

Évolution clonale : qu'est-ce qu'un clone ?

Antoine Jourdain, Matthieu Duchmann
Christophe Willekens, Éric Solary
Leïla Perié & Lucie Laplane¹

Le cancer, comme tout phénomène «historique», est le résultat d'une pluralité de causes (Morange 2014).



Les approches évolutionnistes du cancer occupent une place croissante en oncologie. Dans la vision dominante, l'oncogénèse est décrite comme un processus darwinien d'évolution par sélection naturelle. Les cellules (le plus souvent des cellules souches) deviennent cancéreuses parce qu'elles acquièrent des mutations dont leurs cellules filles héritent. On parle alors d'un clone (une population de cellules d'origine commune partageant les mêmes mutations). Les cancers sont composés de multiples clones en raison de l'acquisition de nouvelles mutations au cours du temps. Ces mutations peuvent modifier le succès reproductif des cellules et les soumettre à une sélection positive (la population clonale croît) ou négative (la population clonale décroît). Ce processus évolutif

[1] **Antoine Jourdain** est étudiant en médecine et en philosophie. Son mémoire de M2 réalisé sous la direction de Lucie Laplane porte sur la notion de clone en cancérologie. **Lucie Laplane** est chargée de recherche au CNRS, membre de l'IHPST (UMR 8590, CNRS & Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne) et de l'équipe «Cellules souches hématopoïétiques et développement des hémopathies myéloïdes» (UMR 1287, Gustave Roussy) où elle conduit une activité mixte entre philosophie, biologie expérimentale et bioinformatique. Ses travaux portent sur les cellules souches et sur la biologie du cancer, en particulier l'évolution clonale et le micro-environnement tumoral. **Matthieu Duchmann**, **Christophe Willekens** et **Éric Solary** sont médecins-chercheurs à l'hôpital Saint-Louis (MD) et à Gustave Roussy (CW et ES). Leurs travaux portent sur différentes hémopathies myéloïdes. **Leïla Perié** est directrice de recherche au CNRS (Curie). Ses travaux portent sur la différenciation des cellules hématopoïétiques à l'échelle unicellulaire.

aboutit généralement à une architecture branchée où de multiples clones cohabitent au sein d'une tumeur.

Ce modèle de l'évolution clonale a des conséquences importantes pour le cancer. Par exemple, il explique la diversité génétique d'une tumeur dans l'espace et dans le temps. Une biopsie prise à un temps t dans un endroit d'une tumeur ne donne à voir qu'une partie des altérations génétiques d'une tumeur. Cette évolution clonale dans l'espace et dans le temps offre une explication à certains échecs des thérapies ciblées en apportant la notion de clones résistants, qu'ils préexistent dans la tumeur, ou adviennent au cours du traitement. Le modèle de l'évolution clonale suggère également de nouvelles pistes thérapeutiques. Le concept de « thérapie adaptative », par exemple, utilise la compétition entre les clones pour contrôler la tumeur.

Cette conception traditionnelle de l'évolution clonale s'est complexifiée ces dernières années avec la prise en compte d'autres dynamiques évolutives. Des travaux ont interrogé la place de la sélection naturelle dans l'évolution clonale (Sottoriva *et al.* 2015, Ling *et al.* 2015). Des analyses génomiques pan-cancer ont révélé qu'au moins 30 % des tumeurs répondent à un modèle d'évolution neutre (Williams *et al.* 2016), et probablement beaucoup plus (Caravagna *et al.* 2020). Une autre a montré que 99 % des mutations des régions codantes de l'ADN sont tolérées et échappent à la sélection négative (Martincorena *et al.* 2017). L'évolution clonale s'est révélée ne pas être toujours graduelle, avec l'accumulation progressive d'un petit nombre d'altérations. Elle peut être soudaine lorsqu'un grand nombre d'altérations se produisent sur une période courte (*e.g.* chromothripsis, chromoplexie, kataegis) (Stephens *et al.* 2011, Rausch *et al.* 2012, Baca *et al.* 2013, Nik-Zainal *et al.* 2016). Cela a conduit à proposer des modèles d'évolution ponctuée (Gao *et al.* 2016, Davis *et al.* 2017) en écho à la théorie de l'évolution des espèces développée par Gould & Eldredge (1972). Toutes ces dynamiques sont susceptibles de s'imbriquer et/ou de varier au cours de l'évolution d'une tumeur.

Les progrès technologiques constants permettant des analyses moléculaires à très grande échelle ont progressivement complexifié la conception initiale de l'évolution clonale. Toutes les composantes théoriques relative à l'évolution clonale font l'objet de débats et d'explorations, sauf le concept de clone. Ce chapitre a pour objectif de soumettre ce concept à une analyse critique. Nous commencerons par montrer que le concept de clone est nécessairement relatif à des



choix qui déterminent la délimitation entre les clones. Cela nous conduira à questionner ces choix. Nous montrerons que plusieurs traits peuvent légitimement servir à l'identification des clones et que la notion traditionnelle du clone perd en pertinence à mesure que les données révèlent la complexité des facteurs impliqués dans l'évolution clonale. Face à ce constat, nous proposerons plusieurs solutions pour, d'une part clarifier le contenu conceptuel et, d'autre part en modifier sa perception.

1] Qu'est-ce qu'un clone ?

Le modèle de l'évolution clonale repose sur l'analyse, dans le temps et dans l'espace, de cellules appartenant à différents clones. Le concept de clone y occupe donc une place centrale. Pourtant, ce concept est très rarement explicitement défini. Il est utilisé dans différentes branches de la biologie. Il a été introduit pour la première fois en 1903 en botanique, pour désigner les plantes domestiquées produites par reproduction végétative et bouturage. À partir des années 1930, le clone a été utilisé pour désigner des lignées de protozoaires et de bactéries, puis, dans les années 1950, des lignées de cellules humaines issues d'une cellule unique. Le concept a donc été élargi : de produit de la reproduction végétative, il est devenu produit de la reproduction asexuée en général, par fission pour les protozoaires et les bactéries, et par mitose pour les cellules eucaryotes. Puis le clone a désigné le produit des expériences de transfection nucléaire dans des œufs énucléés, des expériences de Briggs et King en 1956 à la très fameuse expérience de la brebis Dolly en 1993. Ce dernier sens, que l'on nomme usuellement « clonage », a pris le devant dans la compréhension commune de ce qu'est un clone, même s'il ne constitue pas une méthode de reproduction asexuée à proprement parler (Mittwoch 2002). À partir de 1983, le terme « clonage » a aussi été utilisé pour désigner la multiplication de gènes ou de séquences d'ADN dans des bactéries. Ces différents usages ne se recoupent que très partiellement (figure 1), mais on y voit toujours l'idée d'une copie, également très présente dans les conceptions non scientifiques du clone.

Le concept de clone, à partir du moment où il a été appliqué aux cultures de cellules humaines uniques, a été repris par des physiologistes comme Burnet pour caractériser les lignées de cellules à l'intérieur d'un organisme. Le clone a permis d'introduire un intermédiaire entre l'échelle cellulaire et l'échelle tissulaire, en étudiant des populations de cellules et leur évolution. Plutôt que de

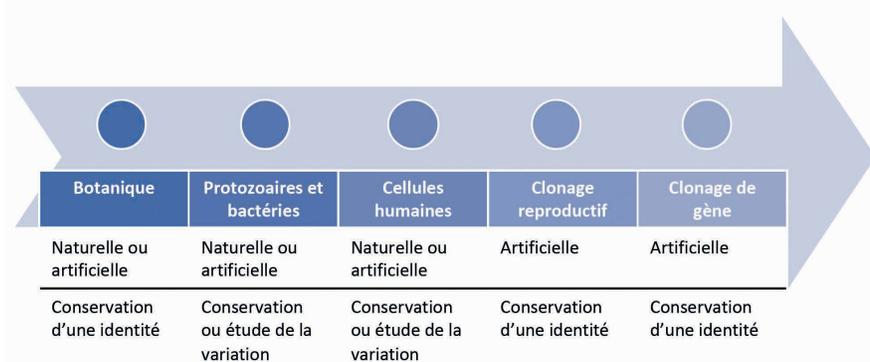


FIGURE 1. *Histoire de la notion de clone*. Le clone s'est imposé dans de nombreux champs de la biologie au cours du XX^e siècle. Ursula Mittwoch (2002) montre que l'engouement pour ce terme a conduit à l'appliquer à des objets biologiques distincts, et à lui faire perdre son sens premier de produit de la reproduction végétative. Avec le passage dans le langage courant du terme de clone à la suite des expériences de clonage, le concept a subi une réduction, entraînant une confusion dans la représentation commune de ce qu'est un clone. On note dans la construction du concept de nombreuses tensions théoriques. La première pose le problème de l'origine du clone, qui est tantôt un produit naturel, tantôt un objet de culture d'origine artificielle. La seconde tension pose un problème de temporalité, le clone ayant d'une part une valeur de stabilité lorsqu'il permet de conserver une identité, et d'autre part une valeur dynamique lorsqu'il permet d'étudier la variation dans une population. Enfin, il fait tantôt référence au groupe des descendants, et d'autres fois à un individu unique. Ces tensions rendent confuse l'extension réelle du concept.

conserver une identité au cours du temps, le concept de clone est ainsi utilisé *in vivo* pour étudier la variation. À partir des travaux de Foulds (1954) et de Burnet (1959) sur la progression des tumeurs dans les années 1950, le concept a été repris par des biologistes pour étudier le cancer. Alors que Foulds décrivait la progression des tumeurs sans proposer de réel mécanisme explicatif, Burnet explique l'évolution des cancers comme étant l'effet de la sélection de certains clones mutés. Lejeune (1967) et de Grouchy *et al.* (1966) emploient ensuite le concept de clone dès 1963 dans leurs études de reconstruction de lignages à partir d'études caryotypiques dans la transformation aiguë de la leucémie myéloïde chronique, avant que Nowell, en 1976, ne formule réellement la théorie de l'évolution clonale (Nowell 1976). Si les travaux contemporains sur l'évolution clonale se placent tous dans la filiation de Nowell, Michel Morange a montré les modifications théoriques qui sous-tendent l'histoire

de l'évolution clonale et sa place en cancérologie (Morange 2012). Nous poursuivons ici ce travail en nous intéressant à la diversité des usages du concept de clone.

Nous avons identifié dans la littérature trois types de définitions (tableau 1). Les premières définissent les clones par un lien strictement généalogique : les cellules appartiennent à un même clone quand elles partagent un ancêtre commun (définitions jaunes). Les autres définissent les clones par une identité commune, soit génétique (définitions bleues) soit phénotypique/fonctionnelle (définitions rouges). Bien que le critère généalogique ne soit pas toujours explicitement formulé dans ces deux derniers types de définition, il est toujours implicitement présent dans l'usage du concept. L'utilisation du critère exclusif de la généalogie est restreinte à un domaine particulier de la biologie, celui du traçage des lignées cellulaires issues des cellules souches. Dans le contexte des travaux sur l'évolution clonale, on voit donc se dessiner un consensus sur la définition du clone autour d'un double critère : les cellules appartiennent à un même clone lorsqu'elles partagent une identité commune, héritée d'un ancêtre commun. Une telle définition ne permet cependant pas de délimiter efficacement les clones. D'un côté, toutes les cellules d'un organisme dérivent de la même cellule, le zygote. D'un point de vue généalogique elles appartiennent toutes à un même clone. De l'autre, deux cellules ne sont jamais identiques en tout point, pas même sur le plan génétique². D'un point de vue de l'identité, il y aurait autant de clones que de cellules.

Notre premier constat est donc que la notion de clone est nécessairement relative à des choix. Ces choix concernent les traits d'identité qui sont utilisés pour étudier les cellules. Les clones sont délimités par l'acquisition (ou la perte) d'un ou plusieurs traits par une cellule et la transmission de ce(s) trait(s) à sa descendance. Quels sont les traits pertinents pour délimiter les clones en cancérologie ?

2] Sur quels traits fonder l'identité clonale ?

L'étude de l'évolution clonale en cancérologie s'articule autour de l'étude des mutations (tableau 1, définitions bleues). Les clones sont identifiés par la présence de mutations qui permettent de reconstruire l'architecture clonale de la tumeur et son évolution.

[2] Les estimations actuelles du taux de mutation dans les cellules somatiques sont supérieures à 1 mutation par génome par division cellulaire, une estimation multipliée de 4 à 100 fois dans les cancers (Lee-Six *et al.* 2018, Werner *et al.* 2020).

	Définition	Référence	Contexte
	1. "We reserve the term 'clone' for the in vivo descendants of a single ancestral cell"	Lee-Six <i>et al.</i> (2018)	Différenciation des cellules souches
	2. "In a simple approximation, the descendants of every HSC constitute a clone [...] the term "clone" in cell biology is sometimes used to infer that a population of cells sharing a common ancestry will have common properties. However, a more rigorous definition simply requires that all cells of a particular clone derive from the same founder cell"	Glauche <i>et al.</i> (2013)	Différenciation des cellules souches
	3. "A set of cells that descend from a common ancestor and thus share genetic features"	Pogrebniak & Curtis (2018)	Évolution clonale
	4. "A clone is defined as a group of tumor cells that shares a highly similar genotype and mutational profile, while a subclone is a group of tumor cells that diverged in the evolutionary lineage and has acquired additional mutations"	Davis <i>et al.</i> (2017)	Évolution clonale
	5. Clone: "A group of cells that are all descended from a single ancestor. Mutations that are shared between these cells are commonly described as 'clonal'. Subclone: «Cells originating from a more recent cell than the most recent common ancestor. These will possess both the clonal mutations and also subclonal mutations that are private to the subclone"	Fittall & Van Loo (2019)	Évolution clonale
	6. "A genetically identical group of cells"	Steensma & Ebert (2020)	Hématopoïèse clonale
	7. "We define pre-existing functional subclones as those having similar growth dynamics in more than one replicate"	Acar <i>et al.</i> (2020)	Évolution clonale
	8. "A group of cells with the same phenotype, which have expressed that phenotype consistently since their most recent common ancestor"	Sottoriva <i>et al.</i> (2017)	Évolution clonale
<p>TABLEAU 1. Définitions des clones représentatives de la littérature scientifique. Les couleurs indiquent les critères utilisés pour définir les clones : en jaune l'existence d'un lien généalogique entre les cellules, en bleu le partage d'une identité génétique commune, en rouge le partage d'une identité phénotypique/fonctionnelle commune.</p>			

La pertinence de ce choix repose sur le pari heuristique d'un réductionnisme génétique : l'idée que les altérations génétiques offrent la meilleure explication de l'évolution des populations de cellules cancéreuses. Ce pari est fondé sur l'idée que les cancers sont des maladies génétiques, idée qui s'est imposée avec le paradigme de l'oncogène établi dans les années 1980. Selon ce paradigme, l'étude de quelques gènes, dont les altérations seraient responsables de l'oncogenèse, représenterait la meilleure approche pour comprendre la transformation des cellules (Morange 1993, 2003). Ce pari heuristique se confronte aujourd'hui à un nombre croissant de difficultés. D'abord, même en se concentrant exclusivement sur les propriétés génétiques des cellules, il n'est pas si simple de savoir quelles mutations fondent l'identité clonale. Ensuite, les mutations ne sont pas les seuls traits héréditaires qui peuvent conférer un avantage sélectif aux cellules et contribuer à l'évolution clonale.

2.1] Problème 1 : sur quelles mutations fonder l'identité clonale ?

Comme nous l'avons indiqué, la probabilité que deux cellules soient génétiquement identiques est très faible, en particulier dans les cancers. Mais parmi les altérations génétiques qui s'accumulent au cours des divisions cellulaires, certaines n'ont aucun impact, ni sur la capacité de division de la cellule, ni sur ses propriétés fonctionnelles et phénotypiques. C'est le cas, par exemple, de certaines mutations ponctuelles «synonymes» où une base est remplacée par une autre sans que cela ne modifie la séquence d'acides aminés, du fait de la redondance du code génétique³. Pour délimiter les clones d'une manière pertinente, il faut donc identifier les mutations qui jouent un rôle dans l'histoire naturelle de la tumeur. C'était l'idée initiale du concept d'oncogène qui désignait les gènes dont l'altération était responsable de l'oncogenèse. Le tableau s'est complexifié avec l'identification d'un nombre croissant de gènes impliqués dans les cancers. Avec l'analyse du génome entier, «des milliers de mutations ont été identifiées comme étant potentiellement «conductrices» (*driver*)» (Kumar *et al.* 2020). Les mutations conductrices désignent les mutations qui confèrent un avantage compétitif à la cellule et contribuent à l'oncogenèse. Le reste des mutations sont

[3] Certaines mutations synonymes peuvent toutefois avoir des impacts fonctionnels, notamment à travers des effets sur la structure des ANR messagers (Supek *et al.* 2014, Sharma *et al.* 2019b).

dites « passagères » (*passenger*). Ce sont des mutations qui se trouvaient simplement présentes dans la cellule quand elle a acquis une mutation conductrice mais qui ne contribuent pas à l'oncogenèse. Ces mutations représentent un bruit dont il faudrait s'abstraire. Dans les cancers, la très grande majorité des mutations sont considérées comme passagères. La distinction entre mutation passagère et conductrice peut être malaisée.

Une même mutation peut avoir des impacts très différents en fonction de la cellule dans laquelle elle se produit, du niveau d'expression du gène muté dans cette cellule, des mutations déjà présentes avec lesquelles elle peut interagir, etc. Une même mutation peut donc être conductrice dans certains contextes et passagère dans d'autres, voire délétère pour la cellule et provoquer l'élimination de cette dernière. Idéalement, il faudrait disposer de preuves fonctionnelles sur l'implication de chaque mutation en fonction du contexte dans lequel elle se trouve. En pratique, de telles données fonctionnelles sont très parcellaires et limitées aux gènes étudiés en laboratoire dans un contexte toujours très défini. En l'absence de preuves fonctionnelles expérimentales, de nombreux outils bio-informatiques ont été conçus pour prédire l'impact d'une mutation, conductrice ou passagère.

Mais la recherche de mutations dans les données brutes de séquençage se heurte à de multiples obstacles : artéfacts de séquençage, positionnement des séquences sur le génome, etc., l'estimation du seuil de bruit de fond du taux de mutations représente un défi central pour éviter les faux positifs ou passer à côté de mutations importantes (Plutynski 2021). Par exemple, pendant la phase initiale de séquençage du consortium *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), des mutations du gène *Titan* ont été observées dans de très nombreux échantillons. Loin d'être l'indice d'une sélection positive et d'un rôle de ce gène dans les cancers, cette observation résultait en fait de la très grande taille de ce gène, qui augmente la probabilité de survenue d'une mutation (Plutynski 2021). L'estimation du bruit de fond doit donc aussi prendre en compte le fait que la probabilité qu'une mutation se produise n'est pas la même sur chaque site : certaines mutations présumées conductrices en raison de leur présence récurrente se sont révélées être des mutations passagères situées dans une région de l'ADN à haute probabilité de mutation (*hotspot*) (Hess *et al.* 2019). À l'inverse, la notion de mutation passagère a été remise en question par plusieurs études montrant que le poids collectif de ces mutations pourrait modifier le cours de la maladie et avoir des

conséquences «qui sont difficiles à expliquer dans une vision traditionnelle centrée sur les mutations conductrices» (McFarland *et al.* 2013). Castro-Giner *et al.* (2015) ont proposé la notion de «mini-driver» et Kumar *et al.* (2020) ont remis en question la dichotomie entre mutations conductrices et mutations passagères, et suggéré qu'il y aurait plutôt un continuum allant des variants ayant un fort impact à ceux ayant un faible impact. Dans ce continuum, un certain nombre de mutations dites passagères pourraient conférer des avantages ou désavantages sélectifs modérés. Les mutations passagères pourraient d'autre part avoir un effet agrégatif prédictif du phénotype cancéreux. À l'inverse, l'accumulation d'un trop grand nombre de mutations conductrices peut devenir délétère et résulter en une sélection négative (Andor *et al.* 2016).

À la difficulté de discriminer entre mutations conductrices et passagères, s'ajoute le problème du niveau de résolution. Les premiers travaux se sont concentrés sur les séquences codantes de l'ADN (*whole exome sequencing*), c'est-à-dire les gènes codants pour des protéines qui ne représentent qu'environ 2 % du génome humain. Le séquençage de génomes entiers (*whole genome sequencing*) montre que des mutations conductrices peuvent se produire hors des séquences codantes, notamment dans les séquences promotrices et amplificatrices des gènes. Les mutations du promoteur du gène *TERT* sont les plus connues (Horn *et al.* 2013) et conduisent à une surexpression de ce gène codant la sous-unité catalytique de la télomérase, ce qui permet le maintien de la longueur des télomères et l'échappement des cellules à la sénescence. Des mutations dans le promoteur ou la région 5' du gène *MTG2* peuvent conduire à une diminution de son expression. Des mutations inactivatrices dans la région 5' de *TP53* ont aussi été identifiées (Rheinbay *et al.* 2020). Des mutations non codantes peuvent donc altérer l'expression des gènes et jouer un rôle dans l'oncogenèse (Zhang *et al.* 2018, Calabrese *et al.* 2020).

L'identification des clones sur la base des mutations est donc plus complexe qu'il n'y paraît. D'une part, identifier les mutations pertinentes ne va pas toujours de soi, d'autre part les reconstructions clonales dépendent des informations disponibles et donc des techniques employées. Tous ces choix, dans les techniques utilisées, dans la profondeur de séquençage, dans le traitement de l'information, peuvent affecter les reconstructions clonales. En fonction des choix faits, on identifiera plus ou moins de clones, de plus ou moins grande taille. Cela peut aussi modifier l'interprétation des dynamiques évolutives sous-jacentes (par ex. Caravagna *et al.* 2020).

2.2] Problème 2: les facteurs non génétiques

Au-delà des difficultés internes à l'identification génétique des clones, on peut s'interroger sur l'utilisation des mutations comme support de l'identité clonale. Tous les traits héréditaires peuvent participer à l'évolution des cellules cancéreuses s'ils sont capables de modifier le comportement et la fitness des cellules. Le pari heuristique du réductionnisme génétique tient de l'idée que les altérations génétiques permettent d'expliquer l'avantage compétitif des cellules sélectionnées dans un contexte donné et d'anticiper leur désavantage dans un contexte différent, par exemple sous pression thérapeutique. Le succès de certains médicaments ciblés, comme l'imatinib utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, et de l'association entre l'acide tout-trans-rétinoïque et l'arsenic dans la leucémie aiguë promyélocytaire justifie le maintien de ce pari dans l'essor de la médecine de précision. Mais il existe des situations dans lesquelles ce pari réductionniste ne tient pas. Cette section documente de tels exemples et nous conduit à confronter au clone génétique la notion de clone épigénétique, deux supports d'identité clonale qui peuvent aboutir à l'identification de clones différents.

La majorité des thérapies ciblées ne sont efficaces qu'un temps avant que des mécanismes de résistances ne mènent à une rechute. Le modèle génétique d'évolution clonale explique la résistance aux thérapies ciblées par la sélection de cellules ayant acquis des mutations qui permettent leur résistance, et leur expansion secondaire. Mais certaines données remettent en question la simplicité de ce modèle mutation/sélection et suggèrent que des mécanismes non-génétiques peuvent être impliqués (Ramirez *et al.* 2016, Hata *et al.* 2016). Ces travaux réalisés sur des lignées de cancer du poumon *EGFR* mutées traitées par inhibiteur d'*EGFR*, indiquent que l'acquisition de mutations résistantes et leur sélection sont précédées par l'entrée de certaines cellules dans un état dit « persistant » par plasticité phénotypique grâce à des modifications épigénétiques rapides. Cet état leur permet d'échapper aux fortes pressions de sélection induites par la thérapie. Le phénotype persistant, d'abord apparu sous l'effet de conditions environnementales inhabituelles induites par l'action continue du traitement, est ensuite renforcé génétiquement par l'apparition de mutations qui confèrent aux différentes cellules des mécanismes de résistance variés. Ce phénomène semble concorder avec la notion d'assimilation génétique de Waddington. Hata *et al.* (2016) montrent que dans le cancer du

poumon non à petites cellules l'apparition de ce type de résistances secondaires est plus fréquente que la simple sélection de mutations préexistantes. L'enjeu devient alors de trouver un moyen de cibler les cellules persistantes, avant qu'elles ne développent des résistances multiples, qui rendent inefficaces les thérapies ciblées.

Certaines réponses cliniques au traitement échappent également à une explication génétique. C'est le cas de la réponse aux hypométhylants dans la leucémie myélomonocytaire chronique, une leucémie caractérisée par une production excessive et déséquilibrée de monocytes, parfois associée à une diminution de production des globules rouges et/ou des plaquettes et à l'augmentation de la taille de la rate. Les agents hypométhylants, parfois qualifiés d'«épiprodrogue», sont les principaux médicaments utilisés dans les formes sévères de cette maladie (Solary & Itzykson 2017). Environ 40 % des patients présentent une réponse clinique qui, lorsqu'elle est complète, se caractérise par une restauration complète de la production des globules rouges et des plaquettes et le retour de la rate à une taille normale. Le séquençage longitudinal des monocytes de patients répondeurs et non-répondeurs a montré que les hypométhylants n'entraînent pas l'élimination des cellules mutées (Merlevede *et al.* 2016). La réponse clinique n'est donc pas due à la disparition des clones malins au profit d'une hématopoïèse normale, mais à une normalisation du comportement des cellules mutées. Cette étude montre d'ailleurs des changements épigénétiques importants dans les cellules des patients répondeurs. Plusieurs autres thérapeutiques ciblées introduites ces dernières années en cancérologie, comme les inhibiteurs des isocitrate déshydrogénases mutées (*IDH1* ou *IDH2* mutée) (DiNardo *et al.* 2018, Quek *et al.* 2018, Roboz *et al.* 2020) et les inhibiteurs de la voie JAK/STAT (Kaznatcheev *et al.* 2017) peuvent avoir un effet similaire. Cela a conduit Kaznatcheev *et al.* (2017) à introduire la notion de «*dark selection*», une sélection n'opérant pas sur les mutations mais sur d'autres traits de la cellule qui doivent encore être identifiées.

Au-delà du contexte des traitements, il arrive qu'aucune mutation somatique susceptible d'offrir une explication du développement tumoral ne soit identifiée dans une tumeur. Les analyses pan-cancer du génome entier n'ont identifié aucune mutation conductrice potentielle dans plus de 5 % des échantillons (Campbell *et al.* 2020). Dans certains types de cancer comme les épépendymomes, des tumeurs du système nerveux central qui sont issus de la membrane tapissant les ventricules cérébraux et la moelle épinière,

le séquençage de l'exome et du génome n'a révélé qu'un très petit nombre de mutations (aucune chez certains patients) et n'a permis d'identifier aucune mutation récurrente ou conductrice potentielle. Des altérations épigénétiques (méthylation des îlots CpG impliquée dans l'expression des gènes) pourraient avoir l'effet conducteur habituellement attribué aux mutations (Mack *et al.* 2014). Des facteurs métaboliques liés à un micro-environnement hypoxique associés à des défauts de la méthylation de certaines histones ont aussi été impliqués (Michealraj *et al.* 2020). Dans ces tumeurs qui imposent de penser «*outside the mutation box*» (Versteeg 2014), des modifications épigénétiques semblent jouer un rôle moteur dans l'évolution clonale.

Le développement des outils d'étude des modifications épigénétiques de l'ADN, bien qu'ils accusent un retard par rapport aux analyses génétiques, permettent désormais d'ajouter cette composante à la reconstruction de l'évolution clonale dans certains cancers. Une grande cohérence a été observée entre évolution génétique et épigénétique dans certains cancers, par exemple les cancers de la prostate (Brocks *et al.* 2014), les tumeurs cérébrales (Mazor *et al.* 2015), les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage (Hao *et al.* 2016), et les cancers colorectaux (Bian *et al.* 2018). L'interprétation de l'imbrication entre ces deux composantes est parfois moins claire, comme dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Oakes *et al.* (2014) puis Gaiti *et al.* (2019) rapportent un faible nombre de régions différenciellement méthylées au sein des clones définis par la présence d'altérations génétiques. Ils perçoivent les altérations épigénétiques comme des marqueurs neutres de l'évolution clonale, offrant une horloge moléculaire plus précise pour la reconstruction des lignages que les mutations génétiques en raison du plus grand nombre d'évènements. Deux scénarios sont proposés : (1) les mutations génétiques conductrices modifient directement l'état épigénétique de la cellule fondatrice du clone, et/ou (2) une première étape d'instabilité épigénétique précède l'acquisition des mutations génétiques conductrices, les altérations épigénétiques présentes dans les cellules sont ensuite co-sélectionnées du fait des altérations génétiques (Oakes *et al.* 2014). Dans cette même leucémie, Landau *et al.* (2014) puis Pastore *et al.* (2019) suggèrent plutôt que des désordres stochastiques de la méthylation de l'ADN, permettant la réexpression de gènes associés aux cellules souches, représenteraient un facteur d'instabilité jouant «un rôle similaire à celui de l'instabilité génétique, en augmentant la capacité des cellules cancéreuses à rechercher des trajectoires

évolutives supérieures» («*empowers evolution*»). Finalement, dans les leucémies aiguës myéloïdes, l'évolution génétique et l'évolution épigénétique suivent des cinétiques divergentes (Li *et al.* 2016). Certains patients présentent une charge importante d'altérations épigénétiques et un petit nombre de mutations géniques, d'autres un nombre important de mutations géniques mais peu d'altérations épigénétiques, d'autres encore un profil mixte. Le suivi longitudinal de l'évolution clonale illustre cette dissociation avec une évolution clonale qui peut être principalement épigénétique à la première rechute et mixte lors des rechutes suivantes.

La contribution réelle des altérations épigénétiques à l'évolution clonale reste débattue et peu étudiée, comparativement à l'attention portée aux mutations génétiques. On sait que les modifications de la méthylation peuvent être transmises et donc peuvent participer à la sélection naturelle. Ces altérations épigénétiques représentent donc de bons candidats pour l'identification des clones. Si la fréquence des altérations épigénétiques est supérieure à celle des altérations génétiques, alors les clones génétiques peuvent contenir des sous-clones épigénétiques. Si les tumeurs sont composées de clones génétiques et épigénétiques, la question est alors de savoir lesquels de ces clones infléchissent les dynamiques évolutives et comment reconstruire cette architecture clonale mixte (figure 2).

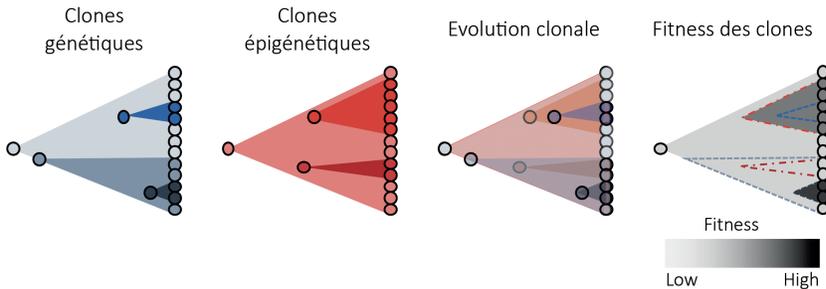


FIGURE 2. *L'évolution clonale multiniveaux*. En fonction des traits choisis pour soutenir l'identité clonale, différents clones sont susceptibles d'être identifiés. Pour une même tumeur, la première figure, en bleu, présente l'évolution clonale reconstruite à partir de traits génétiques. La deuxième figure, en rouge, présente l'évolution des mêmes cellules reconstruites à partir d'altérations épigénétiques. La troisième figure est une superposition des deux précédentes, indiquant les différents traits pouvant contribuer à l'évolution clonale. C'est la quatrième figure qui montre les événements, parfois génétiques parfois épigénétiques, associés à un gain de fitness.

3] Comment refonder le concept de clone ?

Ces analyses du concept de clone nous mènent au constat que ce dernier peut faire référence à des identités multiples, qui ne se recoupent que partiellement. Face à ces difficultés nous proposons trois solutions :

1. Clarifier le contenu du concept.
2. Abandonner la conception typologique du clone, selon laquelle toutes les cellules d'un clone sont différents exemplaires d'un même type, au profit d'une identité qualitative, selon laquelle les cellules d'un clone partagent quelques traits communs.
3. Refonder le concept de clone sur un principe de ressemblance plutôt que d'identité.

3.1] Clarification des contenus du concept de clone

La **figure 3** propose une clarification des différents sens et usages actuels de la notion de clone. Si un consensus semble exister sur la définition du clone par le partage d'une identité commune héritée d'un ancêtre commun (en rouge), le support de cette identité est variable (en bleu). Historiquement c'est l'identité génétique qui occupe la place principale, mais comme nous l'avons vu, les traits épigénétiques hérissables peuvent également contribuer à l'évolution clonale des cellules cancéreuses.

D'autres traits hérissables pourraient également fonder l'identité clonale, en fonction de la période de temps sur laquelle se produit l'évolution clonale. On peut par exemple se poser la question du rôle de l'hérédité étendue dans l'évolution clonale, qui distingue différents systèmes comme l'hérédité génétique, épigénétique, comportementale et symbolique (Jablonka & Lamb 2005). L'hérédité comportementale comprend l'effet de construction de niche, qui permet aux parents de transmettre à leurs descendants des pressions de sélection modifiées, en façonnant leur environnement (Odling-Smee 2010). L'environnement local et distant des cellules cancéreuses joue un rôle important dans leur expansion (Laplaine *et al.* 2019, Solary & Laplaine 2020) et les cellules cancéreuses sont susceptibles d'altérer leur micro-environnement et ainsi de modifier la fitness de leurs cellules filles. Par exemple, une étude dans un modèle murin de syndrome myéloprolifératif a montré que les cellules hématopoïétiques mutées pouvaient endommager le micro-environnement de la moelle osseuse. Cette altération est délétère pour les cellules souches hématopoïétiques normales. Les cellules mutées, en revanche, survivent à ces altérations micro-environnementales, ce qui leur permet d'avoir

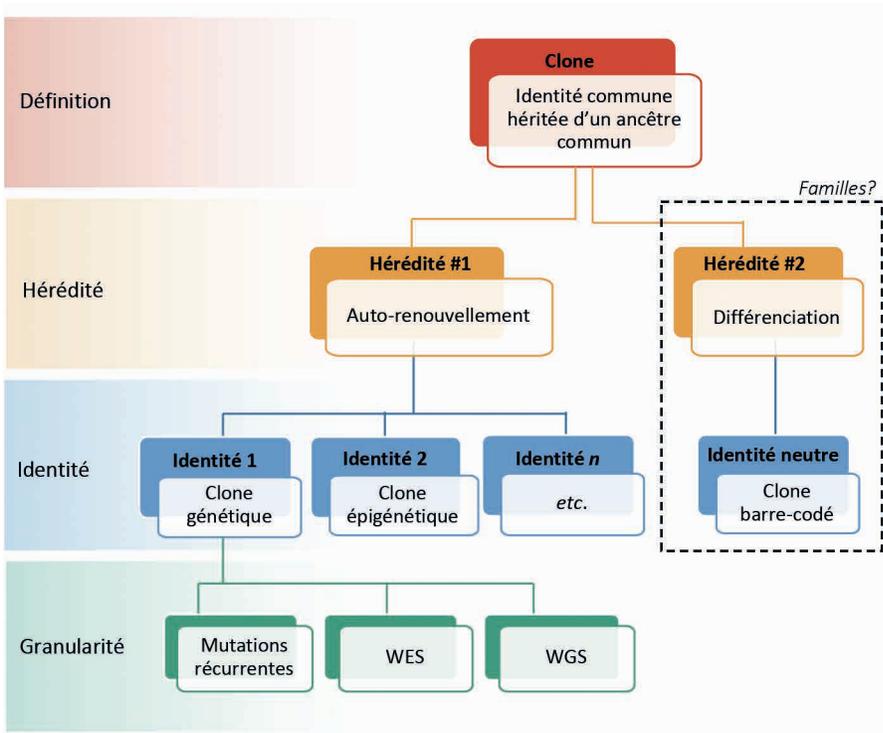


FIGURE 3. *Les sens multiples du concept de clone.* Derrière une définition commune se cachent des usages hétérogènes. Deux branches principales se dégagent, l'une propre à l'étude de l'évolution clonale sur le long terme avec un accent fort porté sur l'identité commune des cellules au sein du clone, l'autre propre à l'étude des lignages cellulaire principalement orientée sur l'étude de la généalogie. Les supports de l'identité peuvent être divers. Actuellement ce sont principalement les mutations génétiques qui servent à marquer l'identité des clones dans l'étude de l'évolution clonale, mais les altérations épigénétiques sont aussi parfois étudiées et d'autres traits pourraient être considérés avec les progrès techniques. Enfin, pour chaque trait choisi, des niveaux de granularité très différents sont possibles en fonction de la quantité d'information prise en compte : de quelques mutations ciblées au génome entier, par exemple.

un avantage compétitif (Arranz *et al.* 2014). Il faudrait toutefois une approche plus précise pour mieux comprendre le rôle potentiel de l'environnement à l'échelle de chaque clone.

À la diversité des traits héréditaires pouvant participer à l'expansion du clone, s'ajoute une diversité dans leur granularité. Le problème s'illustre particulièrement bien avec la génétique : certaines études se concentrent sur l'étude de quelques mutations (pour les-

quelles il y a de bonnes preuves de leur implication causale dans la croissance du clone), d'autres prennent en compte toutes les séquences codantes de l'ADN, ce qui est permis par les techniques de *whole exome sequencing*. Et aujourd'hui, il est aussi possible de prendre en compte la totalité du génome (*whole genome sequencing*). La profondeur et la sensibilité du séquençage peuvent aussi radicalement modifier la résolution des clones, le nombre de clones détectés et les reconstructions clonales (Caravagna *et al.* 2020).

À ces différentes notions de clone s'ajoute celle utilisée dans les travaux de suivi de lignée cellulaire. Dans ces travaux, l'accent est principalement mis sur le lien généalogique entre les cellules, marquées par des **barre-codes** introduits artificiellement ou naturellement présents dans les cellules. Dans ces études, le marqueur d'identité clonale est supposé neutre et permet de suivre le destin de lignées de cellules. Les poids respectifs de la généalogie et de l'identité sont inversés. Dans le concept de clone utilisé pour l'étude de l'évolution clonale, l'identité prime, c'est elle qui doit offrir l'explication du comportement des clones. L'hérédité est une condition nécessaire à l'action de la sélection naturelle, qui opère à l'arrière-plan. Au contraire, dans l'étude du traçage des lignées cellulaires, l'identité du **barre-code** qui réunit les cellules dans un même clone ne jouant aucun rôle causal, ce sont les aspects généalogiques qui sont centraux. Ce concept de clone est principalement utilisé pour l'étude des cellules souches et de leur différenciation.

L'évolution clonale s'intéresse peu à la différenciation et plus à la capacité d'autorenouvellement des cellules, nécessaire au maintien du clone dans le temps. Dans ce chapitre, nous nous sommes principalement concentrés sur la notion de clone dans le modèle de l'évolution clonale. Mais de plus en plus de travaux font appel aux techniques de **barre-codes** pour étudier l'évolution clonale (par ex. Milo *et al.* 2018; Acar *et al.* 2020), ce qui complexifie l'interprétation du concept. Pour échapper à cette ambiguïté, Leïla Perié suggère de remplacer la notion de clone par la notion de famille dans le contexte des travaux de suivi de lignée cellulaire (Tak *et al.* 2019). La notion de famille a l'avantage de marquer la généalogie et l'héritage qui vient avec, tout en permettant une certaine diversité entre les individus, là où le clone porte l'image d'une identité commune forte.



3.2] Abandonner la conception typologique du clone au profit d'une conception qualitative

La diversification de la notion de clone génère une inadéquation entre la représentation traditionnelle du concept de clone et les données et pratiques scientifiques.

La notion traditionnelle de clone fait appel à une identité typologique : une relation d'identité qui relie deux répliques pures. Ces dernières sont définies par le partage de toutes leurs propriétés intrinsèques pures, qui sont des propriétés qui d'une part ne dépendent que de l'objet considéré, et qui d'autre part ne font mention d'aucun terme référentiel (Erdrich 2020). Des objets qui partagent toutes leurs propriétés intrinsèques pures en commun semblent s'inscrire dans un type, au sens où ils dérivent d'un individu ou modèle type originel. C'est par exemple le cas des objets manufacturés, qui sont produits à la chaîne en suivant le modèle d'un prototype. Dans le modèle traditionnel de l'évolution clonale utilisé en cancérologie, le concept de clone a été majoritairement construit sur la base de cette identité typologique : les cellules sur la base de traits génétiques sont conçues comme des répliques pures, produites à partir d'un individu typique qui est la cellule d'origine du clone.

Mais le clone n'est jamais un groupe de copies conformes. Des variations existent entre les cellules d'un même clone qui ne partagent donc qu'un nombre limité de traits en commun. Cela correspond plutôt à une identité de type qualitative. Par exemple, deux chaises peuvent être très différentes mais avoir en commun la présence d'un plateau sur lequel on peut s'asseoir. L'identité qualitative est une identité relative aux propriétés considérées, et graduelle en fonction du nombre de propriétés prises en compte.

L'ambiguïté du clone naît d'une confusion entre ces deux types d'identité : il est perçu comme étant fondé sur une identité typologique alors qu'il repose sur une identité qualitative. Pour clarifier le concept de clone, il faut donc avant tout le débarrasser de cette confusion et abandonner la vision typologique. Cela ne résout que partiellement le problème car la vision qualitative du clone nécessite un pari réductionniste, que celui-ci soit d'ordre génétique ou non. Dans un contexte où l'on ne peut pas connaître toutes les propriétés héréditaires des cellules, mais où l'on sait que toutes peuvent jouer un rôle dans l'évolution de la pathologie, sur quelles propriétés faut-il s'appuyer et/ou lesquelles peut-on négliger ?

Pour déterminer le meilleur pari réductionniste, nous proposons d'utiliser les critères de causalité de Woodward pour quantifier

le rôle causal de différents traits (Woodward 2003, 2010). Pour illustrer cette solution, prenons l'exemple de l'étude de Sharma *et al.* (2019a), qui s'intéresse aux différents facteurs d'hétérogénéité intratumorale phénotypique dans le cadre du cancer du poumon non à petites cellules. Dans ce cancer, l'hétérogénéité génétique est modérée et ne reflète pas seule l'hétérogénéité phénotypique. Ils observent que l'hétérogénéité transcriptomique et l'hétérogénéité immunitaire du micro-environnement, décorréliées des facteurs génétiques, contribuent plus au phénotype cancéreux, en entraînant une hétérogénéité phénotypique régionale, et en influençant les dynamiques clonales et la trajectoire évolutive de la tumeur. En utilisant les critères de stabilité (l'effet est maintenu malgré une grande variabilité d'arrière-plan), de proportionnalité (pour chaque variation dans la cause, il y a un changement dans l'effet) et de spécificité (pour chaque changement dans l'effet, il existe une variation correspondante dans la cause) de Woodward, on peut hiérarchiser les différentes contributions causales. Dans notre exemple, l'hétérogénéité génétique est une cause stable de l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur. L'hétérogénéité transcriptomique est plus proportionnelle et spécifique. Et c'est l'environnement immunitaire qui apparaît comme la cause la plus stable, proportionnelle et spécifique du phénotype. En appliquant les critères de causalité de Woodward, on peut donc conclure que pour ce cas de cancer, le trait d'identité privilégié pour caractériser l'identité des clones serait le micro-environnement immunitaire, car c'est lui qui semble jouer le rôle causal le plus important dans l'évolution tumorale.

S'il ne fallait choisir qu'un type de trait pour fonder l'identité clonale, il faudrait pouvoir faire ce choix sur la base d'une contribution causale plus importante. En fonction des cancers, différents types de traits peuvent contribuer de manière plus ou moins importantes. Une quantification de la contribution respective des différents types de traits qui contribuent à l'évolution clonale devrait permettre de hiérarchiser ces traits afin de faire le pari réductionniste le plus adapté à chaque type de cancer (figure 4).

3.3] Abandonner l'identité au profit de la ressemblance ?

Cette approche pragmatique a tout de même le défaut de reposer sur un pari réductionniste dont on sait qu'il est faux. L'approximation qui en découle n'est légitime que faute de mieux. Or les progrès technologiques permettent de plus en plus l'intégration de données. Il devient possible d'étudier des combinaisons de traits génétiques,

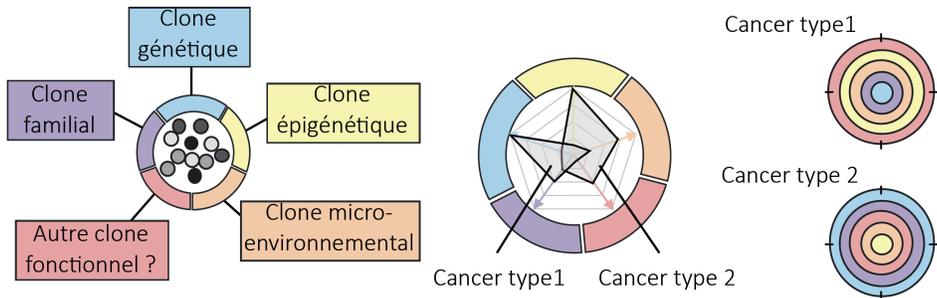


FIGURE 4. *Sur quel trait fonder l'identité clonale qualitative ?* Puisque différents traits peuvent participer à l'évolution clonale, nous proposons d'abord d'identifier les traits potentiellement pertinents, puis d'étudier leur contribution causale respective dans différents cancers et/ou dans différentes situations cliniques (par exemple les mutations conductrices peuvent être la principale cause de l'évolution dans certains cancers mais pas dans d'autres, ou bien dans certaines phases de la maladie, mais plus sous traitement). Une telle quantification pourrait par exemple se faire en utilisant les critères de causalité de Woodward et permettrait, in fine, de hiérarchiser les traits impliqués dans l'évolution clonale, des plus importants aux moins importants. Cela permettrait de déterminer quel trait utiliser en priorité pour identifier et suivre les clones en fonction des cancers et/ou des situations cliniques.

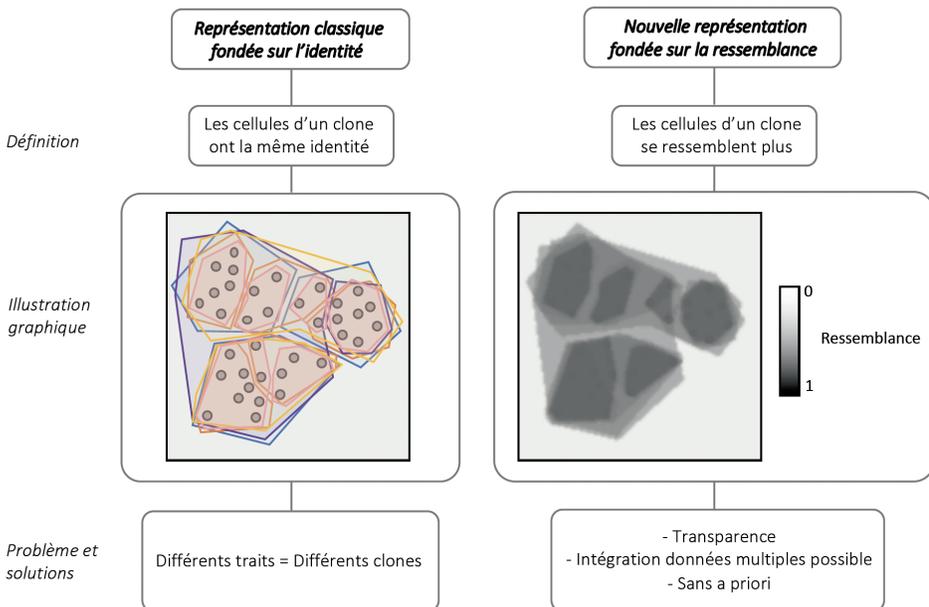
épigénétiques, transcriptomiques et phénotypiques à l'échelle unicellulaire. La notion qualitative du clone n'est pas plus adaptée que son ancêtre typologique pour rendre compte de ces données. Faute d'un outil conceptuel mieux adapté, on voit souvent resurgir la tendance au réductionnisme génétique : par exemple, on s'intéresse aux modifications transcriptomiques associées au statut mutationnel en considérant les diversités intraclonales comme du bruit plutôt que comme des dynamiques clonales sous-jacentes. Ces nouvelles approches intégratives nécessitent un changement plus profond et plus radical dans la notion de clone. Elles nécessitent l'abandon de tout pari réductionniste, favorisé par une définition aristotélicienne du clone en termes de propriétés nécessaires et suffisantes.

Pour cela, il faut probablement débarrasser le clone de la notion d'identité. Le clone ne réunit pas les cellules sur une identité commune, il réunit les cellules qui se ressemblent le plus. Un changement de perspective presque trivial mais qui pourrait offrir au concept de clone un rajeunissement bien mérité. Le mouvement serait similaire à ce qui s'est fait sur le concept de cellule souche. La notion de cellules souches faisait traditionnellement référence à

des entités sur la base de propriétés intrinsèques, catégoriques. Les progrès scientifiques ont révélé une plasticité cellulaire qui n'avait pas été anticipée et qui met à mal la conception traditionnelle des cellules souches. Un nombre croissant de biologistes adoptent aujourd'hui une vision différente du concept de cellule souche, perçu comme faisant référence à un état cellulaire plastique et réversible, plus adapté aux données (Laplane 2016, Fagan 2019). De la même manière, le concept de clone a besoin de faire peau neuve pour rendre compte de l'hétérogénéité et de la diversité des traits qui modifient la dynamique évolutive dans les cancers. Abandonner l'identité, trop fixe et réductionniste, au profit de la ressemblance (figure 5), permettrait de rendre compte du fait que ces ressemblances sont quantitatives et multifactorielles. Les clones pourraient alors être définis par des grappes de propriétés dont aucune n'est ni nécessaire ni suffisante à l'inclusion dans le clone, sur le modèle des définitions par cluster de propriétés homéostatiques (Boyd 1999).

4] Conclusion

Derrière son apparente simplicité, la notion de clone est complexe et donne lieu à des usages hétérogènes. Elle pose la question centrale du trait sur lequel fonder l'identité clonale. Nous avons mis en évidence une évolution significative dans l'utilisation du



concept. La notion traditionnelle de clone, basée sur une vision typologique, génétique du clone où les cellules partageant les mêmes mutations conductrices et sont conçues comme différents exemplaires d'un même type, se confronte à diverses limites. Les opportunités ouvertes par la multiplication des dimensions dans la caractérisation des tumeurs et des cellules qui les composent nécessitent un appareillage conceptuel plus adapté. Nous avons ébauché deux pistes : la première consiste à abandonner la vision typologique de l'identité au profit d'une vision qualitative (qui reflète l'utilisation actuelle de la notion de clone) en appuyant le choix des traits d'identité sur une étude quantitative des contributions causales de différents traits. La seconde consiste à abandonner la notion d'identité au profit d'une notion de ressemblance, en fondant la ressemblance sur l'intégration du plus grand nombre de traits possibles. Ces deux solutions ne sont pas incompatibles : on peut considérer que la notion de clone ne fait que regrouper des cellules se ressemblant plus que d'autres tout en fondant ce regroupement, faute de mieux, sur le choix de traits ayant une contribution causale plus importante.

◀ FIGURE 5. *Refonder la notion de clone sur un principe de ressemblance plutôt que d'identité.* Le problème des notions typologique et qualitative du clone est qu'elles nécessitent une réduction de l'identité à des traits. Or, en fonction des traits choisis, les découpages clonaux peuvent varier. Sur la figure de gauche différentes reconstructions clonales d'une même population sont proposées en fonction du choix de différents traits. On voit que des découpages très différents en résultent. L'apparition de nouvelles technologies permettant d'étudier simultanément plusieurs traits dans une même cellule rend cette conception du clone obsolète et nécessite un tournant conceptuel. Refonder la notion de clone sur de la ressemblance pourrait offrir plus de transparence quant à la diversité des cellules qui composent les clones et pourrait permettre l'intégration de cette pluralité de données sans nécessiter d'a priori sur les traits qui apporterait la plus grande contribution causale à l'évolution des cellules.

