

ÉTUDE DE CAS · IMMUNO-ONCOLOGIE

Identifier, et confirmer, les marqueurs de réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Comment Biomarker Xplorer associe séquençage du génome entier, de l'exome entier et RNA-seq bulk pour la découverte, et quantification ciblée pour la confirmation, dans une étude d'immuno-oncologie illustrative.

Étude de cas illustrative. Ce scénario montre comment Biomarker Xplorer s'applique à une question d'immuno-oncologie. Il ne décrit pas un projet client réel : tailles de cohorte, résultats et délais sont indicatifs et dépendent de l'indication, de la qualité des échantillons et des objectifs de l'étude. Les marqueurs cités sont issus de la littérature publiée en immuno-oncologie ; leur combinaison est ici hypothétique et ne constitue pas un test clinique validé.

1 Concevoir

Groupes, critères et seuils de succès fixés avant toute analyse

2 Découvrir

WGS, WES et RNA-seq bulk sur une cohorte de découverte équilibrée

3 Réduire

Des modèles d'IA ramènent des milliers de variables à quelques candidats

4 Confirmer

Quantification ciblée sur l'ensemble des échantillons, modèle verrouillé

En bref

QUESTION

Qu'est-ce qui distingue les patients tirant un bénéfice durable d'un traitement anti-PD-1 de ceux qui n'en tirent pas ?

CONTEXTE

Biotech en phase clinique · essai de phase II · association à base d'anti-PD-1 · CBNPC avancé

GROUPES

Bénéfice clinique durable (DCB) vs absence de bénéfice durable (NDB)

ÉCHANTILLONS

180 patients : biopsie tumorale pré-traitement et prélèvement sanguin à l'inclusion

DÉCOUVERTE

60 patients (30 DCB / 30 NDB) : WGS, WES, RNA-seq bulk

RÉDUCTION

≈21 400 variables → 11 candidats testables (modèles d'IA, validation croisée imbriquée)

CONFIRMATION

Panel ARN ciblé (RT-qPCR), dPCR et panel ADN par amplicons sur 174 échantillons FFPE évaluables

RÉSULTAT

7 marqueurs confirmés réunis dans un score verrouillé ; AUC de 0,78 sur patients indépendants vs 0,62 pour l'IHC PD-L1 seule

DURÉE

≈ 6 mois

Le défi

L'immunohistochimie PD-L1 et la charge mutationnelle tumorale (TMB) sont les prédicteurs les plus utilisés du bénéfice des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire, mais aucun ne sépare nettement répondeurs et non-répondeurs. Une biotech en phase clinique, conduisant un essai de phase II d'une association à base d'anti-PD-1 dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avancé, souhaitait identifier les caractéristiques tumorales qui distinguent les patients tirant un bénéfice durable, afin de construire une hypothèse d'enrichissement pour son prochain essai.

Le matériel était de qualité : une biopsie tumorale pré-traitement et un prélèvement sanguin à l'inclusion pour 180 patients. Les risques, eux, étaient classiques :

- **Trop de candidats, trop peu de patients.** Les données pangénomiques produisent des dizaines de milliers de variables pour quelques dizaines de patients par groupe, conditions idéales pour les fausses découvertes.
- **Des marqueurs qui ne se transposent pas.** Les signaux trouvés en séquençant des biopsies congelées se transposent souvent mal aux blocs FFPE et aux tests ciblés sur lesquels reposerait un essai ultérieur.

La demande : identifier les marqueurs qui séparent les deux groupes, et prouver leur robustesse avant de bâtir dessus.

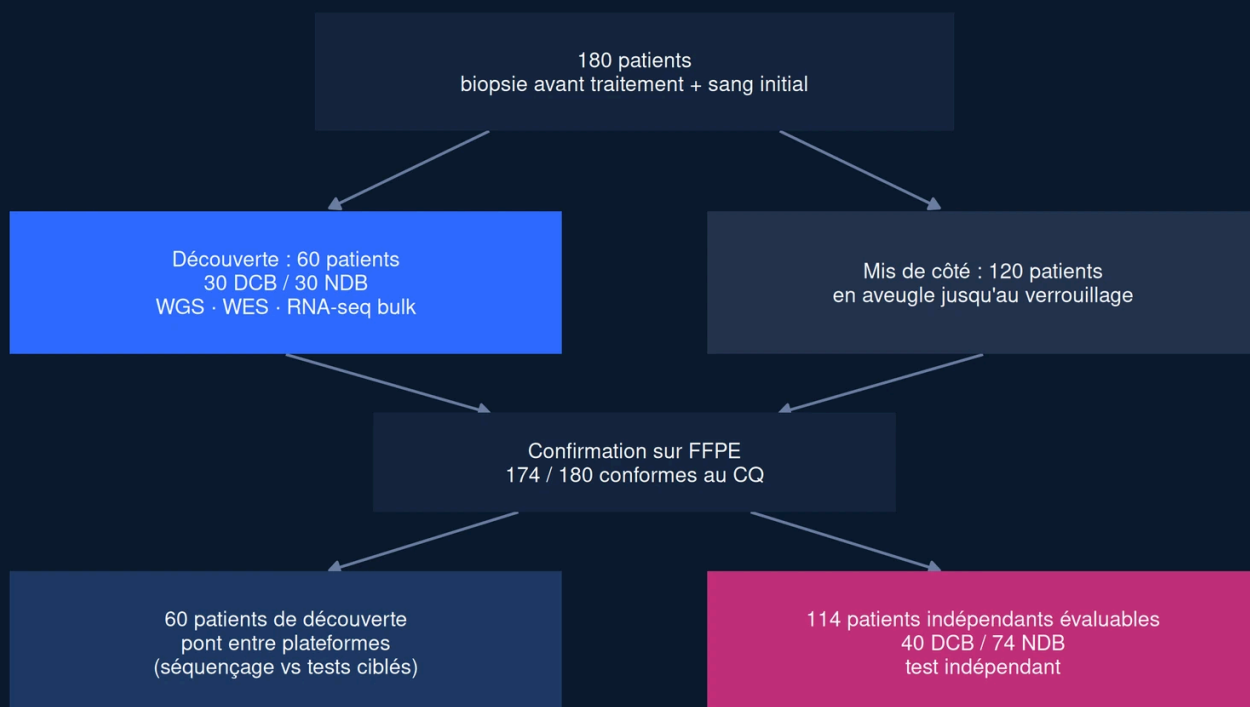
01 Concevoir l'étude avant d'analyser un seul échantillon

La plupart des études de biomarqueurs se jouent dès la conception. Avant tout traitement d'échantillon, nous avons fixé avec le promoteur :

- **Deux groupes définis a priori.** Bénéfice clinique durable (DCB : réponse complète ou partielle, ou maladie stable ≥ 6 mois, RECIST 1.1) versus absence de bénéfice durable (NDB : progression, ou maladie stable < 6 mois), la définition utilisée dans les études de référence sur les inhibiteurs de points de contrôle dans le CBNPC¹.
- **Une répartition découverte / confirmation fixée à l'avance.** 60 patients disposant d'une biopsie congelée de qualité suffisante ont constitué la cohorte de découverte (30 DCB / 30 NDB), équilibrée selon l'histologie, le score de proportion tumorale PD-L1 (TPS), le tabagisme et la ligne de traitement. Les 120 autres patients ont été mis de côté.
- **Aveugle et randomisation des lots.** Les équipes de laboratoire et d'analyse ignoraient la réponse des patients, et les échantillons ont été répartis aléatoirement entre lots d'extraction et de séquençage, afin qu'aucun effet de lot ne puisse se faire passer pour de la biologie.
- **Un critère de succès pré-spécifié.** Chez les patients mis de côté, le modèle final devait atteindre une AUC dont la borne inférieure de l'IC à 95 % dépasse 0,65, et apporter une information significative au-delà du TPS PD-L1, conformément aux principes PROBE d'évaluation des biomarqueurs².
- **Des seuils de contrôle qualité.** Revue anatomopathologique de la cellularité tumorale et seuils d'intégrité ADN/ARN (DIN, RIN, DV200) définis pour chaque test.

Plan d'étude : un seul jeu d'échantillons, deux rôles

Répartition fixée avant le premier échantillon



Plan illustratif. 6 échantillons mis de côté avaient un contenu tumoral insuffisant.

Figure 1. Plan d'étude. Les 180 patients ont été répartis avant le premier échantillon. Les 60 disposant d'un tissu congelé de bonne qualité forment la cohorte de découverte (30 avec bénéfice durable, DCB ; 30 sans, NDB) ; les 120 autres sont mis de côté en aveugle. Tous les blocs FFPE passent ensuite en confirmation ciblée, et 174 sont conformes au CQ. Les 60 patients de découverte servent de pont entre séquençage et tests ciblés ; les 114 patients indépendants évaluables (40 DCB, 74 NDB) constituent le test indépendant. Plan illustratif.

02 Profiler la cohorte de découverte : trois couches complémentaires

Chaque couche de séquençage éclaire une facette différente de la question d'immuno-oncologie. Les trois ont été réalisées sur les mêmes 60 tumeurs, avec le sang apparié comme référence germinale.

TABEAU 1. TROIS COUCHES DE DÉCOUVERTE, UNE SEULE QUESTION

Couche	Plan	Apport
Séquençage du génome entier (WGS)	Tumeur ≈60× / sang ≈30×, banques sans PCR	Nombre de copies et aneuploïdie à l'échelle du génome ⁵ , variants structuraux, doublement du génome et signatures mutationnelles (tabac, APOBEC, déficience du système MMR) : des événements mal captés par l'exome
Séquençage de l'exome entier (WES)	Tumeur ≈200× / sang ≈100×	Appel profond des variants codants : TMB et TMB clonale ³ , typage HLA de classe I et perte allèle-spécifique du HLA ⁴ , néoantigènes prédits, pertes de fonction dans les gènes d'échappement immunitaire et de résistance (B2M, JAK1/2, STK11, KEAP1)
RNA-seq bulk	ARN total brin-spécifique, ≈50 M de paires de lectures	Programmes immunitaires (IFN-γ / inflammation T, cytotoxicité, lymphocytes B / TLS), réponse stromale au TGF-β, présentation antigénique, déconvolution des cellules immunitaires, néoantigènes exprimés et transcrits de fusion

Pourquoi à la fois le génome et l'exome ? Profondeur et étendue répondent à des questions différentes. La profondeur de l'exome résout les mutations sous-clonales nécessaires au calcul de la TMB clonale et à l'appel des néoantigènes ; l'étendue du génome capte les altérations du nombre de copies et les variants structuraux, le type d'altération à l'origine du signal 9p21 décrit plus bas.

03 Réduire des milliers de candidats à quelques marqueurs testables

Le profilage a produit $\approx 21\,400$ variables par patient : niveaux d'expression et scores de signatures, variables mutationnelles et de nombre de copies, métriques HLA et néoantigéniques. L'objectif n'était pas le modèle le plus flatteur en découverte, mais une courte liste de candidats susceptibles de tenir chez de nouveaux patients.



Figure 2. Du profilage pangénomique au score verrouillé. Chaque niveau donne le nombre de variables encore en jeu : environ 21 400 issues du WGS, du WES et du RNA-seq ; environ 6 200 après filtrage qualité ; 34 retenues dans au moins 70 % de 500 rééchantillonnages ; 11 mesurables par un test ciblé sur FFPE ; 7 confirmées chez les patients indépendants et combinées en un score verrouillé. Largeurs schématiques. Chiffres illustratifs.

- **Une modélisation sans fuite d'information.** Filtrage, normalisation et réglage des hyperparamètres ont été réalisés à l'intérieur d'une validation croisée imbriquée (5 plis externes $\times$ 20 répétitions), principale protection contre des estimations d'erreur trop optimistes⁶.
- **Des modèles complémentaires.** Une régression logistique pénalisée (elastic net) a servi de modèle principal interprétable ; des arbres de gradient boosting ont recherché les effets non linéaires et les interactions.
- **Sélection par stabilité.** Seules les variables retenues dans $\geq 70\%$ de 500 rééchantillonnages ont été conservées⁷, soit 34. Les valeurs SHAP ont confirmé que chacune agissait dans un sens biologiquement

plausible.

- **Filtre de faisabilité analytique.** Chaque candidat devait être mesurable sur FFPE par un test ciblé, à une cellularité tumorale réaliste. La TMB, par exemple, était associée au bénéfice mais n'apportait que peu d'information une fois les variables d'expression intégrées ; de plus, une TMB fiable exige un panel de capture ≥ 1 Mb⁸. Elle a donc été conservée comme covariable plutôt que remplacée par un proxy sur amplicons.

Résultat : 11 candidats testables, chacun associé à un test de confirmation. L'AUC en validation croisée sur la cohorte de découverte était de 0,84 (IC à 95 % 0,74–0,94), considérée comme optimiste tant qu'elle n'était pas confirmée.

TABLEAU 2. LES 11 CANDIDATS SOUMIS À CONFIRMATION			
Candidat	Justification biologique	Plus élevé chez	Test de confirmation
CXCL9, GZMB, IFNG	Axe IFN- γ / lymphocytes T cytotoxiques ⁹	DCB	Panel ARN ciblé (RT-qPCR)
CD274 (ARNm PD-L1)	Résistance immunitaire adaptative	DCB	Panel ARN ciblé (RT-qPCR)
CXCL13, MS4A1	Axe lymphocytes B / structures lymphoïdes tertiaires ¹⁰	DCB	Panel ARN ciblé (RT-qPCR)
TGFBI, ACTA2	Réponse stromale au TGF- β , exclusion des lymphocytes T ¹¹	NDB	Panel ARN ciblé (RT-qPCR)
Perte de fonction STK11, KEAP1	Adénocarcinome pulmonaire « froid » ¹²	NDB	Panel ADN par amplicons
Délétion 9p21.3 (CDKN2A / cluster des IFN de type I)	Microenvironnement froid, résistance primaire ¹³	NDB	Test dPCR de nombre de copies

04 Confirmer par quantification ciblée sur l'ensemble des échantillons

Trois tests ciblés ont été conçus et vérifiés analytiquement, efficacité, linéarité, limite de détection et répétabilité, selon les recommandations MIQE et dMIQE^{14,15}, puis appliqués aux coupes FFPE des 180 patients. 174 ont passé le contrôle qualité (6 échantillons de la cohorte mise de côté présentaient une cellularité tumorale insuffisante). Le modèle a été verrouillé avant la levée de l'aveugle sur la réponse de ces patients.

- **Panel ARN ciblé (RT-qPCR) :** 8 cibles et 3 gènes de référence, robuste à l'ARN fragmenté issu de FFPE.
- **PCR digitale (dPCR) :** ratio absolu de nombre de copies 9p21.3 / locus de référence, corrigé de la cellularité tumorale.
- **Panel ADN par amplicons :** STK11 et KEAP1 à une couverture $\geq 500\times$, avec B2M, JAK1 et JAK2 rapportés de façon descriptive (trop rares dans cette cohorte pour être modélisés).

L'ensemble des échantillons a rempli deux rôles. Les 60 patients de découverte ont servi de pont entre plateformes, séquençage sur tissu congelé versus tests ciblés sur FFPE, et les 114 patients mis de côté et évaluables ont constitué le jeu de test indépendant.

TABLEAU 3. PONT ENTRE PLATEFORMES CHEZ LES 60 PATIENTS DE DÉCOUVERTE		
Mesure	Comparaison	Concordance
Expression génique	RT-qPCR vs RNA-seq	ρ de Spearman 0,81–0,93 par gène
Statut mutationnel (STK11, KEAP1)	Panel amplicons vs WES	58 / 60 patients concordants
Nombre de copies 9p21.3	dPCR vs WGS	κ de Cohen = 0,86

Biopsies congelées et blocs FFPE proviennent de fragments tumoraux distincts : une partie des discordances reflète l'hétérogénéité intratumorale, non une erreur de mesure.

TABLEAU 4. DEVENIR DES 11 CANDIDATS CHEZ LES PATIENTS INDÉPENDANTS		
Résultat	Marqueurs	Interprétation
Confirmés (7)	CXCL9, GZMB, CXCL13, CD274, TGFBI, perte de fonction STK11, délétion 9p21.3	Significatifs dans le sens pré-spécifié
Redondants (2)	IFNG, ACTA2	IFNG : faible abondance sur FFPE, aucune information au-delà de CXCL9. ACTA2 : capté par TGFBI.
Non confirmés (2)	MS4A1, perte de fonction KEAP1	MS4A1 : signal expliqué par CXCL13. KEAP1 : même sens, mais l'IC à 95 % inclut l'absence d'effet : conservé à titre exploratoire.

TABLEAU 5. SCORE VERROUILLÉ CHEZ LES PATIENTS INDÉPENDANTS (N = 114 ; 40 DCB / 74 NDB)		
Modèle	AUC (IC à 95 %)	Commentaire
Score de réponse IO Xplorer (7 marqueurs)	0,78 (0,69–0,87)	Critère pré-spécifié atteint
IHC PD-L1 (TPS) seule	0,62 (0,51–0,73)	Référence
Score + TPS vs TPS seul	–	Apport significatif (test du rapport de vraisemblance, $p < 0,01$)

La baisse de 0,84 en découverte à 0,78 chez les patients indépendants est attendue, et c'est ce second chiffre sur lequel un programme de développement peut s'appuyer.

Devenir des 11 candidats chez les patients indépendants

Flèche : groupe dans lequel le marqueur est plus élevé

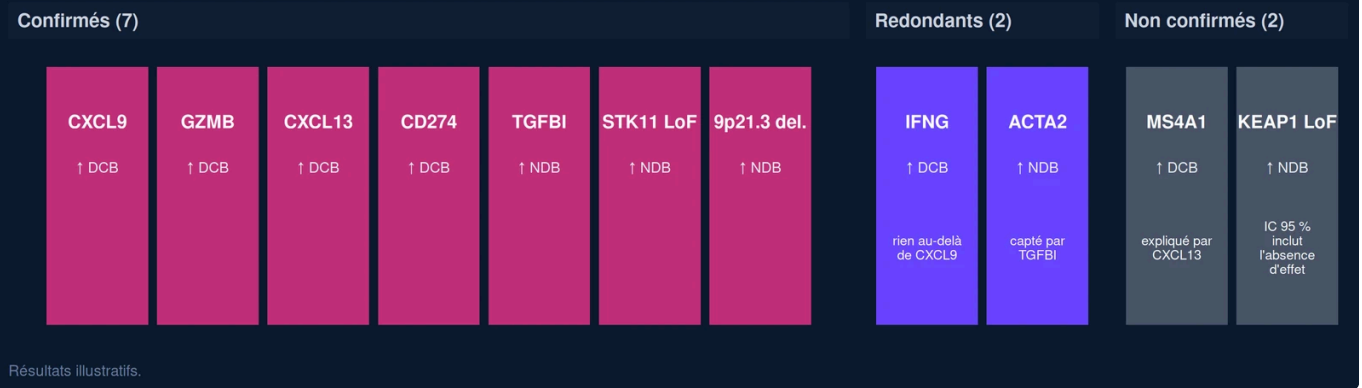


Figure 3. Devenir des 11 candidats chez les patients indépendants. Chaque tuile est un candidat ; la flèche indique le groupe dans lequel il est plus élevé (DCB : bénéfice durable, NDB : pas de bénéfice durable). Sept sont confirmés dans le sens prévu. Deux sont redondants : IFNG n'apporte rien au-delà de CXCL9, et ACTA2 est capté par TGFBI. Deux ne sont pas confirmés : MS4A1 est expliqué par CXCL13, et KEAP1 va dans le même sens mais son IC à 95 % inclut l'absence d'effet. Résultats illustratifs.

Le score à 7 marqueurs chez les patients indépendants

Jaune : altération présente

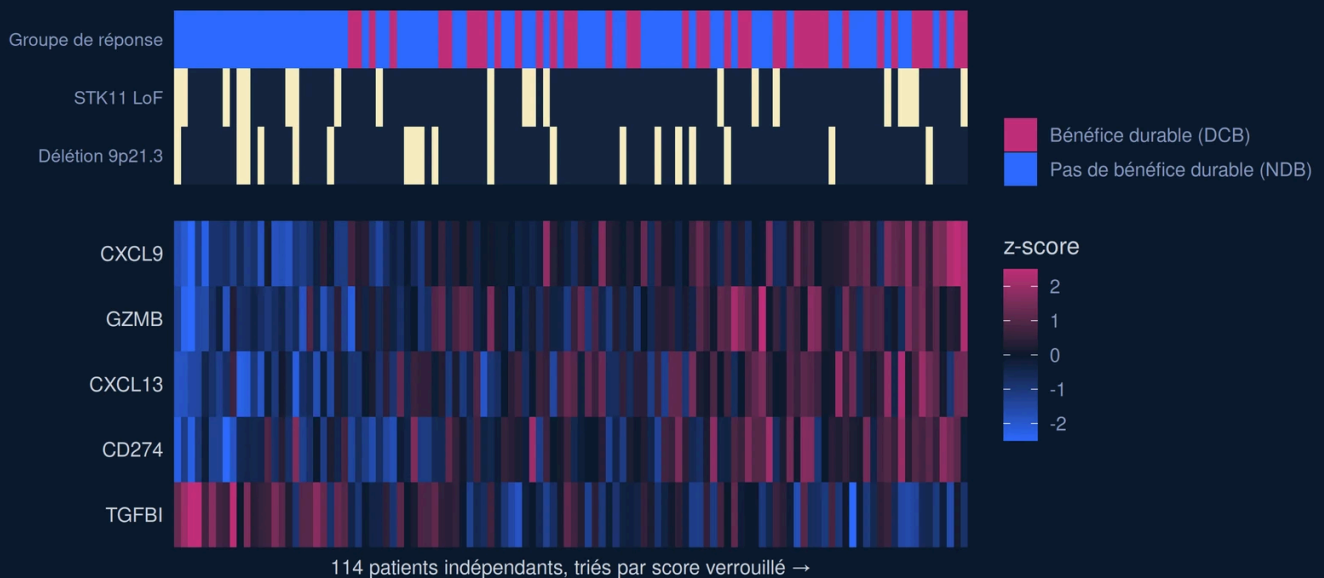


Figure 4. Le score à 7 marqueurs chez les patients indépendants. Chaque colonne est l'un des 114 patients indépendants, du score le plus bas au plus élevé. En haut : groupe de réponse, et présence (jaune) d'une perte de fonction de STK11 ou d'une délétion 9p21.3, deux marqueurs plus fréquents chez les patients sans bénéfice durable. En bas : expression des cinq gènes du score, en z-scores (rose au-dessus de la moyenne, bleu en dessous). CXCL9, GZMB, CXCL13 et CD274 augmentent avec le score ; TGFBI diminue. Données simulées, calées sur l'étude de cas.

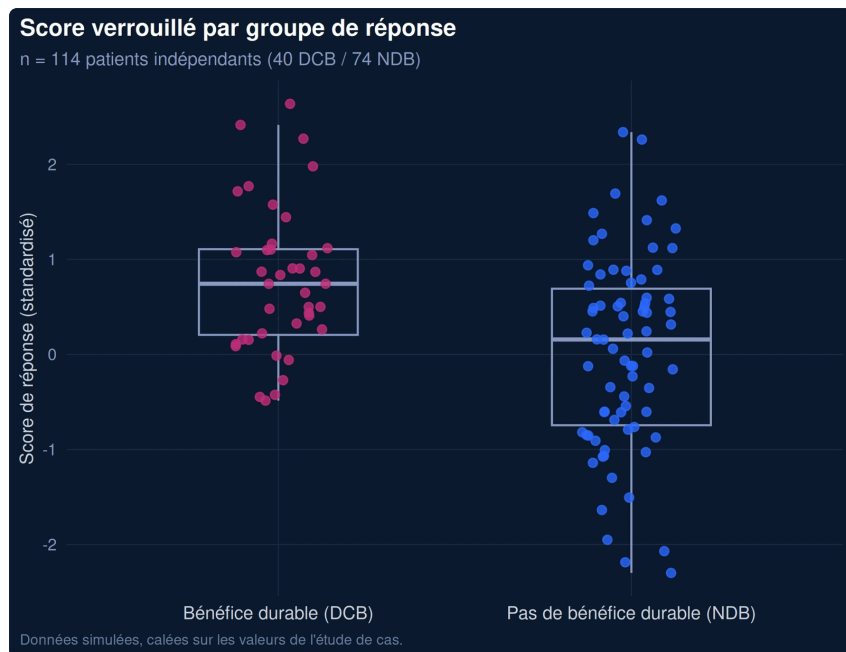


Figure 5. Score verrouillé par groupe de réponse. Chaque point est un patient indépendant ; les boîtes indiquent la médiane et l'écart interquartile. Les scores sont plus élevés chez les patients à bénéfice durable, mais les deux groupes se recouvrent : le score classe les patients selon leur probabilité de bénéfice, il ne classe pas correctement chaque patient. Données simulées, calées sur l'étude de cas.

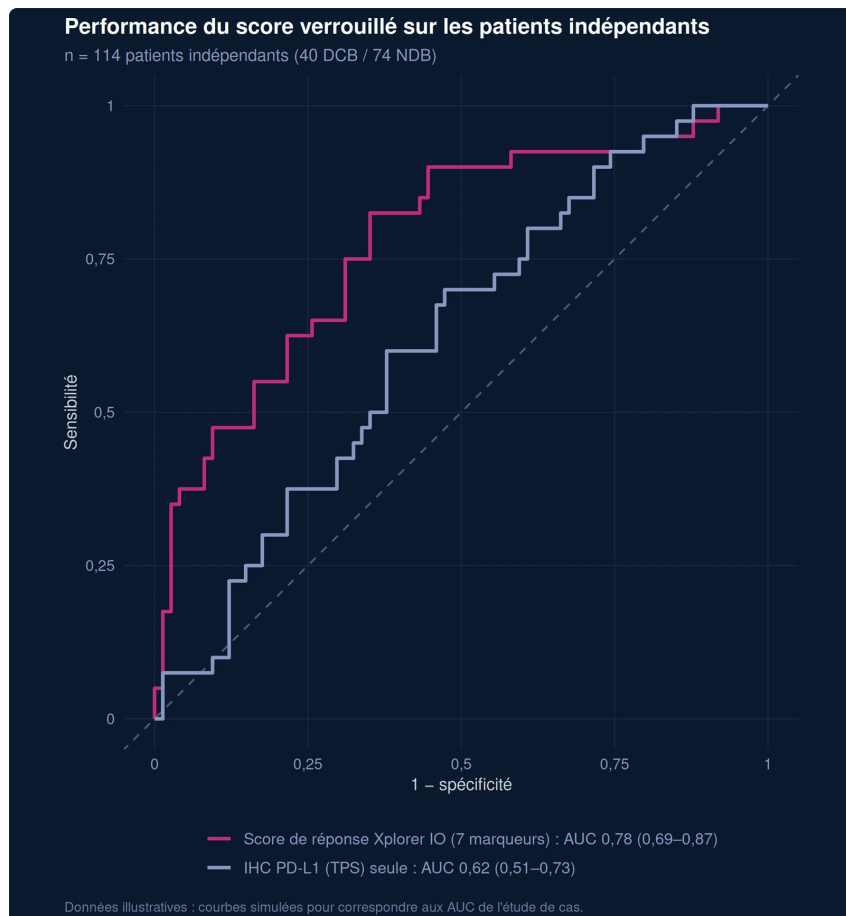


Figure 6. Courbes ROC chez les patients indépendants. Pour chaque seuil possible, une courbe met en regard la part des patients DCB correctement identifiés (sensibilité) et la part des patients NDB signalés à tort (1 – spécificité) ; la diagonale correspond au hasard. Le score à 7 marqueurs (AUC 0,78) sépare mieux les groupes que l'IHC PD-L1 seule (AUC 0,62), et son ajout au TPS PD-L1 apporte une valeur ajoutée significative (test du rapport de vraisemblance, $p < 0,01$). Courbes simulées pour correspondre aux AUC rapportées.

Ce que le promoteur a reçu

- Un **score de réponse verrouillé à 7 marqueurs**, module d'expression à cinq gènes, statut STK11 et nombre de copies 9p21.3, avec coefficients, seuil de décision et code d'analyse.
- **Trois tests ciblés compatibles FFPE**, avec modes opératoires (SOP) et données de performance analytique, prêts pour une validation analytique formelle.
- Le **jeu de données WGS, WES et RNA-seq intégré et contrôlé** (FASTQ, BAM/CRAM, matrices de variants et d'expression) et un rapport statistique complet.
- Un « **no-go** » **documenté** sur quatre candidats, ainsi que sur la TMB comme critère de sélection isolé dans ce contexte, autant d'efforts de développement épargnés sur des marqueurs qui n'auraient pas tenu.
- Une **recommandation pour la suite** : évaluer prospectivement le score comme stratégie d'enrichissement, avec un suivi optionnel en transcriptomique spatiale et single-cell pour localiser le signal CXCL13 / TLS dans le tissu.

CALENDRIER INDICATIF (≈ 6 MOIS)

Semaines 0–3	Conception de l'étude, plan d'analyse statistique, CQ des échantillons
Semaines 3–12	Séquençage de découverte (WGS, WES, RNA-seq) et CQ bioinformatique
Semaines 10–16	Intégration des données, modélisation par IA, sélection des candidats
Semaines 16–19	Conception des tests ciblés et vérifications analytiques
Semaines 19–25	Confirmation sur l'ensemble des échantillons, évaluation du modèle verrouillé, rapport final

Pourquoi cette approche fonctionne

- **Décider avant de mesurer.** Groupes, critères et seuils de succès sont fixés avant que les données n'existent.
- **Découvrir large, confirmer ciblé.** Des données pangénomiques pour trouver les candidats ; des tests ciblés pour les confirmer sur chaque échantillon.
- **Intégrer la faisabilité analytique à la sélection.** Chaque candidat sort de la découverte avec son test ciblé.
- **Confirmer en aveugle, avec un modèle verrouillé.** C'est le résultat sur patients indépendants qui permet de construire.
- **Considérer les résultats négatifs comme des résultats.** Savoir quels marqueurs échouent, c'est protéger le prochain essai.

Au-delà de cet exemple

La même démarche s'applique à de nombreuses questions d'immuno-oncologie :

- **Réponse et résistance** aux inhibiteurs de points de contrôle, anticorps bispécifiques, ADC ou thérapies cellulaires ; résistance primaire versus acquise à partir de biopsies appariées à l'inclusion et à la progression (p. ex. perte de JAK1/2 ou de B2M¹⁶).
- **Phénotypes immunitaires tumoraux**, inflammé, exclu ou désert, et leurs déterminants génomiques.
- **Toxicité** : événements indésirables d'origine immunitaire, par profilage germlinal et sanguin.
- **Indications** telles que mélanome, carcinome rénal, cancers urothéliaux et ORL, cancer colorectal MSI-high ; types d'échantillons : tissu congelé, FFPE et sang.

Références

1. Rizvi NA, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–128.
2. Pepe MS, et al. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:1432–1438.
3. McGranahan N, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016;351:1463–1469.
4. McGranahan N, et al. Allele-specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution. *Cell*. 2017;171:1259–1271.

5. Davoli T, et al. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science*. 2017;355:eaaf8399.
6. Varma S, Simon R. Bias in error estimation when using cross-validation for model selection. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:91.
7. Meinshausen N, Bühlmann P. Stability selection. *J R Stat Soc Series B*. 2010;72:417–473.
8. Buchhalter I, et al. Size matters: dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *Int J Cancer*. 2019;144:848–858.
9. Ayers M, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2017;127:2930–2940.
10. Cabrita R, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577:561–565.
11. Mariathasan S, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018;554:544–548.
12. Skoulidis F, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8:822–835.
13. Han G, et al. 9p21 loss confers a cold tumor immune microenvironment and primary resistance to immune checkpoint therapy. *Nat Commun*. 2021;12:5606.
14. Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611–622.
15. dMIQE Group, Huggett JF. The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. *Clin Chem*. 2020;66:1012–1029.
16. Zaretsky JM, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2016;375:819–829.

Vous préparez une étude de biomarqueurs ?

Indiquez-nous vos deux groupes, vos échantillons et la décision que vous devez prendre. Nous vous proposerons un plan, couches de découverte, répartition des cohortes et tests de confirmation, avant d'analyser le moindre échantillon. genxmap.com/contact