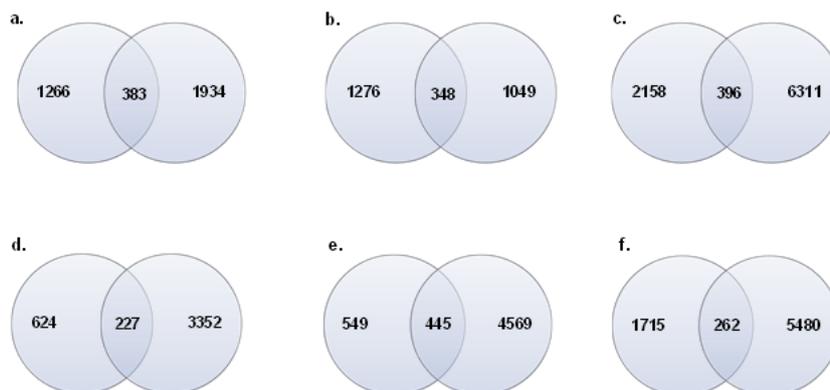


Figure 26 : Diagrammes de Venn représentant les clonotypes communs pour chaque patient (PA) lors de la comparaison des répertoires issus des deux technologies.

Les données correspondent au nombre de clonotypes détectés par le MiSeq à gauche, nombre de clonotypes détectés par le MinION à droite et nombre de clonotypes communs au centre.

a.PA1 ; b.PA2 ; c.PA3 ; d.PA4 ; e.PA5 ; f.PA6.

En moyenne, 35,9% des clonotypes identifiés par la technologie Illumina® étaient également retrouvés par la technologie Oxford Nanopore® pour un même échantillon, tandis que seuls 9,9% des clonotypes identifiés par Oxford Nanopore® étaient partagés avec Illumina®. Bien que ce résultat puisse paraître faible compte tenu du nombre de clonotypes, il reste, en réalité, satisfaisant. En effet, le séquençage haut débit du répertoire des Ig ne capture qu'une fraction de celui-ci, ce qui signifie que deux séquençages d'un même échantillon, même lorsqu'ils sont effectués avec la même technologie, ne produiront pas nécessairement les mêmes clonotypes.

III.1.2.2. Comparaison de la répartition isotypique et de la représentation des sous-classes d'Ig

Nous avons analysé la fréquence des trois isotypes d'Ig (IgG, IgA et IgM) au sein de chaque répertoire, puis comparé les moyennes de ces fréquences entre les répertoires obtenus avec les deux technologies de séquençage (Figure 27).

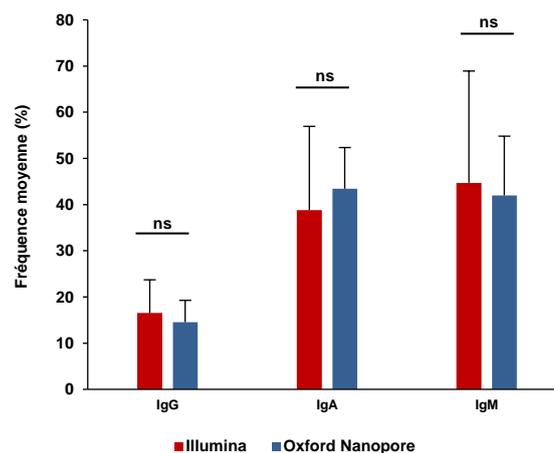


Figure 27 : Comparaison de la répartition moyenne des isotypes d'Ig (IgG, IgA et IgM) obtenue par les technologies Illumina® et Oxford Nanopore®

Les résultats ont révélé une répartition similaire des différents isotypes entre les répertoires issus des deux techniques, suggérant qu'aucune des technologies n'introduit de biais en faveur d'un isotype particulier. Par la suite, nous avons effectué la même comparaison pour les sous-classes d'IgA (Figure 28a) et d'IgG (Figure 28b).

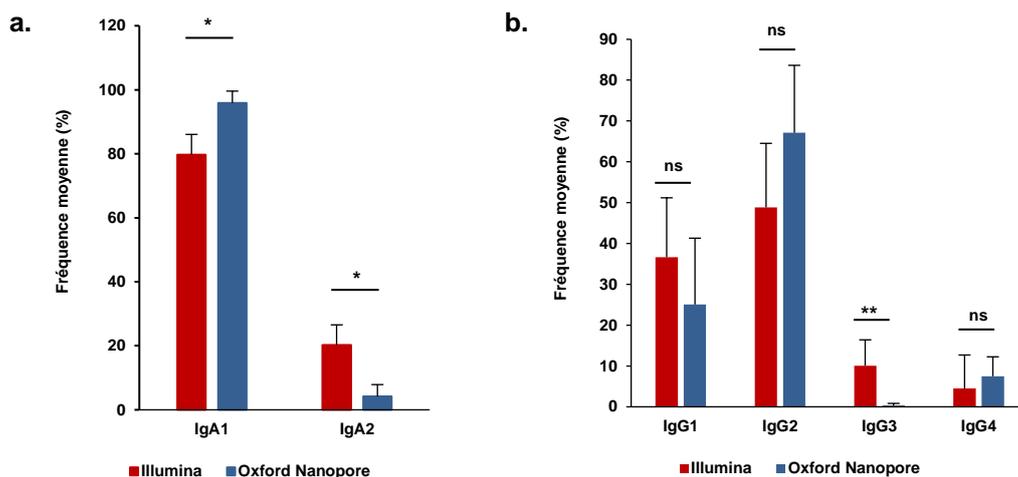


Figure 28 : Comparaison de la répartition moyenne des sous-classes d'Ig
a. Distribution des sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) ; b. Distribution des sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4)

Dans ce cas, des différences significatives ont été observées entre les répertoires séquencés par Illumina® et Oxford Nanopore®. Plus précisément, la proportion d'IgA1 était augmentée au détriment des IgA2 dans les répertoires obtenus avec Oxford Nanopore® par rapport à ceux obtenus avec Illumina®. Concernant les IgG, la sous-classe IgG3 était significativement moins représentée dans les répertoires obtenus avec Oxford Nanopore®.

Ces divergences pourraient s'expliquer par l'utilisation d'outils bio-informatiques distincts pour l'assignation des classes et sous-classes d'Ig dans chaque technologie. En effet, pour les répertoires obtenus avec Illumina®, nous utilisons un outil bio-informatique développé en interne par l'UF de bio-informatique du CHU de Limoges, tandis que pour ceux obtenus avec Oxford Nanopore®, l'outil IgBLAST a été utilisé. Au total, la répartition des isotopes dans les répertoires issus des deux technologies est rassurante quant à l'absence de biais de séquençage. Cependant, les différences observées pour les sous-classes d'Ig nécessitent d'être confirmées après une harmonisation des outils d'analyse.

III.1.2.3. Comparaison des caractéristiques des domaines variables des chaînes lourdes d'Ig

Pour conclure la comparaison des répertoires obtenus avec les technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore®, nous avons examiné les caractéristiques des régions variables des chaînes lourdes d'Ig. Nous avons comparé la longueur des domaines variables des différents clonotypes identifiés dans les répertoires générés par chacune des technologies (Figure 29a) ainsi que la longueur des régions CDR3 (Figure 29b). La région CDR3, partie la plus variable au sein de l'Ig, joue un rôle clé dans la diversité du répertoire. De plus, la séquence de la région CDR3 est utilisée comme marqueur clé pour l'identification et la caractérisation des clonotypes. Il est donc crucial d'assurer l'absence de biais dans cette région lors des analyses de séquençage, afin de garantir la précision et la fiabilité des résultats.

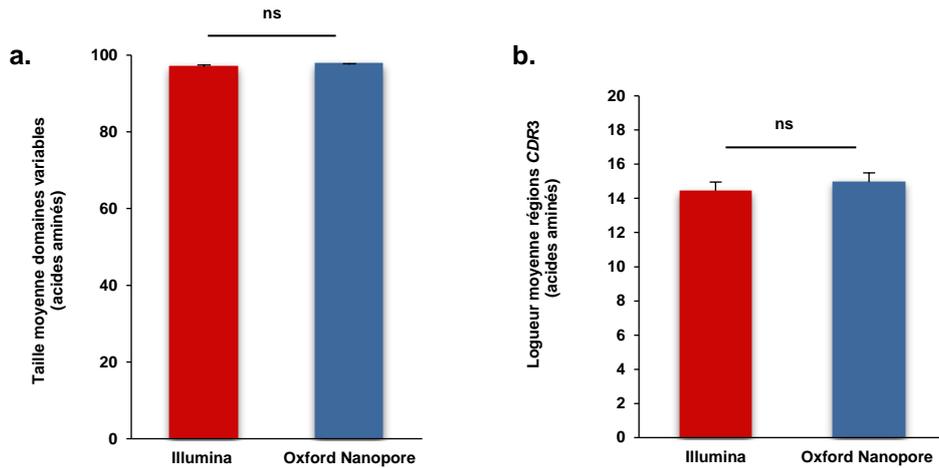


Figure 29 : Comparaison de la longueur moyenne des domaines variables et des régions CDR3 (en AA).

a. Longueur moyenne des domaines variables des chaînes lourdes d'Ig ; b. Longueur moyenne des régions CDR3

L'objectif était de vérifier si l'utilisation de la technologie Illumina®, limitée en termes de longueur des séquences produites, introduisait un biais lors de la génération des répertoires en favorisant le séquençage des séquences plus courtes, malgré l'utilisation d'une stratégie asymétrique pour atténuer cette limite. Nos analyses n'ont cependant révélé aucune différence significative concernant la longueur des domaines variables ou des régions CDR3 entre les deux technologies.

Par ailleurs, nous avons évalué le taux d'hypermutation somatique des domaines variables (Figure 30) en mesurant le pourcentage de divergence par rapport aux banques de données des séquences germinales.

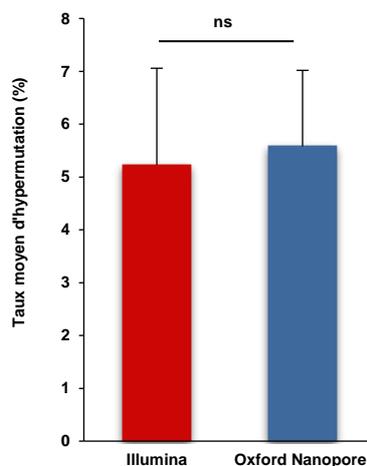


Figure 30 : Comparaison du taux moyen d'hypermutation somatique obtenus par répertoire d'Ig

Aucune différence significative n'a été observée entre les répertoires obtenus par les deux technologies en ce qui concerne le taux moyen d'hypermutation somatique. Ce résultat est particulièrement rassurant, car nous craignons que la technologie Oxford Nanopore®, connue pour son taux d'erreur de séquençage relativement élevé, puisse introduire des artefacts de type hypermutation due à des erreurs de séquençage dans les répertoires générés.

Enfin, nous avons analysé la fréquence des différentes familles de gènes VH (Figure 31a) et JH (Figure 31b) au sein des répertoires d'Ig afin d'évaluer un biais de séquençage de certains segments par rapport à d'autres.

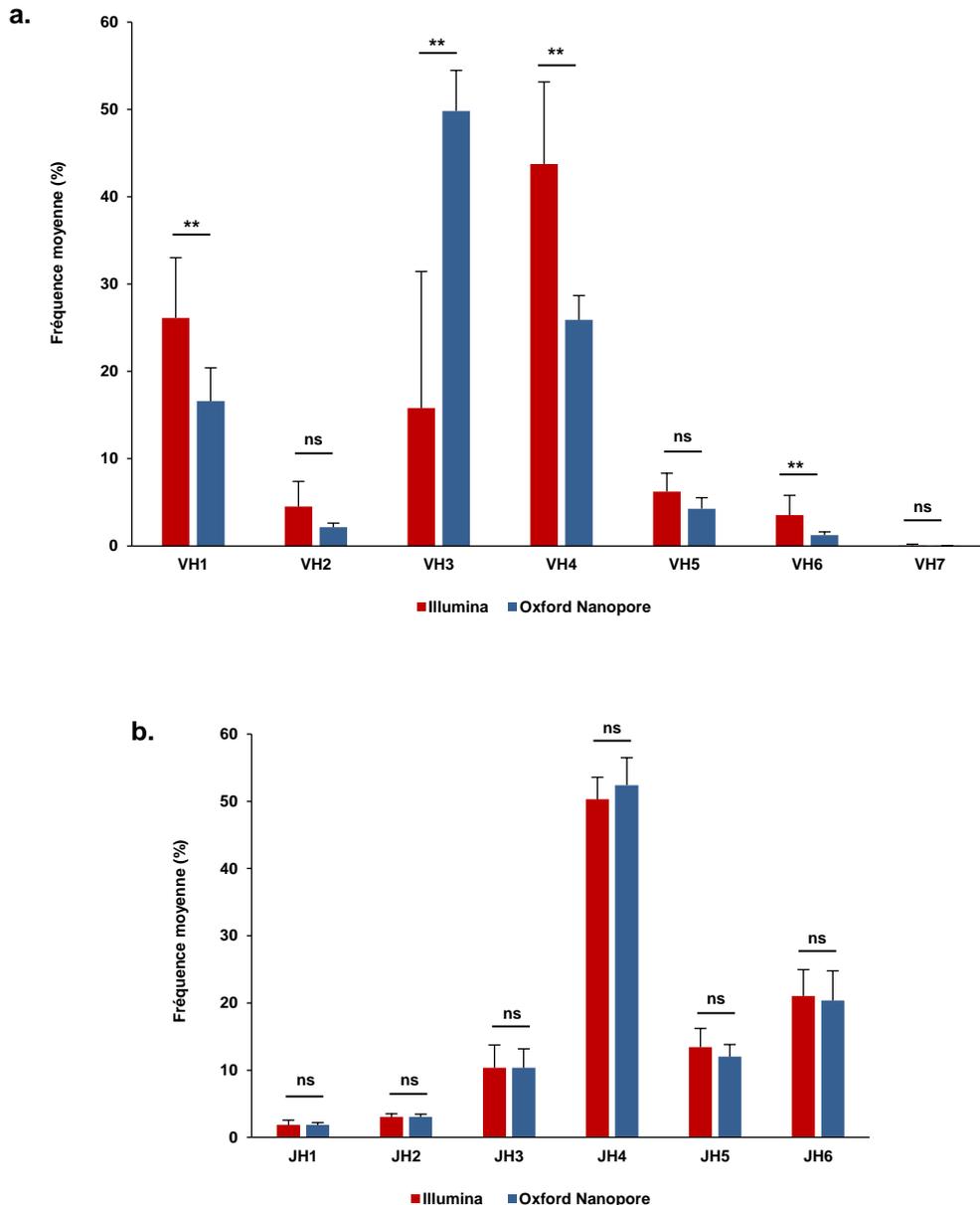


Figure 31 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH et JH des chaînes lourdes d'Ig

a. Fréquence moyenne des gènes VH ; b. Fréquence moyenne des gènes JH

Si l'utilisation des familles de gènes JH n'a montré aucune différence significative, nous avons observé des variations significatives dans la fréquence de celles des gènes VH entre les deux technologies. Notamment, les familles de gènes VH1, VH4 et VH6 étaient significativement plus représentées ($p < 0,05$) dans les répertoires Illumina®, tandis que la fréquence des gènes VH3 y était significativement inférieure ($p < 0,05$). Bien qu'une hypothèse initiale aurait pu être un biais de taille favorisant les segments VH plus courts avec Illumina®, l'absence de différence significative dans la longueur des séquences des domaines variables entre les deux technologies permet d'écarter cette explication. Il est possible que ces variations soient liées à des différences de profondeur des répertoires, affectant la distribution des familles de gènes VH au sein des répertoires analysés, bien que cette hypothèse reste à confirmer.

En conclusion, bien que nous ayons observé quelques différences entre les deux technologies, notamment en ce qui concerne la répartition des sous-classes d'Ig et la fréquence des familles de gènes VH, ces résultats préliminaires restent globalement prometteurs et suggèrent que la technologie Oxford Nanopore® est un outil pertinent pour l'analyse des répertoires d'Ig, sans qu'aucun biais majeur n'ait été détecté dans la génération des séquences. De plus, l'utilisation d'Oxford Nanopore® présente l'avantage d'un coût réduit et permet le séquençage de l'intégralité de la chaîne d'Ig, incluant non seulement la région variable mais également la région constante, qui pourrait elle aussi jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines maladies liées à des Ig pathogènes. Ces observations nécessitent toutefois d'être approfondies et validées sur d'autres types de répertoires, en particulier oligoclonaux et monoclonaux, et avec un plus grand nombre d'échantillons.

La première partie de notre travail nous a ainsi conforté dans l'idée que les résultats issus de la technologie Oxford Nanopore® pouvaient être utilisés de manière fiable pour la suite de cette étude qui concerne la comparaison des répertoires d'Ig circulants des patients de IgAN à ceux des contrôles.

III.2. Etude comparative des répertoires d'Ig circulantes de patients IgAN avec ceux des volontaires sains

La deuxième partie de cette étude porte sur l'analyse du répertoire des Ig sériques chez des patients atteints de IgAN, obtenu avec la technologie Oxford Nanopore®. Ces répertoires ont été analysés chez six des quarante patients inclus dans l'étude ERINA, une étude pilote menée par le Pr Aldigier, visant à explorer les répertoires d'IgA au cours de la néphropathie à dépôts d'IgA. L'étude ERINA, qui comprenait quarante prélèvements sanguins de patients et quarante prélèvements de volontaires sains, avait déjà permis une première exploration des répertoires d'Ig à l'aide de la technologie Illumina®. Les résultats préliminaires n'avaient révélé que peu de différences entre les répertoires des patients et des contrôles, à l'exception d'une proportion plus élevée d'IgG2 chez les patients IgAN.

Dans cette nouvelle étude, nous avons sélectionné uniquement les six patients (PA) inclus au moment du diagnostic de l'IgAN, pour lesquels nous disposions d'un prélèvement sanguin mettant en évidence une atteinte rénale ou de signes cliniques liés aux dépôts d'IgA, et les avons comparés à six volontaires sains (VS) également issus de l'étude ERINA. L'objectif était d'explorer plus en détail le répertoire des Ig sériques en utilisant la technologie Oxford Nanopore® afin d'évaluer si, comme mentionné précédemment, dans certaines études, les domaines variables des IgA pouvaient influencer leur propension à se déposer dans les glomérules rénaux.

III.2.1. Comparaison clinique et biologique des patients et volontaires sains inclus dans notre étude

Dans un premier temps, nous avons recensé les caractéristiques cliniques et biologiques des patients (PA) et volontaires sains (VS) inclus dans notre étude (Annexe 1) et les avons comparées afin d'identifier d'éventuels biais entre les 2 groupes (Tableau 2).

	VS	PA	<i>p-value</i>
Age (années)	28,5	30,4	0,93
Femme (nombre)	0	2	0,14
Homme (nombre)	6	4	
Lymphocytes (g/L)	1,87	2,05	1
IgG (g/L)	12,18	9,72	0,05
IgA (g/L)	2,38	3,48	0,18
IgM (g/L)	1,22	0,99	0,82
Pression artérielle systolique	129,67	133,75	1
Pression artérielle diastolique	79,17	71,5	0,83
DFG (mL/min)	120,83	93,17	0,52
Créatinine (µmol/L)	86,67	142,17	0,40

Tableau 2 : Données clinico-biologiques des patients et des volontaires sains inclus dans notre étude

Aucune différence significative n'a été observée concernant l'âge moyen des participants entre les deux groupes. Bien que la répartition des sexes montre une proportion plus élevée d'hommes dans le groupe VS par rapport au groupe PA, cette différence n'est pas statistiquement significative (Test de Fisher, $p = 0,14$).

Les concentrations sériques des lymphocytes ainsi que celles des IgG, IgA et IgM ne diffèrent pas de manière significative entre les deux groupes. Il convient de noter qu'un seul patient (PA3) présente une élévation des IgA sériques, un phénomène fréquemment observé chez environ 50 % des individus atteints de IgAN. De plus, deux patients (PA2 et PA3) présentaient une hypertension artérielle, un symptôme souvent associé à la IgAN. Cependant, aucune différence significative n'a été relevée concernant les pressions artérielles systoliques et diastoliques entre les deux groupes.

La fonction rénale a été évaluée à l'aide du débit de filtration glomérulaire (DFG) et des taux de créatininémie. Deux patients (PA2 et PA4) présentent une insuffisance rénale, et la majorité des patients montraient des taux de créatininémie élevés, en accord avec la présentation clinique de l'IgAN, caractérisée par une atteinte rénale fréquente. Toutefois, aucune différence statistiquement significative n'a été identifiée entre les deux groupes pour ces paramètres.

En conclusion, les groupes VS et PA apparaissent globalement comparables, aucune différence significative n'ayant été observée pour les paramètres étudiés. Néanmoins, une plus grande hétérogénéité est observée au sein du groupe des patients atteints de IgAN, reflétant la variabilité clinique de cette pathologie.

III.2.2. Comparaison des répertoires d'Ig circulantes et recherche de « signatures » de la IgAN

Pour cette partie, nous avons caractérisé le répertoire des chaînes lourdes des Ig sériques (IgG, IgA et IgM) généré à l'aide de la technologie Oxford Nanopore® chez les six patients nouvellement diagnostiqués pour une IgAN en utilisant les différents paramètres fournis par l'outil Iglook. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux des six volontaires sains, analysés dans les mêmes conditions.

Afin d'assurer la comparabilité des répertoires, nous avons vérifié que le nombre moyen de clonotypes ne présentait pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 32).

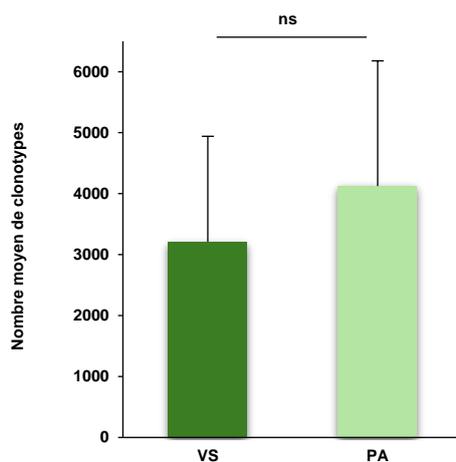


Figure 32 : Comparaison du nombre moyen de clonotypes dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains

III.2.2.1. Proportion des isotypes et des sous-classes d'Ig

Nous avons débuté cette étude par l'analyse de la répartition des isotypes d'Ig entre les deux groupes. Pour cela, nous avons comparé la fréquence moyenne de chaque isotype au sein de chaque répertoire. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (Figure 33).

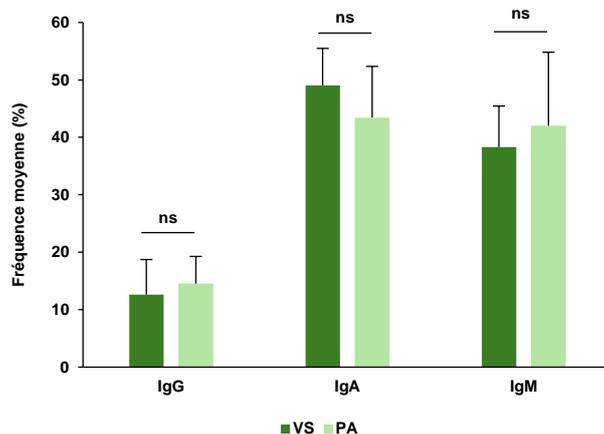


Figure 33 : Comparaison de la fréquence moyenne des isotypes d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains

Une analyse similaire a été réalisée sur les sous-classes d'IgA (Figure 34a) et d'IgG (Figure 34b), et là encore, aucune différence significative n'a été détectée. Ces observations diffèrent des résultats de l'étude menée par Xi Zhang et al. (115), qui avaient identifié une proportion

plus élevée d'IgA et d'IgG chez les patients IgAN comparativement aux contrôles, ainsi qu'une proportion plus faible d'IgM suggérant un phénomène de commutation isotypique plus marqué dans cette population.

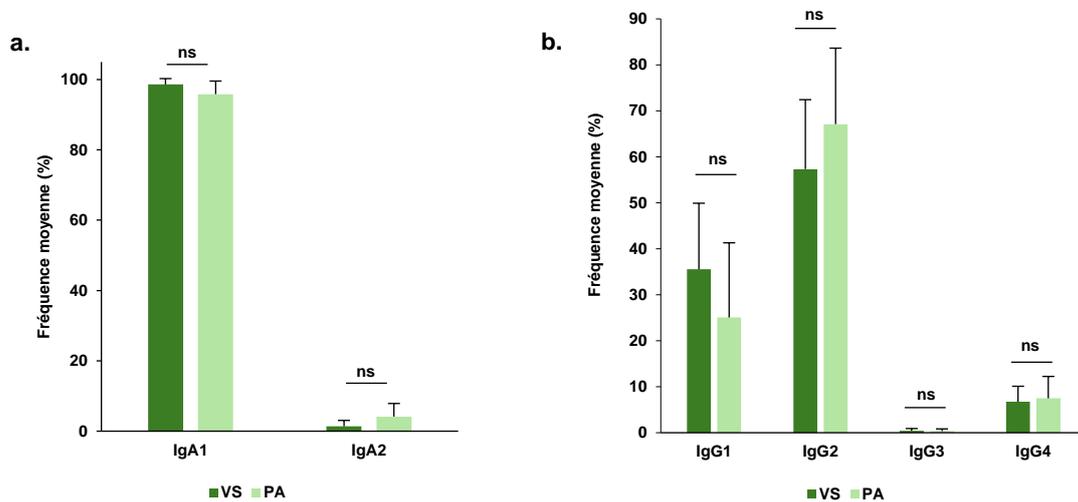


Figure 34 : Comparaison de la fréquence moyenne des sous-classes d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains

a. Sous-classes IgA1 et IgA2 ; b. Sous-classes IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4

En ce qui concerne les sous-classes d'Ig, une tendance à une fréquence plus élevée d'IgG2 a été observée chez les patients, tandis que la proportion d'IgG1 est légèrement inférieure à celle des volontaires sains.

III.2.2.2. Domaines variables des chaînes lourdes d'Ig

Nous avons ensuite étudié la partie variable des chaînes lourdes d'Ig en comparant notamment la taille globale de ces domaines (Figure 35a) ainsi que celle des régions *CDR3* (Figure 35b). La taille des *CDR3* est un paramètre variable au sein d'un répertoire d'Ig et peut être influencée par le contexte immunitaire. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences significatives concernant la taille moyenne des domaines variables et des régions *CDR3* entre les deux groupes.

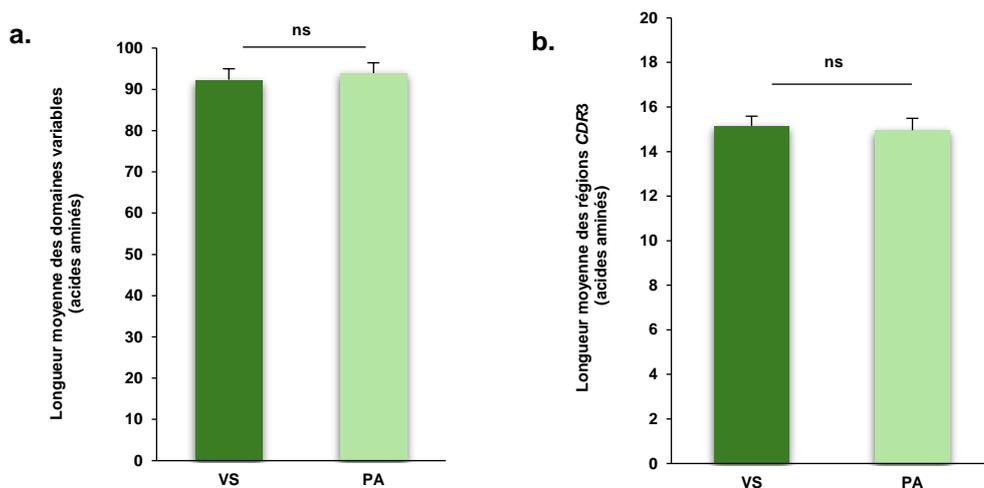


Figure 35 : Comparaison de la longueur moyenne des domaines variables et des régions *CDR3* d'Ig dans les répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN et des volontaires sains

a. Longueur moyenne des domaines variables d'Ig ; b. Longueur moyenne des régions *CDR3* d'Ig

Nous avons également évalué le taux d'hypermutation somatique afin de vérifier si un défaut de maturation d'affinité des IgA, précédemment décrit chez les patients atteints de IgAN, était présent. Cependant, le taux moyen d'hypermutation somatique s'est avéré identique dans les deux groupes (Figure 36) que ce soit pour l'ensemble des répertoires ou pour les IgA1 spécifiquement.

Ces résultats contrastent, à nouveau, avec ceux de Xi Zhang et *al.* (115), qui ont rapporté une taille réduite des *CDR3* chez les patients atteints d'IgAN associé à une moindre diversité de ces régions pouvant être à l'origine d'une efficacité réduite de la réponse immunitaire adaptative.

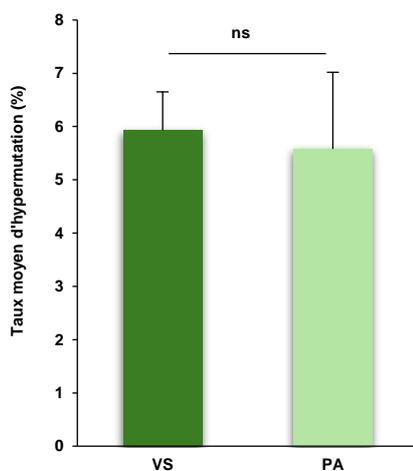


Figure 36 : Comparaison des taux d'hypermutation somatique des chaînes lourdes d'Ig dans les répertoires des patients atteints de IgAN et des volontaires sains

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la répartition des familles de gènes VH (Figure 37a) et JH (Figure 37b) entre les patients et les volontaires sains afin d'identifier d'éventuelles différences dans l'utilisation de ces gènes qui pourrait être lié à la capacité des IgA1 à se déposer dans cette pathologie. Les familles de gènes VH et JH regroupent des segments présentant des similitudes de séquence, permettant d'analyser les préférences d'utilisation des gènes à un niveau plus global que celui des allèles.

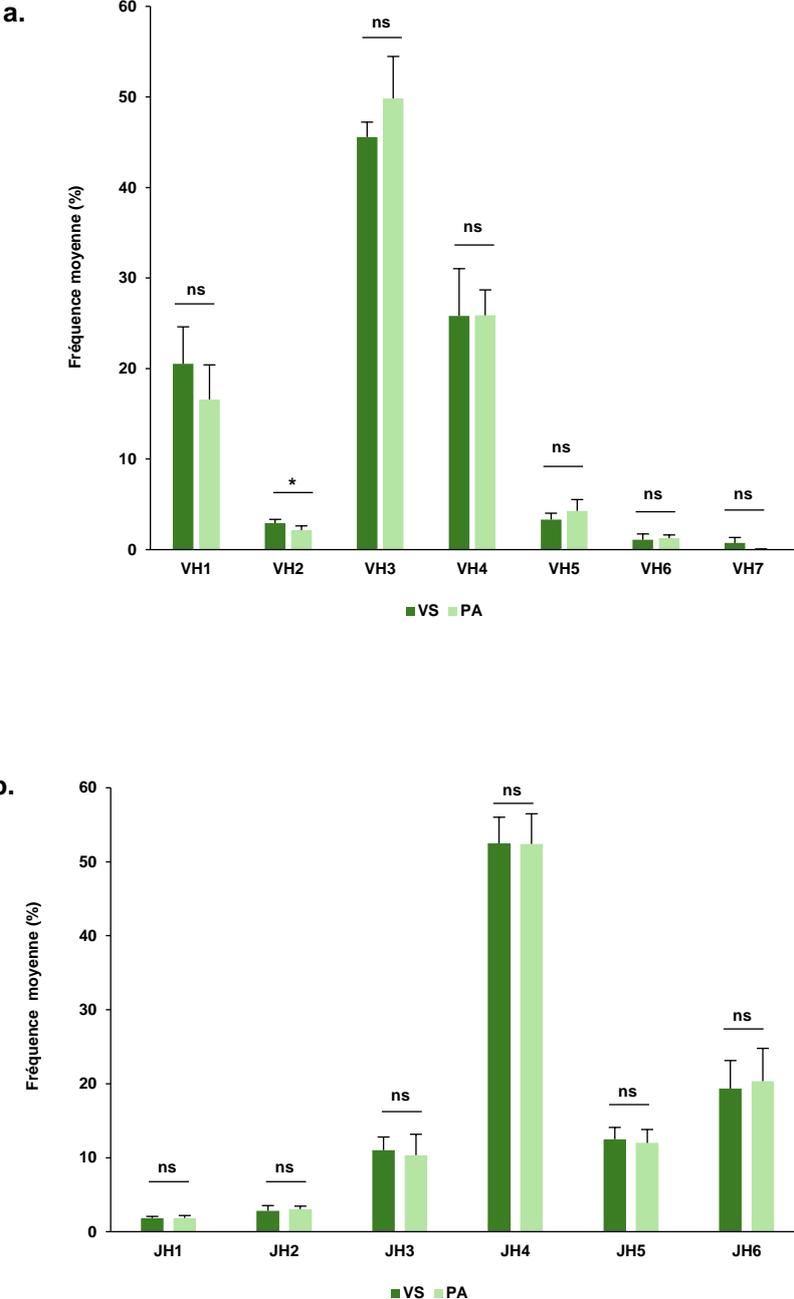


Figure 37 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH et JH dans les répertoires d'Ig des patients atteints de patients atteints de IgAN et des volontaires sains
a. Fréquence moyenne des gènes VH ; b. Fréquence moyenne des gènes JH

L'analyse des fréquences des familles de gènes VH et JH, a révélé une différence significative uniquement pour la répartition des gènes VH2 ($p < 0,05$) avec une fréquence significativement plus faible de ces segments dans le groupe PA par rapport aux VS.

De plus, nous avons observé des tendances non significatives vers une utilisation accrue des familles de gènes VH3 et JH6 dans les répertoires des patients, ainsi qu'une légère réduction de l'utilisation des familles de gènes VH1 et JH3. Ces tendances sont, cette fois, en accord avec les observations de l'étude de Xi Zhang et *al.* (115) qui avaient mis en évidence ces différences (en ce qui concerne les familles VH1, JH3 et JH6) de manière significative.

Étant donné que les dépôts d'IgA dans la IgAN sont principalement de type IgA1, nous avons effectué une analyse spécifique en filtrant les répertoires sur cette sous-classe. Les différences significatives observées concernaient également la répartition des familles de gènes VH (Figure 38).

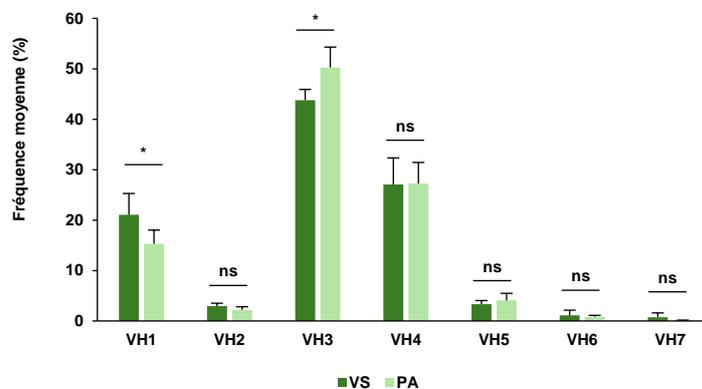


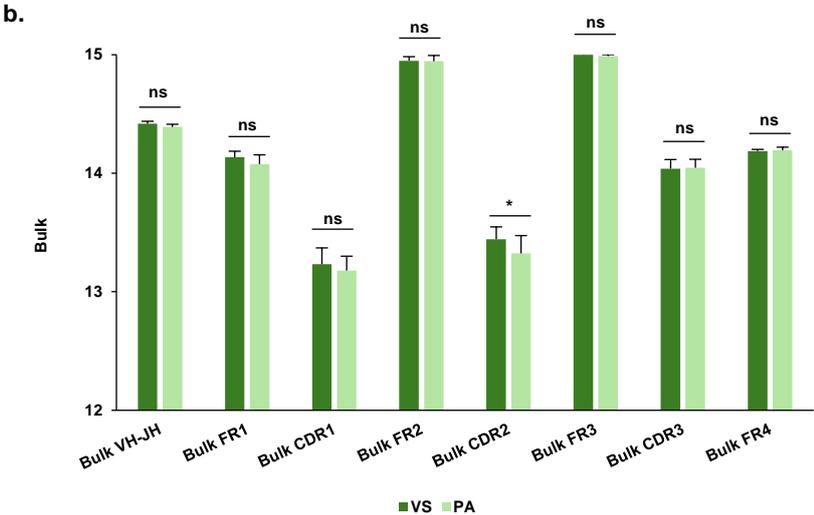
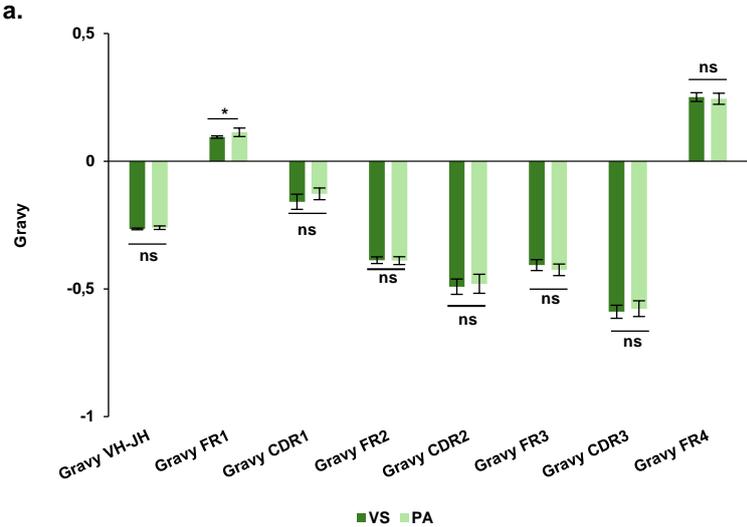
Figure 38 : Comparaison de la fréquence moyenne des familles de gènes VH spécifiquement dans les répertoires IgA1 dans les répertoires des patients atteints de patients atteints de IgAN et des volontaires sains

En effet, une utilisation significativement plus élevée de la famille de gènes VH3 dans le groupe PA, tandis que l'utilisation de la famille de gènes VH1 était significativement réduite. Ces résultats confirment la tendance déjà observée dans l'analyse des répertoires complets. En revanche, la fréquence significativement plus élevée de la famille de gènes VH2 observés dans le groupe PA n'a pas été retrouvée dans cette analyse spécifique.

III.2.2.3. Caractérisation des propriétés physico-chimiques des chaînes lourdes d'immunoglobulines

Nous avons ensuite comparé les propriétés d'hydrophobicité (Gravy), d'encombrement stérique des chaînes latérales (Bulk), l'indice aliphatique, la polarité, la charge, ainsi que la teneur en résidus acides, basiques et aromatiques entre les deux groupes. Cette analyse a été réalisée en calculant la moyenne pour l'ensemble des clonotypes de chaque répertoire de ces propriétés en considérant, d'une part, la région variable entière de la chaîne lourde (VH), et d'autre part, les régions *FR* 1 à 4 et les régions *CDR* 1 à 3 de manière indépendante.

Nos résultats ont montré des différences significatives entre les deux groupes uniquement pour l'hydrophobicité, l'encombrement stérique, l'indice aliphatique et la charge (Figure 39). Les résultats liés aux autres propriétés analysées, qui ne montraient pas de différences significatives, ne seront pas détaillées ici, mais sont disponibles en Annexe 2.



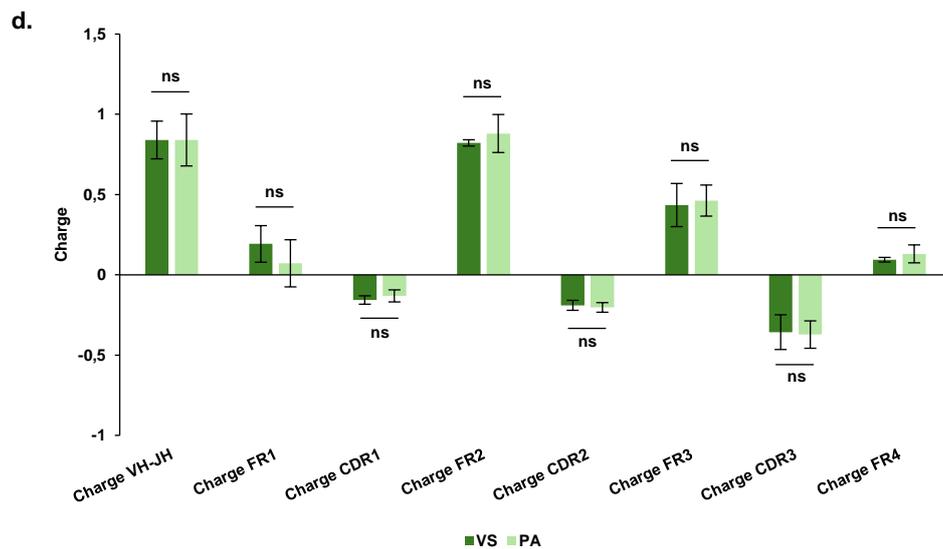
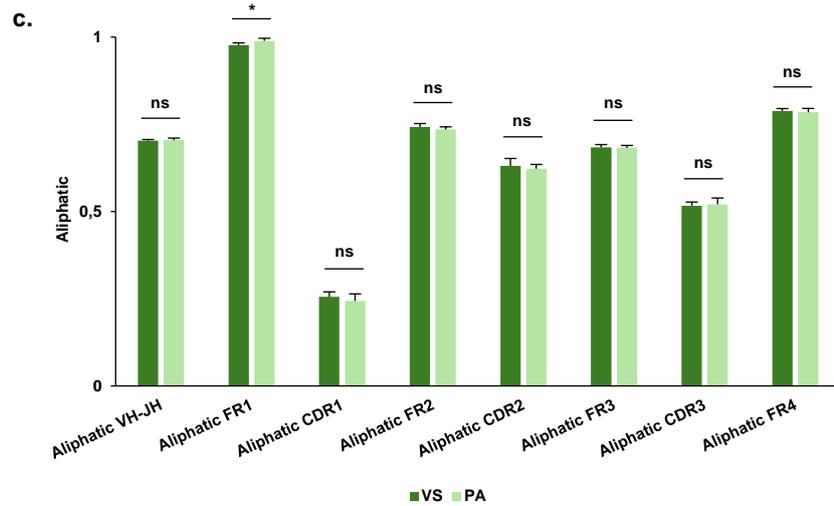


Figure 39 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des segments variables des chaînes lourdes VH et des régions *FR* et *CDR*

a. Score « Gravy » ; b. Score « Bulk » ; c. Score « Aliphatic » ; d. Score « Charge »

Nous avons observé une hydrophobicité significativement plus élevée dans la région *FR1* des Ig du groupe PA par rapport au groupe VS (Figure 39a). Par ailleurs, le score moyen d'encombrement stérique "Bulk" est significativement plus faible dans la région *CDR2* des patients comparativement aux volontaires sains (Figure 39b), indiquant un encombrement stérique réduit des chaînes latérales dans cette région. L'indice aliphatique moyen s'est également avéré significativement plus élevé dans la région *FR1* des répertoires d'Ig des patients (Figure 39c). Il est intéressant de noter qu'un indice aliphatique élevé est généralement associé à une plus grande stabilité thermique des protéines. Enfin, bien que la

charge moyenne des régions *FR1* des patients soit retrouvée plus faible que celles des volontaires sains, cette différence n'était pas significative (Figure 39d).

L'impact potentiel de ces variations sur la structure et la pathogénicité des Ig reste à déterminer. Cependant, en se basant sur des observations dans le domaine des maladies de dépôts d'Ig, il est plausible que certaines propriétés physico-chimiques des domaines variables des Ig modifient leur conformation, et influençant ainsi leur capacité à se déposer dans les tissus (116).

De manière plus ciblée, en filtrant spécifiquement sur les IgA1, nous avons également retrouvé des différences significatives dans la région *FR1*, en particulier concernant l'hydrophobicité et l'indice aliphatique (Figure 40a, b). De plus, cette région *FR1* était caractérisée par une charge positive significativement plus faible chez les patients (Figure 40c). Ces observations renforcent l'importance d'explorer plus en détail l'impact de ces variations sur la physiopathologie des IgA.

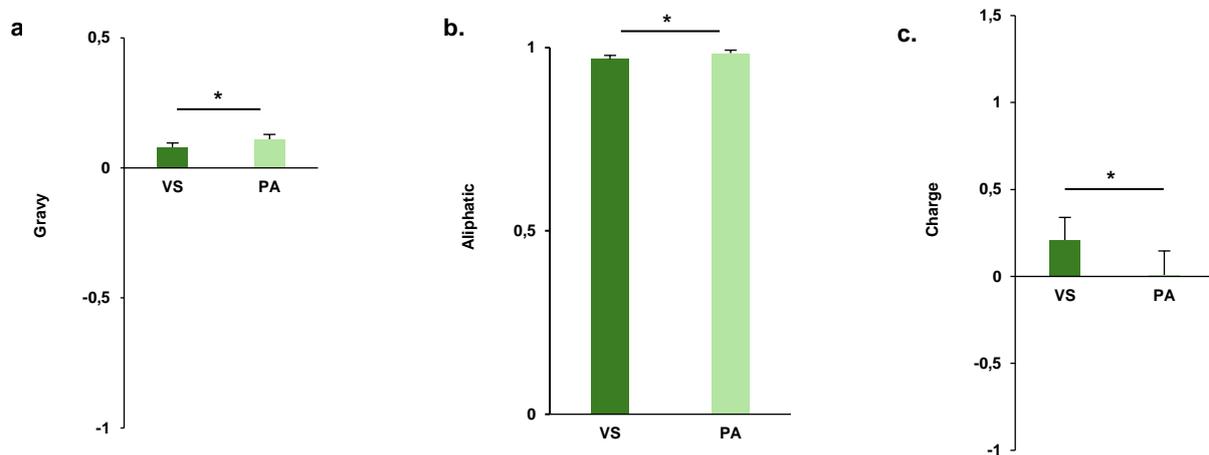


Figure 40 : Comparaison des propriétés physico-chimiques des régions *FR1* spécifiquement sur les IgA1

a. Score « Gravy » ; b. Score « Aliphatic » ; c. Score « Charge »

III.2.2.4. Analyse des clonotypes communs entre les patients IgAN

Nous avons ensuite examiné la présence de clonotypes communs entre les différents répertoires d'Ig, en nous focalisant exclusivement sur les clonotypes partagés entre plusieurs répertoires de patients et absents des répertoires contrôles. Cette analyse a révélé 48 clonotypes partagés dans le répertoire des chaînes lourdes des patients IgAN. La répartition des isotopes au sein de ces clonotypes a été évaluée (Figure 41), mettant en évidence, une prédominance marquée des IgA.

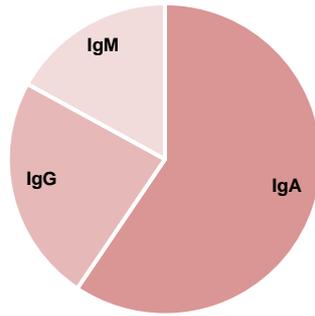


Figure 41 : Répartition des isotypes d'Ig au sein des clonotypes partagés

Nous avons ensuite étudié la distribution des allèles ou sous-groupes de gènes VH parmi ces clonotypes communs afin d'identifier la présence éventuelle d'une prédominance de certains segments variables. Au total, 18 allèles VH différents ont été identifiés, parmi lesquels 5 étaient fréquemment observés et qui représentaient à eux seuls 70 % des segments identifiés au sein de ces répertoires partagés (Figure 42).

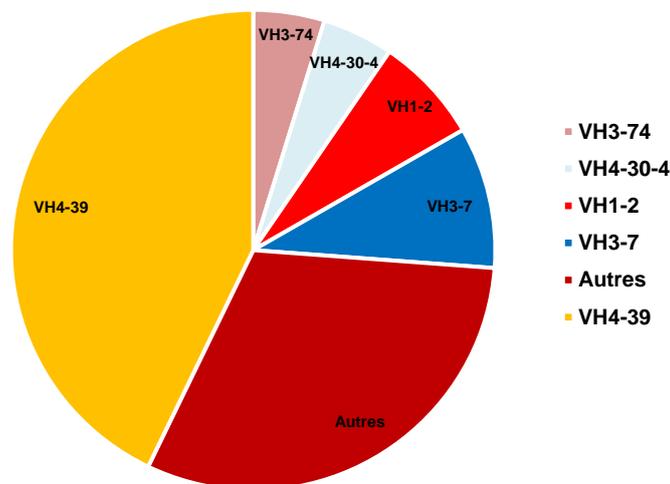


Figure 42 : Répartition des allèles VH au sein des clonotypes partagés des répertoires d'Ig des patients atteints de IgAN

Ces segments variables incluaient VH1-2, VH3-7, VH3-74, VH4-30-4, et le VH4-39, ce dernier représentant à lui seul 40 % des clonotypes partagés.

Nous avons ensuite comparé la fréquence moyenne de ces 5 allèles dans les répertoires globaux d'Ig des groupes PA et VS, à la fois sur l'ensemble des isotypes et en nous concentrant spécifiquement sur les IgA1. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Il est intéressant de noter que, dans l'ensemble, ces segments sont parmi les plus fréquemment représentés dans les répertoires d'Ig circulants d'individus sains

(Figure 43), à l'exception de l'allèle VH4-30-4 qui s'avère relativement peu présent dans les répertoires des VS.

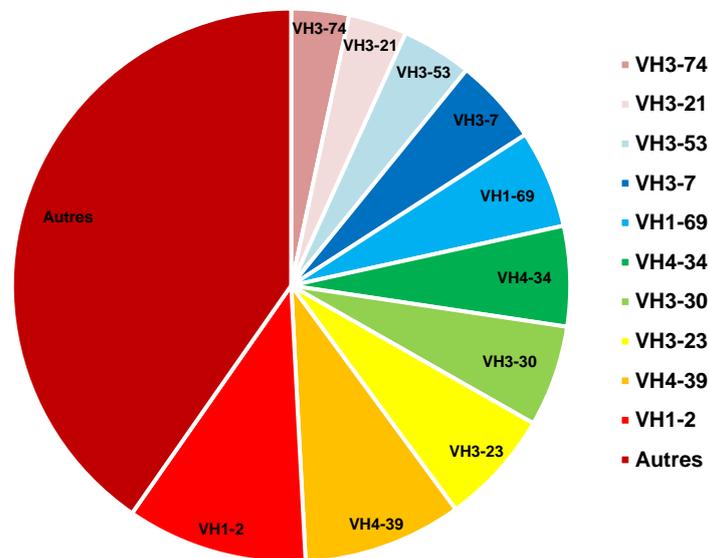


Figure 43 : Répartition des allèles VH au sein des répertoires d'Ig de volontaires sains

Pour approfondir l'analyse de ces clonotypes partagés, il serait pertinent d'explorer d'autres caractéristiques, telles que la taille de leur domaines variables et de leur région *CDR3* ainsi que les propriétés physico-chimiques des différentes régions. Ces investigations pourraient permettre d'identifier des particularités spécifiques, suggérant la présence d'une signature immunologique liée à l'IgAN. Ces analyses sont envisagées dans le cadre des futures étapes de ce projet.

III.2.2.5. Domaines constants des chaînes lourdes d'Ig

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu analyser les régions constantes des Ig grâce au séquençage complet de la chaîne lourde rendu possible par la technologie Oxford Nanopore®. L'objectif principal était d'évaluer la présence de mutations spécifiques au sein de ces régions chez les patients atteints de IgAN. Nous avons calculé le pourcentage de mutations dans les régions constantes, en les comparant aux séquences germinales des données IMGT® (The international immunogenetics information system®). Après exclusion des mutations de type insertion/délétion, probablement liées aux erreurs de séquençage associées à la technologie Oxford Nanopore®, nous avons effectué une analyse intra-répertoire et inter-répertoire.

L'analyse intra-répertoire a permis d'évaluer la fréquence des mutations au sein de chaque répertoire pour identifier les mutations potentiellement surreprésentées, tandis que l'analyse inter-répertoire, a permis de calculer la fréquence moyenne de chaque mutation et d'examiner leur répartition entre les deux groupes étudiés.

Bien que cette étude préliminaire, n'ait pas encore mis en évidence de différences statistiquement pertinentes, nous poursuivrons ces analyses afin de mieux explorer ces mutations.

En parallèle, un deuxième objectif consistait à établir une base de données de protéines complètes, incluant les séquences entières des chaînes lourdes (domaines variables et constants) obtenues lors de cette étude, et ultérieurement, celles des chaînes légères. Cette base de données vise à regrouper les répertoires d'Ig circulants, ainsi que les répertoires d'Ig d'autres compartiments si disponibles et pertinents, tels que la moelle osseuse ou l'infiltrat inflammatoire de reliquats de biopsies rénales. L'originalité de cette base de données réside dans l'inclusion de la diversité des Ig, reflétée par les régions variables et les polymorphismes des régions constantes.

À ce jour, de telles bases de données n'existent pas, ce qui freine les études de spectrométrie de masse sur les dépôts d'Ig polyclonaux. En effet, ces études s'appuient actuellement sur des bases génériques comme Human Swissprot, qui ne permettent pas d'identifier efficacement les domaines variables des Ig, hautement diversifiés et spécifiques à chaque clonotype, limitant ainsi l'identification des Ig dans des contextes de dépôts polyclonaux.

III.3. Etude protéomique de ponctions biopsies rénales de patients atteint de IgAN et de contrôles

Dans le but de caractériser les Ig pathogènes directement *in situ* au sein du tissu rénal, nous avons initié le développement d'une analyse par MS sur des reliquats de biopsies rénales de patients atteints de IgAN. Cette approche comprend une phase de préparation incluant la réalisation de coupes sur lame suivie d'un processus de décellularisation, afin de concentrer l'étude sur les dépôts mésangiaux et la matrice extracellulaire, sans l'interférence des éléments cellulaires. Une première expérience a ainsi été menée sur les biopsies rénales de trois patients atteints de IgAN et de trois contrôles présentant soit une néphropathie interstitielle, soit une néphropathie diabétique.

Dans un premier temps, pour évaluer l'efficacité de la décellularisation et vérifier la persistance des dépôts d'IgA après ce processus, nous avons effectué un co-marquage DAPI/IgA sur les coupes de tissu provenant d'un échantillon d'IgAN et d'un échantillon contrôle (néphrite interstitielle), à la fois avant et après décellularisation (Figure 44).

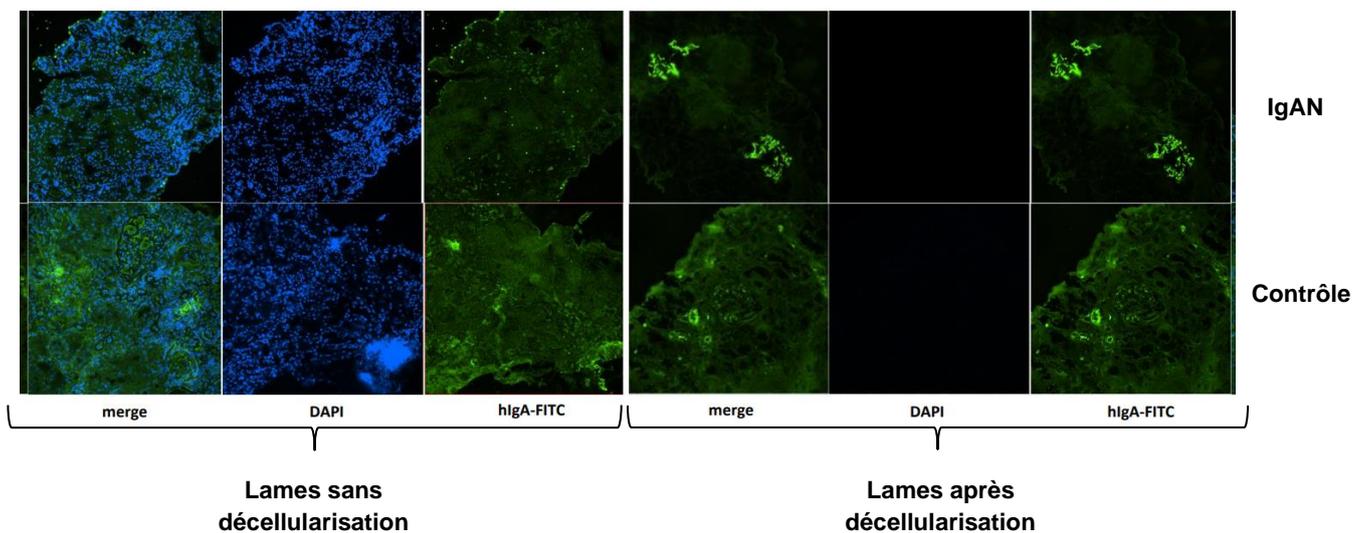


Figure 44 : Images de microscopie à épifluorescence de coupes rénales d'un patient atteint de IgAN et d'un contrôle avant et après décellularisation

Les coupes non décellularisées présentaient un marquage des noyaux cellulaires par le DAPI (en bleu), qui disparaît après le processus de décellularisation, indiquant l'efficacité de cette étape. En ce qui concerne les IgA, un marquage diffus (en vert) a été détecté dans les échantillons de contrôle, qu'ils soient décellularisés ou non, ce qui est attendu car la néphrite interstitielle s'accompagne d'un infiltrat inflammatoire au niveau rénal. En revanche, le marquage IgA chez le patient atteint d'IgAN est bien préservé après décellularisation et se révèle nettement localisé au niveau des glomérules rénaux. Cela confirme que les dépôts d'IgA sont non seulement présents, mais aussi bien conservés après le processus de décellularisation.

III.3.1.1. Analyse par spectrométrie de masse des protéines identifiées sur reliquats de biopsies rénales

Après la décellularisation, les échantillons ont été préparés tel que décrit dans la partie méthodes et adressés à la plateforme technologique BISCEm (Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement) de l'université de Limoges pour la MS. L'analyse des données a été effectuée en utilisant les logiciels Protéoscope® et Mascot®. Protéoscope® a été utilisé avec la base de données Human SwissProt, tandis que Mascot® a permis d'explorer les correspondances des peptides d'Ig identifiés en utilisant une base de données interne des répertoires d'Ig que nous avons fournie.

III.3.1.1.1. Identification des protéines associées aux dépôts d'IgA

À partir des résultats obtenus, nous avons évalué l'abondance relative des protéines associées aux dépôts d'IgA et/ou celles conservées sur les coupes après l'étape de décellularisation. Cette analyse a été réalisée en utilisant le score EmPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index), un indicateur semi-quantitatif qui estime l'abondance relative des protéines dans un échantillon, basé sur le rapport entre le nombre de peptides observés par rapport et le nombre total de peptides théoriquement attendus pour une protéine donnée. Un score EmPAI plus élevé reflète une plus grande abondance de la protéine correspondante

Parmi les protéines identifiées, les chaînes lourdes et légères d'Ig figuraient parmi les plus représentées dans les deux groupes d'échantillon. Bien qu'une analyse statistique formelle n'ait pas encore été réalisée, une comparaison préliminaire des protéines entre les contrôles et les patients atteints d'IgAN a été effectuée (Figure 45).

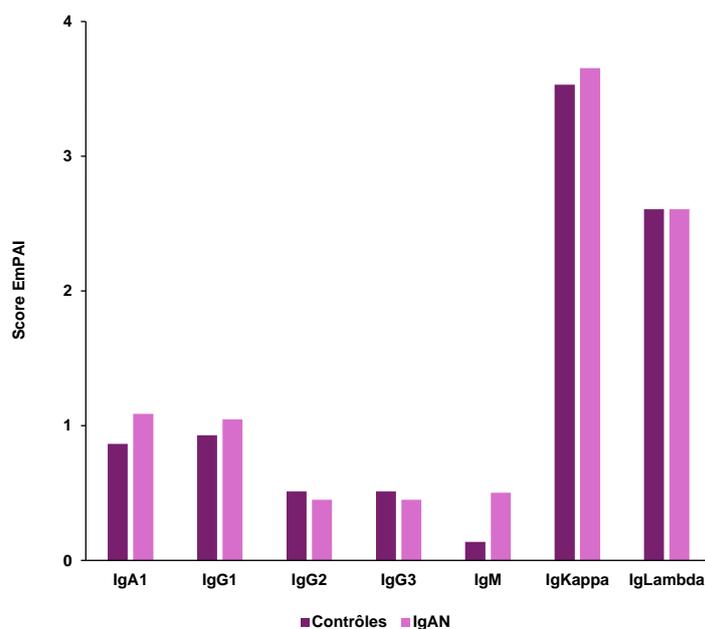


Figure 45 : Abondance moyenne des chaînes lourdes et légères d'Ig dans les deux groupes étudiés

Nous avons observé une tendance vers une plus grande abondance moyenne d'IgA1 chez les patients atteints de IgAN par rapport aux contrôles. De plus, une tendance similaire a été notée pour les IgM. En ce qui concerne les IgG, nous avons constaté une abondance moyenne plus élevée de la sous-classe IgG1 par rapport au groupe contrôle, alors que les sous-classes IgG2 et IgG3 étaient moins abondantes. Ces résultats sont en accord avec la littérature, qui décrit la présence de dépôts d'IgA1 et d'IgM chez les patients atteints d'IgAN, ainsi que la prédominance de la sous-classe IgG1 dans ces dépôts.

Par ailleurs, des protéines associées aux Ig, telles que la chaîne J et le pIgR, sont retrouvées dans les deux groupes (Figure 46).

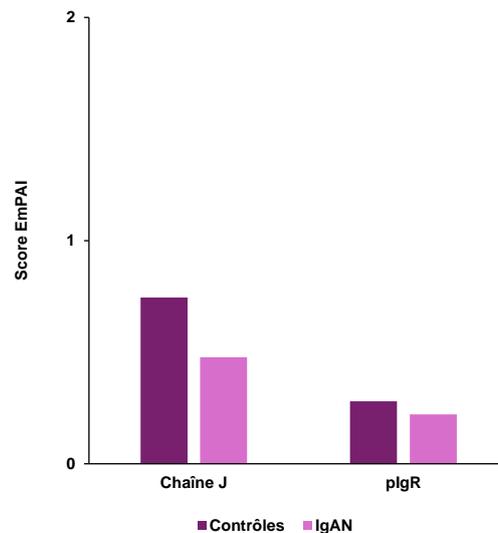


Figure 46 : Abondance moyenne de la chaîne J et du pIgR dans les deux groupes étudiés

Nous avons observé une abondance moyenne plus faible de la chaîne J et du pIgR chez les patients atteints de IgAN suggérant une proportion moindre d'IgAp dans les échantillons rénaux de ce groupe.

Ces observations, bien que préliminaires, sont intéressantes et justifient des investigations plus approfondies, notamment en ce qui concerne l'étude des IgA1. Cependant, nous ne pouvons pas tirer de conclusions définitives en raison du faible nombre de patients inclus dans l'analyse. De plus, la constitution du groupe contrôle n'est pas optimale, car la présence d'une atteinte rénale dans ce groupe pourrait introduire un biais dans les résultats. Il serait donc préférable de comparer les patients atteints d'IgAN avec un groupe exempt de toute pathologie rénale.

Enfin, il serait pertinent de réaliser cette étude en isolant spécifiquement les glomérules rénaux, afin d'éliminer l'influence des protéines provenant d'autres structures rénales.

III.3.1.1.2. Corrélation avec les Ig du sérum

Enfin, nous avons cherché à corréler les séquences peptidiques des Ig rénales obtenues par MS avec celles des Ig sériques obtenues par séquençage. Bien que les correspondances identifiées aient été très limitées, un petit nombre de clonotypes a pu être détecté, notamment dans l'échantillon de contrôle relatif à une néphrite interstitielle. Cette faible correspondance était probablement liée à des limitations techniques dans la préparation des échantillons pour la MS, qui nécessite encore des optimisations.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats, tels qu'une digestion enzymatique insuffisante des Ig par la trypsine, ou la forte glycosylation des IgA1, qui peut entraver l'action de la trypsine en fonction de la localisation des modifications glycosidiques, et ainsi fausser les résultats de l'analyse par MS.

De plus, l'analyse réalisée avec Protéoscope® a montré une forte représentation des chaînes d'Ig, en particulier des chaînes légères, ce qui souligne l'importance de développer une base de données personnalisée comprenant les séquences complètes des chaînes lourdes et légères, y compris leurs régions variables.

IV. Discussion

L'analyse des répertoires d'Ig a grandement bénéficié des récentes avancées du séquençage haut débit. Actuellement, les technologies de deuxième génération, comme celle d'Illumina®, est largement dominante dans ce domaine. Cependant, elle présente une limitation liée à la longueur relativement courte des reads, restreinte à environ 600 pb en séquençage paired-end, que nous avons pu étendre jusqu'à 750 pb en adoptant une stratégie de lecture asymétrique. En revanche, les technologies de troisième génération, telles qu'Oxford Nanopore®, permettent d'obtenir des reads beaucoup plus longs, pouvant atteindre jusqu'à 20 kb pour certaines applications, ce qui représente un avantage considérable pour l'étude des répertoires d'Ig.

Dans cette étude, nous avons comparé les performances de deux plateformes de séquençage : Illumina®, déjà utilisée au laboratoire d'immunologie du CHU de Limoges pour le diagnostic de gammopathies monoclonales, et Oxford Nanopore®, que nous envisageons d'intégrer dans nos analyses de routine. Les répertoires d'Ig de six patients atteints de IgAN ont été séquencés à l'aide de ces deux technologies. Le choix de ces échantillons s'inscrit dans une étude plus large visant à identifier une potentielle signature immunitaire propre à cette pathologie par l'analyse des répertoires d'Ig sériques des patients.

Les résultats obtenus avec la technologie Oxford Nanopore® se sont révélés très prometteurs. En plus de générer des répertoires d'Ig de qualité comparable à ceux obtenus par Illumina®, Oxford Nanopore® a l'avantage de permettre le séquençage complet des chaînes d'Ig, couvrant à la fois les domaines variables et constants, ce qui représente un atout majeur pour l'analyse approfondie des répertoires d'Ig. Sur le plan économique, cette technologie est également plus avantageuse, et la durée totale de l'analyse s'avère plus courte. Il est à noter que le coût et le temps d'exécution pourraient être encore optimisés en réduisant la durée du séquençage à 36 heures au lieu des 48 heures utilisée dans cette étude, ce qui rendrait cette technologie d'autant plus adaptée à une utilisation en routine au sein d'un laboratoire d'analyses médicales.

Cependant, une des limites de cette technologie reste le taux d'erreurs de séquençage observé avec Oxford Nanopore®, en particulier des mutations de type insertion/délétion, fréquemment rapportées avec cette technologie. L'utilisation d'UMI a permis de limiter ces erreurs, bien que les analyses bio-informatiques en soient devenues plus complexes. Néanmoins, le taux d'hypermutation somatique dans les domaines variables des Ig ne différait pas significativement entre les deux technologies, ce qui confirme la fiabilité des résultats après correction des erreurs.

En termes de biais, aucune différence significative n'a été détectée concernant la taille des séquences ou la distribution des isotopes d'Ig. Cependant, des disparités ont été observées dans la répartition des sous-classes d'Ig et des familles de gènes VH, probablement en raison de la plus grande profondeur de séquençage d'Oxford Nanopore® ou des outils bio-informatiques spécifiques utilisés pour chaque technologie. Ces observations soulignent l'impact crucial des outils bio-informatiques sur la fiabilité des résultats, qui peuvent potentiellement introduire des biais dans l'analyse des répertoires d'Ig.

Une des principales limitations de cette étude réside dans le nombre restreint d'échantillons analysés, avec seulement six sérums étudiés. Par ailleurs, l'évaluation de la technologie sur les chaînes légères d'Ig n'a pas été réalisée, notre analyse s'étant concentrée uniquement sur

les chaînes lourdes. Le séquençage avec la technologie Illumina® est actuellement utilisée au laboratoire pour détecter des clones d'Ig de faible abondance, du fait de sa grande sensibilité. Il est donc essentiel de s'assurer que la technologie Oxford Nanopore® offre une sensibilité et une fiabilité comparables avant d'envisager son utilisation en routine.

En conclusion, bien que la technologie Oxford Nanopore® présente des avantages et des résultats prometteurs, des améliorations sont nécessaires pour garantir des performances égales, voire supérieures, à celles d'Illumina®. Si ces améliorations sont réalisées, Oxford Nanopore® pourrait devenir un outil clé pour l'analyse des répertoires d'Ig, non seulement dans le contexte de la IgAN, mais aussi pour d'autres pathologies impliquant des Ig pathogènes.

À partir de cette première étude, nous avons analysé les répertoires d'Ig de six patients atteints de IgAN en utilisant la technologie Oxford Nanopore®, et nous les avons comparés à ceux de volontaires sains séquencés avec la même technologie.

Notre analyse a révélé des différences significatives dans la répartition des familles de gènes VH, avec une fréquence accrue des familles VH3 et une diminution des VH1 chez les patients, particulièrement dans les répertoires d'IgA1. De plus, plusieurs clonotypes communs ont été identifiés entre les répertoires des patients, majoritairement d'isotype IgA, incluant fréquemment l'allèle VH4-39. L'étude approfondie des caractéristiques de ces clonotypes partagés pourrait fournir des informations importantes sur la physiopathologie de l'IgAN.

Nous avons également observé des différences significatives dans certaines propriétés physico-chimiques de la région *FR1* entre les deux groupes, tant au sein des répertoires globaux que dans les répertoires filtrés sur les IgA1. Ces différences pourraient potentiellement influencer la conformation des protéines et être liées à la capacité des IgA à former des dépôts tissulaires, bien que des investigations complémentaires soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse, notamment sur les clonotypes partagés.

Concernant la répartition des classes d'Ig, nous avons constaté une proportion réduite d'IgA, ainsi qu'une augmentation des IgG et IgM chez les patients par rapport aux témoins sains. Ce résultat contraste avec la littérature, qui décrit généralement une augmentation des IgG et des IgA au détriment des IgM chez les patients IgAN, possiblement liée à des événements de commutation de classe plus fréquents, souvent associés à des facteurs infectieux.

Aucune différence significative n'a été relevée concernant la taille des régions *CDR3* ou le taux d'hypermutation somatique entre les deux groupes. Ces observations divergent des descriptions précédentes dans la littérature, qui rapportent généralement des régions *CDR3* plus courtes et un taux d'hypermutation somatique plus faible, en particulier pour les IgA, suggérant un défaut de maturation d'affinité dans l'IgAN.

Ces discordances doivent avant tout être interprétées en tenant compte de la principale limitation de notre étude, qui est le nombre restreint d'échantillons analysés. L'augmentation de la taille de la cohorte, actuellement prévue par la mise en place d'un protocole de collecte systématique en collaboration avec le service de néphrologie, permettra de confirmer ces résultats. Contrairement à l'étude pilote ERINA précédemment réalisée au laboratoire et qui portait elle aussi sur la caractérisation des répertoires des IgA circulantes, la sélection de patients en phase aiguë au moment du diagnostic constitue ici un avantage, car elle devrait offrir une vision plus homogène des répertoires d'Ig à un stade critique de la maladie.

Par ailleurs, les divergences observées par rapport aux études antérieures des répertoires d'Ig chez les patients atteints d'IgAN pourraient également refléter des différences ethniques dans la présentation et la sévérité de la maladie. En effet, la plupart des études antérieures ont porté sur des populations asiatiques, tandis que notre cohorte est principalement composée de patients caucasiens. Des facteurs environnementaux, tels que l'alimentation, et des déclencheurs infectieux, en plus des facteurs génétiques, pourraient contribuer à ces différences et devraient donc dans l'idéal, être également pris en compte lors de la caractérisation des répertoires d'Ig.

Finalement, nos résultats sur cette partie, bien que prometteurs, demeurent préliminaires et nécessitent une validation sur une cohorte de patients plus large. De plus, une comparaison avec la technologie Illumina® sera essentielle pour valider la fiabilité et la reproductibilité des répertoires générés par Oxford Nanopore®. Néanmoins, l'un des avantages notables de cette technologie réside dans sa capacité unique à analyser les domaines constants des Ig en plus des régions variables. Bien qu'aucune mutation spécifique n'ait été identifiée à ce stade dans les répertoires des patients atteints d'IgAN, l'exploration approfondie de ces domaines constants représente un axe de recherche particulièrement intéressant pour des études ultérieures et pourrait offrir des perspectives inédites dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

Poursuivant notre analyse, nous avons cherché à établir une corrélation entre les répertoires d'Ig sériques et les dépôts retrouvés dans les tissus rénaux des patients atteints d'IgAN. À cette fin, une analyse protéomique par MS a été réalisée sur des coupes de biopsies rénales de ces patients. Parmi les protéines identifiées, nous avons détecté à la fois des chaînes lourdes et légères d'Ig, ainsi que des protéines associées, telles que la chaîne J et le pIgR. Nos résultats ont montré une tendance à une plus grande abondance des IgA1 et des IgG1 chez les patients, ce qui concorde avec la physiopathologie de l'IgAN, caractérisée par des dépôts rénaux d'IgA1 et d'IgG1.

Concernant les chaînes légères d'Ig, aucune différence notable n'a été détectée dans la répartition des isotopes κ et λ entre les deux groupes. Néanmoins, les chaînes légères ont été identifiées en plus grande quantité que les chaînes lourdes lors de notre analyse protéomique par MS, indiquant leur présence prédominante dans les dépôts rénaux. Ce constat souligne l'importance d'étendre notre étude à l'analyse des répertoires de chaînes légères chez les patients atteints d'IgAN. Bien que notre analyse sérique se soit jusqu'à présent concentrée uniquement sur les chaînes lourdes d'Ig, l'exploration des répertoires des chaînes légères, en suivant le même protocole d'analyse, pourrait apporter des informations complémentaires sur leur rôle dans la pathogénie de l'IgAN.

Un autre résultat de cette analyse MS concerne la plus faible abondance de la chaîne J et du pIgR chez les patients, suggérant une proportion potentiellement moindre d'IgAp par rapport aux contrôles. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence, en raison de plusieurs limitations de l'étude. Premièrement, la cohorte étudiée était restreinte, comprenant seulement trois patients et trois contrôles. Deuxièmement, la composition du groupe témoin n'est pas optimale, car les biopsies provenaient de patients atteints d'autres pathologies rénales, ce qui a pu influencer l'abondance des protéines et entraîner des biais dans la comparaison. De plus, l'analyse protéomique a été réalisée sur l'ensemble des protéines préservées par l'étape de décellularisation, alors que les dépôts d'IgA sont principalement

localisés au niveau des glomérules rénaux. Cette approche globale a donc pu diluer certaines informations spécifiques aux IgA1 néphrogènes.

Enfin, nous avons tenté de corrélérer les séquences peptidiques d'Ig obtenues par MS à partir des biopsies rénales avec celles présentes dans le sérum des patients et des volontaires sains. Seul un très petit nombre de correspondances a pu être établi, ce qui pourrait s'expliquer par des limitations dans la préparation des échantillons, entraînant une génération insuffisante de peptides exploitables. Une hypothèse principale serait une digestion enzymatique sous-optimale par la trypsine, probablement en raison d'un accès limité de cette enzyme aux sites de clivage des Ig, empêchant ainsi la production de peptides de taille adéquate (entre 5 et 20 acides aminés) pour l'analyse protéomique. L'utilisation d'autres enzymes de digestion est envisagée pour confirmer cette hypothèse et identifier l'enzyme la plus adaptée à la digestion des Ig. De plus, la forte glycosylation des IgA pourrait également constituer un obstacle en masquant les sites de clivage, ce qui altère la masse des peptides et complique leur détection par MS. Si le changement d'enzymes alternatives ne s'avère pas concluante, une étape préalable de déglycosylation des Ig pourrait être envisagée pour optimiser la préparation des échantillons.

Il convient ainsi de noter que cette approche protéomique est encore en phase de développement, et que des optimisations supplémentaires seront effectivement essentielles pour améliorer la précision et la fiabilité des Ig dans ce contexte. En outre, le développement de nouveaux outils bio-informatiques dédiés sera indispensable pour renforcer l'identification des Ig pathogènes et maximiser le potentiel de cette méthode d'analyse protéomique dans la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'IgAN

Conclusion

Cette étude s'est articulée autour de trois axes principaux. Tout d'abord, la comparaison des performances des technologies de séquençage Oxford Nanopore® et Illumina® a montré que la technologie Oxford Nanopore® présente un réel potentiel pour l'analyse des répertoires d'Ig. Cependant, ces résultats préliminaires nécessitent une validation sur une cohorte de patients plus large et diversifiée pour confirmer leur fiabilité. Ensuite, l'analyse des répertoires d'IgA1 chez les patients atteints de IgAN a mis en évidence des différences intéressantes par rapport aux volontaires sains, suggérant des signatures immunologiques potentielles qui devront être confirmées. Enfin, la caractérisation des Ig pathogènes directement au sein des dépôts rénaux par MS reste un défi, avec des résultats préliminaires demandant des optimisations méthodologiques.

Au-delà de ces premiers résultats, cette étude ouvre des perspectives encourageantes dans le développement d'outils innovants combinant les avancées de la biologie moléculaire et de la protéomique pour explorer les répertoires d'Ig. L'utilisation conjointe de séquençage de troisième génération et d'analyses protéomiques pourrait, à terme, enrichir notre compréhension des mécanismes physiopathologiques des gammopathies, qu'elles soient polyclonales ou monoclonales. Ces approches pourraient également contribuer à l'identification de biomarqueurs plus précis, améliorant ainsi le diagnostic et le suivi de ces pathologies.

Cependant, il reste de nombreux défis à relever, tant sur le plan technique que financier, pour rendre ces outils plus accessibles et les intégrer dans la pratique clinique courante. Néanmoins, cette étude s'inscrit dans une démarche de progrès, en posant les bases pour des recherches futures qui pourraient, à terme, apporter des éclaircissements sur le rôle des Ig dans la IgAN et d'autres pathologies associées.

Références bibliographiques

1. Carcelain et al. - 2018 - Immunologie fondamentale et immunopathologie ense.pdf.
2. Schroeder HW. Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Developmental & Comparative Immunology*. 2006 Jan;30(1–2):119–35.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983 Apr;302(5909):575–81.
4. Aranez V, Ambrus J. Immunologic Adverse Effects of Biologics for the Treatment of Atopy. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2020 Oct;59(2):220–30.
5. Lefranc MP, Lefranc G. Immunoglobulins or Antibodies: IMGT® Bridging Genes, Structures and Functions. *Biomedicines*. 2020 Aug 31;8(9):319.
6. IMMUNE DIVERSITY [Internet]. [cited 2024 Sep 24]. Available from: <http://biosiva.50webs.org/immunediversity.htm>
7. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol*. 2005;86:43–112.
8. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J*. 1984 Jun;3(6):1209–19.
9. Bräuninger A, Goossens T, Rajewsky K, Küppers R. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*. 2001 Dec;31(12):3631–7.
10. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis - ScienceDirect [Internet]. [cited 2024 Sep 24]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791595800069?via%3Dihub>
11. Sagaert X, De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol Lett*. 2003 Dec 15;90(2–3):179–86.
12. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem*. 1999 Jun 25;274(26):18470–6.
13. Early onset of somatic mutation in immunoglobulin VH genes during the primary immune response. *J Exp Med*. 1989 Jun 1;169(6):2007–19.
14. IMMUNOGLOBULINES - STRUCTURE ET FONCTION [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter4.htm>
15. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261–92.

16. Boyle EM, Walker BA, Wardell CP, Leleu X, Davies FE, Morgan GJ. B-cell malignancies: capture-sequencing strategies for identification of gene rearrangements and translocations into immunoglobulin gene loci. *BLCTT*. 2014 Oct 30;4:107–19.
17. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity*. 1998 Mar 1;8(3):363–72.
18. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*. 1990 Oct 15;271(2):285–96.
19. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*. 2006 Jan;208(2):270–82.
20. de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies (Basel)*. 2019 Dec 5;8(4):57.
21. Halpern MS, Koshland ME. Noval subunit in secretory IgA. *Nature*. 1970 Dec 26;228(5278):1276–8.
22. Bastian A, Kratzin H, Eckart K, Hilschmann N. Intra- and interchain disulfide bridges of the human J chain in secretory immunoglobulin A. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1992 Dec;373(12):1255–63.
23. Pascal V, Hiblot M, Wehbi B, Aldigier JC, Cogné M. Homéostasie de la réponse IgA et microbiote. *Med Sci (Paris)*. 2021 Jan;37(1):35–40.
24. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinguys P, Brown GD, et al. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol*. 2013 Sep;11(9):e1001658.
25. Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacharuvu KR. The N-Glycans Determine the Differential Blood Clearance and Hepatic Uptake of Human Immunoglobulin (Ig)a1 and Iga2 Isotypes. *J Exp Med*. 2000 Jun 19;191(12):2171–82.
26. Ding L, Chen X, Cheng H, Zhang T, Li Z. Advances in IgA glycosylation and its correlation with diseases. *Front Chem*. 2022 Sep 27;10:974854.
27. Wehbe B. IgA et rein: destructrice ou protectrice?: Rôles de l'immunoglobuline A (IgA) dans deux pathologies rénales.
28. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):63–72.
29. MESTECKY J, RUSSELL M, ELSON C. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut*. 1999 Jan;44(1):2–5.
30. Stokes CR, Soothill JF, Turner MW. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature*. 1975 Jun;255(5511):745–6.
31. Kaetzel CS. Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunol Lett*. 2014 Dec;162(2 Pt A):10–21.
32. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J*. 1990 Oct 15;271(2):285–96.
33. Monteiro RC. The role of IgA and IgA Fc receptors as anti-inflammatory agents. *J Clin Immunol*. 2010 May;30 Suppl 1:S61-64.

34. Autoimmunity in IgA Deficiency: Revisiting the Role of IgA as a Silent Housekeeper | Journal of Clinical Immunology [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-007-9163-2>
35. Coulon S, Dussiot M, Grapton D, Maciel TT, Wang PHM, Callens C, et al. Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat Med*. 2011 Oct 23;17(11):1456–65.
36. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)*. 1968 Sep;74(9):694–5.
37. Pillebout E, Vérine J. Glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'immunoglobulines A. *Néphrologie & Thérapeutique*. 2016 Jul 1;12(4):238–54.
38. O'Shaughnessy MM, Hogan SL, Thompson BD, Coppo R, Fogo AB, Jennette JC. Glomerular disease frequencies by race, sex and region: results from the International Kidney Biopsy Survey. *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Apr;33(4):661–9.
39. Mestecky J, Raska M, Julian BA, Gharavi AG, Renfrow MB, Moldoveanu Z, et al. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan 24;8:217–40.
40. Cherpillod A, Halabi G, Moll DS, Venetz JP. Maladie de Berger: que faut-il savoir en 2005 ? *Rev Med Suisse*. 2005 Feb 23;008:551–6.
41. Barratt J, Feehally J. IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 Jul;16(7):2088.
42. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011 Oct;22(10):1795.
43. Suzuki H, Novak J. IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN. *Semin Immunopathol*. 2021 Oct 1;43(5):669–78.
44. Andre PM, Le Pogamp P, Chevet D. Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal*. 1990;4(2):115–9.
45. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):629–39.
46. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Tanaka A, Toma K, Hotta K, et al. Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1998 Nov;9(11):2048.
47. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest*. 1999 Jul 1;104(1):73–81.
48. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1668–77.
49. Knoppova B, Reily C, Maillard N, Rizk DV, Moldoveanu Z, Mestecky J, et al. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front Immunol*. 2016 Apr 12;7:117.

50. Lechner SM, Papista C, Chemouny JM, Berthelot L, Monteiro RC. Role of IgA receptors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2016 Feb 1;29(1):5–11.
51. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, et al. Fcα receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med*. 2000 Jun 5;191(11):1999–2009.
52. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, et al. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med*. 2001 Aug 20;194(4):417–25.
53. Molyneux K, Wimbury D, Pawluczyk I, Muto M, Bhachu J, Mertens PR, et al. β1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int*. 2017 Dec;92(6):1458–68.
54. Nihei Y, Haniuda K, Higashiyama M, Asami S, Iwasaki H, Fukao Y, et al. Identification of IgA autoantibodies targeting mesangial cells redefines the pathogenesis of IgA nephropathy. *Sci Adv*. 2023 Mar 22;9(12):eadd6734.
55. Novak J, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Hall S, Novak L, et al. IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney Int*. 2005 Feb;67(2):504–13.
56. Trimarchi H, Coppo R. Podocytopathy in the mesangial proliferative immunoglobulin A nephropathy: new insights into the mechanisms of damage and progression. *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Aug 1;34(8):1280–5.
57. Kim MJ, McDaid JP, McAdoo SP, Barratt J, Molyneux K, Masuda ES, et al. Spleen tyrosine kinase is important in the production of proinflammatory cytokines and cell proliferation in human mesangial cells following stimulation with IgA1 isolated from IgA nephropathy patients. *J Immunol*. 2012 Oct 1;189(7):3751–8.
58. Wang C, Liu X, Tang Y, Peng H, Ye Z, Zhang J, et al. Medium from mesangial cells incubated with aggregated IgA1 from IgA nephropathy patients reduces podocyte adhesion through activation of the renin angiotensin system. *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13304.
59. Maillard N. La Néphropathie à IgA – Rôle du complément dans la pathogénie et impact clinique. *La Presse Médicale Formation*. 2022 Apr 1;3(2):164–70.
60. Nam KH, Joo YS, Lee C, Lee S, Kim J, Yun HR, et al. Predictive value of mesangial C3 and C4d deposition in IgA nephropathy. *Clinical Immunology*. 2020 Feb 1;211:108331.
61. Barratt J, Smith AC, Molyneux K, Feehally J. Immunopathogenesis of IgAN. *Semin Immunopathol*. 2007 Nov 1;29(4):427–43.
62. Harper SJ, Allen AC, Pringle JH, Feehally J. Increased dimeric IgA producing B cells in the bone marrow in IgA nephropathy determined by in situ hybridisation for J chain mRNA. *J Clin Pathol*. 1996 Jan;49(1):38–42.
63. Harper SJ, Pringle JH, Wicks AC, Hattersley J, Layward L, Allen A, et al. Expression of J chain mRNA in duodenal IgA plasma cells in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1994 Mar;45(3):836–44.

64. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol*. 2002 Sep;3(9):822–9.
65. Makita Y, Suzuki H, Kano T, Takahata A, Julian BA, Novak J, et al. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2020 Feb;97(2):340–9.
66. Gleeson PJ, Benech N, Chemouny J, Metallinou E, Berthelot L, da Silva J, et al. The gut microbiota posttranslationally modifies IgA1 in autoimmune glomerulonephritis. *Sci Transl Med*. 2024 Mar 27;16(740):ead6149.
67. Barratt J, Eitner F, Feehally J, Floege J. Immune complex formation in IgA nephropathy: a case of the 'right' antibodies in the 'wrong' place at the 'wrong' time? *. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009 Dec 1;24(12):3620–3.
68. Oruc Z, Oblat C, Boumediene A, Druilhe A, Pascal V, Le Rumeur E, et al. IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Sep;27(9):2748–61.
69. Wehbi B, Oblat C, Boyer F, Huard A, Druilhe A, Paraf F, et al. Mesangial Deposition Can Strongly Involve Innate-Like IgA Molecules Lacking Affinity Maturation. *J Am Soc Nephrol*. 2019 Jul;30(7):1238–49.
70. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Barker CV, Woodford SY, Lifton RP, et al. Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 May;19(5):1008.
71. Galla JH. IgA nephropathy. *Kidney International*. 1995 Feb 1;47(2):377–87.
72. Néphropathie à immunoglobulines A - Troubles génito-urinaires - Édition professionnelle du Manuel MSD [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troubles-g%C3%A9nito-urinaires/maladies-glom%C3%A9rulaires/n%C3%A9phropathie-%C3%A0-immunoglobulines-a>
73. Conley ME, Cooper MD, Michael AF. Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1980 Dec;66(6):1432–6.
74. Néphropathies glomérulaires - Article complet PDF - [Manuel de Néphrologie 9^e édition] [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://cuen.fr/manuel2/spip.php?article45>
75. Monteiro RC. Progrès récents dans la maladie de Berger (néphropathie à dépôts d'IgA). *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 2017 Jan 1;201(1):71–9.
76. Lv J, Shi S, Xu D, Zhang H, Troyanov S, Cattran DC, et al. Evaluation of the Oxford Classification of IgA nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2013 Nov;62(5):891–9.
77. berger.pdf [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://www.airg-france.fr/wp-content/uploads/2011/02/berger.pdf>
78. Patrapornpisut P, Avila-Casado C, Reich HN. IgA Nephropathy: Core Curriculum 2021. *American Journal of Kidney Diseases*. 2021 Sep 1;78(3):429–41.
79. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 1991 Dec;354(6352):389–92.

80. Calis JJA, Rosenberg BR. Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol.* 2014 Dec;35(12):581–90.
81. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood.* 2012 May 10;119(19):4467–75.
82. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus - PubMed [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26006014/>
83. Convergent antibody signatures in human dengue - PubMed [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768493/>
84. Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, Busse CE, Wardemann H, Quake SR. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol.* 2014 Feb;32(2):158–68.
85. Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J Microbiol.* 2016 Dec;56(4):394–404.
86. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
87. DNA Sequencing: Definition, Importance, Methods and More [Internet]. 2021 [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://praxilabs.com/en/blog/2021/02/08/dna-sequencing-definition-importance-methods-facts-and-more/>
88. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016 May 17;17(6):333–51.
89. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications | Nature Biotechnology [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-021-01108-x>
90. Principle of Nanopore Sequencing - CD Genomics [Internet]. [cited 2024 Sep 25]. Available from: <https://www.cd-genomics.com/principle-of-nanopore-sequencing.html>
91. Rand AC, Jain M, Eizenga JM, Musselman-Brown A, Olsen HE, Akeson M, et al. Mapping DNA Methylation with High Throughput Nanopore Sequencing. *Nat Methods.* 2017 Apr;14(4):411–3.
92. Liu Q, Fang L, Yu G, Wang D, Xiao CL, Wang K. Detection of DNA base modifications by deep recurrent neural network on Oxford Nanopore sequencing data. *Nat Commun.* 2019 Jun 4;10(1):2449.
93. Method of the Year 2022: long-read sequencing. *Nat Methods.* 2023 Jan;20(1):1–1.
94. Javaugue V, Pascal V, Bender S, Nasraddine S, Dargelos M, Alizadeh M, et al. RNA-based immunoglobulin repertoire sequencing is a new tool for the management of monoclonal gammopathy of renal (kidney) significance. *Kidney International.* 2022 Feb;101(2):331–7.
95. Bender S, Javaugue V, Saintamand A, Ayala MV, Alizadeh M, Filloux M, et al. Immunoglobulin variable domain high-throughput sequencing reveals specific novel mutational patterns in POEMS syndrome. *Blood.* 2020 May 14;135(20):1750–8.

96. Turchaninova MA, Davydov A, Britanova OV, Shugay M, Bikos V, Egorov ES, et al. High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding. *Nat Protoc.* 2016 Sep;11(9):1599–616.
97. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020 Oct;21(10):597–614.
98. Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors (Basel).* 2021 Jun 30;11(7):214.
99. MacKenzie M, Argyropoulos C. An Introduction to Nanopore Sequencing: Past, Present, and Future Considerations. *Micromachines (Basel).* 2023 Feb 16;14(2):459.
100. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Oct;45(7):661–73.
101. Ahumada-García R, González-Puelma J, Álvarez-Saravia D, Barrientos RJ, Uribe-Paredes R, López-Cortés XA, et al. Identification of Immunoglobulin Gene Usage in Immune Repertoires Sequenced by Nanopore Technology. In: Rojas I, Valenzuela O, Rojas F, Ortuño F, editors. *Bioinformatics and Biomedical Engineering.* Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 295–306.
102. Milani P, Murray DL, Barnidge DR, Kohlhagen MC, Mills JR, Merlini G, et al. The utility of MASS-FIX to detect and monitor monoclonal proteins in the clinic. *Am J Hematol.* 2017 Aug;92(8):772–9.
103. Barnidge DR, Dispenzieri A, Merlini G, Katzmann JA, Murray DL. Monitoring free light chains in serum using mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Jun 1;54(6):1073–83.
104. Dasari S, Theis JD, Vrana JA, Rech KL, Dao LN, Howard MT, et al. Amyloid Typing by Mass Spectrometry in Clinical Practice: a Comprehensive Review of 16,175 Samples. *Mayo Clin Proc.* 2020 Sep;95(9):1852–64.
105. Colombat M, Gaspard M, Camus M, Dalloux-Chioccioli J, Delas A, Poullot E, et al. Mass spectrometry-based proteomics in clinical practice amyloid typing: state-of-the-art from a French nationwide cohort. *Haematologica.* 2022 Aug 4;107(12):2983–7.
106. Principes fondamentaux de la HPLC | Thermo Fisher Scientific - FR [Internet]. [cited 2024 Sep 26]. Available from: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html>
107. La chromatographie liquide - Labster [Internet]. [cited 2024 Sep 26]. Available from: <https://theory.labster.com/fr/liquid-chromatography/>
108. Paunas FTI, Finne K, Leh S, Osman TAH, Marti HP, Berven F, et al. Characterization of glomerular extracellular matrix in IgA nephropathy by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *BMC Nephrol.* 2019 Nov 14;20:410.
109. Kaga H, Matsumura H, Saito A, Saito M, Abe F, Suzuki T, et al. Comparative proteomic analysis of glomerular proteins in IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis. *Clinical Proteomics.* 2023 May 13;20(1):21.

110. Miyakawa R, Sato A, Matsuda Y, Saito A, Abe F, Matsumura H, et al. Comparative proteomic analysis of renal proteins from IgA nephropathy model mice and control mice. *Clin Exp Nephrol*. 2020 Aug 1;24(8):666–79.
111. Khan TA, Friedensohn S, Gorter de Vries AR, Straszewski J, Ruscheweyh HJ, Reddy ST. Accurate and predictive antibody repertoire profiling by molecular amplification fingerprinting. *Sci Adv*. 2016 Mar;2(3):e1501371.
112. Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends Biotechnol*. 2017 Mar;35(3):203–14.
113. Native Barcoding Kit 24 V14 [Internet]. [cited 2024 Sep 26]. Available from: <https://store.nanoporetech.com/eu/native-barcoding-kit-24-v14.html>
114. Narciso M, Ulldemolins A, Júnior C, Otero J, Navajas D, Farré R, et al. A Fast and Efficient Decellularization Method for Tissue Slices. *BIO-PROTOCOL* [Internet]. 2022 [cited 2024 Sep 26];12(22). Available from: <https://bio-protocol.org/e4550>
115. Zhang X, Zeng J, Tong Y, Zhang L, Lu X, Zhu S, et al. CDR3 sequences in IgA nephropathy are shorter and exhibit reduced diversity. *FEBS Open Bio*. 2020 Nov 20;10(12):2702–11.
116. Bender S, Ayala MV, Bonaud A, Javaugue V, Carrion C, Oblet C, et al. Immunoglobulin light-chain toxicity in a mouse model of monoclonal immunoglobulin light-chain deposition disease. *Blood*. 2020 Oct 1;136(14):1645–56.

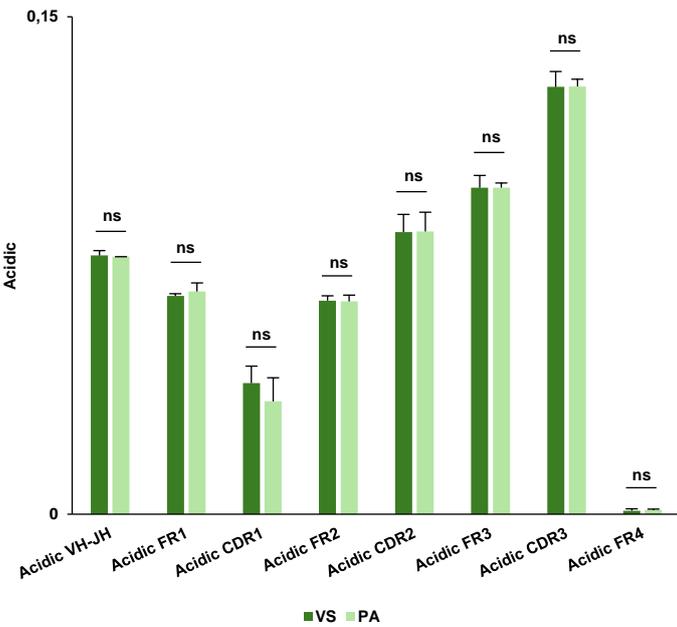
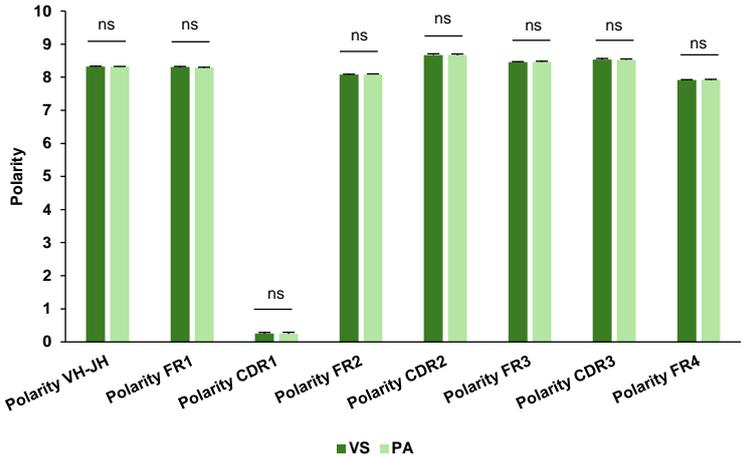
Annexes

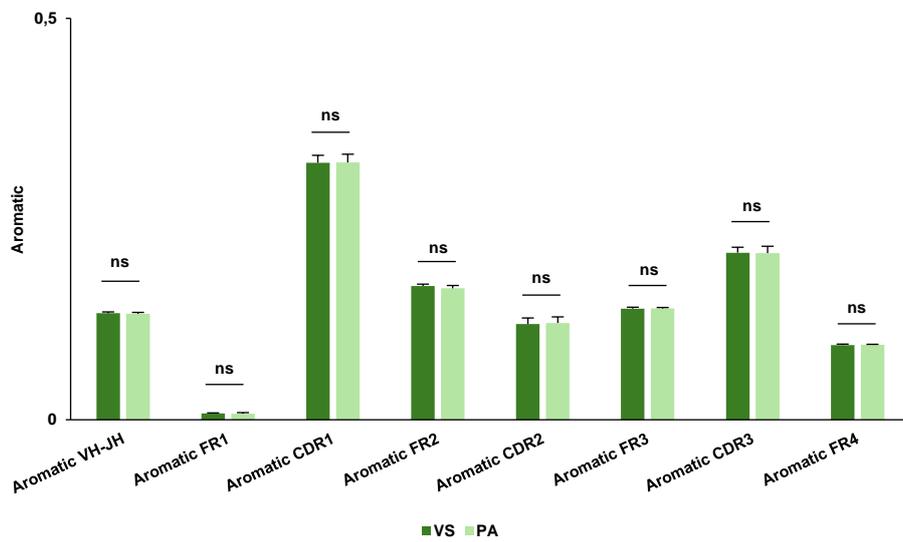
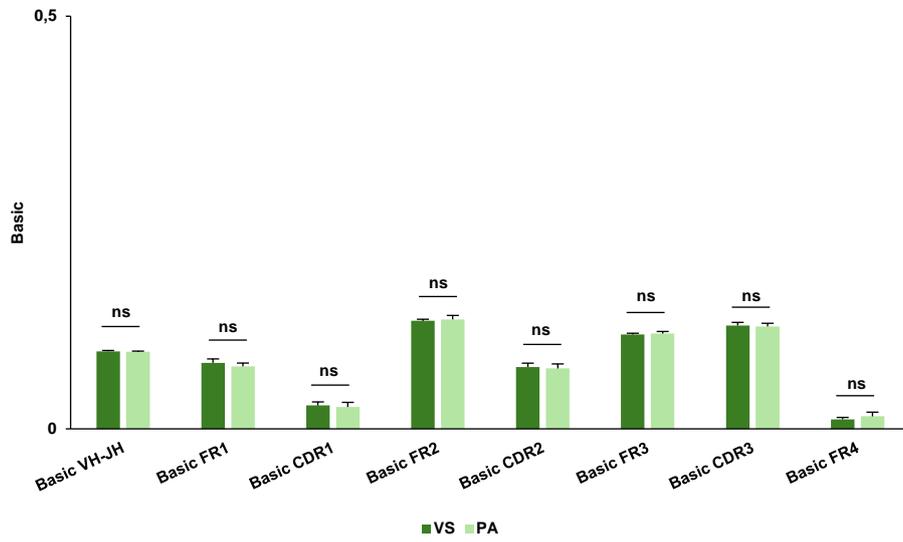
Annexe 1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients et des volontaires sains	94
Annexe 2. Comparaison des propriétés physico-chimiques (polarité, teneur en résidus acides, basiques et aromatiques) des domaines VH et des régions <i>FR</i> et <i>CDR</i>	95

Annexe 1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients et des volontaires sains

	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	PA 5	PA 6	VS 1	VS 2	VS 3	VS 4	VS 5	VS 6
Age (années)	45	25	27	32	Non défini	23	28	33	30	29	21	30
Sexe	homme	femme	homme	homme	femme	homme						
Lymphocytes (G/L) Π	1,63	1,41	1,91	1,94	2,3	3,09	1,78	2,02	1,96	1,5	2,37	1,63
IgG (g/L) [7-16]	11,61	8,18	12,3	10,7	9,09	6,41	13,1	10,4	13,2	10,8	13,3	12,3
IgA (g/L) [0,7-4]	3,03	1,17	6,02	3,46	3,86	3,33	2,33	2,2	3,47	1,85	1,47	2,96
IgM (g/L) [0,4-2,3]	1	0,82	0,7	1,1	1,12	1,2	0,87	0,74	0,95	1,02	1,69	2,07
Pression artérielle systolique	110	156	154	Non défini	115	Non défini	123	136	119	144	133	123
Pression artérielle diastolique	30	97	82	Non défini	77	Non défini	65	88	82	84	72	84
DFG (ml/min) ≥ 30 ml/min/1,73m ²	170	50	101	30	118	>120	117	113	95	136	120	144
Créatinine (μmol/L) Chez la femme : 45 - 105 μmol/L Chez l'homme : 60 - 115 μmol/L	175	126	117	296	72	67	87	80	99	93	86	75
Classification d'Oxford	Non défini	M0 S1 E0 T0	M0 S1 E0 T0	M0 S0 E0 T1 C0	M0 S0 E0 C0	Non défini						
Dialyse	NON	Non défini	Non défini	NON	NON	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Transplantation rénale	NON	NON	NON	NON	NON	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON
IgAN secondaire ou associée	NON	NON	NON	NON	NON	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Traitement par corticoïdes ou immunosuppresseurs	NON	NON	NON	NON	NON	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Antécédents et pathologies associées	NON	hypertension artérielle	Allergies multiples	hypertension artérielle	OU	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Événements indésirables	NON	NON	NON	NON	NON	Non défini	NON	NON	NON	NON	NON	NON

Annexe 2. Comparaison des propriétés physico-chimiques (polarité, teneur en résidus acides, basiques et aromatiques) des domaines VH et des régions FR et CDR





Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Décrypter les répertoires d'immunoglobulines dans la néphropathie à IgA : approches innovantes en séquençage haut débit et protéomique

L'exploration des répertoires d'Ig a été facilitée par les technologies NGS, permettant d'identifier des répertoires caractéristiques associés à des profils immunitaires spécifiques. Cette approche est particulièrement pertinente pour la néphropathie à IgA, où les variations des répertoires d'Ig influencent leur capacité à se déposer dans les tissus. Nous avons comparé les technologies de séquençage Illumina® et Oxford Nanopore®. Bien que nos résultats soient préliminaires, la technologie Oxford Nanopore® a permis d'obtenir des répertoires d'une qualité comparable à ceux obtenus par Illumina®, tout en offrant l'avantage de séquencer les chaînes d'Ig dans leur intégralité, incluant les domaines variables et constants. L'étude des répertoires d'IgA1 chez les patients atteints d'IgAN a révélé une utilisation accrue de la famille de gènes VH3 et une diminution de VH1 par rapport aux volontaires sains, ainsi qu'un enrichissement de l'allèle VH4-39 dans environ 40 % des clonotypes partagés. Nous avons également observé une hydrophobicité, un indice aliphatique plus élevés ainsi qu'une charge moyenne plus faible dans la région *FR1* des IgA1, des caractéristiques nécessitant des investigations complémentaires. L'analyse des IgA des dépôts tissulaires par spectrométrie de masse a montré des correspondances limitées avec les séquences sériques, probablement dues aux défis techniques liés à la préparation des échantillons et à la petite taille de l'échantillon. En conclusion, cette étude démontre le potentiel de la technologie Oxford Nanopore® pour l'analyse des répertoires d'Ig dans la néphropathie à IgA et ouvre la voie à l'utilisation d'outils innovants et complémentaires pour explorer d'autres pathologies impliquant des Ig pathogènes, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de leur physiopathologie.

Mots-clés : RACE-RepSeq, Illumina®, Oxford Nanopore Technologie®, Néphropathie à IgA, Spectrométrie de masse

Deciphering immunoglobulin repertoires in IgA nephropathy : innovative approaches in high-throughput sequencing and proteomics

The exploration of immunoglobulin (Ig) repertoires has been facilitated by NGS technologies, enabling the identification of characteristic repertoires linked to specific immune profiles. This approach is particularly relevant for IgA nephropathy (IgAN), where variations in Ig repertoires influence tissue deposition. We compared Illumina® and Oxford Nanopore® sequencing technologies. While preliminary, our results showed that Oxford Nanopore® produced Ig repertoires comparable to Illumina®, with the added advantage of sequencing complete Ig chains, including both variable and constant domains. The study of IgA1 repertoires in IgAN patients revealed increased usage of the VH3 gene family and decreased VH1, with approximately 40% of shared clonotypes containing the VH4-39 allele. We also noted higher hydrophobicity, aliphatic index, and lower average charge in the *FR1* region of IgA1, requiring further investigation. Mass spectrometry analysis of IgA in tissue deposits showed limited correlation with serum sequences, likely due to technical challenges and limited sample size. In conclusion, this study highlights the potential of Oxford Nanopore® technology for Ig repertoire analysis in IgAN and paves the way for innovative tools to explore other diseases involving pathogenic Ig, enhancing our understanding of their pathophysiology.

Keywords : RACE-RepSeq, Illumina®, Oxford Nanopore Technology®, IgA Nephropathy, Mass Spectrometry

