



HAL
open science

Rôle de l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé dans les événements cardiovasculaires : impact sur l'inflammation et l'athérosclérose

Séverine Marti

► **To cite this version:**

Séverine Marti. Rôle de l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé dans les événements cardiovasculaires : impact sur l'inflammation et l'athérosclérose. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03436574

HAL Id: dumas-03436574

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03436574>

Submitted on 19 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2022

Thèse n°2

THÈSE POUR L'OBTENTION DU

DIPLÔME D'ÉTAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par MARTI Séverine

Née le 13 septembre 1994 à Toulon

Le 01/10/2021

**RÔLE DE L'HÉMATOPOÏÈSE CLONALE DE POTENTIEL
INDÉTERMINÉ DANS LES ÉVÈNEMENTS
CARDIOVASCULAIRES**

Impact sur l'inflammation et l'athérosclérose

Sous la direction du Dr MANSIER Olivier

Membres du jury :

Pr SEVENET Nicolas
Pr COUFFINHAL Thierry
Dr BIDEAU Audrey
Dr FORCADE Édouard

Président
Examinateur
Examinateur
Examinateur

REMERCIEMENTS

Au Professeur Nicolas Sevenet,

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse et je vous en remercie. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Au Professeur Thierry Couffignal,

Je vous remercie de m'avoir inclus dans le projet CHAth et d'avoir accepté de faire partie de mon jury. J'espère que ce manuscrit sera à la hauteur de vos attentes, vous y trouverez le témoignage de ma sincère considération et de mon profond respect.

Au Docteur Edouard Forcade,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma sincère gratitude.

Au Docteur Audrey Bidet,

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Tout ce que j'ai pu apprendre au laboratoire d'Hématologie de Haut-Lévêque et à tes côtés m'a conforté dans l'envie de continuer dans cette spécialité. Soit assurée de ma profonde considération.

Au Docteur Olivier Mansier,

Merci d'avoir accepté d'encadrer ma thèse. Merci pour ta bienveillance et pour toutes les connaissances que tu m'as transmises au cours de ce travail et plus largement au cours de mon internat. J'espère un jour pouvoir être à la hauteur de ton implication et tes compétences dans ma vie professionnelle.

A mes copines, Ingrid, Elisa, Marine et Amandine, pour ces années à la faculté de Pharmacie de Marseille, une pensée à tous nos « Pharmassilia ».

Aux co-internes et aux copains de l'internat : Anne-Sophie, Clémentine, VE, Aurélie, Maxime, Audrey, Benjamin, Nathalie, Goeffrey... à tous ceux que je n'ai pas cités, Alicia bien sûr (ma co-interne préférée), Annabelle aussi, pour tous ces beaux souvenirs.

A vous les filles, Claire, Juliette et Ludivine qui avez rendu cet internat inoubliable, rien n'aurait été pareil sans vous.

A cette belle expérience parisienne. A Charles, pour la cicatrice indélébile de notre première rencontre.

A ma famille, parrain, marraine, oncles et tantes, cousins et cousines, je vous promets que mes études se termineront un jour ! A toi aussi Marion, pour toutes nos aventures durant toutes ces années.

A mes grands-parents, Papi en espérant te rendre fier, Mémé qui me manque tant.

A mon frère, qui a la chance de me supporter depuis toujours, je te souhaite tout ce qu'il y a de plus beau dans la vie.

A mes parents, pour votre soutien indéfectible, je vous aime.

TABLE DES MATIERES

<i>TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....</i>	<i>5</i>
<i>LISTE DES ABREVIATIONS.....</i>	<i>6</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>8</i>
<i>I. Qu'est-ce que l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé ?.....</i>	<i>8</i>
A. Hématopoïèse normale.....	8
B. Hématopoïèse pathologique et hémopathies malignes.....	9
C. Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé.....	10
<i>II. Aspects génétiques de l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé.....</i>	<i>12</i>
A. Rappels de génétique.....	12
B. Caractéristiques des mutations associées aux CHIP.....	13
C. Exemples de gènes mutés dans les CHIP.....	15
1. Rappels sur les mécanismes de régulation de l'expression génique et du maintien de l'intégrité génomique.....	15
2. Gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN.....	18
3. Gènes impliqués dans les modifications des histones.....	21
4. Gènes codant des facteurs de la machinerie d'épissage des ARNm.....	22
5. Gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'ADN.....	24
6. Gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire.....	26
D. Mutations compatibles avec la définition de CHIP.....	29
<i>III. Complications associées aux CHIP.....</i>	<i>30</i>
A. Hémopathies malignes.....	30
B. Pathologies cardiovasculaires.....	31
1. Atteintes cardiaques associées aux CHIP.....	31
2. Physiopathologie des complications cardiovasculaires associées aux CHIP.....	32
<i>IV. Facteurs favorisant l'émergence des CHIP.....</i>	<i>37</i>
<i>OBJECTIFS.....</i>	<i>39</i>
<i>ARTICLE.....</i>	<i>41</i>
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>70</i>
<i>RÉFÉRENCES.....</i>	<i>81</i>
<i>ANNEXES.....</i>	<i>88</i>

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Représentation pyramidale de l'hématopoïèse	8
Figure 2 : Liste des mutations et proportions dans les principales cohortes de CHIP	13
Figure 3 : Prévalence des CHIP détectées selon la technique de séquençage utilisée	15
Figure 4 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN	16
Figure 5 : Acétylation et désacétylation des histones	17
Figure 6 : Le phénomène d'épissage	17
Figure 7 : Régulation de l'apoptose via TP53 et PPM1D	18
Figure 8 : Cycle de méthylation-déméthylation des cytosines	19
Figure 9 : Mutations du gène <i>DNMT3A</i> chez 188 patients atteints de LAM	19
Figure 10 : Mutations du gène <i>TET2</i>	20
Figure 11 : Mutations du gène <i>ASXL1</i>	21
Figure 12 : Le spliceosome, machinerie d'épissage des ARNm	22
Figure 13 : Mutations du gène <i>SRSF2</i>	23
Figure 14 : Mutations du gène <i>SF3B1</i>	24
Figure 15 : Mutations du gène <i>TP53</i>	24
Figure 16 : Mutations du gène <i>PPM1D</i>	25
Figure 17 : Rôle de CBL dans les voies de signalisations intracellulaires	26
Figure 18 : Mutations du gène <i>CBL</i> identifiées dans les hémopathies myéloïdes	27
Figure 19 : Les différentes sous-unités de la protéine G	28
Figure 20 : Mutations du gène <i>GNBI</i>	28
Figure 21 : Mutations du gène <i>GNAS</i>	29
Figure 22 : Progression des CHIP en hémopathies malignes	31
Figure 23 : Physiopathologie de l'athérosclérose	33
Figure 24 : Sécrétion d'IL1 β médiée par NLRP3	35
Figure 25 : Prévalence des CHIP selon l'âge du patient et la taille du clone	71
Figure 26 : Niveau de hsCRP selon le type de mutation	72
Figure 27 : Niveau de hsCRP selon le gène muté et la taille du clone	77
Tableau 1 : Acronymes décrivant l'hématopoïèse clonale	11
Tableau 2 : Place des CHIP parmi les facteurs de risque cardiovasculaire	32

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : Protéine kinase B

ARCH : *Aging related clonal hematopoiesis*

ARNm : Acide ribonucléique messager

ASXL1 : *Additional sex combs like 1*

AVC : Accident vasculaire cérébral

CBF : *Core binding factor*

CBL : *Casitas B-lineage lymphoma*

CCUS : *Clonal cytopenia of undertermined significance*

CD : *Cluster of differentiation/ conserved domain*

CHEK2 : *Checkpoint kinase 2*

CHIP : *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*

CRP/ CRP_{us} : Protéine C réactive/ CRP ultrasensible

CSH : Cellule souche hématopoïétique

DNMT3A : *DNA methyltransferase 3A*

ECS : *Error-corrected sequencing*

ECV : Évènement cardiovasculaire

ELN : *European leukemia net*

FDR CV : Facteur de risque cardiovasculaire

FLT3 : *Fms-Like tyrosine kinase 3*

GDP : Guanosine diphosphate

GTP : Guanosine triphosphate

HDL : *High density lipoprotein*

GNAS : *Guanine nucleotide binding protein α -subunit stimulating*

GNB1 : *Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-1*

HAS : Haute autorité de santé

HAT : Histone acétyltransférase

HbA1c : Hémoglobine glyquée

HDAC : Histone desacétylase

ICUS : *Idiopathic cytopenia of undetermined significance*

IDM : Infarctus du myocarde

IDUS : *Idiopathic dysplasia of undetermined significance*

IL : Interleukine

IMC : Indice de masse corporelle

INF : Interféron

JAK2 : *Janus-kinase 2*

LAL : Leucémie aiguë lymphoïde

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LDL/ LDL-ox : *Low density lipoprotein/ LDL cholestérol oxydé*

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique

MAF : *Minor allele frequency*

MBL : *Monoclonal B-cell lymphocytosis*

M-CSF : *Monocytes colony stimulating factor*

MGUS : *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

NET : *Neutrophil extracellular traps*

NFS : *Numération formule sanguine*

NGS : *Séquençage nouvelle génération*

NLRP3 : *NOD-like receptor protein 3*

PcG : *Polycomb-group proteins*

PRC : *Polycomb repressive complex*

PR-DUB : *Polycomb repressive deubiquitinase*

PPM1D : *Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D*

RCPG : *Récepteur couplé aux protéines G*

RF : *RING-finger*

RS : *Ring sideroblast*

RTK : *Récepteur à activité tyrosine-kinase*

SF3A1 : *Splicing factor 3A subunit*

SF3B1 : *Splicing Factor 3B subunit 1*

SLP : *Syndrome lymphoprolifératif*

SMD : *Syndrome myélodysplasique*

smMIPs : *single-molecule molecular inversion probes*

snRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*

SMP : *Syndrome myéloprolifératif*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SRSF2 : *Serine/arginine rich splicing factor 2*

TAVI : *Transcatheter aortic valve implantation*

TERT : *Telomerase reverse transcriptase*

TET2 : *Ten eleven translocation 2*

Th : *T helper*

TNF : *Tumor necrosis factor*

Treg : *T régulateur*

TP53 : *Tumor protein 53*

U2AF1 : *U2 auxiliary factor 1*

VAF : *Variant allele frequency*

WES : *Whole exome sequencing*

WGS : *Whole genome sequencing*

ZRSR2 : *Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and Serine/arginine Rich 2*

INTRODUCTION

I. Qu'est-ce que l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé ?

A. Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui assurent la production des cellules sanguines à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). La durée de vie des cellules sanguines étant limitée (120 jours pour les hématies, 7 jours pour les plaquettes et 24h pour les polynucléaires neutrophiles), il s'agit d'un processus continu assurant le renouvellement constant et régulé des cellules sanguines. Après la naissance, l'hématopoïèse se localise dans la moelle osseuse, principalement dans les os plats et courts chez l'adulte. Elle peut être divisée en myélopoïèse et en lymphopoïèse. La myélopoïèse aboutit à la production des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, des monocytes, des plaquettes et des érythrocytes. La lymphopoïèse aboutit à la production des lymphocytes (B, T et NK).

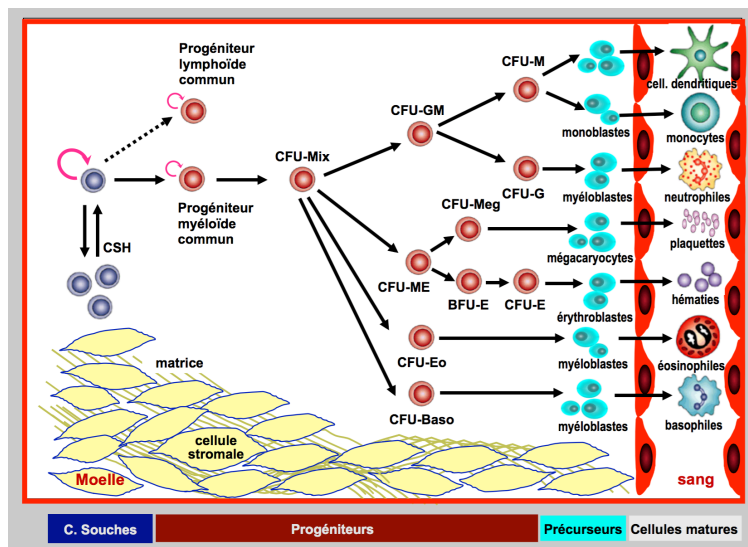


Figure 1 : Représentation pyramidale de l'hématopoïèse

La cellule souche hématopoïétique (CSH) est une cellule multipotente capable de division asymétrique permettant d'une part son autorenouveaulement et d'autre part une différenciation en cellules sanguines matures fonctionnelles. La CSH mature en progénéiteurs puis en précurseurs. Les précurseurs sont des cellules engagées dans une voie restreinte de différenciation. L'hématopoïèse aboutit à la production de lymphocytes, de polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), de plaquettes et d'hématies circulants dans le sang. Il s'agit d'un processus bien régulé au niveau de la moelle osseuse notamment par les cellules stromales de soutien qui modulent l'hématopoïèse. (D'après la Société française d'hématologie, 2014).

L'hématopoïèse est souvent représentée selon une organisation pyramidale (Figure 1). Au sommet se situent les CSH, définies comme des cellules capables de reconstituer une hématopoïèse complète après irradiation létale. Ce sont des cellules rares (0,01 à 0,05 % des cellules médullaires) et

majoritairement quiescentes. Elles sont considérées comme des cellules multipotentes capables d'assurer à la fois leur auto-renouvellement tout au long de la vie et la production de cellules sanguines matures fonctionnelles.

En dessous des CSH, différents compartiments peuvent être distingués en fonction du degré de maturation des cellules qui les composent. Les progéniteurs correspondent aux cellules qui ont perdu la capacité d'auto-renouvellement et la multipotence. Les précurseurs sont des cellules plus engagées encore dans la différenciation hématopoïétique. Elles présentent des capacités de différenciation restreintes à une seule lignée et sont morphologiquement identifiables sur un myélogramme.

La régulation de l'hématopoïèse fait intervenir de nombreux acteurs. (1) On retiendra d'une part les cellules de soutien dites stromales qui concourent à la constitution d'un micro-environnement spécifique appelé niche hématopoïétique. D'autre part, on notera le rôle de facteurs moléculaires et métaboliques dans le contrôle du devenir des CSH. En particulier, il est bien connu que l'hématopoïèse est contrôlée en partie par des facteurs solubles appelés cytokines, qui sont produites à distance ou localement par les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. Certaines cytokines sont des facteurs activateurs de l'hématopoïèse en stimulant la production de cellules matures. Elles peuvent agir de manière synergique (ex : SCF, FLT3-L, ...), avoir une action sur plusieurs lignées (ex : GM-CSF, ...) ou restreinte à une seule (ex : G-CSF, M-CSF, EPO, ...). Ainsi, certaines agissent sur les stades précoces de différenciation hématopoïétique alors que d'autres régulent des processus plus tardifs dans l'hématopoïèse. D'autres encore sont des facteurs inhibiteurs comme le TNF α ou les interférons (INF).

B. Hématopoïèse pathologique et hémopathies malignes

Les hémopathies malignes apparaissent à la faveur d'une dérégulation de l'hématopoïèse. Elles sont généralement caractérisées par une prolifération cellulaire exagérée au niveau du tissu hématopoïétique. En fonction du type de cellule produit en excès et de la présence ou non d'un blocage de maturation, différentes hémopathies malignes peuvent être distinguées.

Les leucémies aiguës sont caractérisées par une prolifération au niveau de la moelle osseuse de cellules hématopoïétiques immatures appelées blastes. L'envahissement de la moelle osseuse par les blastes est responsable d'une insuffisance médullaire par répression de l'hématopoïèse normale. Selon l'appartenance des cellules blastiques à la lignée myéloïde ou lymphoïde, on distingue les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL).

Les hémopathies dites « chroniques » sont associées à une prolifération cellulaire excessive mais en absence de blocage de maturation, conduisant à un excès de production de cellules matures. Selon les lignées atteintes, on pourra distinguer les syndromes myéloprolifératifs (SMP) caractérisés par un excès de production de cellules myéloïdes et les syndromes lymphoprolifératifs (SLP) caractérisés par la prolifération anormale de lymphocytes B, T ou NK.

Un groupe de maladie à part mérite d'être mentionné : les syndromes myélodysplasiques (SMD). En effet, ces hémopathies sont caractérisées principalement par une apoptose prématurée des cellules hématopoïétiques plutôt qu'une prolifération cellulaire excessive, conduisant à une d'insuffisance médullaire.

Pour finir, il paraît important de noter que les hémopathies sont des maladies dynamiques susceptibles d'évoluer dans le temps. En particulier, il existe un risque pour les SMP et les SMD de transformation en leucémie aiguë qui est alors définie comme « secondaire ».

C. Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé

La notion de clonalité définit un ensemble de cellules portant les mêmes mutations et dérivant donc d'une même cellule initiale mutée. Par opposition aux mutations constitutionnelles transmises de façon héréditaire par les parents et donc présentes dès la naissance dans toutes les cellules de l'organisme, les mutations somatiques sont acquises au cours de la vie d'un individu. Elles ne seront présentes que dans les cellules découlant de la cellule initiale mutée. L'Homme adulte possède entre 50 000 et 200 000 CSH. (2) Rarement, les CSH peuvent acquérir des mutations lors de leur division. Welch *et al* ont ainsi estimé qu'environ 1 mutation serait acquise par décade par les CSH. (3) Ces mutations n'affectent généralement pas leur fonction, cependant selon le gène touché, elles peuvent parfois conférer aux cellules qui les portent un avantage d'auto-renouvellement et/ou de prolifération.

L'existence d'une hématopoïèse clonale apparaissant au cours du vieillissement a été démontrée pour la première fois par l'étude de l'inactivation du chromosome X. Chez la femme chaque cellule possède deux chromosomes X, l'un de transmission paternelle et l'autre de transmission maternelle. Un seul de ces deux chromosomes ne peut être actif dans la même cellule. Il existe donc un phénomène d'inactivation aléatoire du chromosome X, appelé lyonisation, au sein de chaque cellule. De ce fait chacun des deux chromosomes X devrait être inactif dans environ 50% des cellules. C'est dans les années 1990, que la mise en évidence d'un déséquilibre dans l'inactivation des 2 chromosomes X, plus fréquent chez les femmes âgées, a permis de suggérer l'existence d'une clonalité des cellules sanguines liée à l'âge. (4,5) Cette hypothèse s'est confirmée en 2012, puisque des mutations dans le gène *TET2* ont été trouvées chez environ 5% des femmes âgées présentant également un déséquilibre d'inactivation du chromosome X. (6) Or les mutations de *TET2* avaient été identifiées 3 ans auparavant comme des mutations somatiques acquises chez des patients porteurs d'hémopathies myéloïdes. (7) L'étude de Busque *et al* constituait donc la première démonstration qu'une hématopoïèse clonale induite par une mutation peut se produire chez des personnes en bonne santé.

Le terme d'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential* ou CHIP) a par la suite été introduit pour décrire l'existence chez un sujet, de CSH portant une ou plusieurs mutations somatiques, en absence de toute hémopathie maligne. Ceci se traduit par la détection de mutations affectant des gènes impliqués dans les hémopathies myéloïdes avec

une fréquence allélique du variant (*variant allele frequency* ou VAF) supérieure ou égale à 2% au niveau des cellules sanguines circulantes alors que la numération formule sanguine (NFS) ne présente pas d'anomalie. (8)

Les CHIP peuvent donc être vues comme l'équivalence moléculaire des anomalies biologiques mises en évidence sans pour autant avoir les critères requis pour conclure à une hémopathie maligne. On connaît ainsi depuis longtemps l'existence des gammopathies monoclonales de signification indéterminée (*monoclonal gammopathy of undetermined significance* ou MGUS) et des lymphocytoses B monoclonales (*monoclonal B-cell lymphocytosis* ou MBL). Plus récemment, des cytopénies de signification indéterminée (*Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance* ou ICUS) et des dysplasies de signification indéterminée (*Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance* ou IDUS) ont également été décrites. Lorsqu'une ICUS est associée à la mise en évidence d'une hématopoïèse clonale, on parle alors de CCUS (*Clonal Cytopenia of Undertermined Significance*). (9) Les critères de ces différentes conditions sont détaillés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Acronymes décrivant l'hématopoïèse clonale

Acronymes	Signification	Définition
CHIP	Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé ou <i>Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential</i>	Détection d'une ou plusieurs mutations somatiques (VAF \geq 2%) touchant des gènes impliqués dans des hémopathies myéloïdes, en absence de cytopénie, de dysplasie ou de néoplasie associée
ARCH	Hématopoïèse clonale liée à l'âge ou <i>Aging Related Clonal Hematopoiesis</i>	Détection d'une ou plusieurs mutations somatiques dont la fréquence augmente avec l'âge
ICUS	Cytopénies de signification indéterminée ou <i>Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance</i>	Présence d'une ou plusieurs cytopénies sans critère de SMD ni d'autres hémopathies malignes
IDUS	Dysplasies de signification indéterminée ou <i>Idiopathic Dysplasia of Undetermined Significance</i>	Présence de dysplasies touchant une ou plusieurs lignées cellulaires sans critère de cytopénie ni d'autres hémopathies malignes
CCUS	Cytopénies clonales de signification indéterminée ou <i>Clonal Cytopenia of Undertermined Significance</i>	Présence d'une ou plusieurs cytopénies sans critère de SMD ni d'autres hémopathies malignes, associées à une hématopoïèse clonale
MGUS	Gammopathies monoclonales de signification indéterminée ou <i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>	Présence d'une immunoglobuline monoclonale, sans infiltrat plasmocytaire ou lymphoplasmocytaire significatif ni clinique significative
MBL	Lymphocytoses B monoclonales ou <i>monoclonal B-cell lymphocytosis</i>	Présence dans le sang périphérique d'une prolifération lymphocytaire B avec un score de Matutes \geq 4 mais un taux de lymphocytes < 5 G/L et sans clinique significative

Comme cela était suggéré par les différentes études ayant conduit à la découverte des CHIP, le principal facteur de risque d'être porteur d'une CHIP est l'âge. (10,11) L'acronyme ARCH (*Aging Related Clonal Hematopoiesis*) est parfois utilisé pour décrire l'hématopoïèse clonale liée à l'âge.

II. Aspects génétiques de l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé

A. Rappels de génétique

L'information génétique d'une cellule est contenue dans l'acide désoxyribonucléique (ADN), répartie entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial. Dans le génome nucléaire, les molécules d'ADN s'associent à des protéines (notamment les histones) pour former la chromatine constituant les chromosomes. Les gènes sont répartis aléatoirement le long de l'ADN. Ils sont formés de parties codantes, les exons et de parties non codantes, les introns. Chaque gène est présent dans le génome en deux copies définissant des allèles (l'un d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle). L'information génétique contenue dans l'ADN est déterminée par l'enchaînement particulier des nucléotides qui le composent, appelé séquence nucléotidique. Chaque nucléotide est composé d'une base azotée (adénine (A), guanine (G), cytosine (C) et thymine (T)) associée à un pentose et un à trois groupes phosphates. L'ADN sera transcrit en acide ribonucléique messager (ARNm) puis traduit en protéine. Cette étape de traduction se fait selon le code génétique qui associe à un triplet de nucléotide (appelé codon) un acide aminé particulier.

Les mutations sont définies comme toute variation de séquence de l'ADN, qu'elle soit ponctuelle ou étendue, et quelles qu'en soient ses conséquences. Elles peuvent avoir lieu au niveau de régions codantes ou non codantes. Les substitutions correspondent au remplacement d'un nucléotide par un autre. Elles peuvent aboutir à la modification de l'acide aminé codé sur la protéine. On parle alors de mutation faux-sens. Parfois, la redondance du code génétique fait que la modification de la séquence d'ADN ne se répercute pas sur la séquence de la protéine codée, on parle alors de mutation silencieuse ou synonyme. Dans le cas des mutations non-sens, le nouveau codon généré par la mutation correspond à un codon stop entraînant une troncation de la protéine par arrêt de la traduction. L'insertion ou la délétion de plusieurs paires de bases peut s'accompagner d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction. Ce décalage aboutit fréquemment à l'apparition d'un codon stop prématuré et donc une troncation de la protéine codée.

De plus, après transcription des ARNm, le phénomène d'épissage permet d'exciser les introns (parties non codantes) et de rapprocher les exons (parties codantes) (voir paragraphe C.1 ci-après). Des mutations peuvent survenir au niveau des sites d'épissage, l'élimination totale ou en partie de certains exons et/ou la conservation d'introns, conduisant souvent à un décalage du cadre de lecture.

La recherche de mutations peut mettre en jeu différentes techniques. La dernière décennie a vu l'avènement de techniques permettant d'étudier un grand nombre de cibles simultanément grâce au

séquençage à haut-débit (communément appelé NGS pour Séquençage Nouvelle Génération). Selon l'exhaustivité souhaitée, il est ainsi possible de séquencer par cette technique l'ensemble du génome (*Whole Genome Sequencing*, WGS), l'ensemble de l'exome c'est-à-dire des régions codantes du génome (*Whole Exome Sequencing*, WES) ou de se limiter à certains exons/introns (séquençage ciblé). Le choix entre ces 3 possibilités est dicté par le coût de l'analyse, mais également par la sensibilité de détection des mutations souhaitée. En effet, un séquençage ciblé couvrira une zone limitée de l'ADN mais permettra d'obtenir une bonne profondeur de lecture (nombre de fois où chaque base a été lue, exprimé en X). A l'inverse une couverture plus large de l'ADN (exome ou génome entier) sera associée à un séquençage avec une moins grande profondeur. Ceci détermine donc la sensibilité et donc la fréquence allélique du variant (*Variant Allele Frequency* ou VAF) que l'on est capable de détecter. La VAF correspond au ratio entre le nombre de lectures de l'allèle variant sur le nombre de lectures totales à une position donnée. Elle est donc le reflet de la proportion de cellules sanguines portant la mutation. On considère que la technique de WGS permet de détecter des mutations dont la VAF est supérieure à 7%, alors que le WES détecte des mutations dont la VAF est supérieure à 3% et qu'un séquençage ciblé permet d'obtenir une sensibilité d'environ 0,5-1%. (12) Notons cependant que des techniques de séquençage ultra-sensibles ont été développées, permettant de détecter des mutations présentes avec des VAF extrêmement faibles.

B. Caractéristiques des mutations associées aux CHIP

Les mutations identifiées au cours des CHIP peuvent affecter de nombreux gènes impliqués dans les hémopathies malignes myéloïdes. Ces mêmes gènes sont parfois retrouvés mutés dans les hémopathies lymphoïdes. Néanmoins, seul un nombre limité de gènes ont été décrits comme mutés de manière récurrente au cours des CHIP (Annexes Tableau S1). Les deux principaux sont *DNMT3A* et *TET2* qui à eux deux rassemblent environ 68% des mutations. *ASXL1* semble être le 3ème gène le plus fréquemment muté dans les CHIP. D'autres gènes sont fréquemment impliqués dans les CHIP comme *CBL*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TP53*, *PPM1D*, *GNB1* et *GNAS* (Figure 2).

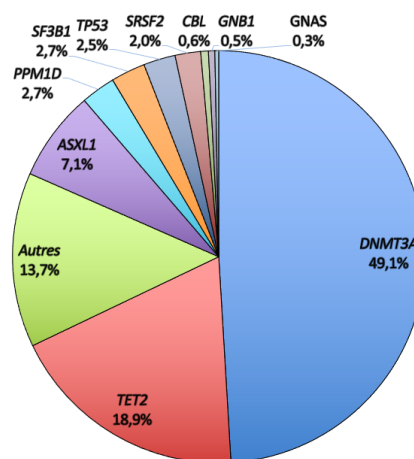


Figure 2 : Liste des mutations et proportions dans les principales cohortes de CHIP

Le diagramme représente les gènes les plus fréquemment retrouvés mutés dans 15 études portant sur l'hématopoïèse clonale. Les mutations de JAK2 ont été exclues. (Genovese 2014, Jaiswal 2014, Xie 2014, Acuna-Hidalgo 2017, Abelson 2018, Jaiswal 2017, McKerrel 2015, Bick 2020, Buscarlet 2017, Fabre 2020, Zink 2017, Dorheimer 2019, Van den Akker 2019, Arends 2018, Cook 2019).

Selon les principales études, dans plus de 90% des cas de CHIP, une seule mutation est détectée. (10) En comparaison, au cours des LAM et des SMD on retrouve fréquemment deux ou plus de deux mutations chez les patients. Chez les porteurs de CHIP, le nombre de mutations par individu semble corrélé avec l'augmentation de l'âge. (11) La VAF médiane est voisine de 10%. (10) La majorité des mutations observées dans les CHIP sont des transitions cytosine vers thymine (C vers T) au niveau exonique. (10,11,13) Ce type de mutation somatique est considéré comme une signature du vieillissement. De plus, les mutations identifiées dans les gènes *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* sont très fréquemment des mutations non-sens, avec décalage du cadre de lecture ou au niveau des sites d'épissage traduisant une tendance à l'apparition d'un codon stop dans la protéine. (11)

Par ailleurs, il a été montré que la présence d'une CHIP est durable dans le temps puisque les mutations sont retrouvées chez un même sujet à plusieurs années d'intervalle. Un des critères pour satisfaire à la définition d'une CHIP pourrait donc être un clone de taille stable ou augmentant avec le temps. (14)

Enfin, les mutations associées aux CHIP apparaissent au niveau d'une CSH ou d'un progéniteur précoce. En effet, ces mutations ont été mises en évidence dans les CSH issues de prélèvements médullaires de sujets porteurs de CHIP et elles sont retrouvées au niveau périphérique dans plusieurs lignages hématopoïétiques. (15,16) Cependant, de façon générale, les VAF semblent plus élevée dans les polynucléaires et les monocytes que dans les lymphocytes suggérant un biais de différenciation myéloïde des cellules mutées. (15,17)

Comme évoqué précédemment, le choix de la technique de séquençage impacte la sensibilité et donc la fréquence de détection de mutations dans une population donnée. Les études de Jaiswal *et al* et de Genovese *et al* rapportent une fréquence de CHIP de l'ordre de 5% à 60 ans, 10% à 70 ans et 20% après 80 ans. L'emploi d'une technique plus sensible, utilisant notamment la technologie des *single-molecule molecular inversion probes* (smMIPs), semble permettre la détection de mutations au niveau des cellules sanguines dans des proportions au moins 2 fois supérieures. (18) A l'extrême, une technique d'*error-corrected sequencing* (ECS) a permis de mettre en évidence une hématopoïèse clonale chez plus de 95% de sujets sains entre 50 et 70 ans. (16) Une illustration de la fréquence de détection des hématopoïèses clonales en fonction de la sensibilité de la technique utilisée est disponible dans la Figure 3. Ainsi, à partir d'un certain âge, la présence de mutations au sein de cellules hématopoïétiques serait détectable de façon quasiment systématique. Néanmoins, dans beaucoup de ces cas les fréquences alléliques mesurées sont inférieures à 2%. La détection d'un clone avec une VAF très faible ou régressant avec le temps reste controversée car elle ne répond pas aux critères de définition des CHIP.

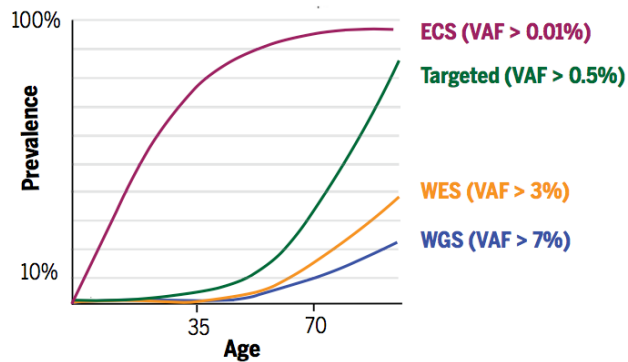


Figure 3 : Prévalence des CHIP détectées selon la technique de séquençage utilisée

Les techniques de WGS, WES, séquençage ciblé et ECS permettent respectivement de détecter des mutations dont la VAF est supérieure à 7%, 3%, 0,5% et 0,01%. La prévalence des CHIP retrouvée dans une population est donc dépendante de la sensibilité de la technique utilisée. WGS : whole-genome sequencing, WES : whole-exome sequencing, targeted : ciblé, ECS : error corrected sequencing, VAF : variant allele frequency. (D'après Jaiswal and Ebert 2019).

Nous nous intéresserons par la suite aux principaux gènes retrouvés mutés dans les CHIP ainsi qu'aux voies moléculaires dans lesquelles ils sont impliqués.

C. Exemples de gènes mutés dans les CHIP

1. Rappels sur les mécanismes de régulation de l'expression génique et du maintien de l'intégrité génomique

A chaque étape de l'hématopoïèse, une régulation stricte de l'expression des gènes est nécessaire. Toute dérégulation de l'expression des gènes qui contrôlent l'hématopoïèse peut en effet conduire au développement d'hémopathies malignes.

Au sein du génome nucléaire humain, les molécules d'ADN s'enroulent autour d'une structure constituée de 8 histones (H2A, H2B, H3 et H4, chacune en double exemplaire). Cette structure cylindrique appelée « *core histone* » associée à l'ADN constitue un nucléosome, la première unité de compaction de l'ADN. Deux autres histones dites « de liaison » (H1 et H5) assurent la bonne compaction de la structure. Les nucléosomes disposés les uns à la suite des autres forment une structure en « collier de perles » appelée euchromatine. Celle-ci correspond à un état actif de l'ADN, permettant l'expression des gènes. Les nucléosomes peuvent ensuite se replier davantage les uns sur les autres pour former des fibres d'hétérochromatine, correspondant à un état inactif de l'ADN (les gènes étant compactés, ils ne sont pas exprimés). L'hétérochromatine peut à son tour former des boucles qui se compactent pour donner des fibres encore plus épaisses formant les chromatides et les chromosomes (Figure 4).

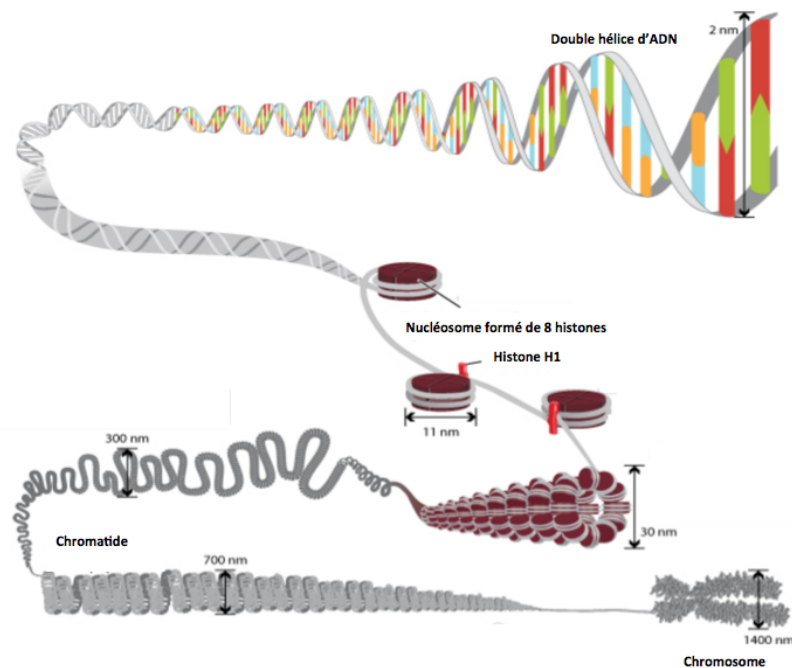


Figure 4 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN

L'hélice double brin d'ADN s'enroule autour de protéines, les histones, pour former des nucléosomes. Chaque nucléosome est formé de 8 protéines d'histones ((H2A, H2B, H3 et H4, chacune en double exemplaire) entourées d'ADN. Les histones de liaison H1 et H5 assurent la liaison des nucléosomes entre eux. Les nucléosomes se replient les uns sur les autres pour former les fibres de chromatine. Ces fibres vont continuer à se replier et s'épaissir formant ainsi la chromatide puis les chromosomes, dernier niveau de compaction de l'ADN. (Adapté d'après Annunziato 2008).

La régulation de l'expression des gènes au niveau de l'ADN fait intervenir des mécanismes épigénétiques. Pour qu'un gène soit exprimé, sa séquence d'ADN doit pouvoir être transcrite en ARNm. Les mécanismes épigénétiques ne modifient pas la séquence d'ADN mais ils influent sur l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN qui dépend du niveau de compaction de la chromatine et de son état d'encombrement stérique. Il est important de noter que ces mécanismes de régulation épigénétiques sont réversibles : le niveau d'expression des gènes est donc variable à un temps et/ou une condition donnés.

Le niveau de compaction de la chromatine est modulé en partie par les modifications post-traductionnelles affectant les histones. Il s'agit d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation en encore d'ubiquitination. Par exemple, l'acétylation des histones maintient la chromatine en position ouverte accessible aux facteurs de transcription alors que la désacétylation des histones maintient la chromatine en position fermée, inaccessible pour la transcription des gènes (Figure 5).

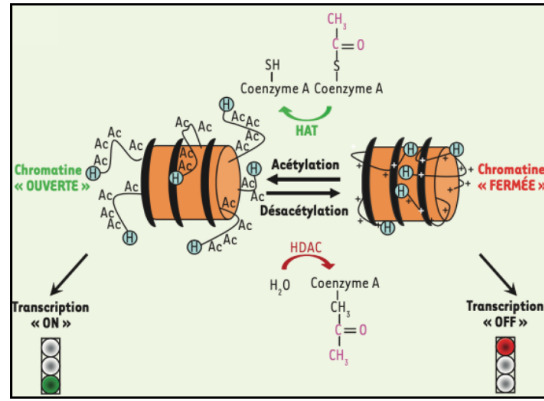


Figure 5 : Acétylation et désacétylation des histones

La régulation de l'expression des gènes au niveau de l'ADN fait intervenir une histone désacétylase (HDAC) capable de catalyser la désacétylation des histones. Les histones désacétylés maintiennent la chromatine en position fermée inaccessible pour la transcription des gènes. A l'inverse, les histones acétylés grâce à l'action de l'histone acétyltransférase (HAT) maintiennent la chromatine en position ouverte accessible pour la transcription des gènes. (D'après Mottet 2008).

Par ailleurs, des phénomènes de méthylation de l'ADN diminuent son accessibilité aux facteurs de transcriptions et participent à diminuer l'expression des gènes.

Au niveau post-transcriptionnel, la régulation de l'expression des gènes fait intervenir un phénomène d'épissage (Figure 6). Ainsi, après la transcription, l'ARN pré-messager mature en ARN messager. Cette maturation des ARN consiste en l'excision des introns, c'est à dire des parties non codantes des gènes, grâce à une machinerie d'épissage appelée complexe du spliceosome. Au cours de ce phénomène, un épissage alternatif peut être réalisé. Certains exons sont conservés mais d'autres peuvent être éliminés, permettant d'obtenir à partir d'un même ARN pré-messager différentes isoformes d'ARNm codant pour des protéines différentes. Ce phénomène intéresse plus de 60% des gènes humains.

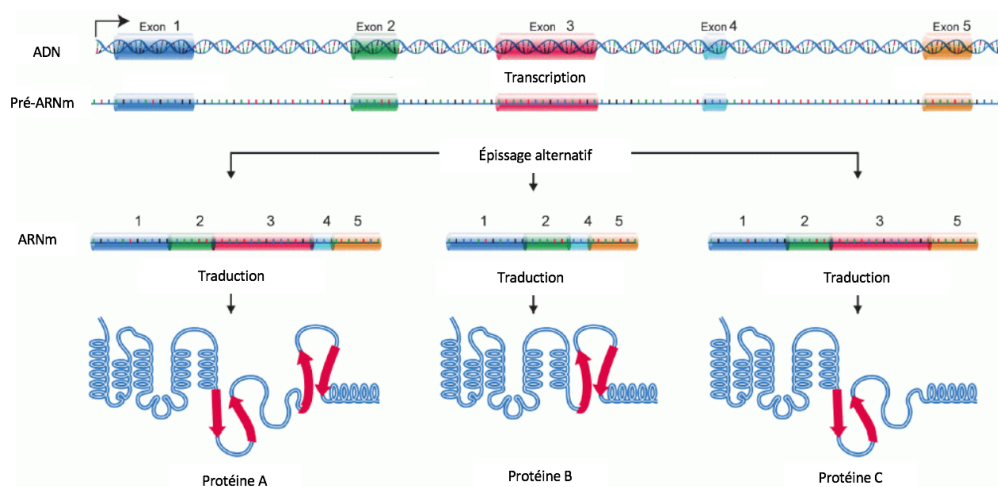


Figure 6 : Le phénomène d'épissage

L'ADN est transcrit en pré-ARN messenger (pré-ARNm). Ce pré-ARNm mature en ARNm par un phénomène d'épissage permettant d'exciser les introns (parties non codantes de l'ADN) et de rapprocher les exons (parties codantes de l'ADN). Un épissage alternatif, consistant à conserver ou éliminer certains exons aboutit à l'obtention de différentes isoformes d'ARNm à partir du même pré-ARNm. Selon l'isoforme formée, la protéine obtenue par traduction sera différente. (Adapté d'après https://en.wikipedia.org/wiki/Alternative_splicing 2020).

Enfin, l'intégrité de l'information génétique est capitale pour éviter l'acquisition d'altérations génétiques délétères favorisant le processus de leucémogénèse. Il existe ainsi des facteurs de transcription, dont TP53 (*Tumor Protein 53*) régulant l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose (mécanisme de mort cellulaire programmée). L'activation de TP53 suite à une cassure de l'ADN déclenche un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN ou à défaut si la réparation est impossible, l'activation de la voie de l'apoptose. Une boucle de rétrocontrôle fait intervenir la phosphatase PPM1D (*Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D*). Ainsi l'activation de TP53 induit l'expression de PPM1D qui elle même déphosphoryle la protéine TP53, inhibant notamment l'apoptose induite par TP53 (Figure 7).

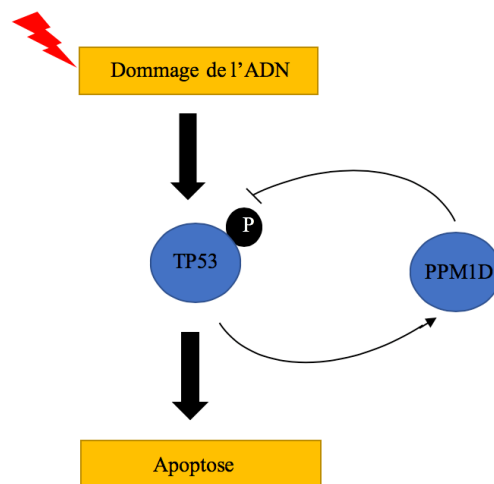


Figure 7 : Régulation de l'apoptose via TP53 et PPM1D

La protéine TP53 est activée par phosphorylation suite à un dommage au niveau de l'ADN. Son activation conduit à l'apoptose de la cellule incapable de réparer les dommages. Une boucle de rétrocontrôle fait intervenir la phosphatase PPM1D qui en déphosphorylant TP53 inhibe l'apoptose induite par TP53.

2. Gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN

Le phénomène de méthylation de l'ADN a lieu notamment au niveau des résidus cytosines des dinucléotides CpG (doublets répétitifs de cytosine et guanine). Les dinucléotides CpG représentent 1 à 4% de l'ADN génomique et environ 75% d'entre eux sont méthylés dans des conditions physiologiques. La plupart sont regroupés au niveau d'ilots CpG, eux-mêmes retrouvés dans des régions promotrices situées en amont des gènes et contrôlant leur niveau d'expression. La méthylation est souvent associée à une répression de l'expression du gène situé en aval. Ce processus met en jeu différentes enzymes, au

premier rang desquelles les DNMT (*DNA Methyl Transferase*). Le cycle de méthylation-déméthylation de l'ADN fait également intervenir une autre enzyme TET2 (*Ten Eleven Translocation 2*). (Figure 8)

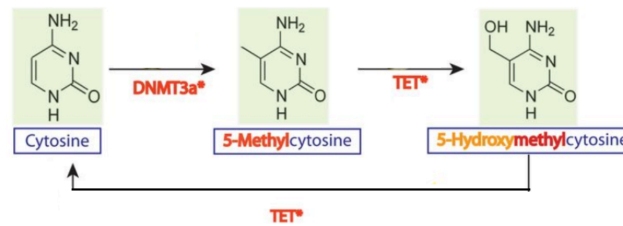


Figure 8 : Cycle de méthylation-déméthylation des cytosines.

La cytosine est méthyliée en 5-méthylcytosine par l'action d'une ADN methyl transferase, DNMT3A. A l'inverse, l'enzyme TET2 catalyse la transformation de 5-méthylcytosine en 5-Hydroxyméthylcytosine aboutissant à une déméthylation de la cytosine qui revient à son état initial. (Adapté d'après Shih 2012).

a. DNMT3A

Le gène *DNMT3A*, situé sur le chromosome 2, code pour l'ADN méthyltransférase 3 qui catalyse l'ajout d'un groupement méthyle sur les résidus cytosine. Les mutations de *DNMT3A* font parties des 3 mutations les plus fréquemment retrouvées chez les sujets atteints de LAM. (19) Elles ont été décrites dans environ 30% des LAM *de novo* à caryotype normal et sont associées à un mauvais pronostic. (20) Les mutations de *DNMT3A* sont également décrites dans des cas de LAM secondaires, de SMD, de SMP ou encore dans certains lymphomes T. (21–25)

Ces mutations sont principalement de type faux-sens, affectant le plus souvent l'acide aminé R882 (plus de 50% des cas) au niveau de l'exon 23 appartenant au domaine méthyltransférase de *DNMT3A*. D'autres mutations faux-sens ont été décrites, ainsi que des délétions avec décalage du cadre de lecture, des mutations non-sens et des mutations au niveau des sites d'épissage (Figure 9).

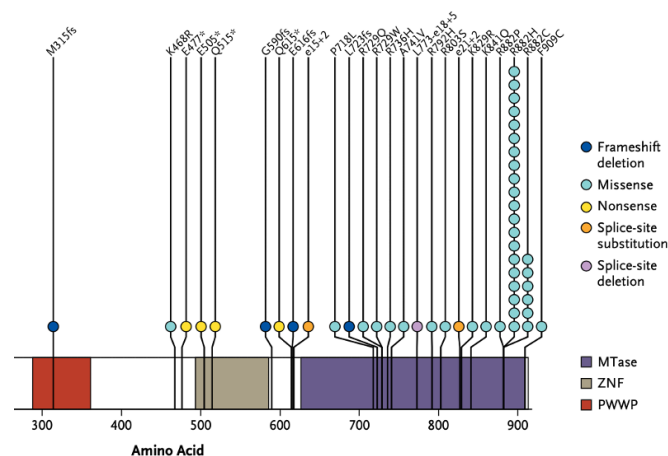


Figure 9 : Mutations du gène *DNMT3A* chez 188 patients atteints de LAM

Les principales mutations décrites de DNMT3A sont des mutations faux-sens (missense) affectant l'arginine en position 882 appartenant au domaine méthyltransférase. Les autres mutations décrites sont des délétions avec décalage du cadre de lecture (frameshift deletion), des mutations non-sens (nonsense) ou des substitutions/délétions au niveau des sites d'épissage (splice-site substitution/deletion). MTase : méthyl transférase, ZNF : zinc finger, PWWP : proline-tryptophan-tryptophan-proline. (D'après Ley 2010).

Les mutations de DNMT3A affectant le domaine méthyltransférase sont associées à une altération de l'activité enzymatique de DNMT3A conduisant à la modification des profils de méthylation de certaines régions génomiques. De même, les mutations non-sens ou avec décalage du cadre de lecture aboutissent à la production d'une protéine au domaine méthyltransférase tronqué, donc à une perte de l'activité enzymatique. (20)

b. TET2

Le gène TET2 (*Ten Eleven Translocation 2*), situé sur le chromosome 4, code pour une dioxygénase dépendante de l'alpha-cétoglutarate. Elle catalyse la conversion de la 5 méthyl-cytosine en 5-hydroxy-méthyl-cytosine induisant une déméthylation de l'ADN. Les mutations de TET2 sont retrouvées dans environ 25% des LAM *de novo* à caryotype normal et des SMD, avec un impact pronostic encore controversé. (26,27) Elles ont été décrites dans des cas de LAM secondaires, de SMP, de SMD et syndromes frontières comme la leucémie myéломocyttaire chronique ou LMMC (jusqu'à 50% des cas) mais également dans des hémopathies lymphoïdes à type lymphomes B ou T. (7,28,29)

Les mutations de TET2 peuvent affecter quasiment tous les exons du gène. Il faut toutefois distinguer les mutations faux-sens des mutations aboutissant à une protéine tronquée. Les mutations faux-sens peuvent affecter des domaines importants et conservés (*conserved domain* ou CD) au cours de l'évolution : CD1 et CD2. Les mutations non-sens et les délétions ou insertions avec décalage du cadre de lecture ainsi que les mutations au niveau des sites d'épissage peuvent quant à elles être observées à n'importe endroit du gène (Figure 10).

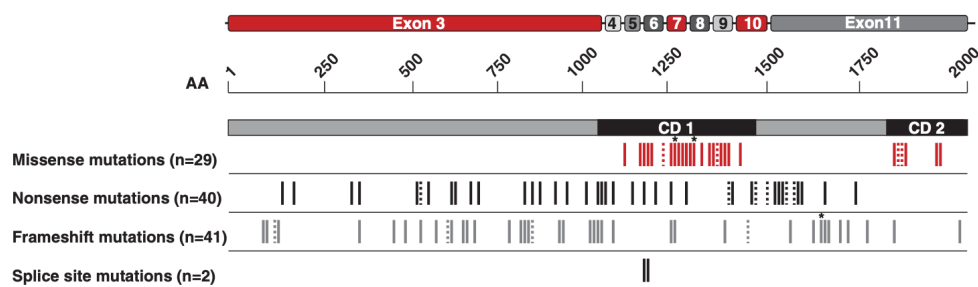


Figure 10 : Mutations du gène TET2

Les principales mutations décrites de TET2 sont des mutations ponctuelles au niveau des exons 3 à 11. Les mutations faux-sens (missense mutations) sont retrouvées au niveau de deux domaines importants et conservés au cours de l'évolution : CD1 et CD2. Les autres mutations décrites sont des mutations ponctuelles non-sens (nonsense mutations), des mutations avec décalage du cadre de lecture (frameshift mutations) ou des mutations au niveau des sites d'épissage (splice site mutations). CD : conserved domain, aa : amino acid. (D'après Weissmann 2012).

Les mutations de *TET2* sont associées à une perte de fonction de l'enzyme, aboutissant à une hyperméthylation anormale de l'ADN (30) en lien avec une diminution de la formation de 5-hydroxyméthyl-cytosine. (31)

3. Gènes impliqués dans les modifications des histones

a. *ASXL1*

Le gène *ASXL1* (*Additional Sex Combs like*), situé sur le chromosome 20, code pour une protéine du groupe polycomb (*polycomb-group proteins* ou PcG). Les PcG regroupées au sein de complexes protéiques, *polycomb repressive complex 1* et 2 (PRC1 et 2) ou *polycomb repressive deubiquitinase* (PR-DUB), sont impliquées dans la répression de l'expression des gènes *via* des modifications post-traductionnelles affectant les histones. (32)

Les mutations d'*ASXL1* sont fréquentes dans la LMMC et les SMP. On les retrouve également dans les SDM, les LAM secondaires et plus rarement dans les LAM *de novo*. Elles sont plus fréquentes chez les hommes et les sujets âgés et sont associées à un pronostic péjoratif. (33–36) En ce sens, la présence d'une mutation d'*ASXL1* est un critère de mauvais pronostic selon la classification ELN (*European Leukemia Net*) 2017 relative aux LAM.

Il s'agit de mutations de type insertion/délétion avec décalage du cadre de lecture (74,1% des cas) ou mutation non-sens (20,7 % des cas) survenant le plus souvent dans le dernier exon du gène (Figure 11). Elles entraînent donc l'apparition prématurée d'un codon stop conduisant à une forme tronquée de la protéine. La mutation la plus fréquemment observée (50% des cas) est une duplication de guanine 1934 (c.1934dup) conduisant à un décalage du cadre de lecture (p. Gly646Trpfs*12). La pathogénicité des mutations faux sens reste controversée. (37)

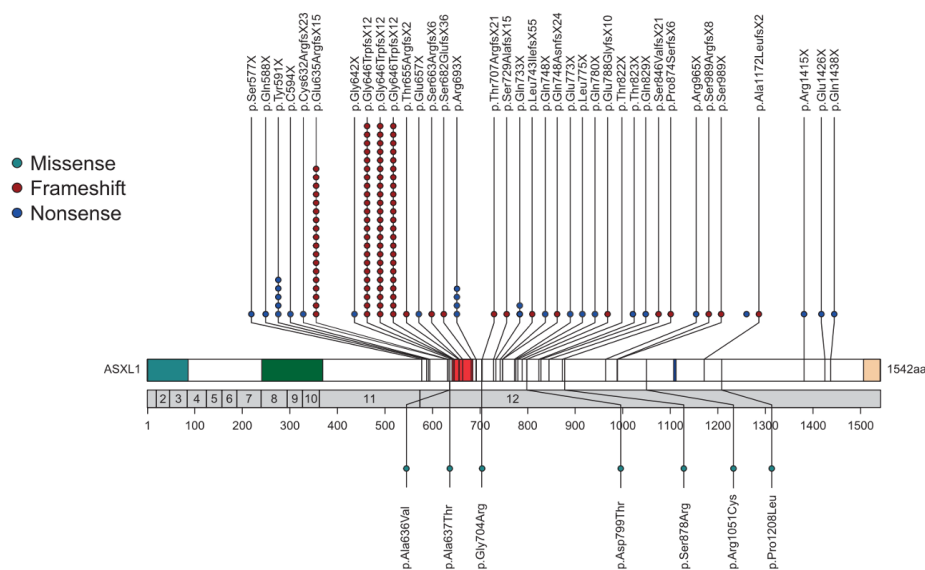


Figure 11 : Mutations du gène *ASXL1*

La plupart des mutations décrites d'*ASXL1* sont des mutations avec décalage du cadre de lecture (frameshift, en rouge) ou des mutations non-sens (nonsense, en bleu). La pathogénicité des mutations faux-sens (missense, en vert) reste controversée. (D'après Schnittger 2013).

Il semble que les mutations d'*ASXL1* soient associées à des altérations au niveau des modifications épigénétiques affectant les histones à l'origine d'un défaut de répression de l'expression génique. (32)

4. Gènes codant des facteurs de la machinerie d'épissage des ARNm

Le complexe du spliceosome, machinerie d'épissage des ARNm, est formé par l'association de riboprotéines snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*), avec d'autres protéines telles que SRSF2, U2AF1, ZRSR2 et SF3B1. Le phénomène d'épissage est initié par un recrutement bien ordonné de ces différentes protéines. Schématiquement, la riboprotéine U1-snRNP se fixe sur le pré-ARNm à une séquence GU située à l'extrémité 5' de l'intron. Au niveau 3', il y a interaction entre les protéines U2AF (*U2 auxiliary factor*), SRSF2 (*Serine/arginine Rich Splicing Factor 2*) et ZRSR2 (*Zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and Serine/arginine Rich 2*). Le complexe ainsi formé permet le recrutement de la riboprotéine U2-snRNP liée aux protéines SF3A1 (*Splicing factor 3A subunit 1*) et SF3B1 (*Splicing factor 3B subunit 1*), ces dernières facilitant l'ancrage de U2-snRNP au pré-ARNm (Figure 12A.). Ainsi, U2-snRNP se fixe à une séquence AG à l'extrémité 3' de l'intron. A partir de ce complexe A, et grâce au recrutement de nouvelles protéines formant les complexes B et C, l'intron est excisé puis les exons soudés entre eux par réactions de trans-estérifications (Figure 12B.).

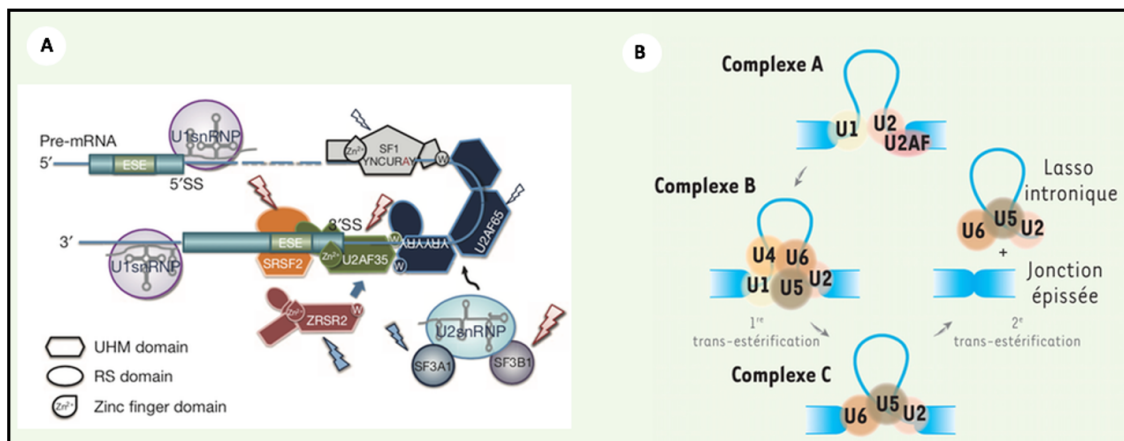


Figure 12 : Le spliceosome, machinerie d'épissage des ARNm

A. L'épissage de l'ARNm est initié par le recrutement de U1-snRNP au niveau 5' de l'intron. Au niveau 3' le recrutement des protéines constituant le spliceosome se fait selon un ordre bien défini : recrutement de U2AF qui interagit avec SRSF2 (fixé au niveau de l'exon adjacent) et ZRSR2 puis recrutement de U2-snRNP lié à SF3A1 et SF3B1. B. Le complexe A est formé, entre autres, par U1-snRNP, U2-snRNP et U2AF. Le recrutement de nouvelles protéines dont U4-snRNP, U5-snRNP et U6-snRNP aboutit à la formation des complexes B et C capables d'induire des réactions de trans-estérifications à l'origine de l'épissage des introns et de la soudure des exons. (Adapté d'après Yoshida 2011 et Dujardin 2016).

Les mutations touchant les facteurs du spliceosome aboutissent à la synthèse de facteurs dont les fonctions d'épissage des ARNm sont altérées. Cela entraîne l'accumulation de transcrits mal épissés et donc la synthèse de protéines non fonctionnelles.

a. *SRSF2*

Les mutations du gène *SRSF2*, situé sur le chromosome 17, sont retrouvées dans 12,4% des SMD et sont de mauvais pronostic, associées à une survie globale plus courte. (38) Elles ont été décrites dans 32% des cas de LMMC (39) ainsi que dans des cas de LAM secondaire au traitement ou de LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies. Ces mutations ne sont cependant que rarement retrouvées dans les LAM *de novo* et les SMP. (40)

Parmi les mutations identifiées, le codon 95 au niveau de l'exon 1 est le site de mutations ponctuelles et constitue un point chaud mutationnel (Figure 13).

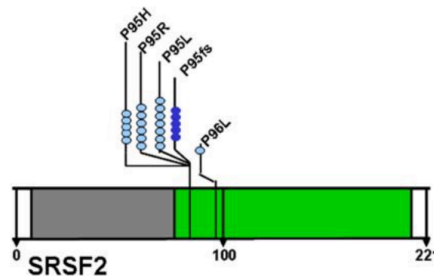


Figure 13 : Mutations du gène *SRSF2*

Les principales mutations décrites de *SRSF2* sont des mutations ponctuelles de la proline en position 95 au niveau de l'exon 1. (D'après Thol 2012).

b. *SF3B1*

Les mutations du gène *SF3B1*, situé sur le chromosome 2, sont retrouvées dans les néoplasies myéloïdes à type de SMD, de syndromes frontières comme la LMMC ou encore dans les LAM. (38,40) A noter que ces mutations sont retrouvées dans plus de 80% des SMD avec dysplasie unilignée et sidéroblastes en couronne (SMD-RS, *ring sideroblast*) ou des SMD/SMP-RS-T (syndrome frontière SMD/SMP avec présence de sidéroblastes en couronne et thrombocytose persistante) qui sont des néoplasies myéloïdes plutôt favorables associées à un faible risque de progression. (41) Au contraire dans la LLC, les mutations de *SF3B1* sont associées à un mauvais pronostic. (42)

Il s'agit essentiellement de mutations ponctuelles de type faux-sens touchant les exons 13 à 16. Deux points chaud mutationnels ressortent : les lysines 666 et 700 au niveau de l'exon 15 (Figure 14).

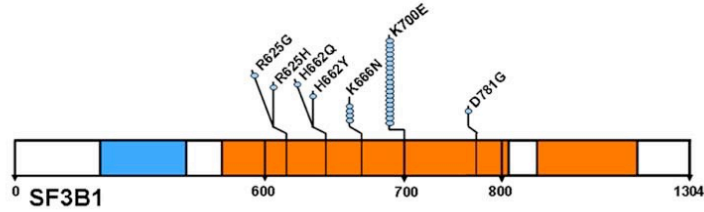


Figure 14 : Mutations du gène SF3B1

Les principales mutations décrites de SF3B1 sont des mutations faux-sens touchant les lysines en position 666 et 700. (D'après Thol 2012).

5. Gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'ADN

a. TP53

Le gène TP53, situé sur le chromosome 17, est un gène suppresseur de tumeur. Les mutations de TP53 sont retrouvées au cours des SMD, SMP et LAM (jusqu'à 60% des cas de LAM à caryotype complexe mais aussi au cours des LLC. (43-46) Dans les hémopathies malignes, mais également dans les cancers solides où elles sont fréquemment retrouvées, les mutations de TP53 sont généralement associées à un mauvais pronostic. (46,47) Ainsi, la présence d'une mutation de TP53 est un critère de mauvais pronostic selon la classification ELN 2017 des LAM. Les mutations de TP53 sont également associées à une diminution de la survie globale dans les SMD et à la transformation des SMP en LAM. (43,44)

La majorité des mutations de TP53 sont localisées dans la séquence de liaison à l'ADN, correspondant aux exons 5 à 8. Le plus souvent, il s'agit de mutations faux-sens, bien que des mutations de type délétion/insertion ou non-sens et des mutations au niveau des sites d'épissage soient également décrites (Figure 15).

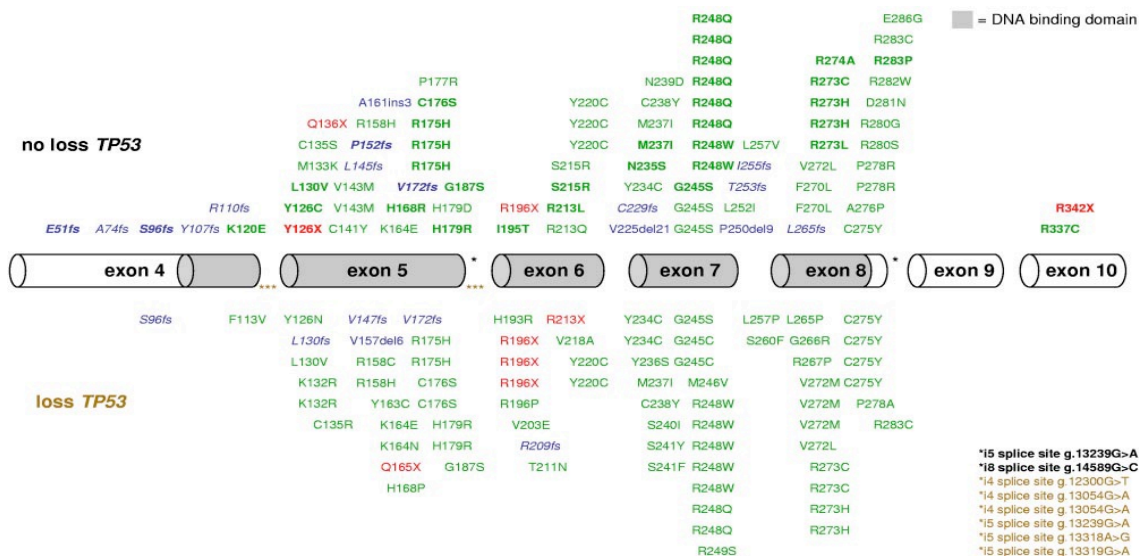


Figure 15 : Mutations du gène TP53

Les mutations de TP53 sont généralement localisées entre les exons 5 à 8 dans une région codant pour le domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain). Dans la grande majorité des cas, il s'agit de mutations ponctuelles faux-sens. (D'après Rucker 2012).

Les mutations de TP53 conduisent à une perte de l'activité transcriptionnelle de TP53 par défaut de liaison à l'ADN des séquences régulatrices des gènes cibles. TP53 n'intervient donc plus en tant que gène suppresseur de tumeur. Par ailleurs, certaines mutations gain-de-fonction de TP53 ont été décrites et permettraient l'acquisition de fonctions oncogéniques. (48)

b. PPM1D

Le gène PPM1D, situé sur le chromosome 17, code une phosphatase qui régule l'activité de TP53. Les mutations de PPM1D sont retrouvées dans 20% des néoplasies myéloïdes secondairement à une exposition aux chimiothérapies (LAM-t et SDM-t). (49) Elles affectent toujours le dernier exon du gène (exon 6) et correspondent à des mutations non-sens ou des insertions/délétions avec décalage du cadre de lecture (Figure 16).

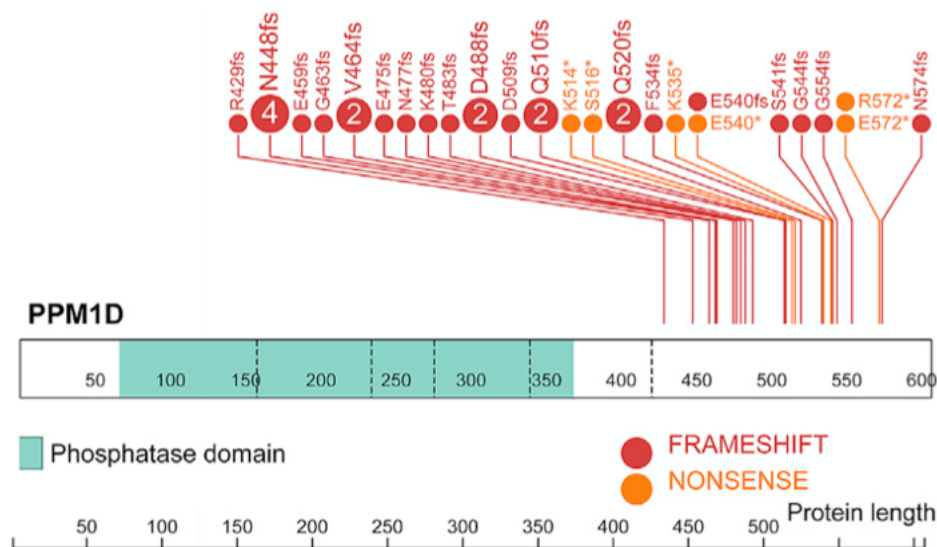


Figure 16 : Mutations du gène PPM1D

Les mutations de PPM1D correspondent à des insertions/délétions avec décalage du cadre de lecture (frameshift) ou à des mutations non-sens (nonsense) au niveau du dernier exon du gène. (D'après Hsu 2018).

Ces mutations aboutissent donc à la production d'une protéine tronquée au niveau C-terminal. Cela entraîne une surexpression de la protéine par augmentation de sa stabilité par défaut d'élimination. PPM1D étant sur-exprimée, celle-ci va exercer son activité répressive de TP53 et donc limiter l'apoptose induite par cette dernière.

6. Gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire

Différentes mutations affectant des facteurs impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire ont été décrites au cours des CHIP. Parmi les plus fréquentes, nous développerons les mutations affectant l'ubiquitine-ligase CBL (*Casitas B cell Lymphoma*), et les gènes codant pour les sous-unités de la protéine G, *GNBI* (*Guanine Nucleotide-Binding protein subunit beta-1*) et *GNAS* (*Guanine Nucleotide binding protein α -subunit, Stimulating*).

a. CBL

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en la fixation covalente d'une ou de plusieurs molécules d'ubiquitine sur une protéine substrat destinée à être dégradée. Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce processus dont les membres de la famille des E3 ligase à laquelle appartient CBL. CBL permet la fixation de molécules d'ubiquitine sur des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), déclenchant ainsi leur internalisation au niveau cytoplasmique et leur dégradation par le protéasome (Figure 17).

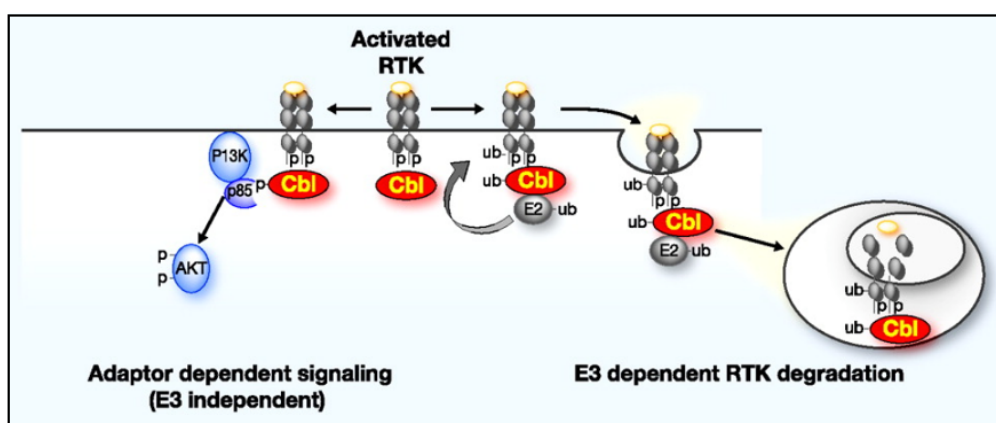


Figure 17 : Rôle de CBL dans les voies de signalisations intracellulaires

CBL (enzyme membre de la famille des E3 ligases) permet la liaison d'une ubiquitine aux récepteurs à activités tyrosine-kinase (RTK). Le RTK est ensuite internalisé au niveau cytoplasmique puis dégradé. Indépendamment de cette activité E3 ligase, CBL joue un rôle d'adaptateur entre le RTK activé par fixation d'un ligand et la voie de prolifération PI3Kinase/AKT. (D'après Kales 2010).

Le gène *CBL*, situé sur le chromosome 11, agit donc comme un gène suppresseur de tumeur en régulant négativement l'expression des RTK et en atténuant le signal de prolifération induit par ces récepteurs.

Des mutations de *CBL* ont été décrites dans les LAM *de novo* (notamment LAM CBF ou *Core Binding Factor acute myeloid leukemia* regroupant les LAM avec translocation t(8 ;21), t(16,16) ou inversion du chromosome 16 inv(16)), (50) dans les LAM secondaires, dans les SMP, les syndromes frontières à type de LMMC ou encore les SMD. Dans ces hémopathies myéloïdes la détection d'une mutation de *CBL* est associée à un mauvais pronostic. (51,52)

La protéine CBL est constituée d'un domaine de liaison aux tyrosine kinases, d'un domaine RING-Finger (RF) catalysant la fixation de la molécule d'ubiquitine au RTK et d'un domaine *linker* reliant ces 2 parties. Les mutations, généralement de type faux-sens, sont retrouvées dans les exons 7 à 9 au niveau des domaines *linker* et RF. Des délétions/insertions ou des mutations des sites d'épissage ont également été décrites (Figure 18). (51)

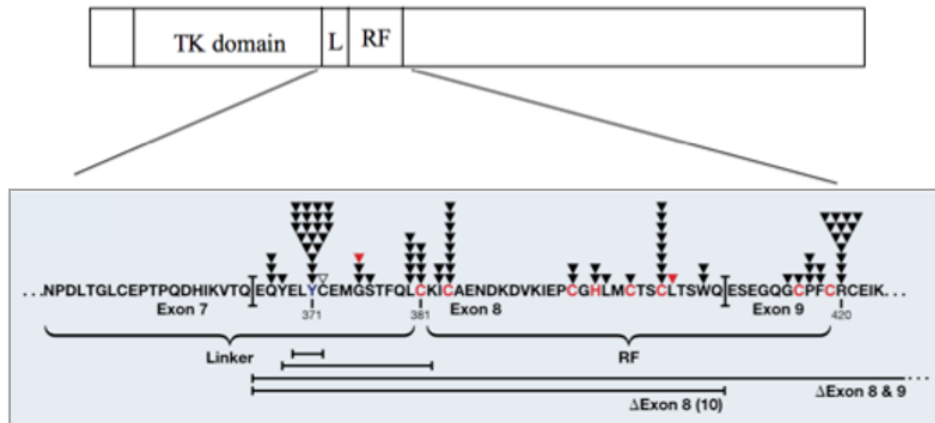


Figure 18 : Mutations du gène CBL identifiées dans les hémopathies myéloïdes

Les mutations de CBL sont généralement retrouvées dans les exons 7 à 9 au niveau des domaines *linker* et RF. Les flèches noires indiquent des mutations de type faux-sens, les flèches rouges des mutations avec décalages du cadre de lecture, les flèches vides des insertions et les délétions sont représentées entre parenthèses. En rouge les acides aminés zinc-coordonateurs et en bleu le point chaud mutationnel Y371. TK: Tyrosine-Kinase, L : Linker, RF : RING-Finger. (D'après Kales 2010).

Ces mutations sont considérées d'une part comme des mutations inactivatrices entraînant un défaut d'ubiquitination des RTK. L'activité des RTK n'étant plus modulée négativement, cela confère aux cellules un avantage prolifératif. Mais ces mutations confèrent d'autre part, des propriétés oncogéniques à CBL. En effet, lorsque CBL est mutée, elle active la voie de prolifération PI3kinase/AKT et ce même en absence d'activation du RTK par fixation de son ligand (Figure 17). (51)

b. GNBI et GNAS

Les gènes *GNBI* et *GNAS* codent pour des sous-unités de la protéine G (protéine *Guanine nucleotide-binding*), protéine hétérotrimérique, indispensable à l'activation de certaines voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), via différents effecteurs intracellulaires (Figure 19).

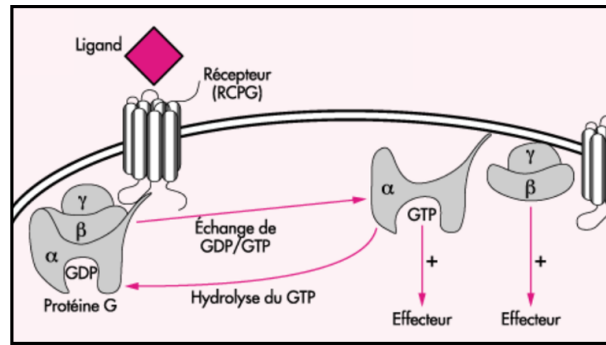


Figure 19 : Les différentes sous-unités de la protéine G

La fixation d'un ligand au récepteur couplé à la protéine G (RCPG) modifie la conformation du récepteur qui devient alors capable de fixer la protéine G. L'échange du GDP par du GTP provoque la dissociation de la sous-unité α et des sous-unités β et γ . Ces sous-unités sont impliquées dans l'activation d'effecteurs et de voies de signalisation intracellulaire. (D'après Hermouet 2000).

Le gène *GNBI*, situé sur le chromosome 1, code pour la sous-unité bêta de la protéine G. Des mutations faux-sens de *GNBI* ont été décrites avec deux points chauds mutationnels : la lysine en position 57 (dans les hémopathies myéloïdes) et l'isoleucine en position 80 (dans les hémopathies lymphoïdes) (Figure 20). (53)

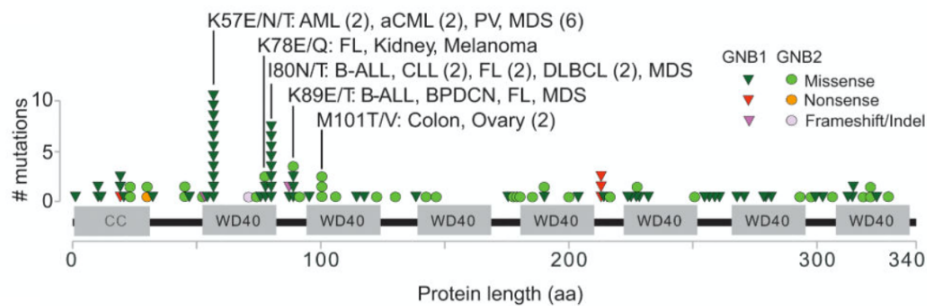


Figure 20 : Mutations du gène *GNBI*

Les principales mutations de *GNBI* identifiées dans les hémopathies malignes sont des mutations faux sens (missense) au niveau de la lysine en position 57 pour les hémopathies myéloïdes (LAM, SMP, SMD) et de l'isoleucine en position 80 pour les hémopathies lymphoïdes (LAL B, SLP). AML : LAM, aCML : leucémie myéloïde chronique atypique, PV : polyglobulie de Vaquez, MDS : SMD, B-ALL : LAL B, CLL : LLC, FL : lymphome folliculaire, DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules. (D'après Yoda 2015).

Les mutations de *GNBI* entraînent une activation constitutive des voies de signalisation dans lesquelles cette protéine est impliquée (PI3Kinase/AKT et MAPKinase), conférant aux cellules qui la portent une capacité de prolifération indépendante de la stimulation par les cytokines.

Le gène *GNAS*, situé sur le chromosome 20, code pour la sous-unité alpha de la protéine G. Des mutations faux-sens de *GNAS* ont été décrites dans les SMD au niveau du codon R201 (Figure 21). (43)

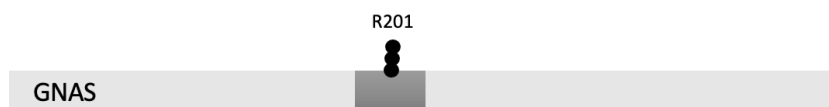


Figure 21 : Mutations du gène GNAS

Dans les SMD, Bejar et al ont décrits des mutations de GNAS au niveau de l'arginine en position 201.

Ce sont des mutations activatrices qui touchent une arginine située dans le domaine de liaison au GDP (guanosine diphosphate)/GTP (guanosine triphosphate). Le défaut d'hydrolyse du GTP qui en résulte aboutit à une activation constitutive de la sous-unité alpha et des voies de signalisation sous-jacentes. (54,55)

D. Mutations compatibles avec la définition de CHIP

Les mutations identifiées au cours des CHIP favorisent l'expansion clonale et la dominance de la CSH mutée au sein de l'hématopoïèse. Plusieurs mécanismes permettant d'expliquer ce phénomène sont résumés ci-après.

Les mutations affectant les régulateurs épigénétiques (comme *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) ou les facteurs de l'épissage des ARNm (comme *SF3B1* et *SRSF2*) confèrent un avantage en terme d'autorenouveau aux CSH. En effet, en perturbant la méthylation des gènes impliqués dans l'autorenouveau et la différenciation, les mutations de *DNMT3A* perturbent donc leur expression. Il a été montré que ce mécanisme conférait aux CSH invalidées pour *DNMT3A* un avantage d'autorenouveau. (56) De la même façon, des modèles murins ont permis de mettre en évidence que la perte de fonction de *TET2* conférait un avantage d'autorenouveau aux CSH mutées, favorisant le développement d'hémopathies myéloïdes. (57,58) Enfin, *ASXL1* mutée pourrait coopérer avec *BAP1* (membre du complexe PR-DUB) pour désubiquitinyler et activer le gène *AKT* (protéine kinase B). Un modèle murin suggère en effet que l'avantage prolifératif des CSH mutées pour *ASXL1* soit expliqué par l'activation de la voie *AKT/mTOR* (*mammalian target of rapamycin*). (59) D'autre part, les mutations touchant le complexe du spliceosome entraîneraient des anomalies d'épissage d'ARNm et donc d'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse. (60–62) Par ailleurs, du fait de l'épissage alternatif des transcrits, ces mutations pourraient accroître l'hétérogénéité épigénétique permettant la sélection du clone présentant le plus d'avantages. (63)

Les mutations touchant les gènes régulateurs de l'apoptose (*TP53* et *PPMD1*) ne confèrent pas d'avantage prolifératif dans des conditions basales mais permettent, au sein de la niche hématopoïétique, la survie du clone muté dans un contexte de stress (chimiothérapie). Dans ces conditions, les cellules non mutées subissent au contraire une apoptose massive. Ceci explique que ces mutations soient principalement retrouvées chez des patients avec antécédents de traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie. (49,64)

Enfin, les mutations touchant les gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire (comme *CBL*, *GNBI* et *GNAS*) confèrent un avantage de prolifération à l'origine d'une forte expansion des cellules mutées qui prennent alors le pas sur les cellules non mutées.

Comme énoncé précédemment, les CHIP sont définies par l'existence de mutations somatiques acquises au niveau des cellules hématopoïétiques en absence de toute hémopathie. Considérant ceci, il apparaît que toutes les mutations ne peuvent pas entrer dans cette définition. Certaines mutations sont fortement associées au développement d'une leucémie et ne sont donc pas compatibles avec l'absence d'hémopathie qui caractérise les CHIP. Ainsi, la définition de *JAK2V617F* en tant que mutation identifiable dans les CHIP est controversée. (65) Ainsi, on sait depuis longtemps qu'il est possible de détecter cette mutation chez des patients sains. Toutefois, dans ces situations, le clone détecté est généralement de petite taille (inférieur ou autour de 1%) et peut rester stable pendant de nombreuses années. (66–69) Lorsque la mutation *JAK2V617F* est retrouvée à un taux significatif avec une VAF supérieure à 2% (définition d'une CHIP), alors la situation est complètement différente et le diagnostic de CHIP doit être remis en cause. (67) En effet, contrairement aux mutations précédemment évoquées, la mutation *JAK2V617F* est capable d'induire une hémopathie maligne, (70) y compris en absence de toute autre mutation additionnelle. (71) La détection d'une mutation *JAK2V617F* avec une VAF > 2% chez un individu sans anomalie de la NFS serait donc plutôt à rattacher au stade précoce d'un SMP.

III. Complications associées aux CHIP

Chez les porteurs de CHIP, il a été montré une augmentation de 1,4 fois de la mortalité toutes causes confondues. (10,11) Celle-ci est liée d'une part au développement d'hémopathies malignes et d'autre part, et de façon plus inattendue, à un risque accru d'accidents cardiovasculaires.

A. Hémopathies malignes

La présence d'une CHIP est associée à un risque accru de transformation en hémopathie maligne évalué entre 0,5 à 1% par an (Figure 22). (8,10,11) Cette incidence d'évolution est superposable au risque d'évolution des MGUS en myélome et des MBL en LLC. Le risque relatif d'évolution en hémopathie maligne est ainsi au moins 11 fois supérieur chez les patients porteurs de CHIP comparativement aux autres personnes. (10,11) En ne considérant que les patients pour lesquels la VAF de la mutation retrouvée est supérieure à 10%, ce risque est même 50 fois supérieur à celui de la population générale. Une étude a récemment confirmé la relation entre la taille du clone et le risque d'évolution vers une hémopathie maligne, montrant que les sujets présentant un clone de petite taille sont moins à risque d'évolution vers une LAM. (72) Dans la majorité des cas, les patients porteurs de CHIP développent des hémopathies myéloïdes mais des cas d'hémopathies lymphoïdes ont également été décrits. Malgré tout, le risque de progression reste faible, de l'ordre de 4% des sujets porteurs d'une CHIP. (10)

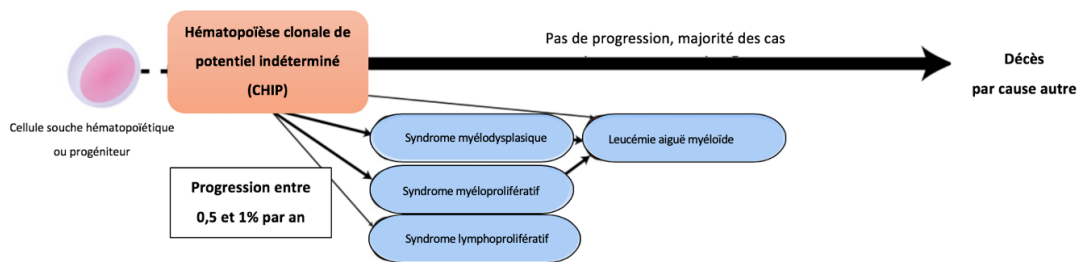


Figure 22 : Progression des CHIP en hémopathies malignes

Le risque de progression d'une CHIP en hémopathie maligne (SMD, SMP, LAM de novo ou secondaire voire SLP) est évalué entre 0,5 et 1% par an. A noter que dans la majorité des cas, les patients décèderont d'une autre cause. (Adapté d'après Steensmas 2015).

Dans le cas des greffes de CSH, la présence d'une CHIP chez les patients autogreffés (généralement acquise après un traitement par chimiothérapie) est associée à une augmentation de la mortalité. (73,74) A l'inverse, dans le cas d'une allogreffe de CSH à partir d'un donneur présentant une CHIP l'impact semble plus controversé. Alors qu'un risque de mauvaise efficacité de reprise de l'hématopoïèse avec cytopénies inexpliquées voir développement d'une hématopoïèse clonale chez le receveur avait été évoquée, (75) une autre étude n'a pas montré d'impact de la présence de CHIP chez le donneur en termes de sécurité et de survie du receveur. (76)

Bien que les évolutions en hémopathies malignes participent à la surmortalité associée au CHIP, elles ne l'expliquent pas complètement. De façon assez inattendue, la principale cause de mortalité associée aux CHIP est liée aux complications cardiovasculaires auxquelles elles sont associées.

B. Pathologies cardiovasculaires

1. Atteintes cardiaques associées aux CHIP

Les évènements cardiovasculaires (ECV) sont la première cause de mortalité dans le monde. Le vieillissement est le principal facteur identifié comme prédictif de la survenue d'ECV. Les facteurs de risques cardiovasculaires (FDR CV) traditionnels n'expliquent qu'environ 75-80% de ces évènements. (77) D'autres facteurs de risques contribuent donc à l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Il a ainsi été montré que la présence d'une CHIP est associée à un doublement du risque de maladie coronaire. (78) La présence d'une CHIP pourrait donc être un nouveau facteur de risque cardiovasculaire non négligeable. Comme présenté dans le Tableau 2, le risque associé à la présence d'une CHIP est supérieur à celui associé au tabac, à la dyslipidémie et même à l'hypertension artérielle. (12) Comme pour le risque d'hémopathies malignes, le surrisque d'ECV est d'autant plus marqué si la VAF est supérieure 10%. (78)

Tableau 2 : Place des CHIP parmi les facteurs de risque cardiovasculaire (D'après Jaiswal et Ebert 2019)

	<i>Hazard ratio</i>
Age 50-59 ans	2,2
Age 60-69 ans	2,4
Age ≥ 70 ans	6,3
Diabète type 2	2,2
Tabagisme actuel ou passé	1,4
Hypertension artérielle	1,4
Cholestérol total > 200 mg/dL	1,4
HDL-cholestérol < 35mg/dL	1,4
CHIP détectée	1,8

Outre leur implication dans des pathologies cardiaques d'origine athérosclérotique, les CHIP peuvent être associées à un remodelage cardiaque pathologique dans un contexte d'insuffisance cardiaque. (79–81) Dans une cohorte de patients souffrant insuffisance cardiaque chronique secondaire à une cardiopathie ischémique, la présence d'une CHIP associée à des mutations dans les gènes *TET2* ou *DNMT3A* est associée à un moins bon pronostic. (82) Enfin, chez des patients atteints de sténose aortique dégénérative, valvulopathie liée à l'âge et à une calcification progressive de la valve, la présence d'une CHIP avec mutation de *DNMT3A* ou *TET2* semble être associée à une augmentation de la mortalité post-TAVI (*Transcatheter Aortic Valve Implantation*). (83)

2. Physiopathologie des complications cardiovasculaires associées aux CHIP

a. Athérosclérose et inflammation

L'athérosclérose correspond à un mécanisme de remodelage de la paroi artérielle aboutissant à l'obstruction de la lumière des vaisseaux (Figure 23). Celle-ci se développe lorsque le LDL cholestérol en excès dans la circulation pénètre de façon passive dans la paroi vasculaire, au niveau de l'intima. Le cholestérol y est ensuite oxydé déclenchant un processus inflammatoire qui favorise le recrutement de monocytes circulants. Dans les tissus, ces monocytes se différencient en macrophages capables de phagocyter le LDL cholestérol oxydé (LDL-ox). Les macrophages se transforment alors en cellules spumeuses riches en cholestérol (notamment en cholestérol sous forme cristallisée). Ces cellules sécrètent des cytokines inflammatoires, créant un environnement inflammatoire au niveau vasculaire qui s'auto-entretient et s'accompagne du recrutement d'autres cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes et polynucléaires neutrophiles notamment). L'accumulation des cellules spumeuses et leur apoptose (induite par l'excès de lipide intracellulaire) conduit à la formation d'un noyau lipidique. Des cellules musculaires lisses de la média sont également recrutées et synthétisent du collagène formant

une chape fibreuse qui se calcifie dans le temps. La plaque d'athérome ainsi formée est responsable d'une sténose des artères.

Dans un dernier temps, du fait d'un défaut de clairance des corps apoptotiques par les macrophages (défaut d'efférocytose), des zones nécrotiques apparaissent au niveau de la plaque, la déstabilise et conduit à sa rupture. Des substances pro-coagulantes sont alors libérées, déclenchant la formation d'un thrombus. L'artère est alors totalement occluse, entraînant un infarctus des territoires en aval. (84)

Les thromboses artérielles sont associées à des manifestations cliniques différentes selon le territoire atteint : infarctus du myocarde (IDM) dans le cas des artères coronaires, accident vasculaire cérébral (AVC) dans le cas des artères carotides et cérébrales ou artériopathie oblitérante des membres inférieurs dans le cas des artères fémorales. A plus long terme, les cardiopathies ischémiques peuvent aboutir à une insuffisance cardiaque chronique liée à la destruction du muscle cardiaque.

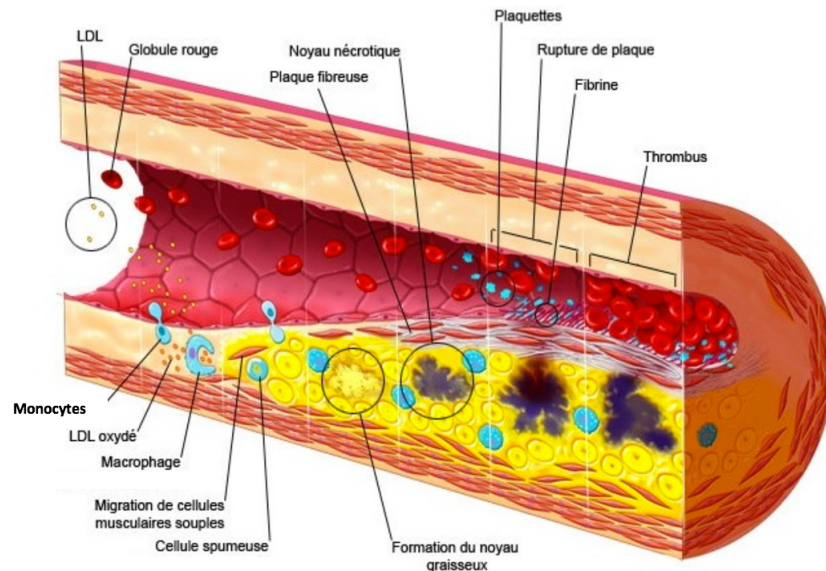


Figure 23 : Physiopathologie de l'athérosclérose

Le LDL cholestérol en excès dans la circulation pénètre de façon passive dans l'intima puis y est oxydé. Les monocytes circulants recrutés se différencient en macrophages capables de phagocyter le LDL-ox. Ils se transforment alors en cellules spumeuses riches en cholestérol dont l'accumulation et l'apoptose aboutira à la formation d'un noyau lipidique. Les cellules musculaires lisses synthétisent du collagène formant une chape fibreuse autour de ce noyau. Du fait d'un défaut de clairance des corps apoptotiques par les macrophages, le noyau devient nécrotique aboutissant à la déstabilisation puis à la rupture de la plaque d'athérome. Des substances pro-coagulantes de l'intima sont alors libérées, déclenchant la formation d'un thrombus (composé notamment de globules rouges, plaquettes et fibrine). (Adapté d'après Diebold 1999).

La physiopathologie de l'athérosclérose fait donc intervenir différents acteurs cellulaires dont :

- Les monocytes, acteurs de l'immunité innée, qui une fois au niveau du tissu cible se différencient en macrophages capables d'englober des éléments à détruire par un phénomène de phagocytose. Ces monocytes peuvent se différencier en deux types de

macrophages : M1 ou M2. Les macrophages classiques, ou de type M1 sont des cellules pro-inflammatoires sécrétant des cytokines inflammatoires parmi lesquelles le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), l'interleukine 1 β (IL1 β) et l'interleukine 6 (IL6). Il s'agit de messagers solubles qui interviennent dans la communication entre les cellules lors de la réponse immunitaire et participent à l'amplification des phénomènes inflammatoires. Ces cytokines stimulent notamment la synthèse hépatique de protéine C réactive (CRP) et de fibrinogène, marqueurs classiques de l'inflammation. D'autre part, les macrophages de type M2 sont des cellules aux propriétés anti-inflammatoires impliquées notamment dans la phagocytose des corps apoptotiques. Lors du processus d'athérosclérose, une dérégulation de la balance entre macrophages de type M1 et de type M2 est à l'origine du défaut d'efférocytose et de l'amplification de l'inflammation. (84)

- Les polynucléaires neutrophiles, qui pourraient intervenir dans la déstabilisation de la plaque d'athérome notamment via la libération de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*). (85,86)
- Les lymphocytes T qui eux sont des acteurs de l'immunité adaptative. Les lymphocytes T CD4 *helper* Th1 et Th17 infiltrant la plaque participeraient à la promotion de l'athérosclérose via leurs propriétés pro-inflammatoires (notamment par production d'interféron γ (INF γ) activant les macrophages M1). Au contraire, les lymphocytes T régulateurs (Treg) ont un rôle anti-inflammatoire par la production d'interleukine 10 (IL10). (87)

b. Lien physiopathologique entre CHIP et athérosclérose

Comme décrit précédemment, le mécanisme de formation et d'entretien des plaques d'athérome est donc principalement lié à un phénomène inflammatoire chronique. Partant de ce postulat, plusieurs études ont ainsi contribué à démontrer que les CHIP sont associées au caractère pro-inflammatoire de cellules hématopoïétiques circulantes (principalement les monocytes) dérivées d'une CSH mutée.

En utilisant un modèle murin de greffe de cellules invalidées pour *TET2*, Jaiswal *et al* et Fuster *et al* ont montré que les CHIP étaient associées à un développement accru d'athérosclérose (augmentation de la taille des lésions aortiques). (78,88) Il a également été montré une augmentation de la transcription des gènes codant pour des cytokines inflammatoires dans les macrophages *TET2* déficients. (89) Ainsi *TET2* est un régulateur négatif de l'inflammation permettant l'inhibition de l'expression de gènes de l'inflammation. Les mutations perte de fonction de *TET2* conduisent donc à l'augmentation de l'expression des médiateurs de l'inflammation que les monocytes/macrophages mutés et recrutés lors du processus d'athérosclérose sécrèteraient de façon plus importante accélérant le processus d'athérosclérose. (88)

Dans ce cas, le mécanisme par lequel *TET2* module l'expression des gènes de l'inflammation serait indépendant de son action sur la méthylation de l'ADN. En effet, lors de la phase de résolution de l'inflammation, *TET2* est capable de recruter une histone désacétylase (HDAC) qui catalyse la désacétylation des histones, les maintenant en position fermée et rendant l'ADN inaccessible à la transcription des gènes (Figure 5). Une mutation perte de fonction de *TET2* associée à un défaut de recrutement de HDAC maintiendrait donc la chromatine en position ouverte facilitant notamment la transcription de cytokines inflammatoires (Figure 24). (90)

En particulier, l'interleukine IL1 β pourrait être le médiateur principal de ce phénomène au niveau du microenvironnement particulier constituant les plaques d'athérome. L'augmentation de la sécrétion d'IL1 β résulterait d'une part d'une augmentation de la transcription du gène *IL1 β* mais également d'une augmentation de l'expression de *NLRP3*. (88) En effet, la synthèse d'IL1 β nécessite le clivage de proIL1 β en IL1 β active par NLRP3 (*NOD-like receptor protein 3*), un constituant de l'inflammasome lui-même activé par des signaux de danger dont les cristaux de cholestérol ou le LDL-ox (Figure 24). (91)

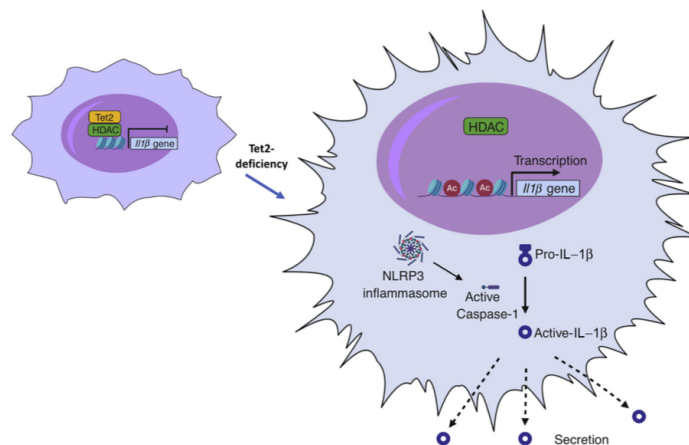


Figure 24 : Sécrétion d'IL1 β médiée par NLRP3

Les macrophages *TET2* déficients sont caractérisés par un défaut de recrutement de HDAC (histone désacétylase) augmentant la transcription du gène de l'IL1 β ainsi que par l'augmentation de l'expression du NLRP3 (*NOD-like receptor protein 3*). Le complexe de l'inflammasome est indispensable au clivage de la proIL1 β inactive en IL1 β active. (D'après Yura, JACC, 2020).

L'IL1 β sécrétée par les monocytes/macrophages stimule également l'expression de la P-selectine, molécule d'adhésion présente à la surface des cellules endothéliales, ayant un rôle essentiel dans le recrutement de monocytes. (88) De plus, l'IL1 β serait impliquée dans le recrutement des cellules musculaires lisses et favoriserait la production d'IL6 et de CRP concourant aux poussées inflammatoires au sein des plaques d'athérome, conduisant à leur déstabilisation et donc participant à la promotion des ECV. (92) La CRP reflétant l'état inflammatoire du patient, elle est associée au risque de rupture des plaques d'athérome. (93)

Les données expérimentales publiées à ce jour portent presque exclusivement sur les mutations de *TET2*. Il semblerait néanmoins que les mutations de *DNMT3A* retrouvées dans les macrophages induisent également une modification de l'expression des gènes de l'inflammation. (94,95) Selon les études le profil d'expression cytokinique est identique (96) ou différent (80,97) de celui associé aux mutations de *TET2*.

La démonstration des mécanismes physiopathologiques liant les CHIP aux évènements cardiovasculaires reste cependant très incomplète et porte essentiellement sur des données obtenues sur des modèles animaux voir *in vitro*. En particulier, peu de données sont disponibles sur l'impact des CHIP sur les marqueurs de l'inflammation chez les patients. Alors qu'il a été montré que la présence d'une CHIP est associée à un taux de CRP plus élevé chez les sujets porteurs, (98) le profil d'élévation cytokinique semble dépendant de la mutation identifiée. Ainsi, si les CHIP semblent globalement être associées à une élévation de l'IL6, l'élévation d'IL1 β était, quant à elle, particulièrement associée à la présence d'une mutation *TET2*. (99) Une élévation des taux sérique d'IL6 et de TNF α avait également été rapportée chez les porteurs de CHIP par Cook *et al.* (100) De même Pascual-Figal *et al.*, identifiaient chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque et porteurs de CHIP un taux d'IL6 plus élevé mais sans aucune différence sur les taux de CRP et d'IL1 β . (101) De leur côté, Mas Peiro *et al* ont montré une absence de différence des marqueurs classiques de l'inflammation (CRP, IL6, taux de leucocytes et plaquettes) entre les porteurs de CHIP et les non porteurs. Cependant, dans leur étude, la présence d'une CHIP *TET2* était associée à une augmentation du nombre de monocytes non classiques (CD14^{dim}CD16⁺⁺), connus pour sécréter des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires. (102) Les patients porteurs de mutations de *DNMT3A* présentaient une augmentation du rapport de lymphocytes Th17/Treg participant au maintien du contexte pro-inflammatoire. (83)

Outre un intérêt scientifique, l'exploration des mécanismes physiopathologiques des complications cardiovasculaires associées au CHIP présente un intérêt clinique majeur. La recherche de CHIP en tant que facteur de risque cardiovasculaire pourrait notamment avoir un intérêt théranostique. En effet, des stratégies visant à limiter l'inflammation de bas grade pourraient être envisagées pour la prévention des ECV chez les porteurs de CHIP. Précédemment, Ridker *et al* ont montré avec l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL1 β ; le canakinumab, une diminution des taux de CRP et d'IL6 pouvant être bénéfique dans la prévention de l'athérosclérose alors même que ce traitement n'impacte pas le taux de LDL-cholestérol. (103) Dans l'étude CANTOS, l'administration de canakinumab (à la dose de 150 mg en sous-cutanée tous les 3 mois) est associée à une diminution de l'incidence d'un nouvel ECV chez des sujets ayant fait un infarctus du myocarde et présentant une CRPus (CRP ultrasensible) \geq 2mg/L. (104) Cette thérapie augmente le risque d'infection sévère en agissant sur les mécanismes de l'immunité innée. Son utilisation devrait donc être limitée aux patients pour lesquels une bonne réponse est attendue, ce qui semble être le cas des porteurs de CHIP et en particulier dans le cas des patients mutés *TET2*. (105) Un des moyens de sélection des patients éligibles à un traitement par

canakinumab pourrait être leur taux de CRP, comme proposé par Fuster *et al*, (106) ou bien la présence d'une mutation identifiée en routine par technique de séquençage ciblé. D'autres stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de traitements antiinflammatoires comme la colchicine, connue pour son action sur le complexe NLRP3 de l'inflammasome, sont également envisagées. (107)

IV. Facteurs favorisant l'émergence des CHIP

Actuellement, nous ne savons pas pourquoi certaines personnes développent une CHIP et d'autres non. Le principal facteur de risque est l'âge. Or, on sait qu'avec l'âge, on assiste à une modification du microenvironnement médullaire, (1) qui devient pro-inflammatoire, notamment en lien avec une augmentation de TNF α , d'IL6, d'INF et de M-CSF. Il a été montré que ce type de microenvironnement sélectionne les CSH mutées pour *DNMT3A* (108,109) ou *TET2* (110,111) et favorise leur différenciation en cellules myéloïdes au dépend des cellules lymphoïdes. (17) Les propriétés pro-inflammatoires des cellules mutées pour *DNMT3A* ou *TET2* pourraient ainsi participer à entretenir le phénomène. (89) Ceci pourrait contribuer à expliquer l'augmentation de la prévalence des CHIP chez les sujets âgés.

D'autres facteurs de risque semblent émerger. Au cours de la vie, les épisodes infectieux et inflammatoires aigus ou chroniques, (109,112–114) le stress psychologique (115) ou l'exposition à divers toxiques sont autant de facteurs de stress environnementaux qui en modifiant la composition du microenvironnement médullaire pourrait jouer un rôle dans la sélection et le développement des CHIP. Comme évoqué précédemment, des liens ont été établis entre l'exposition antérieure à des chimiothérapies/radiothérapies et l'acquisition d'une CHIP. (49,64,116) De même, certains FDR CV connus comme le tabac ou l'obésité sont associés à une augmentation de la prévalence des CHIP. (117) En effet, ces FDR sont à l'origine du développement d'une athérosclérose, or l'athérosclérose elle-même pourrait être associée à une augmentation de la division des CSH entraînant un risque plus élevé d'acquisition de mutations somatiques au sein de ces cellules. (118,119) Ainsi l'athérosclérose favoriserait l'acquisition de CHIP qui, comme expliqué précédemment, amplifieraient le phénomène d'athérosclérose en retour.

Par ailleurs, on sait depuis une dizaine d'années que des variants génétiques constitutionnels (c'est-à-dire transmis d'une génération à une autre et donc présents dans toutes les cellules de l'organisme et ce dès la naissance) sont associés à une prédisposition à développer des hémopathies myéloïdes. (120–124) On peut donc imaginer qu'il pourrait exister une certaine prédisposition génétique à l'acquisition d'une CHIP. Ainsi, des variants génétiques constitutionnels dans gènes *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*, enzyme s'opposant au raccourcissement des chromosomes lors de la répllication de l'ADN), *TET2*, *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*, gène de réparation de l'ADN) ou encore *ATG2B/GSKIP* (*Autophagy-related 2B/GSK3B interacting protein*), prédisposeraient à l'acquisition

d'une CHIP. (99,125,126) Aussi, une prédisposition à l'acquisition de mutations de *TET2* a été décrite dans certaines fratries. (127) De plus, parmi les donneurs de moelle osseuse, il a été montré une prévalence plus importante des CHIP chez les apparentés de sujets présentant une hémopathie myéloïde comparativement aux donneurs apparentés de sujets atteints d'une hémopathie lymphoïde. (76) Cette prédisposition génétique aux CHIP reste cependant controversée. Une étude récente menée sur 299 paires de jumeaux âgés entre 73 ans et 94 ans n'a retrouvé que 20 paires de jumeaux porteurs d'une CHIP avec mutation affectant le même gène et seulement 2 paires de jumeaux présentaient une mutation identique, suggérant qu'il n'existe pas de prédisposition génétique à l'acquisition de CHIP. (128,129)

OBJECTIFS

A ce jour, il n'existe aucune étude chez l'Homme recherchant les mécanismes physiopathologiques par lesquels les CHIP favorisent le développement d'athérosclérose. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle le vieillissement est associé à une augmentation de la fréquence des CHIP et que celles-ci participent au déclenchement des ECV via la génération d'une inflammation qui favorise le développement des plaques d'athérome. Selon cette hypothèse, les macrophages dérivant d'une CSH mutée et donc porteurs de la mutation, acquièrent des propriétés pro-inflammatoires, infiltrent les plaques athéromateuses et favorisent leur expansion via la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, conduisant finalement au développement d'ECV. Si tel est le cas, on devrait s'attendre à ce que les patients ayant fait un ECV présentent plus fréquemment une CHIP que ceux n'ayant jamais fait d'ECV dans une tranche d'âge donnée. Toujours selon cette hypothèse, les patients porteurs de CHIP devraient présenter une inflammation systémique basale plus importante que les patients ne portant pas de CHIP associée à un volume athéromateux supérieur.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du protocole CHAth : « Fréquence de l'hématopoïèse clonale chez les patients ayant fait un premier événement cardiovasculaire après 75 ans et conséquences sur l'inflammation et le volume athéromateux » (NCT04581057). Il s'agit d'une étude observationnelle monocentrique transversale à visée étiologique menée au CHU de Bordeaux dont l'investigateur principal est le Professeur Thierry Couffignal.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la prévalence des CHIP chez des patients de plus de 75 ans ayant eu un premier ECV.

Les objectifs secondaires de l'étude sont les suivants :

- Établir, dans la population ayant présenté un ECV et en différenciant les porteurs et les non porteurs de CHIP :
 - o une association entre la présence d'une CHIP et la présence d'une inflammation systémique (évaluée par les taux circulants de hsCRP, IL1 β , IL6, TNF α , IL18 et IL10) à distance du premier ECV, ainsi qu'une corrélation entre la fréquence allélique des mutations et le niveau d'inflammation systémique.
- Établir, dans la population ayant présenté un ECV et en différenciant les porteurs et les non porteurs de CHIP :
 - o une association entre la présence d'une CHIP et les FDR CV traditionnels classiquement recueillis lors de la prise en charge des patients présentant un ECV.

- une association entre la présence d'une CHIP et le volume athéromateux (évalué par échographie 3D) à distance du premier ECV, ainsi qu'une corrélation entre la fréquence allélique des mutations avec le volume athéromateux.
- une association la présence d'une CHIP et une récurrence d'ECV.
- Comparer la fréquence des CHIP chez des patients ayant eu un ECV avec la fréquence des CHIP chez des patients sélectionnés pour n'avoir jamais présenté d'ECV.

Le recueil et l'analyse des données cliniques et d'imagerie permettant de répondre aux objectifs secondaires sus-cités ont été réalisés par le Pr Thierry Couffinhal, le Dr Yann Pucheux et Sami Fawaz, cardiologues exerçant dans le service de « Maladie coronaire, tests d'effort, réadaptation et sport santé » et « Maladie coronaire et prévention » du CHU de Bordeaux.

Nous avons orienté notre travail sur l'interprétation et l'analyse des données de séquençage permettant de répondre à l'objectif principal ainsi que sur l'analyse des données de biologie sur l'inflammation systémique.

ARTICLE

Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential is highly prevalent among elderly patients with a first cardiovascular event and is associated with an increased inflammation

Fawaz S^{1*}, Marti S^{2*}, Pucheu Y¹, Bidet A, James C^{2,3}, Mansier O^{2,3§}, Couffinhal T^{1,3§}

¹ CHU de Bordeaux, service de maladies coronaires et vasculaires

² CHU de Bordeaux, laboratoire d'Hématologie

³ INSERM UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases

* These authors contributed equally to this work

§ These authors contributed equally to this work

Abstract

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is defined by the acquisition of a somatic mutation in leukemia-driver genes in hematopoietic cells without any hematological malignancy. CHIP has been associated with cardiovascular events through the induction of a chronic inflammatory state in mice. The purpose of this study was to verify these findings in human and thus to evaluate the impact of CHIP on inflammation and atherosclerosis burden in patients. We enrolled prospectively 106 patients suffering from a first myocardial infarction of atherosclerosis origin to assess simultaneously the presence of CHIP, the basal inflammatory state and the atheroma burden. To avoid any bias linked with the acute phase of atherothrombosis, we performed the analyses between 2 and 7 months after the acute event (considered as the date of inclusion in the study). A CHIP was detected in 55% of patients and was associated with increased hsCRP levels. This result was only observed for mutations present with a VAF $\geq 2\%$ and was more pronounced when patients had multiple mutations. However, atherosclerosis burden was not different between CHIP carriers and non-carriers. Interestingly, CHIP carriers presented a 3-fold higher risk of recurrence of cardiovascular event between the first event and the inclusion in the study. In conclusion, CHIP is highly prevalent among elderly patients suffering a first myocardial infarction and is associated with a higher chronic inflammatory state but not with an increased atherosclerosis burden.

Introduction

Atherothrombosis is the main cause of death worldwide. Traditional cardiovascular risk factors (CVRF), such as diabetes, smoking, dyslipidemia, hypertension, only explain 70 to 85% of cardiovascular events our patients suffer. However, a significant part of these events remains unexplained by these traditional risk factors. Thus, 15 to 30% of people without any evident cause can present an atherosclerotic cardiovascular event (CVE), whereas not all high-risk patients (according to traditional CVFR) experience such an event.(1)

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) has emerged as a potential new risk factor of cardiovascular diseases.(2) This condition results from the acquisition by a hematopoietic stem cell of a somatic mutation in leukemia-driver genes, leading to the clonal expansion of a population of hematopoietic cells without any clinical or biological sign of hematological malignancy. It has been proposed that the definition of CHIP required the detection of the mutation at a variant allele frequency (VAF) of more than 2%, representing a proportion of mutated cells of more than 4%.(3) The most commonly mutated genes in CHIP are DNA Methyltransferase 3A (*DNMT3A*) and Tet Eleven Translocation 2 (*TET2*). The frequency of CHIP increases with age. Using whole-exome sequencing techniques, the prevalence of CHIP in the general population has been evaluated at about 5% at 60 years of age, 10% at 70 years and >20% after 80 years.(2,4) Since their description, CHIP has been associated with a risk of evolution towards overt hematological malignancies.(2,4) However, the increased mortality rate associated with CHIP is mainly driven by its association with chronic diseases, in particular atherothrombosis and chronic heart failure.(5–8) Because age remains the most important risk factor for the majority of cardiovascular diseases and because CHIP is more frequently observed in the elderly, CHIP could represent a new major risk factor in cardiology.

CHIP is said to contribute to cardiovascular complications by inducing a chronic inflammatory state. Indeed, experiments in mice showed that clonal hematopoiesis exacerbates the inflammatory phenotype of macrophages infiltrating the atherosclerotic plaques, aggravating the over-production of various cytokines, especially IL1 β .(9) This favours the recruitment of monocytes within the plaque, the production of foam cells and the growth of the plaque. In mice, various studies have shown that CHIP was associated with a higher level of inflammation and a higher atherosclerotic burden.(5,9) Induction of an inflammation seems also to be the mechanism through which CHIP contributes to heart failure.(10,11)

In humans, CHIP has been associated with an increased risk of myocardial infarction (MI).(5,12) But few studies have evaluated the prevalence of CHIP in cohorts of people suffering from a coronary artery disease (CAD), reporting a prevalence of 8-22% depending on the sensitivity of the sequencing technique used.(5,13) Furthermore, different groups have linked CHIP to the induction of a chronic inflammatory state, but rarely in the context of CAD.(13–16) Finally, to our knowledge, no study has evaluated the correlation between CHIP and atherosclerotic burden in human yet.

Thus, studies in human and in mice suggest that CHIP favors an chronic inflammatory state that contribute to the development of atherosclerosis, leading to the occurrence of CVE. However, none of these studies demonstrated this entire pathophysiological role of CHIP, neither in human, nor in mice. In this study, we prospectively enrolled patients suffering a first MI after 75 years and searched for the presence of CHIP using a sensitive sequencing technic. We simultaneously determined the basal inflammation level (based on hyper-sensitive CRP and inflammatory cytokines plasmatic levels) and the atheroma volume to associate for the first time in human these 2 parameters to the existence of CHIP in the context of CAD.

Methods

Patients

Patients were enrolled in this study between March 2019 and June 2021. Eligible patients were screened at the time of their admission for MI in the intensive care unit of the cardiologic department of the university hospital of Bordeaux. They were informed about the study, and were included between 2 and 7 months after the acute event, at the time of the consultation for the post-MI clinical assessment. They all signed written informed consent before inclusion in the study (NCT04581057, IRDCB 2019-A02902-05). The main eligibility criterion was suffering from a first MI from atherosclerosis origin after 75 years without evidence of hematological malignancy. Exclusion criteria encompassed the absence of atherosclerotic coronary disease, an uncontrolled diabetes (HbA1c >10%), a previous atherosclerotic cardiovascular event before 75 years (myocardial infarction, ischemic stroke, peripheral arterial disease, angina pectoris), a hematologic malignancy (known or revealed by blood count at admission), a known chronic inflammatory disease (rheumatoid arthritis, arteritis, gastro-intestinal illness), an active neoplasia, and long-term anti-inflammatory therapies. These criteria are detailed in the Supplementary Method.

Collected data

All data were collected on a secured e-case report form and were systematically double-checked by the investigator and a clinical research assistant.

Data from the index event

Patient's characteristics, traditional alterable CVRF, drugs used to be taken at the time of the event and prescribed at discharge, data regarding MI and biological data at the time of the initial admission were recorded by the investigators (as detailed in the Supplementary Appendix).

Clinical and routine biological testing at inclusion

We ensured that patients were still eligible by checking inclusion and exclusion criteria again. We established and checked a list of conditions that, if present, had to make the appointment reported in

order not to skew biological and genetic data (detailed in the Supplementary Appendix). We also ensured that patients had not been vaccinated against SARS-Cov2 within the 8 previous days. A routine cardiovascular evaluation was then run. Patients were asked about presence of dyspnea or angina, evaluated with NYHA and CCS scales. Information was obtained from medical record about potential recurrence of a cardiovascular event since the index event (new MI, coronary revascularization, stroke, hospitalization for acute heart failure). Routine biological analyses comprising blood count, high sensitive CRP (hsCRP), lipid profile, HbA1c were performed in the laboratory of the university hospital of Bordeaux.

Measurement of atherosclerosis burden

Transthoracic echocardiography was performed by the same cardiovascular center and ejection fraction calculated. Supra-aortic trunks ultrasonography with 3D-measurement of atherosclerotic volume was performed by trained physicians, using a Philips iU22 probe equipped with a linear-3D volume convertor VL13-5 (Philips). Images were analyzed using the Vascular Plaque Quantification software on the QLAB 10.2 system (Philips). Functional ischemic testing was performed at the clinicians' discretion.

Somatic genetic analysis and inflammatory markers

A blood sample of 30 mL was drawn at the time of inclusion and sent within 4 hours to the Biological Cancer Resources Center of the university hospital of Bordeaux. Total leukocytes were frozen using the Maxwell Blood DNA kit (Promega). Plasma was frozen at -80°C following a double centrifugation step.

The search for somatic mutations was carried out by the laboratory of Hematology of the university hospital of Bordeaux using the Next Generation Sequencing (NGS) panel designed for the diagnosis and follow-up of myeloid hematological malignancies. The genes tested are detailed in the Supplementary Table S1. Briefly, target sequences were captured using the SureSelect technology (Agilent). Sequencing was performed on a NextSeq 550Dx Instrument (Illumina technology) and analyzed using an in-house bioinformatics pipeline (see Supplementary Appendix for more details). Variants interpretation was performed independently by two biologists according to criteria previously described (17) and reported in the Supplementary Table S2. All variants with a VAF>1% were considered.

Inflammatory markers were measured from the same blood sample. IL6, TNF α , IL18 and IL10 levels were analyzed by a multiplex immunoenzymatic technic (Bioplex200, Biorad). IL1 β level was assessed using the SIMOA IL-1 β kit (Quanterix).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad). Continuous variables were compared using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Categorical variables were analyzed using Chi-square test. A $p < 0.05$ was considered for statistical significance.

Results

Patients characteristics at the time of cardiovascular event

One hundred and six patients were included in this study. Their characteristics at the time of the event are presented in Table 1. Patients were 82 years old in median, and 65% of them were men. Thirty-one percent had diabetes, 76% had high blood pressure and 65% had dyslipidemia. Sixty-five percent of the patients had at least two traditional CVRF. Only 3 patients were current smokers. Median hemoglobin level, white blood cells, neutrophils and platelets counts were within the normal values.

Fifty-eight patients (55%) presented with a ST-segment elevation. All patients but two (98%) underwent coronary angiography, and 50 patients (48%) had multitruncular lesions. Forty-two percent of the patients had at least one complication following the MI, the most frequent being heart failure requiring administration of intravenous diuretics ($n=39$, 37%). Rhythmic disorders occurred in 7 patients (6.6%). Patients were all given a complete secondary prevention medical treatment at discharge, with aspirin (95%), P2Y12 receptor inhibitors (89%), ACEI or ARB (90%), statin (95%) and beta-blocker (93%).

CHIP prevalence in the cohort

At least one mutation was detected in 72 patients (68%) with a threshold of detection of 1% (Figure S1A, Table S3). We first used the definition of CHIP that requires a VAF $\geq 2\%$ and determined that 55% of the patients were CHIP carriers (Figure 1A). As previously described, the prevalence of CHIP increased with age (Figure 1B, Figure S1B). Using a VAF threshold of 2%, 49% of patients aged between 75 and 80 years had a CHIP, 51% of the patients aged 81 to 85 years, 65% of the patients between 86 and 90 years and 67% of the patients after 91 years of age.

Description of the mutations detected in the cohort

As expected, *DNMT3A* was the most frequently mutated gene, with 52% of patients having at least one mutation in *DNMT3A*. *TET2* was concerned in 29% of the cases, before *PPM1D* (14%), *TP53* (10%) and *ASXL1* (8.6%). The list of the main genes found mutated in our cohort was strictly similar to that of previous studies (Figure 1C).^(2,4,5,7,8,14,18–26) As described, most of the mutations affected genes involved in DNA methylation, DNA repair, histones modifications, spliceosome complex and cell signaling (Figure S2A). The median VAF observed was 2%, without impact of the gene mutated (Figure 1D). Most of *DNMT3A* mutations were missense mutations (this was also the case for *TP53*, *CBL*,

SF3B1, *SRSF2* and *GNB1* mutations). Most of *TET2* mutations were truncating mutations (as for *ASXL1* and *PPM1D*, Figure S2B-C). Single nucleotide variants frequently consisted in C>T substitution, a classical signature associated with aging and previously described in CHIP (Figure S2D).(2,4)

Multiple mutations are frequently detected among CHIP-carrier patients

Using a VAF threshold of 1%, we were able to detect several mutations in a single patient in 54% of CHIP cases. In particular, 31% of CHIP-carriers had 2 mutations, and 24% had 3 or more mutations (Figure 1E). Thus, *DNMT3A* or *TET2* were often associated with other mutations. The main associations were *DNMT3A/DNMT3A* (n=11), *DNMT3A/TET2* (n=6) and *TET2/TET2* (n=5) (Figure 1F). We hypothesized that different mutations within these genes would confer similar properties to the hematopoietic cells, and analyzed the detection of a global clone (defined as the sum of the VAF of the different mutations detected in a single patient). With this extended definition of CHIP, 60 patients (57%) presented a CHIP with a global VAF at least at 2% (Figure S3A). Using this definition of CHIP, the median VAF of the global clone per patient was 5% and the prevalence of CHIP also increased with age (Figure S3B). There was no impact of mutation profile (association between genes and number of mutations) on global VAF per patient but the VAF of the most important clone per patient increased with the number of mutations (p=0.0003 according to Spearman test, data not shown).

Association between CHIP and Cardiovascular Risk Factors

Because CHIP has been previously linked with high blood pressure (27) or tobacco use, (14) we next evaluated the association between CVRF and CHIP (defined as the detection of at least one mutation with a VAF \geq 2%). In our cohort, there was no difference of sex-ratio, age, BMI, dyslipidemia, high blood pressure frequency or smoking habits between CHIP-carriers and no-carriers. However, patients with CHIP presented less frequently diabetes (23% vs 41% in the non-CHIP group, p=0.053) and had lower HbA1c levels (median of 5.70 [5.50-6.10] vs 6.15 [5.70-7.07], p<0.01, Table 1). They also had a higher level of LDLc (0.85 [0.63-1.09] vs 0.76 [0.63-0.83], p<0.05, Table 2). We did not observed any significant association between CHIP and “high risk” profiles, with 59% of the CHIP carriers having at least 2 traditional risk factors compared with 71% in the non carriers group (Table 1, p=0.18).

CHIP is associated with an increased basal inflammation

CHIP was previously associated with an inflammatory state. In order to verify that this conclusion was also true in the context of CAD, we evaluated in our patients the impact of CHIP on plasmatic hsCRP levels. Because acute CVE would interfere with this parameter, we assessed the inflammatory state 2 to 7 months after the first event, and at least 2 weeks after any potential cause of inflammation. This time period appears sufficient to evaluate the basal inflammation induced by the CHIP.(28) Using a VAF threshold of 2%, CHIP carriers presented higher hsCRP plasmatic levels than no-carriers (2.7 [1.25-6] vs 1.2 [0.7-3.2], p=0.0127, Figure 2A). This difference was not significant when keeping all mutations

with a VAF $\geq 1\%$ (Figure S4A), suggesting that isolated small clones do not have any impact on inflammation.

Because the risk of cardiovascular event (CVE) was shown to be more important with “high VAF” CHIP (more than 10%), (5) we searched for a clone size-effect on inflammation. Patients with a VAF $\geq 10\%$ or with 2-10% VAF had higher hsCRP levels compared with patients with a VAF $< 2\%$ (3.6 [1.2-6] or 2.4 [1.2-7] vs 0.7 [0.5-1.5], $p=0.0371$ and $p=0.0179$ respectively, Figure 2B). However, hsCRP in all these patients’ groups was not different from those of patients without any detectable clone.

Finally we searched if CHIP would be more associated with hsCRP levels $\geq 2\text{mg/L}$, a threshold recognized as bearing a prognosis value in cardiology.(29) Sixty-six percent of CHIP-carriers had hsCRP $> 2\text{mg/L}$ compared with only 42% of no-carriers (Table 2, $p=0.095$).

Differential effect of *DNMT3A/TET2* mutations on inflammation

Some studies recently suggested that the different mutations identified in CHIP could have a differential impact on inflammation or prognosis in cardiovascular diseases. We thus explored whether the mutated genes had an influence on the hsCRP level. When evaluating patients with CHIP except those carrying *DNMT3A* and/or *TET2* mutation, we found no difference compared with the no-CHIP group (2.3 [1.0-3.6] vs 1.2 [0.70-3.2], $p=0.45$, Table 2). On the contrary, patients carrying CHIP involving *DNMT3A* and/or *TET2* mutations showed a significant increase of hsCRP levels ($p=0.0189$, Figure 2C).

Thus, we then focused on patients carrying *DNMT3A* and/or *TET2* mutation, testing various VAF threshold and comparing them to all other patients, namely those without CHIP and those with a CHIP not involving *DNMT3A* and/or *TET2* (Table 3). Patients with *DNMT3A* and/or *TET2* mutation at VAF over 2% and 5% had a significantly higher hsCRP than those of the control group (3.00 [1.47-6.75] and 3.60 [1.60-8.07] respectively vs 1.40 [1.00-3.80], $p=0.042$ and $p=0.043$). Patients in the *DNMT3A/TET2* group had also more frequently hsCRP $> 2\text{ mg/L}$, regardless of the VAF event if this effect was not statistically significant (69% vs 48% for VAF $\geq 2\%$). An effect of higher VAF of *DNMT3A/TET2* mutations on inflammation was also supported by the increase of neutrophils counts that was statistically significant at VAF over 5% and 10% compared to the control group (4.60 [4.25-4.95] and 4.70 [4.35-5.35] respectively vs 3.80 [2.90-4.53], $p=0.034$ and 0.046).

Multiple clones are associated with a higher inflammatory state

As detailed earlier, we detected multiple mutations in a high proportion of our CHIP-carriers patients. Carrying several mutations having a potential impact on the prognosis of cardiovascular diseases, (30) we wondered if this parameter had an effect on the inflammatory state. Patients with 2 or more clones presented higher hsCRP levels than patients with only one mutation (Figure 2D). When combined in the same patient, these clones had an impact on hsCRP level. Thus, patients with a global clone $\geq 2\%$ presented increased levels of hsCRP than patients without CHIP (Figure S4B). This effect was more

important when the global VAF was $\geq 10\%$ (Figure S4C). Similar conclusions were observed when restricting the analysis on *DNMT3A/TET2* CHIP patients (Figures S4D-F).

The presence of CHIP is not associated with an increased atherosclerosis burden

MI are generally triggered in patients with a high atheroma burden. Because CHIP increases the risk of CVE, we hypothesized that CHIP would be associated with an increased atheroma volume. Supra-aortic trunks ultrasonography with 3D-measurement of atherosclerotic volume, a recent reliable technic to measure atheroma volume, (31,32) was performed in 34 patients of the cohort. Using a VAF threshold of 2%, we found no significant impact of CHIP on atherosclerosis burden. There was not difference in carotid atheroma volume between patients with CHIP and patients without CHIP (520 [412-612] vs 455 [374-555], $p=0.36$, Table 2 and Figure 3A). We did not observe any difference in the rate of multitruncular coronary lesions neither (54% vs 40%, $p=0.16$, Table 2). However, using a VAF threshold of 5%, the rate of multitruncular lesions tended to be higher in CHIP carriers compared with no-carriers (61% VS 40%, $p=0.07$, data not shown).

In patients carrying *DNMT3A* and/or *TET2* mutation, no significant difference in atheroma burden, nor in the frequency of multitruncular lesions was highlighted compared to the other groups of patients (Figure 3B, Table 3).

Association between CHIP and recurrence of cardiovascular event

CHIP has previously been linked to an increased risk of incidence of atherothrombosis and heart failure.(5,6) Even if the study did not included patient follow up, we asked wether carrying a CHIP had an impact on CVE recurrence between the first event and the inclusion (2-7 moths after). Between hospital discharge and inclusion in the study, 9 patients (9.7%) presented a recurrence of CVE. CHIP carriers presented a near 3-fold increased risk of CVE recurrence compared with no-carriers (14% vs 4.7%, $p=0.15$, Table 2 and Figure 4). We observed the same trend when restricting the analysis to patients carrying *DNMT3A* and/or *TET2* mutations (Figure 4B). Particularly, with a VAF of at least 5%, we observed an significant increased of CVE recurrence, with 24% of mutated patients being concerned vs 4.4% of the control group ($p=0.029$, Table 3). This effect was mainly driven by hospitalization for heart failure (14% vs 2.2%, $p=0.09$, Table 3).

Finally, the presence of multiple clones being associated with a poorer prognosis in heart failure (30) we assessed the effect of detection multiple mutations on CVE recurrence. Patients carrying more than one mutation did not present a higher rate of CVE recurrence compared with patients with no or one mutation (Figure S5A). However, summing the VAF of the different clones observed in the same patient demonstrated a near 3-fold increase of the rate of CVE recurrence when the global VAF was $\geq 2\%$. We did not observed a clear effect of the VAF level on the rate of CVE recurrence probably due to the low number of such events (Figure S5B-D).

Discussion

In this study, we sought to correlate for the first time in a prospective cohort the existence of CHIP to both an increased inflammatory state and an increased atheroma burden. In order to maximize the prevalence of CHIP in our cohort, we included patients ≥ 75 years who suffered from a MI. To link more easily CHIP to the CVE, we selected patients with a first event and thus patients that do not present a very high number of traditional risk factors. This led to a very high rate of detection of CHIP in our patients: 68% with a VAF threshold of 1%, and 55% with the classical VAF threshold of 2%. This prevalence is more than 2-fold higher than expected from the results of the first studies that evaluated the prevalence of CHIP in the general population.(2,4,5) In fact, this high prevalence could result from 2 parameters: 1/the sensitivity of our sequencing technic that is higher than the one of whole-exome and whole-genome sequencing. 2/ the selection of very old patients that suffered from a CVE and thus that were more likely to carry a CHIP. However, previous studies based on a targeted sequencing strategy and using a VAF threshold of 2% reported a prevalence of CHIP of only 22.6-33% in patients >70-80 years.(7,13,23,26,33) Of note, Buscarlet *et al* observed a CHIP in only 24.5% of patients >80 years.(7) Moreover, Busque *et al* did not observed any difference in the frequency of CHIP depending on the existence of a history of CAD or not.(13) In the context of chronic heart failure, a prevalence of CHIP similar to ours was observed by 2 groups among patients >70-80 years. (16,27,34)

In line with previous studies, most of the cases of CHIP were associated with mutations in *DNMT3A* and *TET2* that represent 58.2% (85/146) of all the mutations detected. However, we detected a rather high proportion of *TET2* mutations (20.5%) and a quite low proportion of *DNMT3A* mutations (37.7%). These results are in contradiction with the study of Busque *et al* who observed a higher proportion of *TET2* mutations among patients without CAD.(13) However, this could be due to the high age of our patients. Indeed, *TET2* mutations confer a higher proliferative advantage to hematopoietic cells compared with *DNMT3A* mutations. Consequently, it has been observed an increase of *TET2* mutations frequency and a decrease of *DNMT3A* mutations frequency with age in different CHIP cohorts.(21,35) Another explanation could be that *TET2* mutations are more efficient in favoring CVE than *DNMT3A* mutations, as this was recently described in patients with chronic heart failure.(6)

Although CHIP has been associated with occurrence of CVE independently of tradition risk factors, (5) it is not clear whether CHIP is linked to or can synergies with some of them. Indeed the different studies that address this point found that patients with CHIP were more likely to present diabetes (2,23,36), tobacco use (4,14) or less likely to have a dyslipidemia (13) or healthy diet.(12) However, other studies did not highlighted such association between CHIP and CVRF.(6,30,37) In our cohort, patients with CHIP presented a lower level of HbA1c, a recognized marker of chronic hyperglycemia and tended to present less frequently diabetes. This result was unexpected given that CHIP associated with *TET2* mutations were shown to favor resistance to insulin in a mouse model.(38) However, patients with CHIP did not presented less frequently a “high-risk profile” (>2 CVRF) compared with patients without CHIP,

suggesting that CHIP cannot replace traditional risk factors to promote CVE. These results have to be confirmed in larger cohorts.

Animal models have demonstrated that CHIP associated with *TET2* or *DNMT3A* mutations contributed to cardiovascular diseases through the induction of a pro-inflammatory phenotype of monocytes/macrophages.(5,9,11) The association between CHIP and inflammation has been confirmed in human in some studies. In particular, CHIP was shown to be linked to an increased levels of IL6, (5,14,23) IL1 β , or IL18. (14) Surprisingly, only one study noticed in patients with CHIP an increased level of hsCRP, the commonest marker of inflammation used in routine practice.(13) In our study, we observed increased levels of hsCRP in patients with CHIP compared to patients without CHIP when considered a VAF threshold of 2%. Moreover, we observed that inflammation was higher in CHIP with *TET2* and/or *DNMT3A* mutations than in other cases. Such a differential effect depending on the gene mutated has been previously suggested.(14,23) Studies on larger cohorts are needed to determine the effect of mutations involving other genes on the inflammatory state. We also observed a trend toward a higher proportion of patients with a hsCRP>2 mg/L in the presence of CHIP compared with patients without CHIP. Because this threshold is considered to be a marker of a higher risk of CVE,(29) this result strengthens that CHIP increases the risk of CVE through the induction of a chronic inflammatory state.

To our knowledge, our study is the first one to address the direct evaluation of atheroma burden in patients with CHIP. CHIP were previously associated with an increase of the calcic score that represents an indirect marker of atherosclerosis.(5) In our cohort, we noticed a trend towards a higher rate of multitruncular coronary lesions in patients with CHIP (using a VAF threshold of 5%), but without significant difference in the carotid atheroma volume. This is probably due to the low number of patients that could have been evaluated. Studies in larger cohorts are thus required to confirm this result. Determining in patients the effect of CHIP on atheroma development in absence of history of CVE would also be of particular interest since patients with MI irrespective of the presence of CHIP should have higher levels of atherosclerosis due to multiple factors.

Finally, we detected 2 or more mutations with a VAF $\geq 1\%$ in 54% of patients. In one patient, we were able to detect up to 8 variants. All patients having a normal blood count (those having an anemia also had an evident cause of cytopenia), none of them presented an evidence of hematological malignancy. However, in absence of follow up, we cannot exclude that some of them present an early stage myelodysplastic syndrome. This rate of “multiple-clones” CHIP is higher than previous studies that detected this status in 14.4-29% cases of CHIP.(7,13,26,33) Once again, this could be due to the advanced age of our patients since the prevalence of multiple mutations in CHIP increases with age.(4,26) Another reason could be the sensitivity of our technic of sequencing that allowed the detection of mutations with a VAF of 1%. Indeed, 49% (22/45) of the additional mutations were present at a VAF between 1 and 2%. One can also imagine that in patients who suffered from a MI, atherosclerosis favors

the development of CHIP and thus the emergence of multiple mutated clones as recently suggested.(39) Today, it is not clear if such low VAF variants have a clinical and biological relevance. However, it has been suggested that *TET2* and *DNMT3A* mutations with a VAF below 2% had an impact on the prognosis in chronic heart failure.(30,40) The presence of such additional small size clones was even associated with an increased mortality or occurrence of peripheral artery disease.(26,30) In our cohort, the presence of more than 2 mutations was associated with an increase of hs-CRP level. This is in line with another study that reported higher IL6 levels in the presence of >1 clone.(23) However, we did not find any significant association between the presence of multiple mutations and atheroma burden, nor with CVE recurrence. Once again, larger studies are required to precise the potential role of additional small clones in the pathophysiology of cardiovascular diseases.

References

1. Berry JD, Ning H, Horn LV, Lloyd-Jones DM. Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2012;9.
2. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2488-98.
3. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2 juill 2015;126(1):9-16.
4. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2477-87.
5. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 13 juill 2017;377(2):111-21.
6. Yu B, Roberts MB, Raffield LM, Zekavat SM, Nguyen NQH, Biggs ML, et al. Supplemental Association of Clonal Hematopoiesis With Incident Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 6 juill 2021;78(1):42-52.
7. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoin V, Lépine G, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood.* 10 août 2017;130(6):753-62.
8. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood.* 10 août 2017;130(6):742-52.
9. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 24 févr 2017;355(6327):842-7.
10. Sano Soichi, Oshima Kosei, Wang Ying, Katanasaka Yasufumi, Sano Miho, Walsh Kenneth. CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 20 juill 2018;123(3):335-41.
11. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol.* févr 2018;71(8):875-86.
12. Bhattacharya R, Zekavat SM, Uddin MM, Pirruccello J, Niroula A, Gibson C, et al. Association of Diet Quality With Prevalence of Clonal Hematopoiesis and Adverse Cardiovascular Events. *JAMA Cardiol.* 9 juin 2021;
13. Busque L, Sun M, Buscarlet M, Ayachi S, Feroz Zada Y, Provost S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is associated with clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv.* 9 juin 2020;4(11):2430-8.
14. Bick AG, Weinstock JS, Nandakumar SK, Fulco CP, Leventhal MJ, Bao EL, et al. Inherited Causes of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential in TOPMed Whole Genomes [Internet]. *Genomics*; 2019 sept [cité 25 oct 2019]. Disponible sur: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/782748>
15. Mas-Peiro S, Hoffmann J, Fichtlscherer S, Dorsheimer L, Rieger MA, Dimmeler S, et al. Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J.* 21 févr 2020;41(8):933-9.
16. Pascual-Figal DA, Bayes-Genis A, Díez-Díez M, Hernández-Vicente Á, Vázquez-Andrés D, de la Barrera J, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Progression of Heart Failure With Reduced Left Ventricular

Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 13 avr 2021;77(14):1747-59.

17. Luque Paz D, Riou J, Verger E, Cassinat B, Chauveau A, Ianotto J-C, et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of ASXL1 mutations: a FIM study. *Blood Adv*. 9 mars 2021;5(5):1442-51.
18. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. déc 2014;20(12):1472-8.
19. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet*. 6 juill 2017;101(1):50-64.
20. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. juill 2018;559(7714):400-4.
21. McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Pongstingl H, Stephens J, et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep*. 3 mars 2015;10(8):1239-45.
22. Fabre MA, McKerrell T, Zwiebel M, Vijayabaskar MS, Park N, Wells PM, et al. Concordance for clonal hematopoiesis is limited in elderly twins. *Blood*. 23 janv 2020;135(4):269-73.
23. Cook EK, Izukawa T, Young S, Rosen G, Jamali M, Zhang L, et al. Comorbid and inflammatory characteristics of genetic subtypes of clonal hematopoiesis. *Blood Adv*. 27 août 2019;3(16):2482-6.
24. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 1 janv 2019;4(1):25-33.
25. van den Akker EB, Makrodimitris S, Hulsman M, Brugman MH, Nikolic T, Bradley T, et al. Dynamic clonal hematopoiesis and functional T-cell immunity in a supercentenarian. *Leukemia*. juill 2021;35(7):2125-9.
26. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, Chan W, Jäger M, Yoshida K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia*. sept 2018;32(9):1908-19.
27. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Abou-El-Ardat K, Kiefer KC, et al. Hematopoietic alterations in chronic heart failure patients by somatic mutations leading to clonal hematopoiesis. *Haematologica*. 7 nov 2019;haematol.2019.224402.
28. Lafitte M, Tastet S, Perez P, Serisé M-A, Grandoulier A-S, Aouizerate B, et al. High sensitivity C reactive protein, fibrinogen levels and the onset of major depressive disorder in post-acute coronary syndrome. *BMC Cardiovasc Disord*. déc 2015;15(1):23.
29. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA. C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med*. 2005;9.
30. Cremer S, Kirschbaum K, Berkowitsch A, John D, Kiefer K, Dorsheimer L, et al. Multiple Somatic Mutations for Clonal Hematopoiesis Are Associated With Increased Mortality in Patients With Chronic Heart Failure. *Circ Genomic Precis Med*. août 2020;13(4):e003003.
31. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Oliva B, García-Ruiz JM, Peñalvo JL, Gómez-Talavera S, et al. Subclinical Atherosclerosis Burden by 3D Ultrasound in Mid-Life. *J Am Coll Cardiol*. juill 2017;70(3):301-13.
32. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Sánchez-González J, Vilchez JP, Cecconi A, Mateo J, et al. Accurate quantification of atherosclerotic plaque volume by 3D vascular ultrasound using the volumetric linear array method. *Atherosclerosis*. mai 2016;248:230-7.
33. Guermouche H, Ravalet N, Gallay N, Deswarte C, Foucault A, Beaud J, et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv*. 11 août 2020;4(15):3550-7.
34. Assmus B, Cremer S, Kirschbaum K, Culmann D, Kiefer K, Dorsheimer L, et al. Clonal haematopoiesis in chronic ischaemic heart failure: prognostic role of clone size for DNMT3A - and TET2 -driver gene mutations. *Eur Heart J*. 20 janv 2021;42(3):257-65.
35. van Zeventer IA, de Graaf AO, Wouters HJCM, van der Reijden BA, van der Klauw MM, de Witte T, et al. Mutational spectrum and dynamics of clonal hematopoiesis in anemia of older individuals. *Blood*. 2 avr 2020;135(14):1161-70.
36. Bonnefond A, Skrobek B, Lobbens S, Eury E, Thuillier D, Cauchi S, et al. Association between large detectable clonal mosaicism and type 2 diabetes with vascular complications. *Nat Genet*. sept 2013;45(9):1040-3.
37. Haring B, Reiner AP, Liu J, Tobias DK, Whitsel E, Berger JS, et al. Healthy Lifestyle and Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: Results From the Women's Health Initiative. *J Am Heart Assoc*. févr 2021;10(5):e018789.
38. Fuster JJ, Zuriaga MA, Zorita V, MacLauchlan S, Polackal MN, Viana-Huete V, et al. TET2-Loss-of-Function-Driven Clonal Hematopoiesis Exacerbates Experimental Insulin Resistance in Aging and Obesity. *Cell Rep*. oct 2020;33(4):108326.
39. Heyde A, Rohde D, McAlpine CS, Zhang S, Hoyer FF, Gerold JM, et al. Increased stem cell proliferation in atherosclerosis accelerates clonal hematopoiesis. *Cell*. févr 2021;S0092867421000921.

40. Assmus B, Cremer S, Kirschbaum K, Culmann D, Kiefer K, Dorsheimer L, et al. Clonal haematopoiesis in chronic ischaemic heart failure: prognostic role of clone size for DNMT3A - and TET2 -driver gene mutations. *Eur Heart J*. 20 janv 2021;42(3):257-65.

Acknowledgements

This study was supported by the Fondation Cœur Recherche. The authors would like to thank the CRB-K of the University Hospital of Bordeaux for processing of the samples and Coralie Foucault and the Agilent Society for their partnership in supplying NGS reactive. We also thank Marina Migeon, Joël Decombe and Candice Falourd for their technical help.

Authorship

TC, OM and CJ designed the study. SF, YP, TC enrolled the patients in the study and performed all cardiovascular evaluation. SM, OM analysed the NGS data. SF, SM, CJ, TC and OM wrote the paper. All authors read and agreed to the final version of the manuscript.

Table 1. Characteristics of the population at the time of the event depending on CHIP status

	All patients n=106	Patients without CHIP n=48	Patients with CHIP n=58	P-value (CHIP vs non-CHIP)
Male, n (%)	69 (65%)	34 (69%)	35 (61%)	0.39
Age, years	82 [79.0-87.0]	81 [78.0-85.0]	82 [80.0-87.0]	0.13
Risk factors				
BMI, kg/m ²	25.1 [22.7-27.5]	25.6 [23.1-27.5]	25.1 [22.5-27.5]	0.45
Diabetes, n (%)	33 (31%)	20 (41%)	13 (23%)	0.053
HbA1c, %	5.90 [5.60-6.60]	6.15 [5.70-7.07]	5.70 [5.50-6.10]	< 0.01
Hypertension, n (%)	80 (76%)	37 (76%)	43 (77%)	0.88
Dyslipidemia, n (%)	68 (65%)	16 (33%)	21 (38%)	0.6
Smoking, n (%)	3 (2.9%)	2 (4.2%)	1 (1.8%)	0.59
≥ 2 CV risk factors, n (%)	68 (65%)	35 (71%)	33 (59%)	0.18
Myocardial infarction				
ST-segment elevation, n (%)	58 (55%)	26 (54%)	32 (56%)	0.84
Coronary angiography performed, n (%)	104 (98%)	47 (96%)	57 (100%)	0.1
Multi-troncular lesions, n (%)	50 (48%)	19 (40%)	31 (54%)	0.16
Acute phase treatment				
PCI, n (%)	92 (87%)	42 (86%)	50 (88%)	0.86
Medical therapy, n (%)	9 (8.5%)	5 (10%)	4 (7%)	0.73
PCI and CABG, n (%)	3 (2.8%)	1 (2.9%)	2 (3.5%)	1
CABG, n (%)	1 (0.9%)	1 (2%)	0 (0%)	0.46
Fibrinolysis and PCI, n (%)	1 (0.9%)	0 (0%)	1 (1.8%)	1
Acute phase complications before hospital discharge				
All complications*, n (%)	45 (42%)	20 (41%)	25 (44%)	0.75
- Heart failure, n (%)	39 (37%)	18 (37%)	21 (37%)	0.99
- Ventricular arrhythmia/AV block, n (%)	7 (6.6%)	3 (6.1%)	6 (11%)	0.5
- Thrombus, n (%)	4 (3.8%)	2 (4.1%)	2 (3.5%)	1
- Pericarditis/Tamponade, n (%)	3 (2.8%)	1 (2%)	2 (3.5%)	1
Blood test				
Hemoglobin, g/dL	13.60 [12.50-14.30]	13.6 [12.8-14.6]	13.4 [12.1-14.1]	0.26
White blood cells, G/L	9.10 [7.30-11.20]	9.40 [7.40-11.20]	8.85 [7.30-11.20]	0.86
Neutrophils, G/L	6.75 [5.00-8.43]	6.80 [4.70-8.40]	6.70 [5.60-8.70]	0.3
Platelets, G/L	218 [186-265]	218 [176-262]	226 [194-269]	0.36
Creatine, μmol/L	77.5 [67-101]	81 [67-109]	76 [67-96]	0.19
Medical treatment at discharge				
Aspirin, n (%)	94 (95%)	45 (98%)	49 (92%)	0.37
P2Y12 receptor inhibitor, n (%)	88 (89%)	39 (85%)	49 (92%)	0.23
ACEI, n (%)	75 (76%)	36 (78%)	39 (74%)	0.59
ARB, n (%)	14 (14%)	4 (8.7%)	10 (19%)	0.15
Statin, n (%)	94 (95%)	42 (91%)	52 (98%)	0.18
Beta-blocker, n (%)	92 (93%)	42 (90%)	50 (94%)	0.7

Results are expressed in median and interquartile ranges for quantitative variables, and numbers and percentages for qualitative variables. For each variable, results do not include patients with missing values.

In this table we considered any CHIP with VAF ≥2%.

*One patient could suffer more than one complication; all complications were recorded.

Table 2. Characteristics at inclusion and secondary outcomes

	Non-CHIP carriers ^o (n=48)	CHIP-carriers (n=58)	CHIP-carriers except DNMT3A and/or TET2 carriers (n=14)
Time from index event, months	5.00 [4.00-6.00]	4.00 [3.00-5.75]	4.00 [4.00-5.75]
Age, y	81.00 [78.00-85.00]	82.00 [80.00-87.00]	83.5 [78.50-87.00]
Male, n (%)	31 (63%)	38 (67%)	10 (71%)
Blood tests			
Hemoglobin (g/dL)	13.10 [12.50-14.30]	12.70 [12.10-13.60]	13.00 [12.40-14.50]
White blood cells (G/L)	6.40 [5.50-7.50]	6.70 [5.65-7.50]	5.85 [5.50-7.20]
Neutrophils (G/L)	4.15 [2.75-4.92]	4.00 [3.20-4.70]	3.75 [3.18-4.28]
Platelets (G/L)	205 [155-242]	199 [174-253]	190 [162-206]
Total cholesterol (g/L)	1.45 [1.22-1.68]	1.55 [1.23-2.13]	1.46 [1.13-1.70]
LDL-c (g/L)	0.76 [0.63-0.83]	0.85 [0.63-1.09]*	0.86 [0.57-1.04]
HDL-c (g/L)	0.45 [0.39-0.54]	0.46 [0.41-0.54]	0.47 [0.39-0.56]
HbA1c (%)	6.10 [5.80-6.60]	5.90 [5.70-6.20]*	5.70 [5.60-6.00]
Recurrence of CV event between hospital discharge and inclusion			
All CV events, n (%)	2 (4.7%)	7 (14%)	1 (7.7%)
Heart failure, n (%)	0 (0%)	4 (8%)	1 (7.7%)
Myocardial infarction, n (%)	2 (4.7%)	1 (2%)	0 (0%)
Coronary revascularization, n (%)	0 (0%)	2 (4%)	0 (0%)
LVEF (%)	59.50 [49.50-61.00]	56.50 [50.00-65.00]	55.00 [50.00-59.00]
Inflammation			
hsCRP, mg/L	1.20 [0.70-3.20]	2.70 [1.25-6.00]	2.30 [1.00-3.60]
hsCRP > 2 mg/L, n (%)	13 (42%)	23 (66%)	5 (56%)
hsCRP > 5 mg/L, n (%)	6 (19%)	12 (34%)	2 (22%)
Atherosclerosis burden			
Multitroncular lesions, %	40%	54%	57%
Global atheroma volume, mm ³	455 [374-555]	520 [412-612]	515 [492-521]
Right CCA, mm ³	191 [158-248]	252 [164-359]	252 [202-330]
Left CCA, mm ³	241 [164-284]	266 [198-333]	240 [205-347]

Results are expressed in median and interquartile ranges for quantitative variables, and percentages of the concerned group for qualitative variables. For each variable, results do not include patients with missing values. In this table we considered any CHIP with VAF $\geq 2\%$.

^o All comparisons are made with the non-CHIP group, at a VAF of 2%.

* Statistically significant ($p < 0.05$).

Table 3. Characteristics at inclusion according to *DNMT3A/TET2* status and VAF

	Non <i>DNMT3A/TET2</i> [°] (n=48)	<i>DNMT3A/TET2</i> VAF 1% (n=58)	<i>DNMT3A/TET2</i> VAF 2% (n=44)	<i>DNMT3A/TET2</i> VAF 5% (n=21)	<i>DNMT3A/TET2</i> VAF 10% (n=12)
Time from index event, months	5.00 [4.00-6.00]	4.00 [3.00-5.75]	4.00 [3.00-5.75]	4.00 [3.00-5.25]	4.00 [3.00-5.00]
Age, y	81.00 [78.00-87.00]	82.00 [80.00-86.00]	82.00 [80.00-87.00]	83.00 [81.00-85.00]	82.50 [80.20-85.80]
Male, %	71%	60%	65%	67%	67%
Blood tests					
Hemoglobin (g/dL)	13.00 [12.30-14.40]	12.70 [12.1-13.5]	12.40 [12.00-13.40]	13.00 [12.30-13.50]	12.6 [12.30-14.40]
White blood cells (G/L)	5.90 [5.40-7.20]	6.85 [5.88-7.95]	6.80 [5.78-7.50]	7.00 [6.52-7.60]	7.15 [6.45-7.72]
Neutrophils (G/L)	3.80 [2.90-4.53]	4.50 [3.35-5.00]	4.40 [3.25-4.90]	4.60 [4.25-4.95]*	4.70 [4.35-5.35]*
Platelets (G/L)	199 [156-230]	218 [175-254]	224 [191-253]	198 [175-248]	212 [172-260]
Total cholesterol (g/L)	146 [1.21-1.69]	1.50 [1.28-2.10]	1.55 [1.23-2.13]	1.46 [1.26-2.10]	1.37 [1.14-1.92]
LDL-c (g/L)	0.77 [0.62-0.87]	0.78 [0.65-1.04]	0.83 [0.67-1.13]	0.83 [0.69-1.22]	0.78 [0.65-1.09]
HDL-c (g/L)	0.45 [0.38-0.56]	0.47 [0.40-0.54]	0.46 [0.42-0.54]	0.47 [0.41-0.50]	0.47 [0.39-0.53]
HbA1c (%)	6.10 [5.70-6.60]	6.00 [5.70-6.32]	5.90 [5.70-6.25]	5.90 [5.70-6.25]	6.05 [5.53-6.35]
Recurrence of CV event					
All CV events, %	4.4%	15%	16%	24%*	17%
Heart failure (%)	2.2%	6.2%	8.1%	14%	17%
Myocardial infarction (%)	2.2%	4.2%	2.7%	4.8%	0%
Coronary revascularization (%)	0%	4.2%	5.4%	4.8%	0%
LVEF (%)	56.00 [50.00-61.00]	60.00 [46.00-64.50]	60.00 [46.00-64.50]	57.00 [47.00-66.00]	65.5 [44.20-68.00]
Inflammation					
hsCRP, mg/L	1.40 [1.00-3.80]	2.00 [1.00-5.25]	3.00 [1.47-6.75]*	3.60 [1.60-8.07]*	3.60 [1.82-6.25]
hsCRP > 2 mg/L, %	48%	60%	69%	69%	75%
hsCRP > 5 mg/L, %	23%	31%	38%	44%	38%
Atherosclerosis burden					
Multi-troncular lesions, %	47%	49%	53%	62%	58%
Global atheroma volume, mm ³	484 [411-519]	552 [402-608]	552 [395-615]	552 [417-600]	476 [417-562]
Right CCA, mm ³	198 [164-262]	256 [157-393]	256 [152-372]	247 [152-387]	154 [148-282]
Left CCA, mm ³	244 [203-338]	259 [153-317]	270 [175-326]	270 [250-334]	259 [250-272]

Results are expressed in median and interquartile ranges for quantitative variables, and percentages of the concerned group for qualitative variables. For each variable, results do not include patients with missing values.

[°] All comparisons are made with the Non-*DNMT3A/TET2* group, which encompasses patients without CHIP and patients with CHIP but no *DNMT3A* or *TET2* mutation.

* Statistically significant (p<0.05).

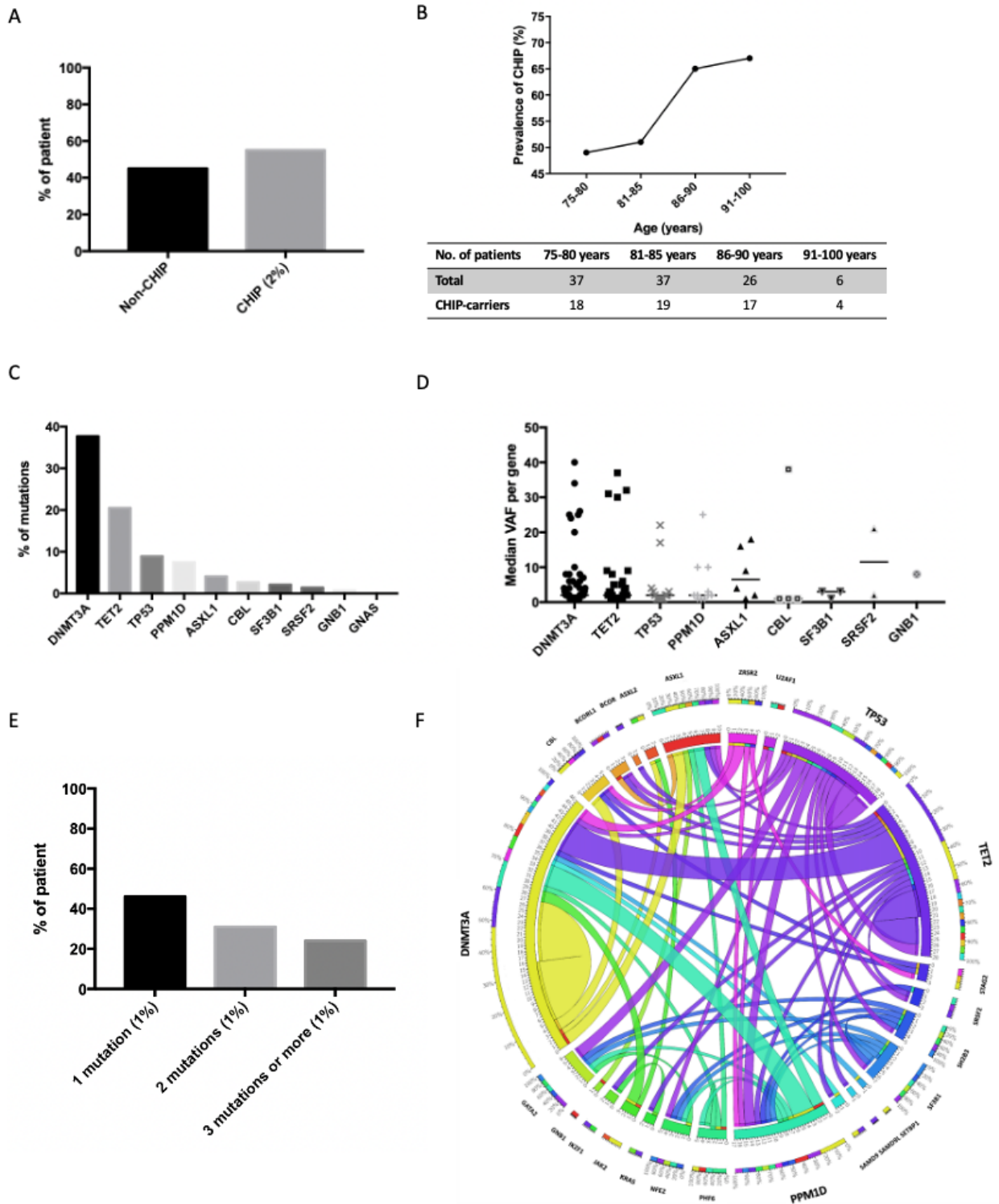


Figure 1. Prevalence and characteristics of detected mutations

(A) CHIP prevalence in our cohort using a VAF threshold of 2% (B) CHIP prevalence in our cohort using a VAF threshold of 2% depending on the age of the patients. (C) List of mutated genes in our cohort. (D) Median variant allele frequency per gene. No significant differences were found by ordinary one-way ANOVA multiple comparisons. (E) Proportion of patients carrying 1, 2 or more than 2 mutations (with VAF \geq 1%) (F) Circos plot representing associations between mutated genes.

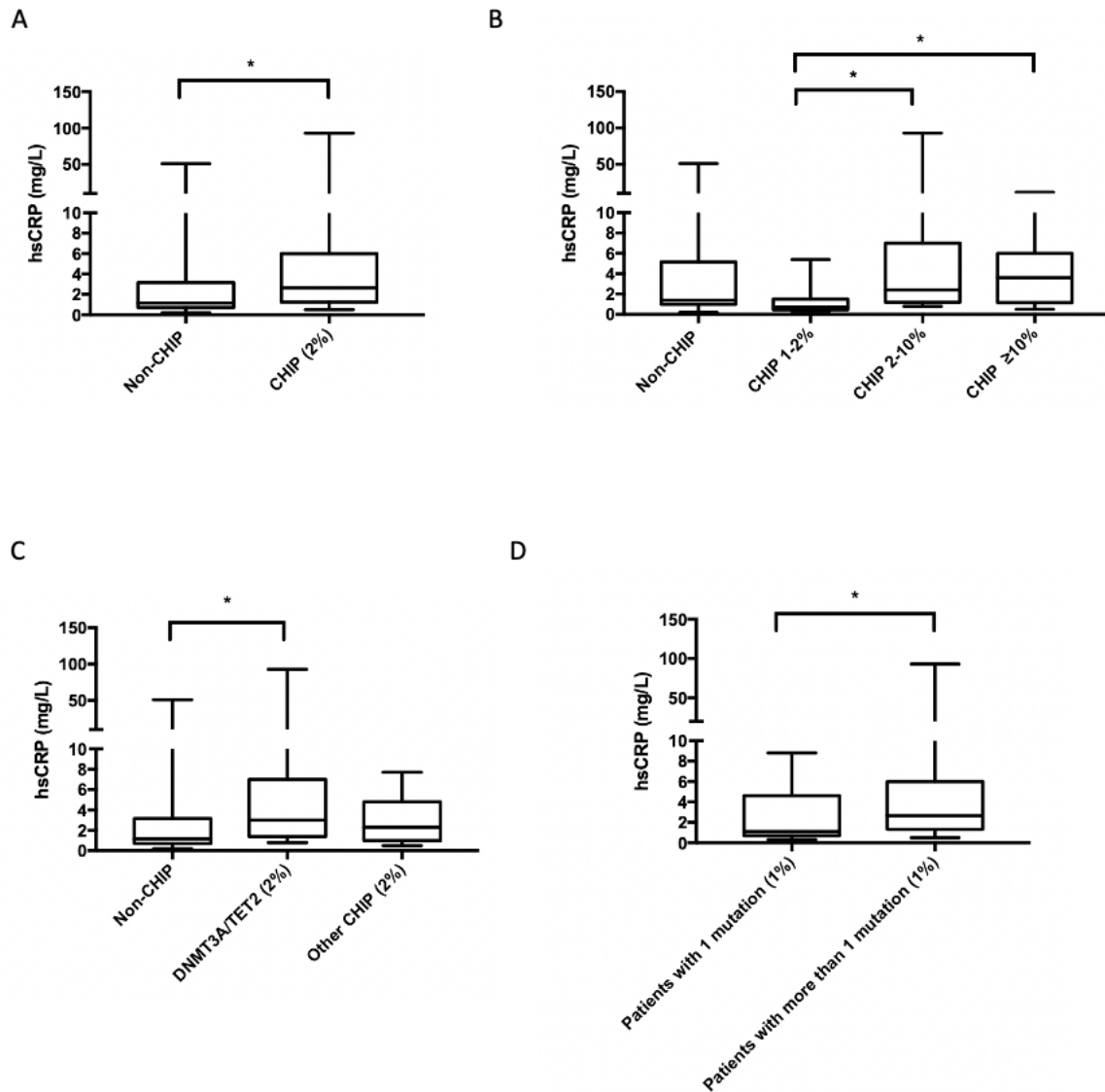


Figure 2. Correlation between CHIP status and inflammation

(A) hsCRP level according to the presence of mutations with VAF $\geq 2\%$. Statistical tests were performed using D'Agostino and Pearson normality test or Shapiro-Wilk normality test (no normality) and Mann-Whitney test (* $p=0.0127$ Non-CHIP (n=30) vs CHIP 2% (n=36)). (B) hsCRP level according to VAF of the higher clone per patient. Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (* $p=0.0179$ CHIP 1-2% (n=9) vs CHIP 2-10% (n=23) and $p=0.0371$ CHIP 1-2% vs CHIP $\geq 10\%$ (n=13), Non-CHIP (n=21)). (C) hsCRP level according to the type of mutation with VAF $\geq 2\%$. Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (* $p=0.0189$ Non-CHIP (n=30) vs DNMT3A/TET2 2% (n=27), Other CHIP 2% (n=9)). (D) hsCRP level according to the number of mutations per patients with VAF $\geq 1\%$. Statistical tests were performed using D'Agostino and Pearson normality test or Shapiro-Wilk normality test (no normality) and Mann-Whitney test (* $p=0.0446$ Patients with 1 mutation 1% (n=17) vs patients with more than 1 mutation 1% (n=28)).

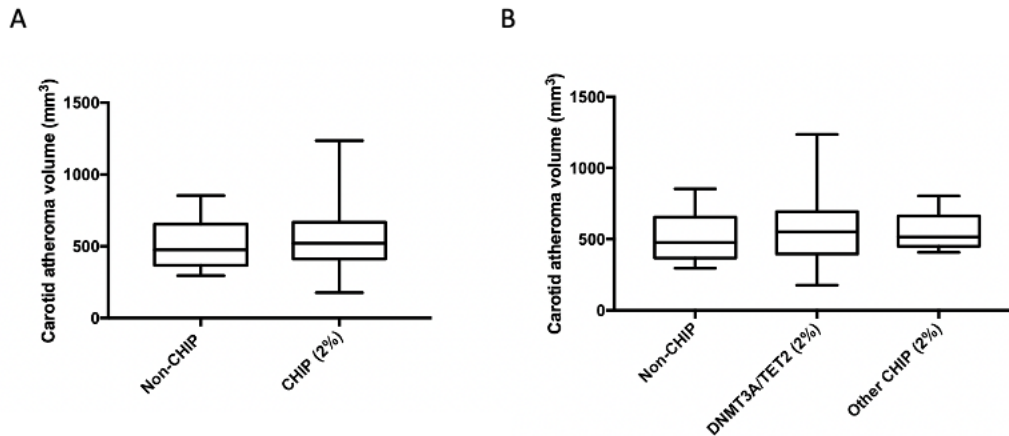


Figure 3. Correlation between CHIP status and atherosclerosis burden

(A) Carotid atheroma volume according to the presence of mutations with VAF of 2%. Statistical tests were performed using D'Agostino and Pearson normality test or Shapiro-Wilk normality test (no normality) and Mann-Whitney test (Non-CHIP (n=9), CHIP 2% (n=21)). (B) Carotid atheroma volume according to the type of mutation with VAF \geq 2%. Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (Non-CHIP (n=9), DNMT3A/TET2 2% (n=16), Other CHIP 2% (n=5)).

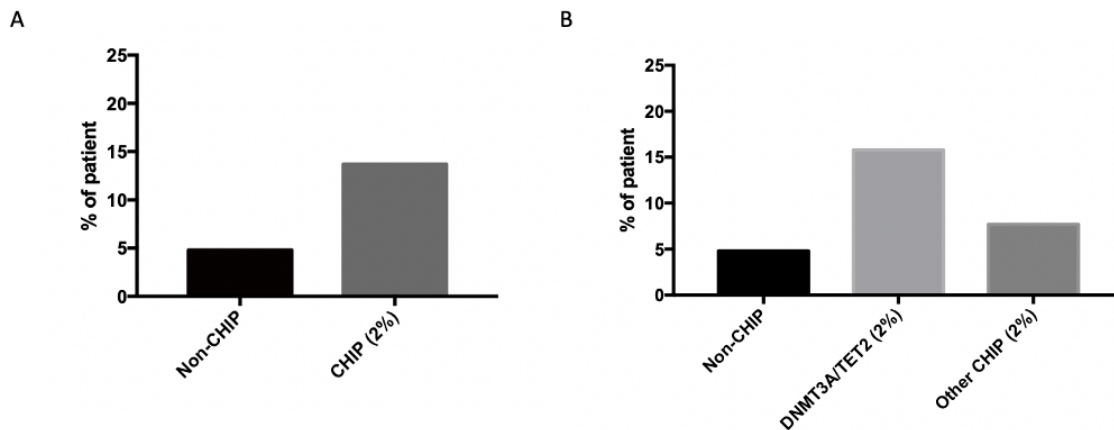


Figure 4. Association between CHIP status and recurrence of cardiovascular event

(A) Prevalence of recurrence of cardiovascular event in patients carrying CHIP with VAF of 2% (Non-CHIP (n=42), CHIP 2% (n=52)). (B) Prevalence of recurrence of cardiovascular event according to the type of mutation with VAF \geq 2% (Non-CHIP (n=65), DNMT3A/TET2 2% (n=38), Other CHIP 2% (n=13)). Statistical tests were performed using Chi-square test.

Supplementary Appendix

Supplementary Methods

Patients' inclusion

Eligible patients were ≥ 75 years and were admitted for a first acute coronary event, without any previous other cardiovascular event in their history. According to guidelines, a myocardial infarction was defined as a myocardial injury with clinical evidence of myocardial ischemia, with significant change in cTroponin levels above the 99th percentile and at least one of the following criteria: symptoms of myocardial ischemia, ischemic ECG changes, development of pathological Q waves, imaging evidence of loss of viable myocardium or new regional wall motion abnormality, identification of a coronary thrombus by angiography.(1) Type 1 myocardial infarctions, and type 2 and 3 if there was evidence of an atherosclerotic coronary disease were included. Myocardial infarctions due to vasospasm, microvascular dysfunction, non-atherosclerotic coronary dissection, oxygen supply/demand imbalance alone were excluded.

The other inclusion criteria were the absence of evidence of hematologic malignancy, known or revealed by blood count at admission at the time of the event. Blood count at admission had to be normal. In case of abnormality on this first blood count, we ran complementary analysis to search for a non-neoplastic cause (hemoconcentration, dilution, inflammation due to an active and reversible condition, vitamin or iron deficiency, bleeding not related to an active neoplasia). If no reversible cause was found and/or if blood count didn't normalize during the hospital stay, the patient was excluded. Hemoglobin was normal if between 12 g/dL and 16 g/dL in women, and 13 g/dL and 17 g/dL in men; platelets count had to be between 150 and 400 G/L, and white blood cells were expected to be between 4 and 10 G/L.

Fourty-nine patients (46%) had an abnormality on blood count at admission, either on white blood cells, hemoglobin or platelets. Twenty-four patients had anemia, twenty-two patients had leukocytosis, and three had low platelets. All of these patients had complementary analysis to search for a reversible cause. Among patients with anemia, 11 had fluid overload, 13 had iron deficiency, three had folates deficiency and two had cyanocobalamin deficiency. Some patients had more than one cause of anemia. Leukocytosis was explained either by inflammation due to the myocardial infarction, pneumonia (3 patients), gout (2 patients) or urinary tract infection (1 patient), and all cases normalized during the hospital stay. The three platelets count abnormalities normalized during the hospital stay, one was due to a platelets aggregate.

Patients who were under legal protective measures, deprived of liberty by court order, unable to give their written informed consent, or having participated to an interventional study on a drug within 30 days before enrolment were ineligible to our study. The patient should be affiliated to a social security regimen.

Data from the index event

Data concerning patient's characteristics comprised: age, gender, body mass index.

For traditional alterable cardiovascular risk factors, smoking was defined as having an active smoking activity or having stopped within the last three years. Hypertension was defined by a systolic blood pressure of at least 140 mmHg and/or a diastolic blood pressure of at least 90 mmHg from the means of daily measures during the hospital stay, or by the use of anti-hypertensive drugs. Dyslipidemia was defined as a c-LDL > 4.1 mmol/L (> 1.6 g/L) and/or c-HDL < 1.03 mmol/L (< 0.4 g/L) in men and < 1.29 mmol/L (< 0.5 g/L) in women, or by the use of lipid-lowering drugs.(2) A threshold of HbA1c $> 6.5\%$ was used to define diabetes, as well as use of anti-diabetic agents.(3)

Data regarding myocardial infarction comprised: existence of a ST-elevation; concerned territory; number of main vessels with a stenosis $> 50\%$, according to the morphological assessment carried out by the cardiologist performing the coronary angiography; acute phase treatment (medical treatment, fibrinolysis, angioplasty, coronary artery bypass graft surgery); presence and type of potential

complications: heart failure defined according to the 2016 ESC guidelines(4), ventricular arrhythmia defined as sustained ventricular tachycardia or ventricular fibrillation, high-degree atrio-ventricular block, pericarditis, mechanical complication comprising mitral regurgitation, ventricular free-wall rupture and ventricular septal defect, intra-cardiac thrombosis diagnosed by echocardiography.

Biological data recorded at the time of the initial admission comprised: blood count, hsCRP, creatinine, lipid profile and HbA1c.

Data at inclusion

The checklist at the inclusion comprised:

- Infection or fever >38.5°C within 15 days prior to hospitalization
- Surgical operation within 30 days prior to hospitalization
- Anti-inflammatory drug within 7 days prior to hospitalization (except for long term treatment)

NGS sequencing and analysis

Library preparation and sequencing

The DNA from the total leukocytes was extracted using Maxwell RSC Instrument (Promega). A custom RNA-baits panel was designed to cover 56 genes involved in myeloid malignancies. The list of the genomic regions targeted is available in the Supplementary Table 1. Libraries were prepared from approximately 200 ng of DNA for each patient using SureSelect XT Low Input kit (Agilent) or using Magnis NGS Prep System (Agilent). Libraries were pooled for multiplex sequencing on a NextSeq500 (Illumina) with Mid Output Kit v2.

Bioinformatic pipeline

We developed a bioinformatic pipeline to analyse sequencing data in order to control each step of analysis. FASTQ files were generated by bcl2fastq. They were then aligned against reference genome hg19 (2013) with bwa-mem, producing BAM files. After this step, duplicate reads were tagged but not removed using agilent locatit software. Finally, coverage analysis was performed with bbctools, mosdepth, samtools and resulting metrics were gathered with MultiQC to assess sequencing data quality, including depth of coverage for every gene of panel. For this study we used 3 different tools for variant calling in order to detect with good accuracy mutations in samples. We have chosen GATK Mutect2, VarScan and VarDict to detect somatic mutations. Annovar software (version 2020-06-08) and ensembl VEP (v.103) were used to annotate all called variants. Following databases were used:

- COSMIC 92 (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)
- gnomAD 2.1.1 (The Genome Aggregation Database), ExaC (The Exome Aggregation Consortium), 1000 genome, ESP (Exome Sequencing Project) to assess variant frequency in world population
- SIFT, PolyPhen2, PROVEAN (in-silico pathology prediction tools)
- dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database)
- ClinVar (2021-01-03) (information on the relationships between variants and human health): this descriptor allows to know clinical effect of variant
- InterVar (software tool for automatic clinical interpretation of genetic variants by the ACMG/AMP 2015 guideline)

Review and classification of mutations

Intronic and synonymous mutations were removed as well as variants with VAF <1% and variants with a minor allele frequency (MAF) $\geq 0.1\%$ listed in databases (dbSNP, gnomAD, ExaC, 1000 genome, ESP). Variants known as recurring artifact (manually curated and stocked in a local database) were also removed.

Finally, retained variants were reviewed independently by 2 molecular biologists for (i) visual inspection of reads in BAM file to conclude for real mutation or artifact and for (ii) classification of the pathogenicity of mutations. To be interpretable, the generated data had to meet the following criteria:

- Minimum read depth of 200X
- Sufficient coverage of the different regions in both reading directions
- Total number of reads corresponding to the variant must be greater than 10

In order to have more confidence in variants with low VAF, we distinguished them from artifacts by estimating the background noise *via* the median absolute deviation and the corresponding confidence intervals. To exclude variants that could represent artifacts, we only retained those that presented a VAF at least 2-fold higher than the upper limit of the confidence interval.

The classification of mutations was based on the consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and the American Society of Clinical Oncology.⁽⁵⁾ Variants were classified as pathogenic, likely pathogenic or of unknown significance according to the criteria shown in Supplemental Table 2.

Supplementary References

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 14 janv 2019;40(3):237-69.
2. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* [Internet]. 10 sept 2019 [cité 13 avr 2021];140(11). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000677>
3. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*. 1 janv 2019;42(Supplement 1):S13-28.
4. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 14 juill 2016;37(27):2129-200.
5. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. janv 2017;19(1):4-23.

Supplementary Tables

Table S1. Gene panel used in the Hematology laboratory of the Bordeaux University Hospital for the diagnosis and follow-up of myeloid hemopathies and used in this study

Gene	Transcript		Gene	Transcript		Gene	Transcript	
ANKRD26	NM_014915.2	5'UTR	GNAS	NM_000516.5	exon 8	RIT1	NM_006912	exon 5
ASXL1	NM_015338.5	whole exon	GNB1	NM_002074.4	exon 5-6	RUNX1	NM_001754.4	whole exon
ASXL2	NM_018263	exon 11-12	IDH1	NM_005896.2	whole exon	SAMD9	NM_017654	whole exon
BCOR	NM_001123385	whole exon	IDH2	NM_002168.2	whole exon	SAMD9L	NM_001303497.2	whole exon
BCORL1	NM_021946	whole exon	IKZF1	NM_006060.6	whole exon	SETBP1	NM_015559.2	exon 4
CALR	NM_004343.3	exon 9	JAK2	NM_004972	whole exon	SF3B1	NM_012433.2	exon 13-16
CBL	NM_005188.2	whole exon	KDM6A	NM_021140.2	whole exon	SH2B3	NM_005475.2	whole exon
CCND2	NM_001759.3	exon 5	KIT	NM_000222.2	whole exon	SMC1A	NM_006306	whole exon
CEBPA	NM_4364.3	whole exon	KRAS	NM_033360.2	whole exon	SMC3	NM_005445.3	whole exon
CSF3R	NM_156039.3	whole exon	MPL	NM_005373.2	whole exon	SRSF2	NM_003016.4	whole exon
CUX1	NM_181552.3	whole exon	MYC	NM_001354870	whole exon	STAG2	NM_001042749.2	whole exon
DDX41	NM_016222	whole exon	NFE2	NM_006163.2	whole exon	TERC	NM_001566.1	whole exon
DNMT3A	NM_175629.1	whole exon	NPM1	NM_002520	exon 11	TERT	NM_198253	whole exon
ETNK1	NM_018638	exon 3	NRAS	NM_002524.3	whole exon	TET2	NM_001127208.1	whole exon
ETV6	NM_001987.4	whole exon	PHF6	NM_001015877	whole exon	TP53	NM_000546.4	whole exon
EZH2	NM_004456.4	whole exon	PPM1D	NM_003620	exon 6	U2AF1	NM_001025203.1	whole exon
FLT3	NM_004119	whole exon	PTEN	NM_000314.4	exon 5-7	WT1	NM_001198551	exon 7 + 9
GATA1	NM_002049.3	whole exon	PTPN11	NM_002834.3	exon 3 + 13	ZRSR2	NM_005089	whole exon
GATA2	NM_032638	whole exon + intron 4	RAD21	NM_006265.2	whole exon			

Table S2. Characteristics of the identified mutations according to the degree of certainty of their pathogenicity (deleterious, possibly deleterious or variant of undetermined significance)

Deleterious variant (A)*	<ul style="list-style-type: none"> - Variant resulting in a truncated protein - Variant described in myeloid hemopathies (COSMIC) as somatic or VAF in favor of a somatic origin (<40% or between 60% and 80%) - Variant with demonstrated functional effect (including splicing)
Possibly deleterious variant (B)*	<ul style="list-style-type: none"> - Variant not probably deleterious, with MAF <0.1% and VAF <40% or >60% (probably somatic origin)
Variant of undetermined significance (C)	<ul style="list-style-type: none"> - Variant not probably deleterious with VAF between 40 and 60% or equal to 100% (probably rare SNP) - Splice variant predicted without impact by Human Splicing Finder

Excepted for :

- *ASXL1/ASXL2/TET2*: only variants resulting in a truncated protein were retained as deleterious variant (A). For *TET2*, missense mutations were retained only when they affected CD1 or CD2 domain
- *ANKRD26*: non-coding region 5'-UTR was retained
- *TP53*: database IARC (<https://p53.iarc.fr/>) was used for the classification

* Only variants classified as A or B are retained as CHIP in the study.

Supplementary Figures

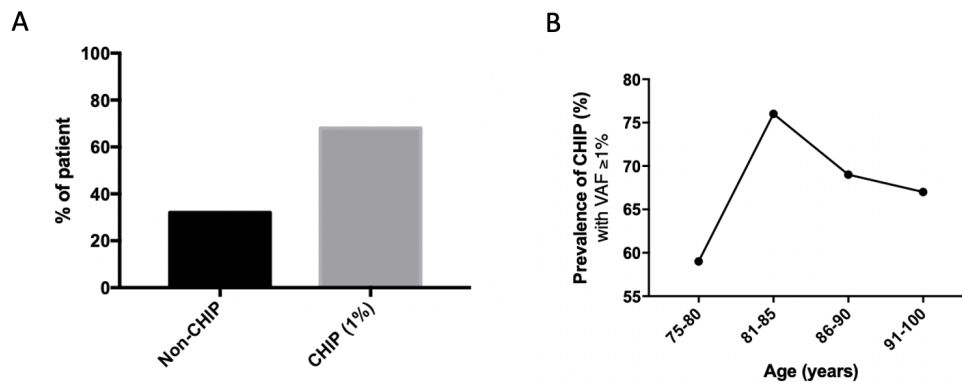


Figure S1. Prevalence of mutations according to a VAF threshold of 1%

(A) CHIP prevalence in our cohort using a VAF threshold of 1%. (B) CHIP prevalence in our cohort using a VAF threshold of 1% depending on the age of the patients.

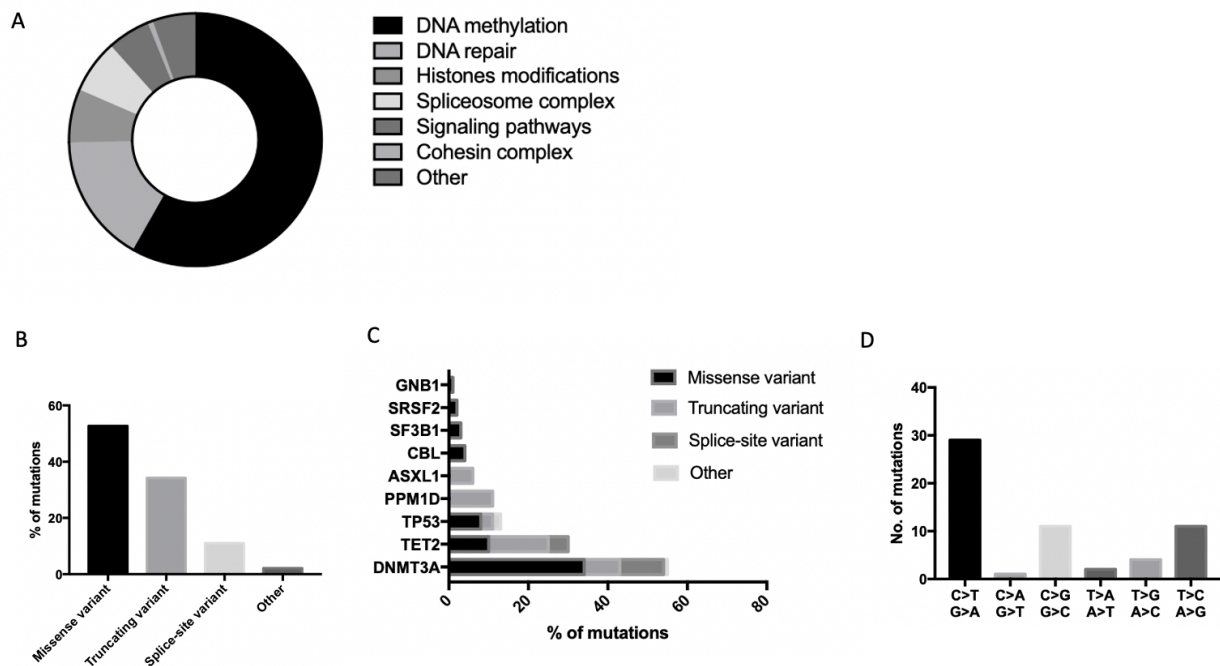


Figure S2. Characteristics of detected mutations

(A) Proportions of pathways mutated in our cohort. DNA methylation group: *DNMT3A* and *TET2*; DNA repair group: *TP53* and *PPMD1*; histones modifications group: *ASXL1*, *ASXL2*, *BCOR*, *BCORL1* and *SETB1*; spliceosome complex group: *SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSF2* and *U2AF1*; signaling pathways group: *CBL*, *GNB1*, *GNAS*, *JAK2* and *KRAS* and cohesin complex group: *STAG2*, *RAD21*, *SMC3* and *SMC1A*. The other genes category includes: *GATA2*, *IKZF1*, *NFE2*, *PHF6*, *SAMD9*, *SAMD9L*, *SH2B3*. (B) Type of mutations identified. Truncating variant groups stop gain and frameshift mutations and the other category includes stop loss and non-frameshift mutations. (C) Type of mutations according to mutated genes. (D) Type of single nucleotide base-pair changes.

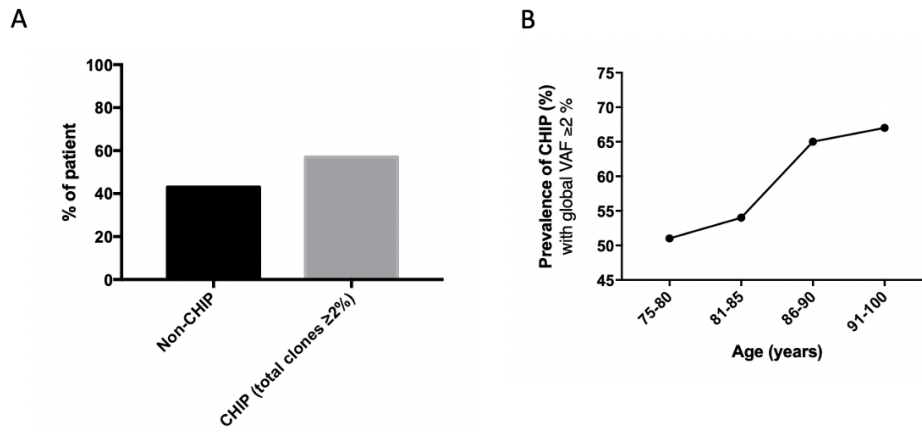


Figure S3. Prevalence of mutations according to the global VAF of multiple clones

(A) CHIP prevalence in our cohort considering the sum of the VAF of all mutations detected in a single patient. (B) CHIP prevalence in our cohort using the sum of the VAF of all mutations detected in a single patient depending on the age of the patients.

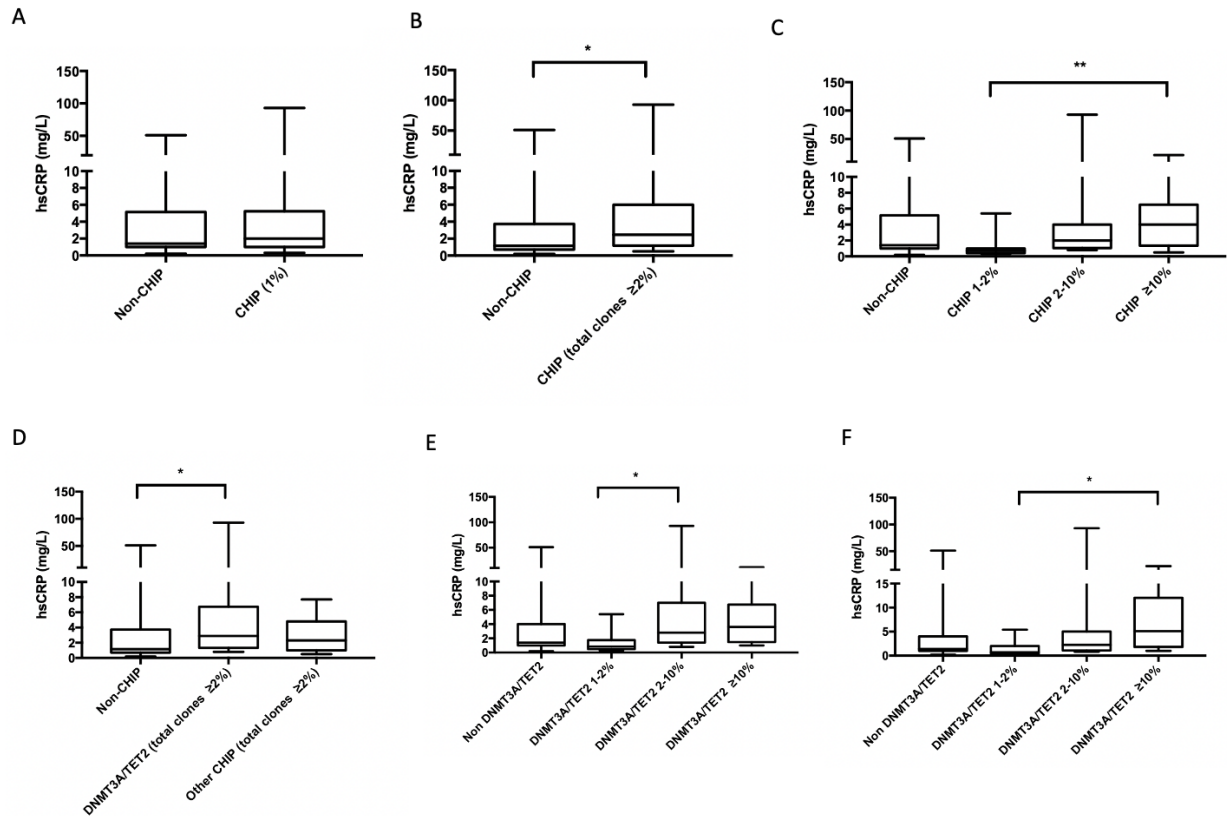


Figure S4. Correlation between CHIP status and inflammation

hsCRP level according to the presence of (A) mutations with VAF of 1% (Non-CHIP (n=21), CHIP 1% (n=45)) or (B) with global VAF (sum of all clones) of 2%. Statistical tests were performed using D'Agostino and Pearson normality test or Shapiro-Wilk normality test (no normality) and Mann-Whitney test (*p=0,0232 Non-CHIP (n=28) vs CHIP total clones 2% ((n=38)). (C) hsCRP level according to global VAF per patient. Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (**p=0.0075 CHIP 1-2% (n=7) vs CHIP \geq 10% (n=17), Non-CHIP (n=21), CHIP 2-10% (n=21)). (D) hsCRP level according to the type of mutation with global VAF \geq 2%. Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (*p=0.0376 Non-CHIP (n=28) vs *DNMT3A/TET2* total clones 2% (n=28), Other CHIP total clones 2% (n=9)). hsCRP level according to VAF of the higher clone *DNMT3A* or *TET2* per patient (E) or global VAF (F, sum of *DNMT3A* and *TET2* clones). Statistical test performed was Kruskal-Wallis test Multiple comparisons (*p=0.0282 *DNMT3A/TET2* 1-2% (n=8) vs *DNMT3A/TET2* 2-10% (n=19), Non-*DNMT3A/TET2* (n=31), *DNMT3A/TET2* \geq 10% (n=8) and p=0.0141 *DNMT3A/TET2* 1-2% (n=7) vs *DNMT3A/TET2* \geq 10% (n=10), Non *DNMT3A/TET2* (n=31), *DNMT3A/TET2* 2-10% (n=18)).

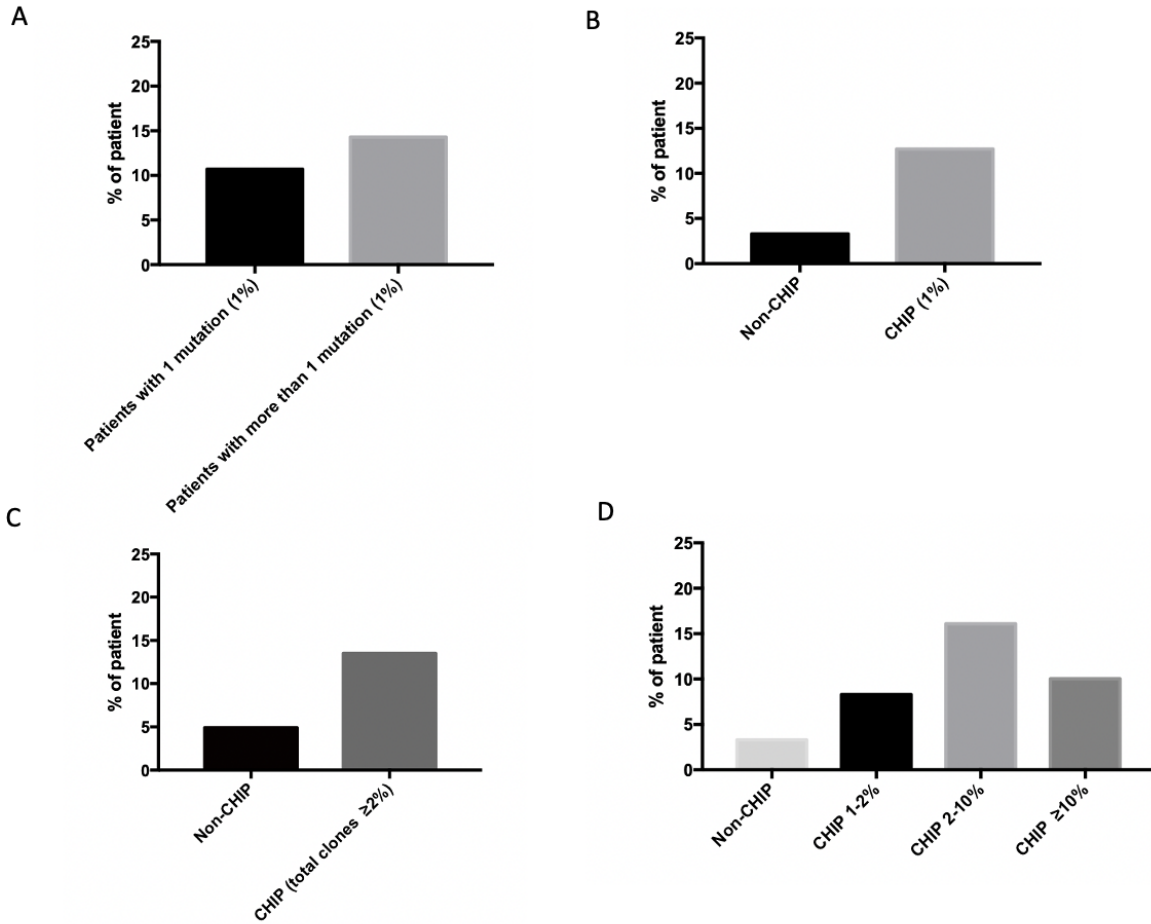


Figure S5. Association between CHIP status and recurrence of cardiovascular event

(A) Prevalence of recurrence of cardiovascular event according to the number of mutations per patients with VAF $\geq 1\%$ (Patients with 1 mutation 1% (n=28), patients with more than 1 mutation 1% (n=35)). (B) Prevalence of recurrence of cardiovascular event in patients carrying CHIP with VAF of 1% (Non-CHIP (n= 30), CHIP 1% (n=63)) and (C) with global VAF (sum of all clones) of 2% (Non-CHIP (n=41), CHIP total clones 2% (n=52)). (D) Prevalence of recurrence of cardiovascular event according to VAF of the higher clone per patient (Non-CHIP (n=30), CHIP 1-2% (n=12), CHIP 2-10% (n= 31), CHIP $\geq 10\%$ (n=20)). Statistical tests were performed using Chi-square test.

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons recherché chez 106 sujets de plus de 75 ans ayant fait un premier évènement cardiovasculaire la présence d'une CHIP, que nous avons corrélée à l'existence d'une inflammation de bas grade et au volume athéromateux carotidien des patients.

Il convient de noter que parmi les sujets inclus dans l'étude, certains présentent une NFS subnormale avec cytopénies modérées. En absence d'examen cytologique et cytogénétique de la moelle osseuse, nous ne pouvons pas exclure qu'il puisse s'agir d'un SDM débutant chez des sujets âgés. D'autant plus que chez les patients atteints de SMD (hémopathies au cours desquelles des mutations similaires à celles identifiées dans les CHIP sont retrouvées), une augmentation de la mortalité par ECV a été mise en évidence, (130) notamment dans les cas de SMD de bas risque (survie > 5 ans) où un taux de CRP élevé serait associé à un mauvais pronostic. (131) Néanmoins, pour chacun de ces patients, les anomalies de NFS pouvaient être liées à des facteurs confondants, tenant à l'évènement cardiovasculaire lui-même, ou l'existence de comorbidités (carences et insuffisance rénale notamment). Par ailleurs, nous n'avons noté aucune relation entre l'existence d'anomalie de la NFS et la mise en évidence d'une mutation.

La prévalence des CHIP identifiées dans notre étude (68% avec une VAF $\geq 1\%$ et 55% avec une VAF $\geq 2\%$) est supérieure à celle retrouvée dans la plupart des publications. En effet, les premières études sur le sujet estimaient une prévalence de 10-20% de CHIP après 75 ans. (10,11) Cependant, ces études utilisaient des techniques de WES moins sensibles que le séquençage ciblé restreint à un panel de gènes que nous avons utilisé. Dans une étude récente, basée sur des volontaires sains de plus de 50 ans, Guermouche *et al* ont identifié par séquençage ciblé, 40% de CHIP au seuil de 1% (23% au seuil de 2%). (132) De même, dans la population générale et pour une VAF de 2%, Buscarlet *et al* observaient une CHIP chez 24,5% des patients de plus de 80 ans et Cook *et al*, chez 23,1% des plus de 65 ans. (100,127) De manière surprenante, dans une cohorte de sujets âgés de plus de 70 ans, Busque *et al*, n'observaient aucune différence dans la fréquence des CHIP que les sujets aient un antécédent de maladie coronaire ou non (21,1% vs 25,3%). (98) Enfin, dans des cohortes de sujets atteints de pathologies cardiovasculaires, Dorsheimer *et al* et Arends *et al*, mettaient en évidence une CHIP, respectivement, chez seulement 27,9% et 33% des sujets de plus de 70 ans. (15,82) Cependant, une étude récente sur une cohorte de sujets atteints d'insuffisance cardiaque a identifié avec un seuil de VAF à 2%, une fréquence de CHIP de 46% proche de celle que nous avons mise en évidence dans notre étude. (101)

Comme décrit dans la littérature, nous constatons une augmentation de la prévalence des CHIP avec l'âge pour un seuil de VAF à 2%. Cependant, nous ne retrouvons pas d'augmentation avec l'âge de la

proportion des sujets porteurs d'une mutation avec une VAF $\geq 5\%$ ou $\geq 10\%$, suggérant qu'il n'existe pas de relation évidente entre l'âge du patient et la taille du clone (Figure 25).

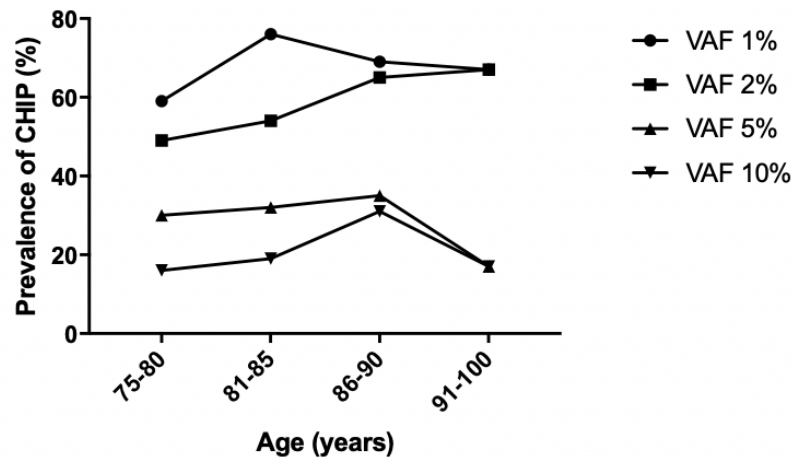


Figure 25 : Prévalence des CHIP selon l'âge du patient et la taille du clone

Prévalence des CHIP dans notre cohorte en utilisant un seuil de VAF (VAF du plus gros clone par patient) à 1%, 2%, 5% et 10% et en fonction de l'âge des patients.

En ce qui concerne les cas de mutations ponctuelles, la principale substitution retrouvée est une transition C>T, caractéristique du phénomène lié à l'âge de désamination spontanée de 5-methylcytosine en thymine au niveau des dinucléotides CpG. (10)

Les mutations identifiées dans notre étude intéressent un nombre restreint de gènes. En effet, le total des 146 mutations retrouvées dans notre cohorte a été identifié dans seulement 25 gènes. Les deux principaux gènes identifiés dans notre étude sont, comme attendu (Figure 2), *DNMT3A* et *TET2*, représentant à eux deux 58,2% des mutations. Conformément à ce qui est décrit dans le cas des CHIP, (11) la majorité des mutations que nous avons retrouvées sont des mutations de type faux sens (52,7%), 34,2% des mutations identifiées aboutissent à des protéines tronquées et de manière surprenante nous retrouvons 11% de mutations situées dans les sites d'épissage à 1 ou 2 bases de l'exon. Nous n'avons identifié ce dernier type de mutation que dans les gènes *DNMT3A* et *TET2*. Notre expérience au CHU de Bordeaux, montre que dans le cas d'hémopathies malignes myéloïdes, les mutations au niveau des sites d'épissage de ces gènes ne sont retrouvées que dans 3,2% des cas. Même si la fréquence de ces mutations est ici inhabituellement élevée, elles ne semblent pas être associées à un niveau d'inflammation basal supérieur (Figure 26).

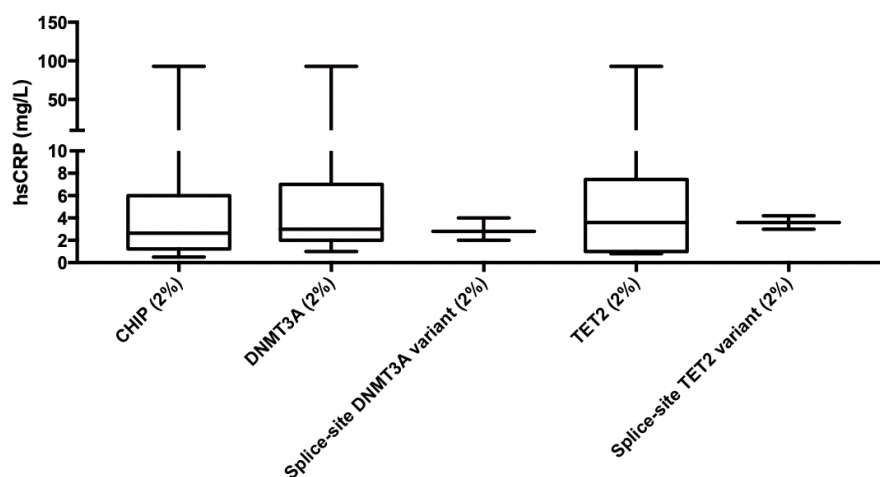


Figure 26 : Niveau de hsCRP selon le type de mutation

Niveau de hsCRP selon la présence d'une mutation de *DNMT3A*, *TET2* ou de mutations aux sites d'épissage (splice-site variant) avec une VAF $\geq 2\%$. Le test statistique effectué est le test de comparaisons multiples de Kruskal-Wallis (*DNMT3A* ($n=19$), Splice-site *DNMT3A* variant ($n=3$), *TET2* ($n=10$), Splice-site *TET2* variant ($n=2$)).

Alors que la grande majorité des mutations impliquant *DNMT3A* identifiées au cours des hémopathies malignes concerne l'arginine en position 882 (R882), des mutations non-R882 ont été fréquemment identifiées dans le cas de CHIP. En effet, dans ce contexte, moins de 10% des mutations de *DNMT3A* affectent le résidu R882. (133) Dans notre cohorte, seules 3 mutations sur l'arginine en position 882 ont été identifiées soit 5,5% de l'ensemble des mutations de *DNMT3A*. Une des hypothèses serait qu'une mutation de *DNMT3A* confère un avantage à la cellule mutée mais que le risque de progression en hémopathie maligne est plutôt associé à la présence d'une mutation R882. (10,11,16,18,127)

Nous ne retrouvons par ailleurs que 37,7% de mutations sur le gène *DNMT3A* soit moins que ce qui est décrit dans la littérature. A contrario, nous identifions 20,5% de mutations sur le gène *TET2* ce qui est supérieur à ce qui est rapporté dans les principales cohortes de CHIP (Figure 2). Ceci est contradictoire avec l'étude de Busque *et al* qui relève plus de mutations de *TET2* parmi les sujets sans antécédents que parmi ceux avec antécédents de maladie coronaire. (98) Il conviendra de noter que notre cohorte regroupe des sujets plus âgés. Or, les clones mutés *TET2* semblent présenter un plus grand avantage prolifératif que ceux mutés pour *DNMT3A* (augmentation annuelle de la VAF de 3,95% en cas de mutation de *DNMT3A* versus 9,98% en cas de mutation de *TET2*). (127) De ce fait, avec l'âge on observe une augmentation de la proportion de mutations de *TET2* et une diminution de la proportion de mutations de *DNMT3A* parmi les patients porteurs de CHIP. (134,135) De plus, en cohérence avec nos résultats, une étude récente a révélé que les mutations de *TET2* (comme *ASXL1*) seraient plus à risque de progression vers une insuffisance cardiaque que les mutations de *DNMT3A*. (136) Ainsi, les mutations de *TET2* pourraient contribuer davantage à l'apparition d'un ECV d'où la fréquence élevée de détection de cette mutation dans notre étude.

Nous n'avons identifié que 6 mutations de *ASXL1* dans notre cohorte. Dans 33% des cas (2/6), il s'agissait de la mutation c.1934dup qui est celle la plus fréquemment identifiée dans les cas d'hémopathies malignes. La prévalence de cette mutation est très variable selon les études de la littérature (Annexes Tableau S1). D'un point de vue technique, cette mutation consiste en l'insertion d'une guanine après un homopolymère de 8 guanines. Or certaines technologies de séquençage détectent mal les mutations dans ce type de région. Nous avons cependant utilisé la technologie Illumina qui ne pose pas ce problème. Les mutations d'*ASXL1* seraient particulièrement retrouvées chez les fumeurs et ex-fumeurs. (137) Dans notre cohorte, seuls 3 sujets sont fumeurs actuels : 1 ne présente pas de mutation, 1 présente une mutation de *ASXL1* avec une VAF de 18% et 1 présente une mutation de *CBL* avec une VAF de 1%.

A l'inverse, la fréquence des mutations de *TP53* et *PPM1D* est étonnement élevée (16,4% de l'ensemble des mutations identifiées) au sein d'une cohorte de sujets à priori sans antécédents de chimiothérapie ou radiothérapie. L'exposition à des génotoxiques autres, non relevés lors de l'interrogatoire, joue potentiellement un rôle dans cette constatation. Les mutations de *TP53* sont majoritairement de type faux-sens et celles de *PPM1D* exclusivement tronquantes conformément à ce qui est décrit dans le cas des hémopathies malignes. *PPM1D* est souvent associé à d'autres gènes mutés, notamment *DNMT3A* (n=4) ou *ASXL1* (n=2) et *TP53* (n=2). Ceci est également vrai pour *TP53* et concordant avec le contexte d'instabilité génomique dans lequel apparaissent les mutations dans ces gènes.

Des mutations touchant des gènes impliqués dans le complexe du spliceosome ont été trouvées dans 6,8% des cas au niveau des points chauds mutationnels habituels. Certaines études suggèrent que les mutations touchant les gènes *SRSF2* et *SF3B1* dans des contextes d'hématopoïèse clonale ne seraient retrouvées que chez les sujets âgés de plus de 70 ans. (134)

Les mutations au niveau du complexe de la cohésine (gènes *STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*) sont rares (0,7% des cas). De la même façon, nous n'avons identifié que peu de mutations de *CBL* (n=5, mutations faux sens qui sont le type de mutation majoritairement trouvé dans les hémopathies malignes), *GNBI* (n=1, mutation au niveau du point chaud mutationnel décrit dans les hémopathies malignes) et *GNAS* (n=0).

Un patient a été exclu du fait de la présence d'un clone *JAK2V617F* (VAF=26%) avec thrombocytose. Un autre patient présentait un clone *JAK2V617F* avec une VAF de 1% et une NFS normale sans notion d'anomalie splénique ni de thrombose digestive. Celui-ci n'a pas été exclu, car comme évoqué précédemment, un seuil de 2% peut être retenu pour associer des mutations *JAK2V617F* à une malignité. (67) On peut cependant difficilement parler de CHIP dans ce contexte. En effet, même si la présence d'un clone *JAK2V617F* de petite taille semble être associée à une augmentation du risque de maladie vasculaire et à une élévation des taux plasmatiques d'IL1 β , (138) la présence d'une mutation *JAK2V617F* est, de manière générale, associée à risque d'ECV 12 fois plus élevé, (78) remettant en cause la notion de mutation de « potentiel indéterminé » dans ce cas.

Enfin, aucune mutation au niveau des gènes *IDH1* ou *IDH2* n'a été identifiée. Il a pourtant été montré, chez des patients atteints de LAM mutées pour *IDH1*, une augmentation de prévalence des maladies coronaires avec déclin de la fonction cardiaque. (139)

A l'heure actuelle, la liste des mutations compatibles avec la définition de CHIP ne comprend que des mutations ponctuelles ou de petites insertions/délétions dans des gènes impliqués dans les hémopathies myéloïdes. Il est donc légitime de se demander ce qu'il en est des autres types de mutations. Ainsi, la présence d'une hématoïèse clonale liée à des mutations dans des gènes « non drivers » ou à de larges altérations chromosomiques semblerait également augmenter avec l'âge et être associée à une surmortalité. (125,140–142) Cependant, leur lien avec les pathologies cardiovasculaires reste peu étudié. Le fait que certains gènes, comme *DNMT3A* et *TET2*, soient surreprésentés dans les cohortes de CHIP, soutient l'idée que les différentes mutations pourraient apparaître à des stades différents de différenciation. Ainsi, les mutations de *DNMT3A* apparaîtraient à un stade CSH très précoce alors que celles de *TET2* apparaîtraient à un stade un peu plus engagé d'où un biais de différenciation myéloïde observé dans les cellules portant cette mutation. Dans ce contexte, les mutations de *JAK2* apparaîtraient à un stade encore plus tardif dans des cellules non douées de capacité d'autorenouvellement. En effet, les mutations de *JAK2* amplifient l'hématoïèse à un stade tardif par opposition à *TET2* qui amplifie l'hématoïèse à un stade précoce. Ainsi, sur modèle murin, une meilleure prise de greffe a été observée avec des cellules humaines *TET2* mutées qu'avec des cellules *JAK2* mutées suggérant un avantage d'autorenouvellement des cellules *TET2* mutées comparé aux cellules *JAK2* mutées. (7) Cela pourrait laisser supposer que l'apparition d'une mutation de *JAK2* dans une cellule non douée de capacité d'autorenouvellement peut entraîner l'apparition d'une « CHIP » *JAK2* transitoire (71) disparaissant à la faveur de la sélection d'un clone présentant une mutation lui conférant un avantage d'autorenouvellement. Dans ce cas, cela serait également vrai pour *CBL*, *GNAS* et *GNBI* car de la même façon, il s'agit de gènes impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire. Ceci serait concordant avec le fait que les mutations dans ces gènes sont rarement retrouvées dans les contextes de CHIP par opposition aux mutations affectant des régulateurs épigénétiques. A noter que *CBL* étant impliqué dans la voie Ras, les mutations touchant ce gène devraient être plutôt rapprochées de celles touchant d'autres gènes comme *PTPN11*, *NRAS* et *KRAS*. Dans notre cohorte, ces 4 mutations représentent 3,4% de l'ensemble des mutations identifiées.

Les mutations associées aux CHIP touchant principalement des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, des auteurs se sont intéressés au lien entre CHIP et étude la méthylation de l'ADN. En effet la méthylation des dinucléotides CpG étant âge-dépendant, la quantification des ADN méthylés est prédictif de l'âge biologique (concept « d'epigenetic clock »). Ainsi, il a été montré que les CHIP sont associées à une augmentation de l'âge épigénétique et que chez des sujets de plus de 70 ans ayant fait un premier ECV, les personnes ayant une CHIP associée à une augmentation de l'âge épigénétique ont un risque encore plus élevé d'ECV. (143,144) Selon les auteurs, l'âge épigénétique serait plus discriminant que la CRP parmi les sujets porteurs de CHIP pour prédire le risque d'ECV.

Plus de la moitié des sujets de notre cohorte présentent 2 mutations ou plus avec une VAF $\geq 1\%$. Chez un même patient, nous avons détecté jusqu'à 8 variants sans aucun critère d'hémopathie maligne. Cependant, en absence de suivi à long terme, nous ne pouvons pas exclure que cela puisse correspondre à un stade précoce d'hémopathie maligne. Ce taux de « clones multiples » est supérieur à ce qui a été précédemment rapporté dans la littérature. En effet, la plupart du temps, une seule mutation est détectée chez les patients dans un contexte de CHIP. (10,11) Les études plus récentes dans la population générale rapportent une fréquence de mutations multiples chez un même patient de 14 à 26%, (98,127,132) et seulement 28,1% dans l'étude de Arends *et al* alors même que celle-ci a été réalisée chez des patients à risque hospitalisés en cardiologie. (15) Le nombre de mutations par patient semble cependant être corrélé avec l'âge, (11,15) or nous n'avons sélectionné que des sujets de plus de 75 ans ce qui pourrait expliquer en partie cette constatation. De plus, il a récemment été montré que l'athérosclérose augmente le risque d'apparition de mutations somatiques au sein des CSH pouvant expliquer que les sujets ayant fait un IDM présentent plus fréquemment une CHIP et notamment plus fréquemment de multiples mutations. (118) Une autre raison pourrait être la sensibilité de notre technique de séquençage permettant la détection de mutations avec une VAF de 1%. Ainsi, 49% (22/45) des mutations additionnelles ont une VAF comprise entre 1 et 2%. Dans ce contexte et considérant que différentes mutations pouvaient conférer des propriétés similaires aux cellules hématopoïétiques, nous avons décidé d'additionner les VAF de l'ensemble des mutations chez un même patient afin de réaliser des études de corrélation. En effet, même si nous n'en n'avons pas la preuve absolue, car ceci nécessiterait des études à l'échelon unicellulaire, il est possible que les différentes mutations ne soient pas retrouvées dans les mêmes clones et ne prendre en compte les charges alléliques qu'individuellement sous estimerait la taille du clone global chez un individu.

Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature, (15,127) les principaux gènes retrouvés mutés en association chez un même patient sont *DNMT3A/DNMT3A* (n=11), *DNMT3A/TET2* (n=6) et *TET2/TET2* (n=5). Dans l'étude de Arends *et al*, les patients mutés *TET2* ont tendance à présenter plus de multiples mutations que ceux mutés pour *DNMT3A*. Dans notre cohorte, parmi les patients mutés *TET2*, 63,6% (14/22) ont plusieurs mutations et parmi les patients mutés *DNMT3A*, 61% (25/41) ont plusieurs mutations.

L'évènement cardiovasculaire lui-même pouvant être un facteur confondant sur le niveau d'inflammation systémique, nous avons évalué le taux de CRP chez les patients à une distance de deux à sept mois après l'évènement. En effet, ce délai est suffisant pour revenir à un niveau d'inflammation « basal ». (145)

Comme montré par Busque *et al*, (98) nous rapportons un taux de CRP significativement plus élevé chez les sujets porteurs d'une mutation avec une VAF $\geq 2\%$ ainsi qu'un niveau d'inflammation à l'état basal corrélé à la taille du clone. De même, nous observons une tendance à une plus grande proportion de patients présentant un taux de hsCRP $>2\text{mg/L}$ chez les porteurs de CHIP que chez les non porteurs.

Parce que ce seuil a été défini comme un marqueur de mauvais pronostic dans les contextes de pathologies cardiovasculaires, (146) ces résultats soutiennent l'idée que les CHIP augmentent le risque d'ECV via l'induction d'un état inflammatoire chronique.

De plus, le seuil de VAF à 2% définissant une CHIP ne serait donc pas uniquement un seuil technique mais il serait également un seuil à utiliser en pratique pour définir l'impact pronostic de la détection d'une mutation. Ainsi, Pascual-Figal *et al* ne montrent pas d'impact de la présence de mutations *DNMT3A* ou *TET2* avec une VAF comprise entre 1 et 2% sur l'évolution de sujets atteints d'insuffisance cardiaque. (101) Cependant, certains auteurs ont montré que même des clones de petites tailles pouvaient être associés à un mauvais pronostic cardiovasculaire. (147) Ainsi, chez 419 sujets atteints d'insuffisance cardiaque chronique, Assmus *et al*, ont montré que la présence d'une mutation de *DNMT3A* au seuil de 1,15% et/ou *TET2* au seuil de 0,73% était déjà associée à une augmentation de la mortalité. (148)

Cependant, si l'impact pronostic des « petits clones » reste controversé, leur association chez un même patient pourrait être tout autre. La présence de plusieurs mutations semble être associée à un risque plus élevé de pathologies artérielles périphériques ainsi qu'à une augmentation de la mortalité chez les sujets atteints d'insuffisance cardiaque. (15,149) Nous ne retrouvons pas d'augmentation du taux de récurrence d'ECV en cas de multiples mutations chez un même patient (14% si plus de 1 mutation vs 11% si une seule). Cependant, nous constatons de manière significative, une élévation du niveau d'inflammation basal. Ceci est concordant avec l'étude de Cook *et al* qui rapportaient un taux d'IL6 plus élevé chez les individus portant plusieurs mutations. (100) Deux patients présentent plusieurs « petits clones » avec des VAF de 1% (un patient présente 2 mutations de *TP53* et 1 mutation de *DNMT3A* soit une VAF globale de 3% et l'autre patient présente 2 mutations de *DNMT3A* soit une VAF globale de 2%). Chez ces patients, les taux de CRP sont respectivement de 3 et 8mg/L correspondant à une inflammation basale comparable aux porteurs de CHIP $\geq 2\%$ (médiane 2.7 [1,25-6] mg/L) et laissant suggérer que les clones de petite taille ont une relevance clinique dès lors qu'ils permettent d'obtenir une proportion de cellules mutées $\geq 4\%$ (VAF globale $\geq 2\%$). Ceci devra cependant être vérifié sur un nombre plus important de patients. Néanmoins, l'impact pronostic de l'association de plusieurs « petits clones » a déjà été évoqué par Cremer *et al*. Dans leur étude, les auteurs rapportent une augmentation de la mortalité chez des sujets atteints d'insuffisance cardiaque dès lors que la VAF globale chez un individu dépasse les 3%. (149) Nous retrouvons également un risque de récurrence de l'ECV trois fois supérieur en cas de VAF globale $\geq 2\%$ chez un sujet associé à une augmentation significative du taux de CRP. Il conviendra cependant de noter que conformément à ce qui avait été rapporté par Buscarlet *et al*, (127) la VAF du plus gros clone par patient augmente avec le nombre de mutation chez un même patient, ce qui rend difficile l'interprétation de nos résultats. L'effectif de la cohorte est, de plus, trop limité pour nous permettre de déterminer l'impact des clones additionnels par des régressions logistiques.

De la même façon que dans les hémopathies malignes toutes les mutations n'ont pas le même impact pronostic, les différentes mutations identifiées dans le cas de CHIP pourraient ne pas avoir les mêmes conséquences. Nous observons en effet, un niveau d'inflammation à l'état basal supérieur chez les patients porteurs de mutations *DNMT3A* ou *TET2* par rapport à ceux présentant une mutation dans d'autres gènes. Un effet différentiel sur le profil inflammatoire dépendant du gène muté ayant déjà été suggéré précédemment. (99) Dans l'étude CANTOS et au contraire de la population générale, chez les patients sélectionnés pour présenter une augmentation de la CRP, la prévalence de CHIP *TET2* est plus importante que celle de CHIP *DNMT3A*. (105) Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de différence marquée entre le taux de CRP associé à la présence d'une mutation de *TET2* et celui associé à une mutation de *DNMT3A* (3,6 mg/L [1-7,45] vs 3 mg/L [2-7], $p=0.63$, Figure 27). Par ailleurs, chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque, la présence d'une CHIP *TET2* était associée à une augmentation du taux de leucocytes. (150) L'association entre présence de CHIP et variation des paramètres sanguins est variable dans la littérature. (101,127) Dans notre étude, nous rapportons, chez les patients porteurs d'une CHIP *DNMT3A* et/ou *TET2*, une tendance à une augmentation du taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles notamment pour des VAF $\geq 5\%$, suggérant l'impact de ces mutations sur le profil inflammatoire.

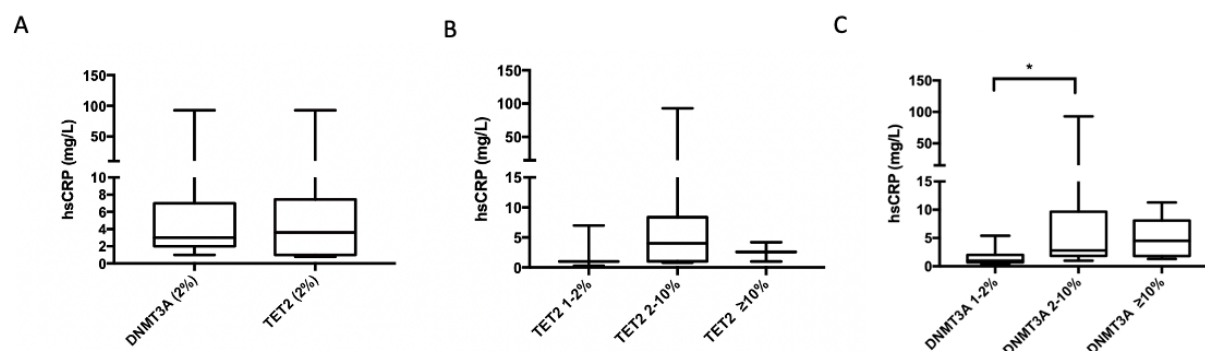


Figure 27 : Niveau de hsCRP selon le gène muté et la taille du clone

A. Niveau de hsCRP selon la présence d'une mutation de *DNMT3A* ou de *TET2* avec une VAF $\geq 2\%$. L'absence de normalité a été vérifiée par les tests d'Agostino and Person ou de Shapiro-Wilk. Le test statistique effectué est le test de Mann-Whitney (*DNMT3A* ($n=19$), *TET2* ($n=10$)). B. Niveau de hsCRP selon la VAF (VAF du plus gros clone par patient) de la mutation *TET2*. Le test statistique effectué est le test de comparaisons multiples de Kruskal-Wallis (*TET2* 1-2% ($n=3$), *TET2* 2-10% ($n=8$), *TET2* $\geq 10\%$ ($n=2$)). C. Niveau de hsCRP selon la VAF (VAF du plus gros clone par patient) de la mutation *DNMT3A*. Le test statistique effectué est le test de comparaisons multiples de Kruskal-Wallis (* $p=0,0419$ *DNMT3A* 1-2% ($n=7$) vs *DNMT3A* 2-10% ($n=13$), *DNMT3A* $\geq 10\%$ ($n=6$)).

Des études sur de plus larges cohortes seraient nécessaires pour déterminer l'effet de mutations impliquant les autres gènes (non *TET2* et non *DNMT3A*) sur le profil inflammatoire et les complications cardiovasculaires. Le mécanisme par lequel les mutations d'*ASXL1* pourraient promouvoir l'inflammation et l'athérosclérose est peu étudié dans la littérature et aucune étude *in vivo* n'a été publiée à ce jour. Récemment des modèles murins ont permis de montrer un lien entre une CHIP *PPM1D* et une

augmentation du remodelage cardiaque. Les macrophages mutés pour *PPM1D* présentaient un profil inflammatoire caractérisé par l'augmentation de la sécrétion d'IL1 β et d'IL18, et l'utilisation d'un inhibiteur de NLRP3 permettait de reverser le phénotype chez la souris. (151) En ce qui concerne *TP53*, il a été montré une association entre une hématoïèse clonale *TP53* et une augmentation de la toxicité cardiaque d'un traitement de chimiothérapie par doxorubicine liée à une augmentation de l'infiltration de polynucléaires neutrophiles activés au niveau du cœur. (152) Ces constatations suggèrent l'implication de ces gènes dans les contextes de pathologies cardiovasculaires.

Nous ne montrons pas de corrélation entre la présence d'une CHIP et une augmentation de la sténose carotidienne dans notre étude. Cela est possiblement dû au faible nombre de patients chez qui cet examen a pu être réalisé et une étude sur une plus large cohorte semble donc nécessaire pour confirmer ces résultats. Il conviendra également de noter que l'ensemble des patients de notre étude ayant fait un ECV, il pourrait être intéressant de comparer le volume athéromateux carotidien chez des patients n'ayant pas encore fait d'ECV afin d'éviter tout élément de confusion. Dans leur étude, Jaiswal *et al* avaient en effet montré une calcification artérielle plus importante chez les sujets porteurs de CHIP par rapport aux sujets sains. (78)

Une question persiste, la présence d'une CHIP constitue-t-elle un FDR CV indépendant ou potentialise-t-elle le risque d'ECV chez des sujets avec FDR CV traditionnels ? Certaines études ne mettent pas en évidence d'association entre CHIP et autres FDR CV. (136,149) D'autres, mettent en évidence que les patients avec une hématoïèse clonale ont tendance à avoir plus de diabète, (10,100,153) à être fumeur, (11,117) à avoir un moins bon régime alimentaire, (154) ou encore à avoir un indice de masse corporelle (IMC) plus élevé. (117) Dans notre cohorte, les sujets porteurs de CHIP tendent à présenter moins fréquemment un diabète et leur taux d'hémoglobine glyquée (HbA1), reflet de la glycémie des 3 derniers mois, est significativement plus bas. Ce résultat est inattendu du fait de la démonstration dans des modèles murins que les CHIP *TET2* pourraient favoriser un état d'insulinorésistance. (155) Cependant, nous ne retrouvons pas de différence significative dans la proportion de sujets présentant plus de 2 FDR CV traditionnels entre les porteurs et les non porteurs de CHIP. Ainsi, bien que les CHIP puissent constituer un FDR CV indépendant, elles ne semblent pas suffisantes pour remplacer certains facteurs de risque traditionnels dans le déclenchement d'ECV. Là encore, ces résultats devront être vérifiés sur un nombre plus important de patients.

De manière très intéressante, la présence CHIP est associée à augmentation du taux de récurrence d'ECV (notamment chez les patients présentant une mutation de *DNMT3A* ou *TET2* avec une VAF supérieure à 5%). Ainsi cela pourrait suggérer une place pour la recherche de CHIP dans le cadre de la prévention secondaire d'ECV.

En pratique, l'intérêt de rechercher une CHIP dans la population générale en systématique peut être remis en cause du fait du risque très rare d'évolution vers une hémopathie maligne. Cependant, la présence d'une CHIP chez un individu avant l'introduction d'une chimiothérapie, augmente le risque d'hémopathies secondaires à un traitement. (156) De même, l'impact pronostic de la présence de CHIP dans le cadre d'une autogreffe soulève la question de l'intérêt de rechercher une CHIP avant de prendre une décision thérapeutique chez ces patients. Enfin, la présence d'une hématoïèse clonale *TP53* pouvant favoriser la toxicité cardiaque de certaines chimiothérapies, la recherche de CHIP pourrait être envisagée en amont chez les patients en cancérologie afin de mieux prévenir cette cardiotoxicité.

Dans le cadre des pathologies cardiovasculaires, l'intérêt semble bien plus évident. En effet, des moyens de prévention existent et prévenir les ECV permettrait de réduire les coûts qui leur sont associés. Il s'agirait alors de mettre en place des mesures hygiéno-diététiques, d'augmenter le suivi des patients voir de cibler l'inflammation comme il a été suggéré via l'utilisation d'inhibiteur d'IL1 β ou d'inhibiteur de NLRP3. (104,107) Cibler l'IL6 pourrait également être une piste thérapeutique du fait de la constatation chez les porteurs de CHIP que la présence d'une mutation du récepteur à IL6 atténue le risque d'ECV. (157) Enfin il pourrait s'agir de cibler la cellule mutée et son expansion en utilisant par exemple la vitamine C capable de restaurer la fonction de *TET2*. (158)

La recherche de mutations somatiques peut maintenant être réalisée facilement grâce à l'expansion des techniques de séquençage haut débit. L'utilisation de techniques de WGS, WES ou un panel de gènes trop large ne semble pas pertinent dans ce contexte compte tenu du nombre limité de gènes identifiés de manière récurrente. Ainsi, en réduisant les coûts des techniques de séquençage nécessaires à la détection des CHIP, cela pourrait permettre à l'avenir d'asseoir la place de cet examen dans la prise en charge des maladies hématologiques et cardiologiques.

D'autres explorations sont nécessaires pour confirmer le lien entre CHIP, inflammation systémique et pathologies cardiovasculaires chez l'Homme.

Outre la CRP, il apparaît intéressant d'étudier d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL1 β , l'IL6, le TNF α , l'IL18 (marqueur de l'inflammation au niveau endothélial) ou encore la cytokine anti-inflammatoire IL10. (99–101) En effet, les données de la littérature sont contradictoires et la corrélation entre présence de CHIP et élévation du taux plasmatique de cytokine inflammatoire chez l'Homme n'est pas toujours retrouvée. (101,159,160) Nous prévoyons donc de réaliser ces dosages à partir des différents prélèvements sanguins obtenus lors de notre étude.

De même, l'expression du CD16, marqueur de monocytes inflammatoires, pourrait être étudiée par cytométrie en flux à la surface des monocytes des sujets porteurs de CHIP. Un autre marqueur, le CD36, exprimé par les monocytes et macrophages, présente une forte affinité pour le LDL-ox. La fixation du ligand à son récepteur active la voie NF κ B augmentant la transcription de NLRP3 et aboutissant à la synthèse d'IL1 β . Ainsi, des monocytes surexprimant le CD36 favoriseraient l'inflammation à l'origine du processus d'athérosclérose. (161)

L'impact de la présence des mutations dans les monocytes et le lien avec profil inflammatoire des cellules ont été bien étudiés. Cependant, les mutations associées aux CHIP peuvent se retrouver aussi bien dans des cellules de l'immunité innée que de l'immunité adaptative. Ainsi, les mutations de *DNMT3A* sont retrouvées au niveau des lymphocytes T et ont été associées chez l'Homme à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la conversion des lymphocytes Treg en d'autres sous-types lymphocytaires favorisant ainsi le déséquilibre des sous-populations lymphocytaires infiltrant la plaque d'athérome. (15,162,163) La diminution des lymphocytes Treg pourrait être associée à une diminution de la production de la cytokine antiinflammatoire IL10 chez les sujets porteurs de CHIP. (87)

Par ailleurs, un élément intéressant pourrait être l'étude de l'impact des CHIP au niveau des polynucléaires neutrophiles et notamment leurs conséquences sur la production de NETs connus pour leur rôle prothrombotique. (164)

En conclusion, notre étude apparait comme innovante du fait de son caractère prospectif. Ceci nous a permis d'étudier pour la première fois chez les mêmes patients les caractéristiques de l'ECV, les FDR CV, la présence d'une CHIP avec une technique de séquençage sensible, des marqueurs de l'inflammation et cela dans un contexte d'athéro-thrombose. La plupart des études publiées à ce jour concerne des patients atteints d'insuffisance cardiaque et très peu ont étudié la présence de CHIP chez des sujets atteints de pathologies athérosclérotiques. A notre connaissance, CHAth est également la première étude évaluant directement la sténose carotidienne chez les porteurs de CHIP, permettant ainsi de vérifier pour la première fois chez l'Homme l'hypothèse d'une inflammation liant les CHIP à l'athérosclérose. Nous mettons ainsi en évidence une très forte prévalence de CHIP dans un contexte d'accident athéro-thrombotique. Nous confirmons également dans ce contexte que la présence d'une CHIP est associée avec une inflammation basale plus importante, avec un possible impact de la taille du clone voire du nombre de mutations détectées. Nous ne confirmons cependant pas de relation entre la présence d'une CHIP et le volume athéromateux carotidien, mais nos données suggèrent une possible relation avec un taux de récurrence d'ECV majoré en présence de CHIP. Des explorations complémentaires pourront encore être réalisées sur cette cohorte afin de mieux comprendre les liens entre CHIP, inflammation et pathologies cardiovasculaires chez l'Homme.

RÉFÉRENCES

1. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2019;20(5):303-20.
2. Lee-Six H, Øbro NF, Shepherd MS, Grossmann S, Dawson K, Belmonte M, et al. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature.* sept 2018;561(7724):473-8.
3. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell.* 20 juill 2012;150(2):264-78.
4. Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr A, Borisch B, Theilkäs L, Schneider V, et al. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta DNA probe. *Blood.* 15 févr 1994;83(4):931-8.
5. Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood.* 1 juill 1996;88(1):59-65.
6. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* nov 2012;44(11):1179-81.
7. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 28 mai 2009;360(22):2289-301.
8. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2 juill 2015;126(1):9-16.
9. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia.* 2017;31(9):1869-71.
10. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2488-98.
11. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med.* 25 déc 2014;371(26):2477-87.
12. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 1 nov 2019;366(6465):eaan4673.
13. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med.* déc 2014;20(12):1472-8.
14. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood.* 1 févr 2018;131(5):496-504.
15. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, Chan W, Jäger M, Yoshida K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia.* sept 2018;32(9):1908-19.
16. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun.* nov 2016;7(1):12484.
17. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Bourgoin V, Mollica L, Dubé M-P, et al. Lineage restriction analyses in CHIP indicate myeloid bias for TET2 and multipotent stem cell origin for DNMT3A. *Blood.* 19 juill 2018;132(3):277-80.
18. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet.* juill 2017;101(1):50-64.
19. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 9 juin 2016;374(23):2209-21.
20. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. *DNMT3A* Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 16 déc 2010;363(25):2424-33.
21. Fried I, Bodner C, Pichler MM, Lind K, Beham-Schmid C, Quehenberger F, et al. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 1 févr 2012;97(2):246-50.
22. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* juill 2011;25(7):1153-8.
23. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blesch C, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* juill 2011;25(7):1217-9.
24. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood.* 6 oct 2011;118(14):3932-41.
25. Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 5 janv 2012;366(1):95-6.
26. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, et al. *TET2* Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 1 avr 2011;29(10):1373-81.

27. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* juill 2009;41(7):838-42.
28. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racœur C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 1 déc 2009;94(12):1676-81.
29. Qivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell.* juill 2011;20(1):25-38.
30. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 14 déc 2010;18(6):553-67.
31. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature.* 9 déc 2010;468(7325):839-43.
32. Fujino T, Kitamura T. ASXL1 mutation in clonal hematopoiesis. *Exp Hematol.* mars 2020;83:74-84.
33. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia.* janv 2013;27(1):82-91.
34. Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, et al. Prognostic Significance of ASXL1 Mutations in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol.* 20 juin 2011;29(18):2499-506.
35. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccioni N, Esterni B, et al. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010;151(4):365-75.
36. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv.* 29 nov 2016;1(1):21-30.
37. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood.* 22 déc 2011;118(26):6920-9.
38. Thol F, Kade S, Schlarman C. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. 2012;119(15):8.
39. Kar SA, Jankowska A, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 1 janv 2013;98(1):107-13.
40. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature.* oct 2011;478(7367):64-9.
41. Patnaik MM, Tefferi A. Refractory Anemia with Ring Sideroblasts (RARS) and RARS with Thrombocytosis (RARS-T) – “2019 Update on Diagnosis, Risk-stratification, and Management”. *Am J Hematol.* avr 2019;94(4):475-88.
42. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia.* janv 2014;28(1):108-17.
43. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med.* 30 juin 2011;364(26):2496-506.
44. Ashot H, Thorsten K, Mario C, Robert K. p53 Lesions in Leukemic Transformation. *N Engl J Med.* 2011;3.
45. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood.* 1 mars 2012;119(9):2114-21.
46. Malcikova J, Pavlova S, Kozubik KS, Pospisilova S. TP53 Mutation Analysis in Clinical Practice: Lessons From Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hum Mutat.* 2014;35(6):663-71.
47. Robles AI, Harris CC. Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. mars 2010 [cité 4 avr 2020];2(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829964/>
48. Oren M, Rotter V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 févr 2010;2(2):a001107-a001107.
49. Hsu JI, Dayaram T, Tovy A, De Braekeleer E, Jeong M, Wang F, et al. PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell.* nov 2018;23(5):700-713.e6.
50. Abbas S, Rotmans G, Lowenberg B, Valk PJM. Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica.* 1 oct 2008;93(10):1595-7.
51. Kales SC, Ryan PE, Nau MM, Lipkowitz S. Cbl and Human Myeloid Neoplasms: The Cbl Oncogene

Comes of Age: Figure 1. *Cancer Res.* 15 juin 2010;70(12):4789-94.

52. Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Clemente MJ, Ng KP, Muramatsu H, et al. CBL mutation-related patterns of phosphorylation and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia.* juill 2012;26(7):1547-54.
53. Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, Chapuy B, Shindoh N, Yoda Y, et al. Mutations in G protein beta subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med.* janv 2015;21(1):71-5.
54. Ostrander EL, Koh WK, Mallaney C, Kramer AC, Wilson WC, Zhang B, et al. The GNAS R201C mutation associated with clonal hematopoiesis supports transplantable hematopoietic stem cell activity. *Exp Hematol.* janv 2018;57:14-20.
55. Pérez de NG, Mantovani G, Fernandez-Rebollo E. GNAS (GNAS complex locus). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* [Internet]. mars 2013 [cité 15 sept 2020];(3). Disponible sur: <http://hdl.handle.net/2042/48758>
56. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet.* 4 déc 2011;44(1):23-31.
57. Li Z, Cai X, Cai C-L, Wang J, Zhang W, Petersen BE, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood.* 27 oct 2011;118(17):4509-18.
58. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell.* 12 juill 2011;20(1):11-24.
59. Fujino T, Goyama S, Sugiura Y, Inoue D, Asada S, Yamasaki S, et al. Mutant ASXL1 induces age-related expansion of phenotypic hematopoietic stem cells through activation of Akt/mTOR pathway. *Nat Commun.* déc 2021;12(1):1826.
60. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC-W, Ramakrishnan A, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell.* mai 2015;27(5):617-30.
61. Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa MM, et al. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood.* 8 févr 2018;131(6):621-35.
62. Smeets MF, Tan SY, Xu JJ, Anande G, Unnikrishnan A, Chalk AM, et al. Srsf2 P95H initiates myeloid bias and myelodysplastic/myeloproliferative syndrome from hemopoietic stem cells. *Blood.* 9 août 2018;132(6):608-21.
63. Jan M, Ebert BL, Jaiswal S. Clonal hematopoiesis. *Semin Hematol.* janv 2017;54(1):43-50.
64. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, Kishtagari A, Syed A, Jonsson P, et al. Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell.* sept 2017;21(3):374-382.e4.
65. Clonal Hematopoiesis and Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 5 oct 2017;377(14):1400-2.
66. Martinaud C, Brisou P, Mozziconacci M-J. Is the JAK2^{V617F} mutation detectable in healthy volunteers? *Am J Hematol.* avr 2010;85(4):287-8.
67. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica.* 1 sept 2014;99(9):1448-55.
68. Cordua S, Kjaer L, Skov V, Pallisgaard N, Hasselbalch HC, Ellervik C. Prevalence and phenotypes of JAK2 V617F and calreticulin mutations in a Danish general population. *Blood.* 1 août 2019;134(5):469-79.
69. Lippert E, Mansier O, Migeon M, Denys B, Nilsson A, Rosmond C, et al. Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica.* 1 juill 2014;99(7):e098-e101.
70. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 28 avr 2005;434(7037):1144-8.
71. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 3 avr 2014;123(14):2220-8.
72. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Cohen NM, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature.* juill 2018;559(7714):400-4.
73. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyian V, Mar BG, Shi J, Jaiswal S, et al. Clonal Hematopoiesis Associated With Adverse Outcomes After Autologous Stem-Cell Transplantation for Lymphoma. *J Clin Oncol.* 10 mai 2017;35(14):1598-605.
74. Ortmann CA, Dorsheimer L, Abou-El-Ardat K, Hoffrichter J, Assmus B, Bonig H, et al. Functional Dominance of CHIP-Mutated Hematopoietic Stem Cells in Patients Undergoing Autologous Transplantation. *Cell Rep.* mai 2019;27(7):2022-2028.e3.
75. Gibson CJ, Kennedy JA, Nikiforow S, Kuo FC, Alyea EP, Ho V, et al. Donor-engrafted CHIP is common

- among stem cell transplant recipients with unexplained cytopenias. *Blood*. 6 juill 2017;130(1):91-4.
76. Frick M, Chan W, Arends CM, Hablesreiter R, Halik A, Heuser M, et al. Role of Donor Clonal Hematopoiesis in Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 10 févr 2019;37(5):375-85.
 77. Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, et al. Lifetime Risks of Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 26 janv 2012;366(4):321-9.
 78. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 13 juill 2017;377(2):111-21.
 79. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol*. févr 2018;71(8):875-86.
 80. Sano S, Oshima K, Wang Y, Katanasaka Y, Sano M, Walsh K. CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 20 juill 2018;123(3):335-41.
 81. Yu K-R, Espinoza DA, Wu C, Truitt L, Shin T-H, Chen S, et al. The impact of aging on primate hematopoiesis as interrogated by clonal tracking. *Blood*. 15 mars 2018;131(11):1195-205.
 82. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 1 janv 2019;4(1):25.
 83. Mas-Peiro S, Hoffmann J, Fichtlscherer S, Dorsheimer L, Rieger MA, Dimmeler S, et al. Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J*. 3 sept 2019;ehz591.
 84. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. janv 2010;10(1):36-46.
 85. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 17 juill 2015;349(6245):316-20.
 86. Silvestre-Roig C, Braster Q, Wichapong K, Lee EY, Teulon JM, Berrebeh N, et al. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature*. mai 2019;569(7755):236-40.
 87. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. mai 2011;473(7347):317-25.
 88. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*. 24 févr 2017;355(6327):842-7.
 89. Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Exp Hematol*. nov 2017;55:56-70.e13.
 90. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*. 17 sept 2015;525(7569):389-93.
 91. Zimmer S, Grebe A, Latz E. Danger Signaling in Atherosclerosis. *Circ Res*. 16 janv 2015;116(2):323-40.
 92. Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 1 juill 2014;35(27):1782-91.
 93. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein (a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *ACC Curr J Rev*. sept 2001;10(5):25-6.
 94. Lim J-Y, Duttke SH, Baker TS, Lee J, Gambino KJ, Venturini NJ, et al. DNMT3A haploinsufficiency causes dichotomous DNA methylation defects at enhancers in mature human immune cells. :21.
 95. Abplanalp WT, Mas-Peiro S, Cremer S, John D, Dimmeler S, Zeiher AM. Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential With Inflammatory Gene Expression in Patients With Severe Degenerative Aortic Valve Stenosis or Chronic Postischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 1 oct 2020;5(10):1170.
 96. Rauch PJ, Silver AJ, Gopakumar J, McConkey M, Sinha E, Fefer M, et al. Loss-of-Function Mutations in Dnmt3a and Tet2 Lead to Accelerated Atherosclerosis and Convergent Macrophage Phenotypes in Mice. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):745-745.
 97. Li X, Zhang Q, Ding Y, Liu Y, Zhao D, Zhao K, et al. Methyltransferase Dnmt3a upregulates HDAC9 to deacetylate the kinase TBK1 for activation of antiviral innate immunity. *Nat Immunol*. juill 2016;17(7):806-15.
 98. Busque L, Sun M, Buscarlet M, Ayachi S, Feroz Zada Y, Provost S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is associated with clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv*. 9 juin 2020;4(11):2430-8.
 99. NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine Consortium, Bick AG, Weinstock JS, Nandakumar SK, Fulco CP, Bao EL, et al. Inherited causes of clonal haematopoiesis in 97,691 whole genomes. *Nature* [Internet]. 14 oct 2020 [cité 25 oct 2020]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2819-2>
 100. Cook EK, Izukawa T, Young S, Rosen G, Jamali M, Zhang L, et al. Comorbid and inflammatory

- characteristics of genetic subtypes of clonal hematopoiesis. *Blood Adv.* 27 août 2019;3(16):2482-6.
101. Pascual-Figal DA, Bayes-Genis A, Díez-Díez M, Hernández-Vicente Á, Vázquez-Andrés D, de la Barrera J, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Progression of Heart Failure With Reduced Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol.* avr 2021;77(14):1747-59.
 102. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* nov 2015;5(1):13886.
 103. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J, et al. Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation.* 4 déc 2012;126(23):2739-48.
 104. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 21 sept 2017;377(12):1119-31.
 105. Svensson Eric C, Madar Aviv, Campbell Catarina D, He Yunsheng, Sultan Marc, Healey Margaret L, et al. Abstract 15111: TET2-Driven Clonal Hematopoiesis Predicts Enhanced Response to Canakinumab in the CANTOS Trial: An Exploratory Analysis. *Circulation.* 6 nov 2018;138(Suppl_1):A15111-A15111.
 106. Fuster JJ, Walsh K. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis: Unexpected Potential New Drivers of Age-Related Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2 févr 2018;122(3):523-32.
 107. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 26 déc 2019;381(26):2497-505.
 108. SanMiguel JM, Young K, Trowbridge JJ. Hand in Hand: Intrinsic and Extrinsic Drivers of Aging and Clonal Hematopoiesis. *Exp Hematol.* sept 2020;S0301472X20305622.
 109. Hormaechea-Agulla D, Matatall KA, Le DT, Kain B, Long X, Kus P, et al. Chronic infection drives Dnmt3a-loss-of-function clonal hematopoiesis via IFN γ signaling. *Cell Stem Cell.* mars 2021;S1934590921001089.
 110. Cai Z, Kotzin JJ, Ramdas B, Chen S, Nelanuthala S, Palam LR, et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis. *Cell Stem Cell.* déc 2018;23(6):833-849.e5.
 111. Abegunde SO, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. An inflammatory environment containing TNF α favors Tet2 -mutant clonal hematopoiesis. *Exp Hematol.* mars 2018;59:60-5.
 112. Meisel M, Hinterleitner R, Pacis A, Chen L, Earley ZM, Mayassi T, et al. Microbial signals drive pre-leukaemic myeloproliferation in a Tet2-deficient host. *Nature.* mai 2018;557(7706):580-4.
 113. Matatall KA, Jeong M, Chen S, Sun D, Chen F, Mo Q, et al. Chronic Infection Depletes Hematopoietic Stem Cells through Stress-Induced Terminal Differentiation. *Cell Rep.* déc 2016;17(10):2584-95.
 114. Cook EK, Luo M, Rauh MJ. Clonal hematopoiesis and inflammation: Partners in leukemogenesis and comorbidity. *Exp Hematol.* mars 2020;83:85-94.
 115. McAlpine CS, Kiss M, Rattik S, He S, Anzai A, Chan CT, et al. Sleep Modulates Hematopoiesis and Protects Against Atherosclerosis. *Atheroscler Suppl.* juin 2018;32:97.
 116. Wong TN, Ramsingh G, Young AL, Miller CA, Touma W, Welch JS, et al. Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature.* févr 2015;518(7540):552-5.
 117. Haring B, Reiner AP, Liu J, Tobias DK, Whitsel E, Berger JS, et al. Healthy Lifestyle and Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: Results From the Women's Health Initiative. *J Am Heart Assoc [Internet].* 2 mars 2021 [cité 21 mars 2021];10(5). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.120.018789>
 118. Heyde A, Rohde D, McAlpine CS, Zhang S, Hoyer FF, Gerold JM, et al. Increased stem cell proliferation in atherosclerosis accelerates clonal hematopoiesis. *Cell.* mars 2021;184(5):1348-1361.e22.
 119. Lusis AJ. A vicious cycle in atherosclerosis. *Cell.* mars 2021;184(5):1139-41.
 120. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* avr 2009;41(4):446-9.
 121. Hinds DA, Barnholt KE, Mesa RA, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 25 août 2016;128(8):1121-8.
 122. Tapper W, Jones AV, Kralovics R, Harutyunyan AS, Zoi K, Leung W, et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun.* nov 2015;6(1):6691.
 123. Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet.* oct 2015;47(10):1131-40.
 124. FinnGen, 23andMe Research Team, Bao EL, Nandakumar SK, Liao X, Bick AG, et al. Inherited myeloproliferative neoplasm risk affects haematopoietic stem cells. *Nature [Internet].* 14 oct 2020 [cité 26 oct 2020]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2786-7>
 125. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis,

- with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 10 août 2017;130(6):742-52.
126. Pegliasco J, Hirsch P, Marzac C, Isnard F, Meniane J-C, Deswarte C, et al. Germline ATG2B/GSKIP-containing 14q32 duplication predisposes to early clonal hematopoiesis leading to myeloid neoplasms. *Leukemia* [Internet]. 25 juin 2021 [cité 5 juill 2021]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41375-021-01319-w>
 127. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoin V, Lépine G, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood*. 10 août 2017;130(6):753-62.
 128. Hansen JW, Pedersen DA, Larsen LA, Husby S, Clemmensen SB, Hjelmborg J, et al. Clonal hematopoiesis in elderly twins: concordance, discordance, and mortality. *Blood*. 23 janv 2020;135(4):261-8.
 129. Fabre MA, McKerrell T, Zwiebel M, Vijayabaskar MS, Park N, Wells PM, et al. Concordance for clonal hematopoiesis is limited in elderly twins. *Blood*. 23 janv 2020;135(4):269-73.
 130. Brunner AM, Blonquist TM, Hobbs GS, Amrein PC, Neuberg DS, Steensma DP, et al. Risk and timing of cardiovascular death among patients with myelodysplastic syndromes. *Blood Adv*. 24 oct 2017;1(23):2032-40.
 131. Baba Y, Saito B, Shimada S, Sasaki Y, Fujiwara S, Arai N, et al. Increased serum C-reactive protein is an adverse prognostic factor in low-risk myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*. 5 juill 2021;
 132. Guermouche H, Ravalet N, Gally N, Deswarte C, Foucault A, Beaud J, et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv*. 11 août 2020;4(15):3550-7.
 133. Amorós-Pérez M, Fuster JJ. Clonal hematopoiesis driven by somatic mutations: A new player in atherosclerotic cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. mars 2020;297:120-6.
 134. McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J, et al. Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Rep*. mars 2015;10(8):1239-45.
 135. van Zeventer IA, de Graaf AO, Wouters HJ, Van der Reijden BA, van der Klauw M, de Witte TM, et al. Mutational spectrum and dynamics of clonal hematopoiesis in anemia of older individuals. *Blood*. 13 févr 2020;blood.2019004362.
 136. Yu B, Roberts MB, Raffield LM, Zekavat SM, Nguyen NQH, Biggs ML, et al. Association of Clonal Hematopoiesis With Incident Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. juill 2021;78(1):42-52.
 137. Bolton KL, Ptashkin RN, Gao T, Braunstein L, Devlin SM, Kelly D, et al. Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. nov 2020;52(11):1219-26.
 138. Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Kaneshiro T, et al. Clonal Hematopoiesis and JAK2V617F Mutations in Patients With Cardiovascular Disease. *JACC CardioOncology*. mars 2021;3(1):134-6.
 139. Kattih B, Shirvani A, Klement P, Garrido AM, Gabdoulline R, Liebich A, et al. IDH1/2 mutations in acute myeloid leukemia patients and risk of coronary artery disease and cardiac dysfunction—a retrospective propensity score analysis. *Leukemia*. mai 2021;35(5):1301-16.
 140. Loh P-R, Genovese G, Handsaker RE, Finucane HK, Reshef YA, Palamara PF, et al. Insights into clonal haematopoiesis from 8,342 mosaic chromosomal alterations. *Nature*. juill 2018;559(7714):350-5.
 141. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet*. juin 2012;44(6):651-8.
 142. Gao T, Ptashkin R, Bolton KL, Sirenko M, Fong C, Spitzer B, et al. Interplay between chromosomal alterations and gene mutations shapes the evolutionary trajectory of clonal hematopoiesis. *Nat Commun*. déc 2021;12(1):338.
 143. Nachun D, Lu AT, Bick AG, Natarajan P, Weinstock J, Szeto MD, et al. Clonal hematopoiesis associated with epigenetic aging and clinical outcomes. *Aging Cell* [Internet]. juin 2021 [cité 26 juin 2021];20(6). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ace1.13366>
 144. Zarzour A, Kim HW, Weintraub NL. Epigenetic Regulation of Vascular Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juin 2019;39(6):984-90.
 145. Lafitte M, Tastet S, Perez P, Serisé M-A, Grandoulier A-S, Aouizerate B, et al. High sensitivity C reactive protein, fibrinogen levels and the onset of major depressive disorder in post-acute coronary syndrome. *BMC Cardiovasc Disord*. déc 2015;15(1):23.
 146. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA. C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med*. 2005;9.
 147. Dorsheimer et al. - 2020 - Hematopoietic alterations in chronic heart failure.pdf.
 148. Assmus B, Cremer S, Kirschbaum K, Culmann D, Kiefer K, Dorsheimer L, et al. Clonal haematopoiesis in chronic ischaemic heart failure: prognostic role of clone size for DNMT3A- and TET2-driver gene mutations. :9.
 149. Cremer S, Kirschbaum K, Berkowitsch A, John D, Kiefer K, Dorsheimer L, et al. Multiple Somatic Mutations for Clonal Hematopoiesis Are Associated With Increased Mortality in Patients With Chronic Heart Failure. *Circ Genomic Precis Med* [Internet]. août 2020 [cité 22 août 2021];13(4). Disponible sur: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGEN.120.003003>
 150. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Abou-El-Ardat K, Kiefer KC, et al. Hematopoietic

- alterations in chronic heart failure patients by somatic mutations leading to clonal hematopoiesis. *Haematologica*. juill 2020;105(7):e328-32.
151. Yura Y, Miura-Yura E, Katanasaka Y, Min K-D, Chavkin NW, Polizio AH, et al. The Cancer Therapy-Related Clonal Hematopoiesis Driver Gene *Ppm1d* Promotes Inflammation and Non-Ischemic Heart Failure in Mice. *Circ Res*. 28 juill 2021;CIRCRESAHA.121.319314.
 152. Sano S, Wang Y, Ogawa H, Horitani K, Sano M, Polizio AH, et al. TP53-mediated therapy-related clonal hematopoiesis contributes to doxorubicin-induced cardiomyopathy by augmenting a neutrophil-mediated cytotoxic response. *JCI Insight*. 8 juill 2021;6(13):e146076.
 153. Bonnefond A, Skrobek B, Lobbens S, Eury E, Thuillier D, Cauchi S, et al. Association between large detectable clonal mosaicism and type 2 diabetes with vascular complications. *Nat Genet*. sept 2013;45(9):1040-3.
 154. Bhattacharya R, Zekavat SM, Uddin MM, Pirruccello J, Niroula A, Gibson C, et al. Association of Diet Quality With Prevalence of Clonal Hematopoiesis and Adverse Cardiovascular Events. *JAMA Cardiol* [Internet]. 9 juin 2021 [cité 22 août 2021]; Disponible sur: <https://jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2780386>
 155. Fuster JJ, Zuriaga MA, Zorita V, MacLauchlan S, Polackal MN, Viana-Huete V, et al. TET2-Loss-of-Function-Driven Clonal Hematopoiesis Exacerbates Experimental Insulin Resistance in Aging and Obesity. *Cell Rep*. oct 2020;33(4):108326.
 156. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, Doss D, Khanna K, Thompson E, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol*. janv 2017;18(1):100-11.
 157. Bick AG, Pirruccello JP, Griffin GK, Gupta N, Gabriel S, Saleheen D, et al. Genetic Interleukin 6 Signaling Deficiency Attenuates Cardiovascular Risk in Clonal Hematopoiesis. *Circulation*. 14 janv 2020;141(2):124-31.
 158. Miller PG, Ebert BL. Vitamin C regulates stem cells and cancer. *Nature*. sept 2017;549(7673):462-4.
 159. Mas-Peiro S, Cremer S, Zeiher AM. Clonal Hematopoiesis and Premature Menopause: Unexpected Liaison. *Circulation*. 2 févr 2021;143(5):424-6.
 160. Kusne Y, Lasho T, Mangaonkar A, Tefferi A, Gangat N, Finke C, et al. Remarkable stability in clonal hematopoiesis involving leukemia-driver genes in patients without underlying myeloid neoplasms. *Am J Hematol*. 21 juill 2021;ajh.26297.
 161. Zhao L, Varghese Z, Moorhead JF, Chen Y, Ruan XZ. CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1 juin 2018;126(1):101-12.
 162. Abplanalp WT, Cremer S, John D, Hoffmann J, Schuhmacher B, Merten M, et al. Clonal Hematopoiesis-Driver DNMT3A Mutations Alter Immune Cells in Heart Failure. *Circ Res*. 6 nov 2020;
 163. Evans CM, Jenner RG. Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Brief Funct Genomics*. 1 nov 2013;12(6):499-511.
 164. Laridan E, Martinod K, De Meyer S. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. févr 2019;45(01):086-93.

ANNEXES

Tableau S1 : Tableau répertoriant les gènes retrouvés mutés dans de grandes cohortes d'études portant sur l'hématopoïèse clonale

Les gènes sélectionnés en gras représentant 86% (6920/8019) du total des CHIP identifiées après exclusion de JAK2. WGS, whole-genome sequencing, WES, whole-exome sequencing, smMIPs, single-molecule molecular inversion probes, ECS, error-corrected sequencing.

Cohorte Technique de séquençage	Genovese NEJM 2014			Jaiswal NEJM 2014			Xie Nat Med 2014			Acuna AJHG 2017			Abelson Nature 2018			Jaiswal NEJM 2017			McDermott Cell Report 2015			Bick Nature 2020			
	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	Gène	Nb de mutations	%	
	DMMT3A	190	58,1	50,1	18	23,4	57	64,7	181	46,2	88	40,2	47	42,0	2391	48,4									
	ASXL1	35	10,7	7,2	8,9	13,0	8	9,1	85	21,7	36	10,0	25	22,3	898	18,2									
	TET2	31	9,5	7,7	10,4	14,4	8	9,1	23	5,9	22	6,3	18	16,1	357	7,2									
	JAK2	24	7,3	4,1	5,8	7,8	7	7,8	17	4,3	21	5,9	15	13,4	172	3,5									
	PPM1D	15	4,6	3,3	4,6	6,4	5	5,6	11	2,8	6	1,7	2	1,8	109	2,2									
	SRSF2	13	4,0	3,4	4,6	6,4	4	4,4	11	2,8	4	1,1	2	1,8	109	2,2									
	DNMT3A	7	2,1	2,7	3,8	5,2	4	4,4	9	2,3	3	0,8	2	1,8	85	1,7									
	ASXL1	7	2,1	2,7	3,8	5,2	4	4,4	9	2,3	3	0,8	2	1,8	85	1,7									
	CBX1	3	0,9	1,4	1,9	2,6	2	2,2	5	1,3	1	0,3	1	0,9	691	14,0									
	Autres	5	1,5	15,4	21	27,3	2	2,2	43	11,0	2	0,6	2	1,8											
Nb de mutations/nb de patients		327/12 380			77/2 728			150/2 014		392/509			219/8 255		112/4 967		4 938 / 97 691								
Cohorte	Buscaferri Blood 2017			Fabre Blood 2020			Dorshamer JAMA Cardiology 201		Van den Akker Blood 2016			Arends Leukemia 2018		Cook Blood Advance 2019											
Technique de séquençage	WES	230	57,2	60	43,2	26,9	14	29,8	29	35,0	59	35,1	34	20,2	41	40,2									
	DMMT3A	134	58,3	40	28,8	87	9	19,1	26	29,5	34	20,2	11	6,5	34	33,3									
	TET2	10	2,5	9	6,5	25,1	4	8,5	8	9,1	11	6,5	9	5,3	5	4,9									
	ASXL1	10	2,5	7,7	10,4	14,4	3	6,4	6	6,8	8	5,3	8	4,8	3	2,9									
	TP53	9	2,2	3,3	4,6	6,4	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	3	2,9									
	JAK2	3	0,8	2,7	3,8	5,2	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	2	1,9									
	CBX1	3	0,8	2,7	3,8	5,2	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	2	1,9									
	Autres	6	1,5	14	19,9	21	2	4,3	6	6,8	2	1,2	2	2,0	6	5,9									
	DMMT3A	230	57,2	60	43,2	26,9	14	29,8	29	35,0	59	35,1	34	20,2	41	40,2									
	TET2	134	58,3	40	28,8	87	9	19,1	26	29,5	34	20,2	11	6,5	34	33,3									
	ASXL1	10	2,5	9	6,5	25,1	4	8,5	8	9,1	11	6,5	9	5,3	5	4,9									
	TP53	9	2,2	3,3	4,6	6,4	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	2	1,9									
	JAK2	3	0,8	2,7	3,8	5,2	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	2	1,9									
	CBX1	3	0,8	2,7	3,8	5,2	2	4,3	4	4,5	3	1,9	3	2,9	2	1,9									
	Autres	6	1,5	14	19,9	21	2	4,3	6	6,8	2	1,2	2	2,0	6	5,9									
Nb de mutations/nb de patients		402/2 530			346/11 262			47/200		88/864			168/437		102/959		8 312/161 532								

Nous avons sélectionné de grandes cohortes (> 100 sujets) et exclu les études présentant un biais lié à la sélection de sujets ayant reçu un traitement par chimiothérapie, présentant une hémopathie ou apparentés à des sujets ayant une hémopathie maligne. Les données issues des 15 cohortes ainsi sélectionnées (Genovese NEJM 2014, Jaiswal NEJM 2014, Xie Nat Com 2014, Acuna AJHG 2017, Abelson Nature 2018, Jaiswal NEJM 2017, McKerrel Cell 2015, Bick Nature 2020, Buscarlet Blood 2017, Fabre Blood 2020, Zink Blood 2017, Dorheimer JAMA 2019, Van den Akker Blood 2019, Arends Leukemia 2018, Cook Blood advances 2019) sont présentées dans le tableau S1. Un certain nombre d'éléments liés à l'hétérogénéité des études ci-dessus doivent être pris en compte :

- Selon la technique de séquençage utilisée (WGS, WES, ciblé, techniques ultra-sensibles telles que l'ECS) la sensibilité de détection des mutations est variable. Les techniques propres à chacune des études sont rapportées dans le tableau S1.
- Le seuil de VAF retenu n'est pas le même pour toutes les études et est parfois en dessous du seuil de 2% définissant une CHIP.
- Les panels de gènes retenus dans les différentes études comprennent de façon générale des gènes impliqués dans les hémopathies myéloïdes cependant certains gènes récurrents dans les CHIP ne sont parfois pas inclus. Par exemple, *PPM1D* est exclu de l'étude d'Acuna-Hidalgo *et al* ainsi que de celle de Cook *et al*, et *TET2* et *PPM1D* ne sont également pas recherchés dans l'étude de McKerrel *et al*. Enfin, les mutations de *PPM1D* n'ont été recherchées que chez 148 des 437 patients de l'étude d'Arends *et al*.
- Selon les études et les techniques utilisées, de potentiels artefacts techniques sont à prendre en considération. Par exemple, la mutation d'*ASXL1* la plus fréquente consiste en l'insertion d'une guanine après un stretch de 8 G, or la technologie de séquençage Ion Torrent, utilisée par Buscarlet *et al* ou Cook *et al*, détecte mal les mutations dans les régions d'homopolymère. De même, pour 2 cohortes (Genovese NEJM 2014, Jaiswal NEJM 2014) les auteurs rapportent une mauvaise couverture de la portion de l'exon 12 d'*ASXL1* portant cette mutation ainsi qu'une mauvaise couverture de certains exons de *TET2*. De ce fait, les mutations d'*ASXL1* et de *TET2* sont probablement sous représentées dans ces études.
- Enfin, la plupart des études sus-citées ont été réalisées à partir de sang veineux périphérique. Seul deux études ont utilisé en partie (Arends *et al*) ou en totalité (Dorsheimer *et al*) des prélèvements médullaires pour la recherche de mutations.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

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

RÉSUMÉ en français :

L'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP) est caractérisée par l'acquisition de mutations au sein de cellules hématopoiétiques en absence de toute hémopathie maligne. Chez la souris, cette condition semble favoriser les pathologies cardiaques par l'induction d'un état inflammatoire chronique. Le but de notre étude était d'évaluer chez l'Homme l'impact de la présence d'une CHIP sur l'inflammation et l'athérosclérose à partir d'une population de patients âgés d'au moins 75 ans et souffrant d'un premier infarctus du myocarde d'origine athérosclérotique. L'existence de mutations somatiques au niveau des leucocytes circulants a été recherchée par séquençage de 56 gènes, chez 106 patients (âge médian 82 ans), deux à sept mois après l'évènement. Au même moment, une échographie 3D des troncs supra-aortiques et un dosage de la CRP ultrasensible (hsCRP) ont été réalisés. La présence d'une mutation avec une fréquence allélique du variant $\geq 2\%$ a été détectée chez 55% des patients et était associée à une augmentation des taux plasmatiques de hsCRP (2,7 mg/L vs 1,2 mg/L, $p=0,0127$). Aucune différence significative n'a cependant été retrouvée concernant le volume athéromateux carotidien entre les porteurs de CHIP et les non porteurs. Ces résultats sont également observés en limitant nos analyses aux principaux gènes identifiés dans notre cohorte, *DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)* et *Ten eleven translocation 2 (TET2)*. A noter que les porteurs de CHIP présentaient un risque de récurrence d'un événement cardiovasculaire trois fois supérieur aux non porteurs. En conclusion, la présence d'une CHIP est fréquente chez les patients souffrant d'un premier infarctus du myocarde après 75 ans et est associée à une inflammation basale plus importante, avec un possible impact de la taille du clone voire du nombre de mutations détectées chez un même patient.

TITRE et RÉSUMÉ en anglais :

Role of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential in cardiovascular events: impact on inflammation and atherosclerosis

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) defines the acquisition of somatic mutations in leukemia-driver genes in hematopoietic cells without any hematological malignancy. This condition has been associated with atherothrombosis and cardiovascular complications via the induction of a chronic inflammatory state in mice. The purpose of this study was to evaluate in human the impact of the presence of a CHIP on inflammation and atherosclerosis in a population of patients aged of at least 75 years and suffering from a first myocardial infarction. The study cohort comprised 106 patients having a first myocardial infarction from atherosclerosis origin (age 82 [79-87] years). Between two and seven months after the acute event, CHIP were searched by Next Generation Sequencing of 56 genes. At this time, supra-aortic trunks ultrasonography with 3D-measurement of atherosclerotic volume and high sensitive CRP (hsCRP) dosage were performed. CHIP mutations with a variant allelic frequency $\geq 2\%$ were detected in 55% of patients and were associated with a significant increase of hsCRP plasmatic levels (2.7 mg/L vs 1.2 mg/L, $p=0.0127$). However, we did not observed any difference in atherosclerosis burden between CHIP carriers and no-carriers. These results are also observed when restricting analysis on the mutations affecting the two main genes, *DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A)* and *Ten eleven translocation 2 (TET2)*. Interestingly, CHIP carriers presented a 3-fold higher risk of recurrence of cardiovascular event between the first event and the inclusion in the study. In conclusion, CHIP is common among patients suffering a first myocardial infarction after 75 years and is associated with a higher chronic inflammatory state, with a possible effect of clone size and number of mutations detected in a same patient.

MOTS-CLÉS :

Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé ; Inflammation ; Athérosclérose ; Facteurs de risque cardiovasculaire