

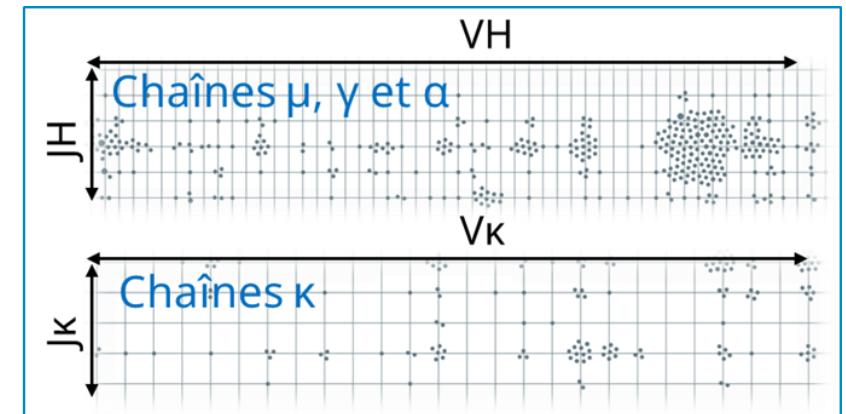
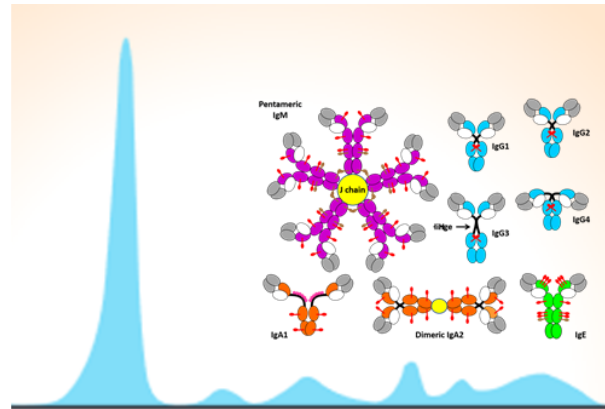
# Le NGS pour le séquençage des immunoglobulines : diagnostic et suivi des amyloses AL

V. PASCAL



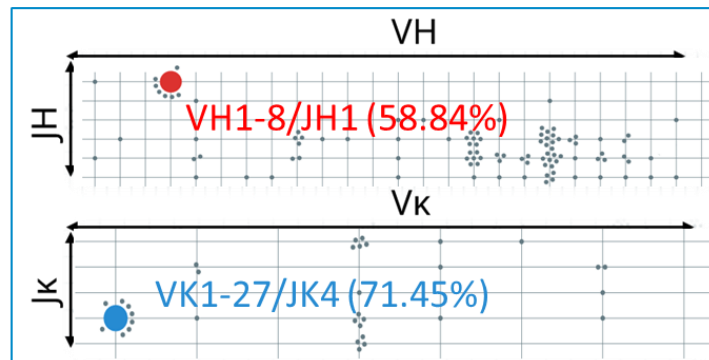
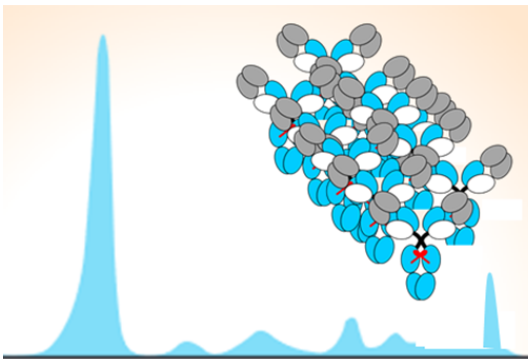
# Répertoires d'immunoglobulines par NGS

**Région  $\gamma$ -globulin / statut immunologique** (inflammation, infections, maladie auto-immune, composant monoclonal)



Replg - Seq (~ EPS "moléculaire")

Profil  
Ig-MO



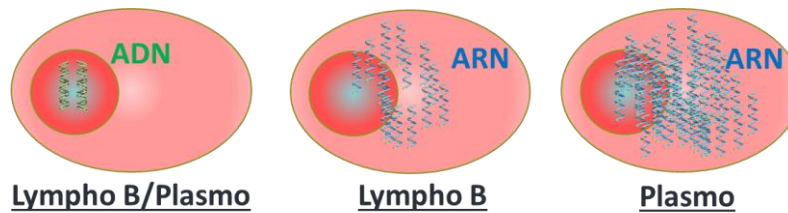
```
GGGGGACTTTCTGAGAGTCTGGACCTCCTGTGCAA
GAACATGAAACATCTGTGGTCTTCTCCTCCTGGTG
GCAGCTCCAGATGGGTCTGTCCAGGTGCAGCTG
CAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAT
ACCCTGTCCCTCAGTGCAGCTGTCTGGTGGCTCCA
TCAGTAGTGGTACTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA
GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGCGTA
TCTATACCAAGTGGGAGTACCAACTACAACCCCTCCT
CAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTTGACCCGTTCAAG
AACAAAGTCTCCTGAAACTGAGGTCCGTGACCCGCG
CAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGTT
GTAGTGGTGGTAGCTGCCACCACTCCATTATTACGG
TATGGACGTCTGGGCAAGGGACACGGTACAGT
CTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCC
CTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACA
GCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTC
```

```
GGGGGGGGCCTCAGGAAGCAGCATCGGAG
GTGCTCAGCCATGGCATGGATCCCTCTT
CCTGGCGTCTTGTACTGACAGGATCC
GTGGCCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCC
TCAGTGTCCGTGTCAGGACAGACAGCC
ACCATCACCTGTCTGGAGATAAATTGGGG
AATAAATACTTCTGGTATCAGCAGAAGC
CAGGCCAGTCCCCTGTACTGGTATCTATCA
AGATAACAAGCAGCCCTCAGGGATCCCTGA
GCGATTCTTGGTCCAACTCTGGGAACAC
AGCCACTCTGACCATCAGCGGACCCAGTC
TATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGAGGC
GTGGACACCAGCTGTGGTATTCGGCGG
AGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTGACCC
CAAGGCTCCCTCCTGCTGCTACTGTTCGGC
CCCTCTGAGGAGTCCAAGCCAAC
```

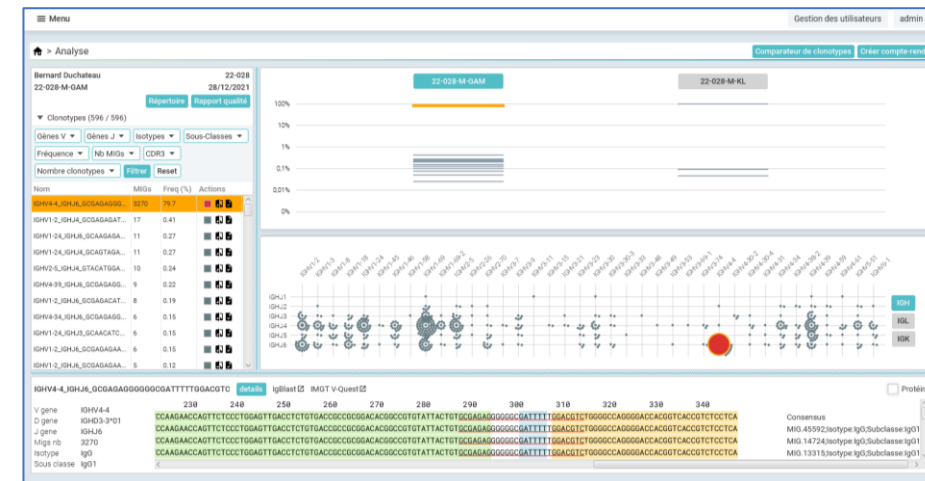
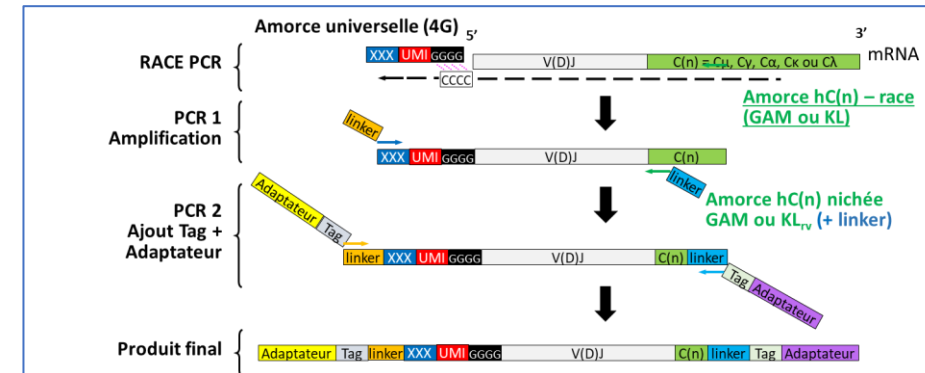


# RACE RepSeq au labo d'immunologie (CHU Limoges)

- Développée / **CRIBL** en collaboration avec le **CNR amylose AL**
- Recherche **composante monoclonale** (MO, sang, tissus)
- Sur matrice **ARN** : ↗ **sensibilité**



- En routine depuis juin 2021 (~ 30 prélèvements / mois)
- **Indications:**
  - **Outil diagnostique** -> MGRS/MGCS :
    - Clone de **faible abondance**
    - Cas incertains/compliqués (Sd POEMS, chaîne lourde tronquée...)
  - **Suivi et MRD** -> MGRS/MGCS : en cours d'évaluation...



# Outil diagnostic -> MGRS / « petits » clones

-> 13 patients:

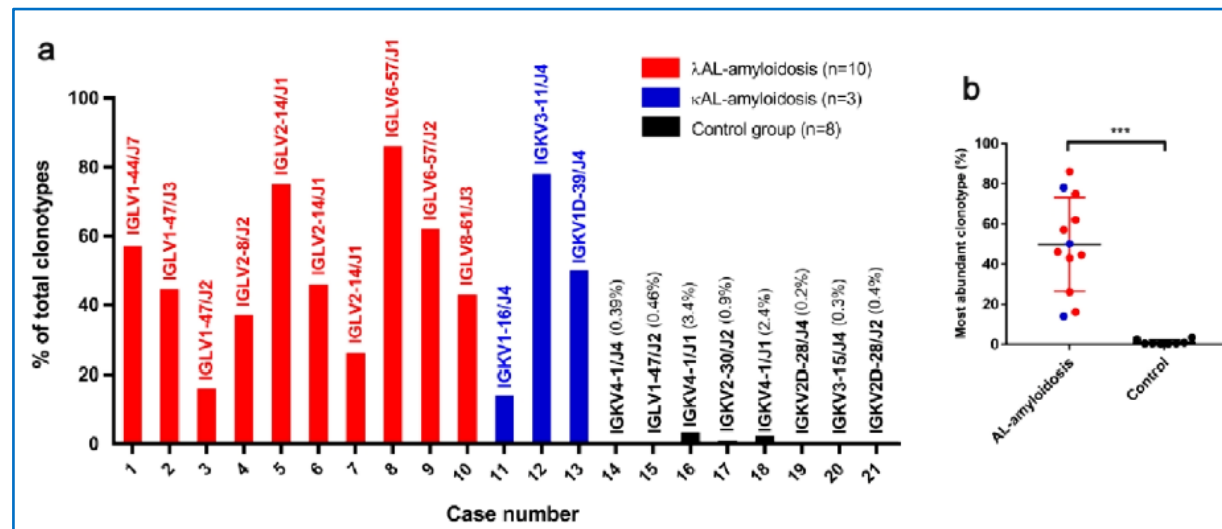
PBR -> amylose AL + dFLC <50 mg/L

www.kidney-international.org

technical notes

## RNA-based immunoglobulin repertoire sequencing is a new tool for the management of monoclonal gammopathy of renal (kidney) significance

Vincent Javaugue<sup>1,2,9,10</sup>, Virginie Pascal<sup>2,3,9,10</sup>, Sébastien Bender<sup>2,9</sup>, Sarah Nasraddine<sup>3</sup>, Mathilde Dargelos<sup>1,9</sup>, Mehdi Alizadeh<sup>4</sup>, Alexis Saintamand<sup>5</sup>, Matthieu Filloux<sup>3</sup>, Paco Derouault<sup>6</sup>, Sabrina Bouyer<sup>7</sup>, Estelle Desport<sup>1,9</sup>, Arnaud Jaccard<sup>2,8,9</sup>, Frank Bridoux<sup>1,2,9</sup>, Michel Cogné<sup>2,5,9</sup> and Christophe Sirac<sup>2,9</sup>



	Case 1	Case 2
Sex	Male	Male
Age (years)	71	63
Serum immunofixation	Negative	<del>IgGκ</del>
Urine immunofixation	Negative	λ
Kappa (mg/L)*	8	16
Lambda (mg/L)*	24	42
dFLC	16	26
Lambda/Kappa ratio*	3	2.62
Peripheral blood flow cytometry	No clone	ND
Bone marrow findings		
Plasma cell (%)	1	3
IHC	No clone	ND
Flow cytometry	No clone	No λ clone κ-PC clone (1% of cells)
RACE RepSeq analysis		
Number of λ sequences	142205	176577
Clone	IGLV1-44	IGLV1-47
Clonal sequences (%)	80	65



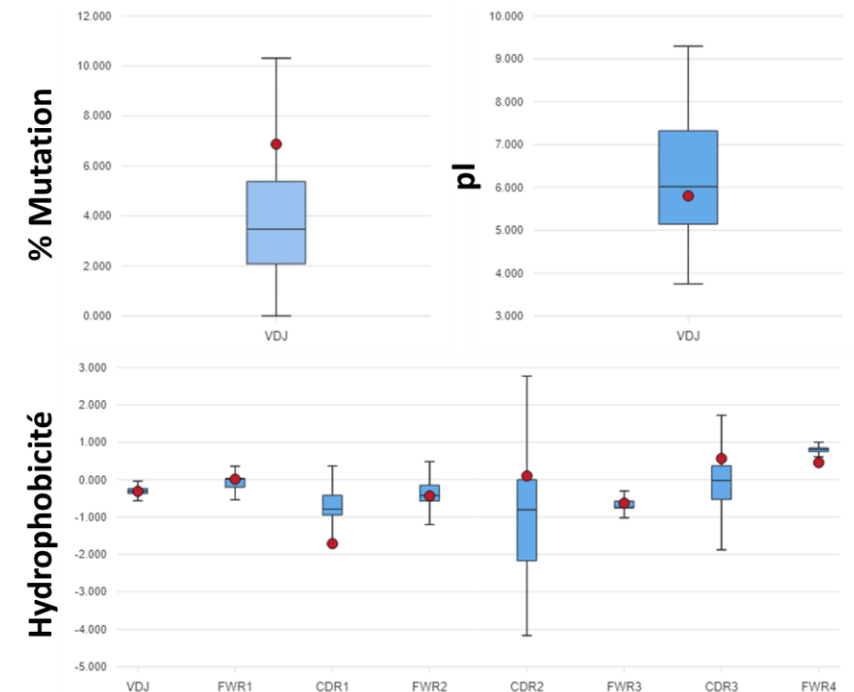
# RACE-RepSeq : Base de données d'IgMo

- 602 IgMo – chaînes légères séquencées (338 chaînes Lourdes)
  - 258 AL -> 145 IgMo confirmé (Anapath)
  - 87 POEMS -> 36 (Clinique)
  - 24 PGNMID -> 19 (Anapath)
  - 155 MM-MGUS-MW
  - 27 Cryo
  - 22 LCPT
  - 18 LCDD

-> Confirmation Clinique / Anapath en cours...

-> Base de reference = 21111 HC + 54740 LC

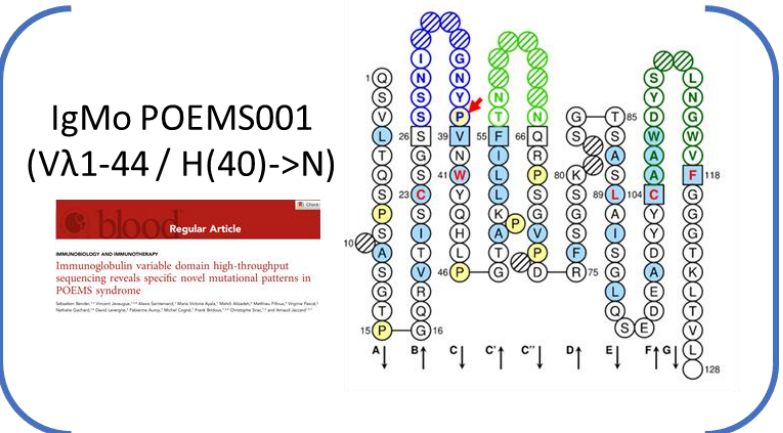
-> IgMo AAL183 (IGLV6-57)



# Décryptage moléculaire et prédiction?

## IgMo-LC dans l'amylose AL :

- Prédominance Vλ6-57, Vλ2-14, Vλ1-44, Vκ1-33....
- Prédominance certains Vλ ↔ atteinte d'organe particulière
- Outils prédicteurs accessibles / web:



Mutations somatiques, Hydrophobicité, Modifications post-traductionnelles, Score d'aggrégation  
-> « Machine learning » pour prédire la toxicité individuelle des IgMo-LC

**83% prediction** **LICTOR**

ARTICLE  
Machine learning analyses of antibody somatic mutations predict immunoglobulin light chain toxicity

Maura Garofalo<sup>1</sup>, Luca Piccoli<sup>1</sup>, Margherita Romeo<sup>2</sup>, Maria Monica Barzago<sup>2</sup>, Sara Ravasio<sup>3,3</sup>, Mathilde Foglierini<sup>1,4</sup>, Milos Matkovic<sup>1</sup>, Jacopo Sgrignani<sup>1</sup>, Raoul De Gasparo<sup>1</sup>, Marco Prunotto<sup>5</sup>, Luca Varani<sup>1</sup>, Luisa Diomedea<sup>2</sup>, Olivier Michielin<sup>6,7</sup>, Antonio Lanzavecchia<sup>8</sup>, & Andrea Cavalli<sup>1,4,8,9</sup>

Leukemia

**NetNGlyc** **42% AL vs 12% MM**

ARTICLE  
An N-glycosylation hotspot in immunoglobulin κ light chains is associated with AL amyloidosis

Alice Nevone<sup>1,2</sup>, Maria Grelli<sup>1,2</sup>, Silvia Mangiacavalli<sup>3</sup>, Bruno Paiva<sup>4</sup>, Paolo Milani<sup>5</sup>, Pasquale Cascino<sup>1,3</sup>, Maggie Piscitelli<sup>1,2</sup>, Valentina Speranzini<sup>6</sup>, Claudio Salvatore Carità<sup>7</sup>, Pietro Benvenuto<sup>8,9</sup>, Bai Goicoechea<sup>1</sup>, Francesca Fazio<sup>1</sup>, Marco Bassetto<sup>1,2</sup>, Andrea Falò<sup>10</sup>, Martina Nenci<sup>11</sup>, Giulia Mazzini<sup>12</sup>, Serena Cammino<sup>13</sup>, Melania Antonietta Seta<sup>14</sup>, Simona Casarini<sup>15</sup>, Paola Roggioni<sup>16</sup>, Francesca Lavatelli<sup>17</sup>, Maria Teresa Petrucci<sup>18</sup>, Pier Paolo Olimpieri<sup>19</sup>, Stefano Ricagno<sup>20</sup>, Luca Arcani<sup>21</sup>, Giampaolo Merlini<sup>1,2</sup>, Giovanni Palladini<sup>1,2</sup> and Mario Nuvolone<sup>1,2,22</sup>

**scientific reports**

**VLamyPred**

OPEN Exploring the sequence features determining amyloidosis in human antibody light chains

Puneet Rawat<sup>1</sup>, R. Prabakaran<sup>1</sup>, Sandeep Kumar<sup>2</sup> & M. Michael Gromiha<sup>1,3,23</sup>

**79% prediction**

**Limoges-Poitiers database**

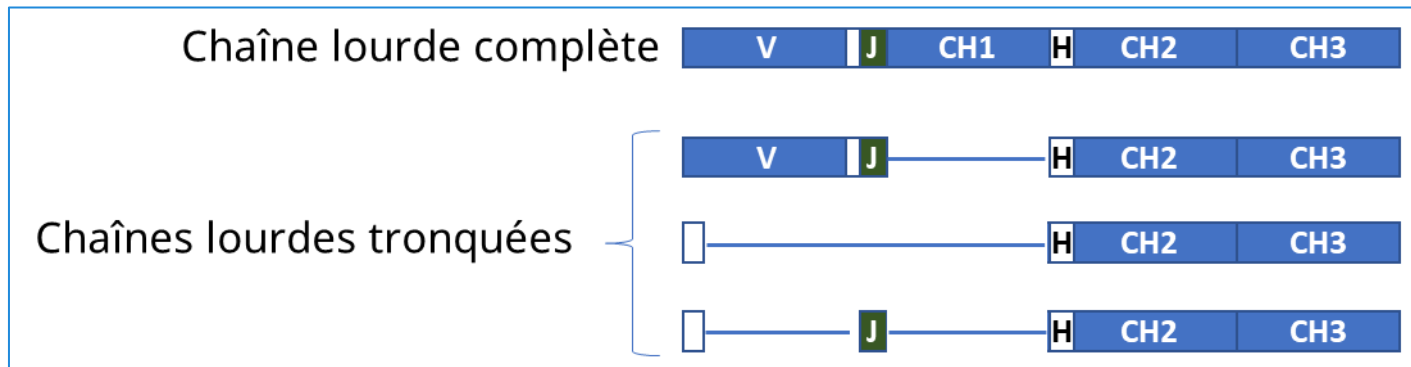
**100 seq AL**

- VLamyPred = 66%
- (Lictor = 33%)
- NetNGly = 19% / kappa

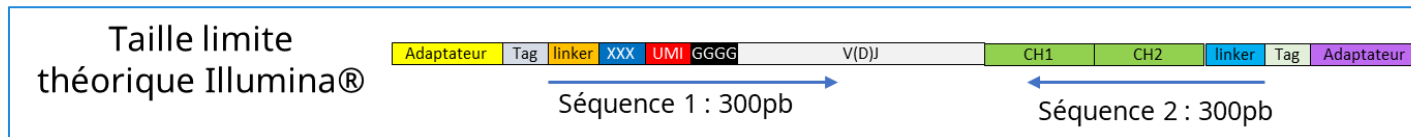
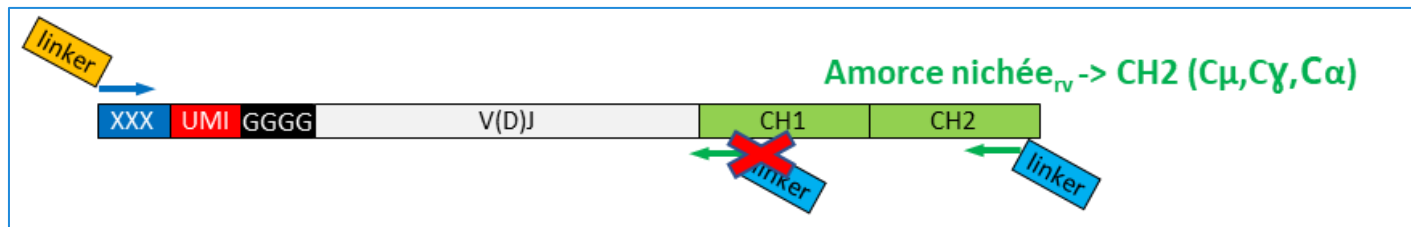
1	meas_ano	tech	isotype LC	% LC	V-GENE and allele	VLamy-Pred	Lictor
2	AA101	lambda	NIS	4,4	Hommap IGLV6-57*05 F	Amyloid	toxic
3	AA105	kappa	NIS	53,09	CV1-53*01 F, or Hommap IGRV	Amyloid	x
4	AA102	lambda	NIS	75,84	Hommap IGLV6-97*03 F	Amyloid	toxic
5	AA133	lambda	NIS	65,01	Hommap IGLV2-54*01 F	Non amyloid	non toxic
6	AA136	κ isotype incert	NIS	57,07	CV1-39*01 F, or Hommap IGRV	Non amyloid	x
7	AA187	kappa isotype incert	NIS	88,01	CV1-33*01 F, or Hommap IGRV	Amyloid	x
8	AA142	carpien, dans 1	NIS	86,27	CV1-33*01 F, or Hommap IGRV	Amyloid	x
9	AA106	lambda	NIS	28,14	Hommap IGLV1-44*01 F	Amyloid	toxic
10	AA101	lambda	NIS	4,4	Hommap IGLV6-57*05 F	Non amyloid	non toxic
11	AA101	lambda	NIS	4,4	Hommap IGLV6-57*05 F	Non amyloid	non toxic
12	AA101	lambda	NIS	4,37	seq IGLV1-51*01 F (see com)	Amyloid	non toxic
13	AA101	lambda	NIS	92,76	CV12-24*02 F, or Hommap IGL1	Non amyloid	toxic
14	AA158	lambda	anti-ol	28,12	Hommap IGLV1-55*01 F	Amyloid	x
15	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGRV6-21*02 F	Non amyloid	x
16	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
17	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV1-44*01 F	Non amyloid	non toxic
18	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
19	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
20	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
21	AA101	lambda	NIS	64,71	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
22	AA101	lambda	NIS	92,76	CV12-24*02 F, or Hommap IGL1	Non amyloid	toxic
23	AA175	lambda	NIS	78	Hommap IGLV1-44*01 F	Amyloid	non toxic
24	AA177	ε iscale / pas 1	NIS	96,6	Hommap IGRV1-5*03 F	Non amyloid	toxic
25	AA101	lambda	NIS	47,6	Hommap IGLV9-17*01 F	Amyloid	toxic
26	AA101	kappa	NIS	76,6	Hommap IGRV1-16*02 F	Non amyloid	x
27	AA101	lambda	NIS	65,2	GLV9-1*01 F, or Hommap IGL1	Amyloid	non toxic
28	AA101	amylose	NIS	82,09	Hommap IGLV2-23*02 F	Non amyloid	toxic
29	AA104	AL Lambda	NIS	94,54	seq IGLV2-54*01 F (see com)	Non amyloid	toxic



# Outil diagnostique -> chaîne lourde tronquée (amylose AH)

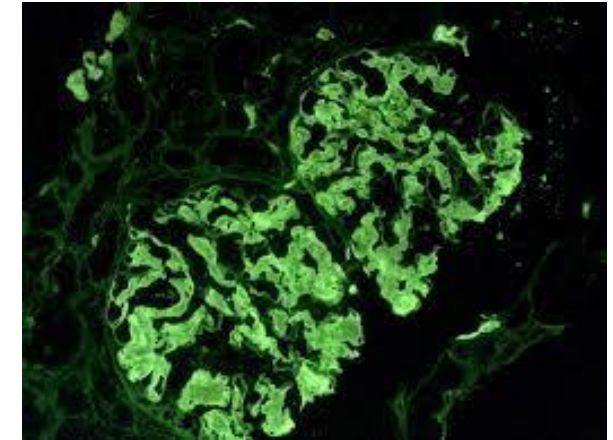


Séquençage des chaînes d'Ig complètes (domaine variable + constant)

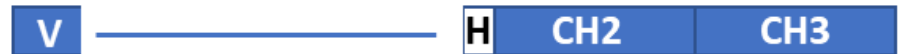
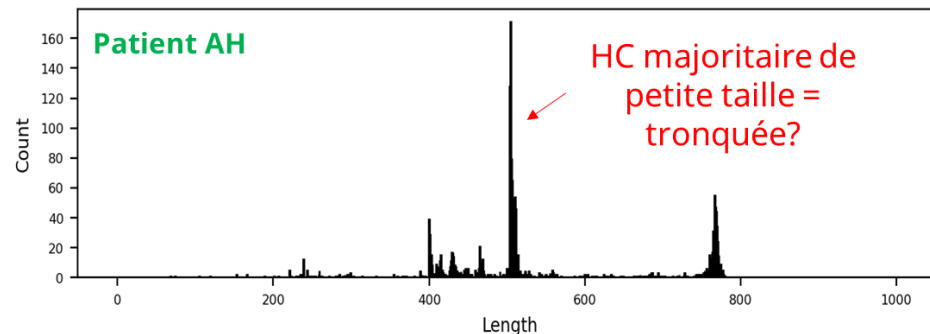
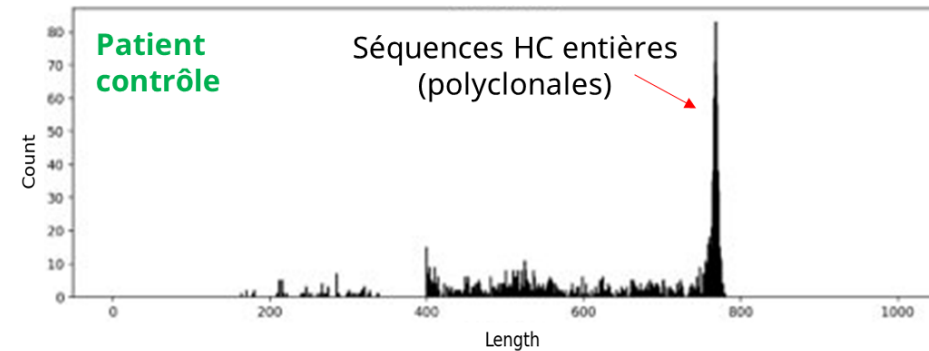


# Outil diagnostique -> chaîne lourde tronquée

Patient	EPS	IF	PBR
<b>Amylose AH <math>\gamma_1</math></b>	Pic = 4,5 g/L	IgA-kappa	Dépôts glomérulaires amyloïdes IF = <b>Chaînes lourdes <math>\gamma_1</math></b> ( $\emptyset$ $\kappa$ ou $\lambda$ )



Répartition  
des séquences  
d'Ig en  
fonction de  
leur taille



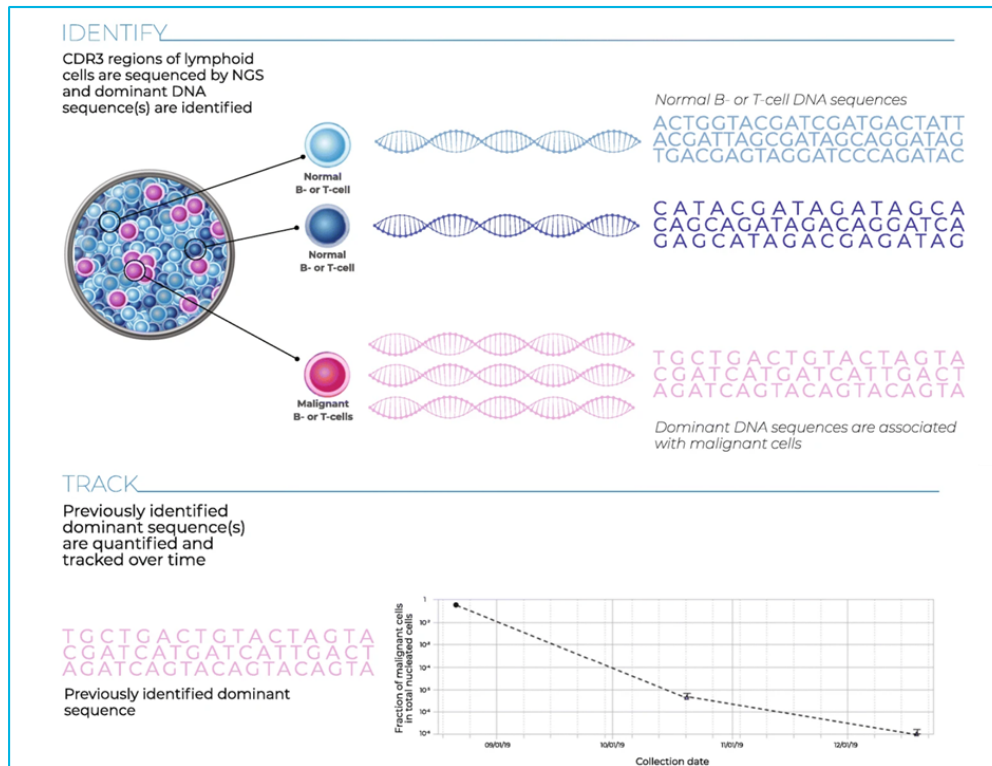
**Chaîne tronquée  $\gamma_1$  = 49% du  
répertoire GAM (MO)**



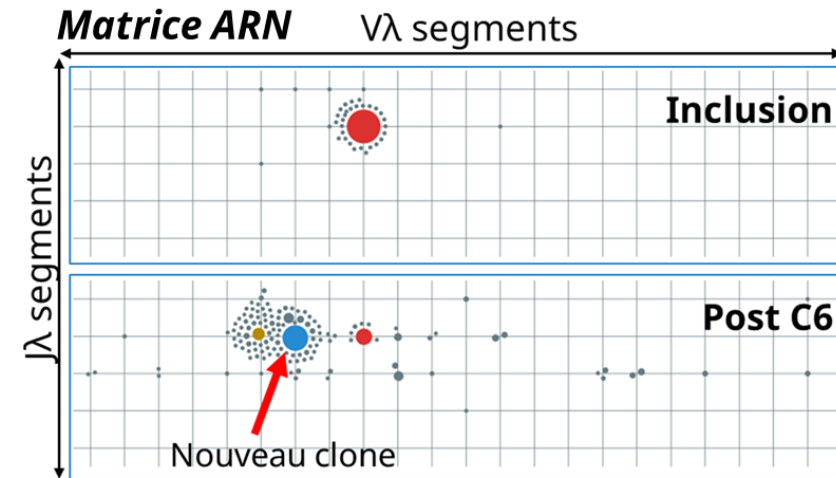
# Outil suivi + MRD (évaluation en cours -> IsAMYP)

- **Technique de référence (MM...): clonoSEQ<sup>®</sup>**  
By Adaptive

## Matrice ADN



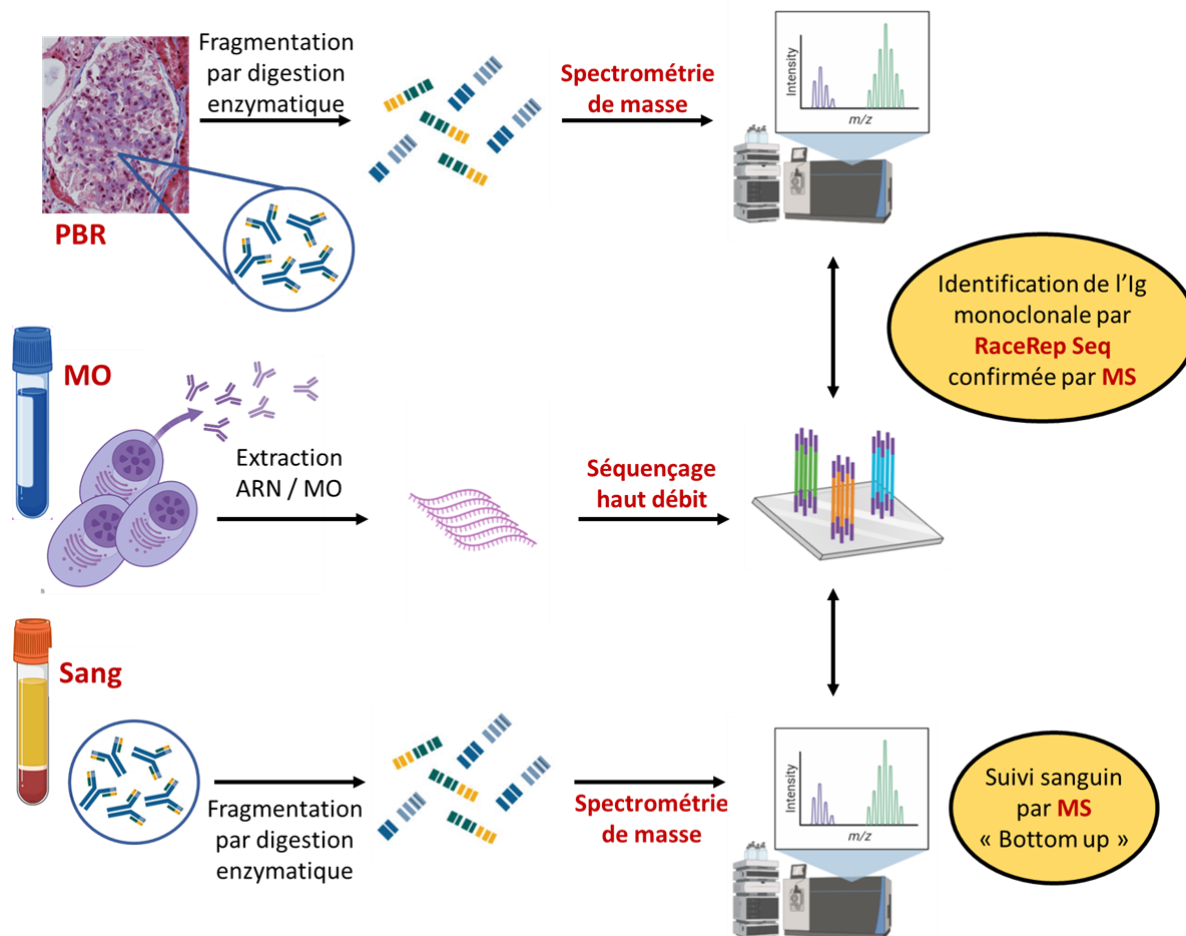
- **RACE RepSeq (AMYDARA):**



## Patient 167-34

- Réponse hématologique (CLL) = PR
- MRD (clonoSeq) < 7 (/10<sup>6</sup> cellules saines)
- Discordance CLL / MRD (ADN) -> **émergence d'un nouveau clone lambda** (Race RepSeq)

# Couplage spectrométrie de masse et RACE-RepSeq



## MS « Bottom up » :

- Isolement des Ig + digestion tryptique
- **Peptides candidats clonotypiques déduits** de la séquence ADN/ARN du clone cellulaire médullaire
- **Ss ~ MRD médullaire**
- **-> En cours:**
  - ❖ LMD-MS (Poitiers) <-> RACE-RepSeq (Limoges)
  - ❖ RACE-RepSeq (Limoges) <-> Entreprise SEBIA





Merci



Centre national de référence  
**Amylose AL**  
& autres maladies par dépôt d'immunoglobulines monoclonales



Alexia Rinsant, Sihem  
Kaaki, Cécile Ory, Estelle  
Desport, JM Goujon, Pr  
Guy Touchard



Sébastien Bender



Christophe Sirac



Vincent Javaugue



Séléna Teillaud

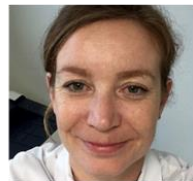
Labo immunogénétique CHU Limoges



Frank Bridoux



Arnaud Jaccard



Murielle Roussel



Paco Derouault

