



HAL
open science

La clonalité hématopoïétique de signification indéterminée est-elle associée aux pathologies cardio-vasculaires ?

Ophélie Evrard

► To cite this version:

Ophélie Evrard. La clonalité hématopoïétique de signification indéterminée est-elle associée aux pathologies cardio-vasculaires ?. Médecine humaine et pathologie. 2022. dumas-03665896

HAL Id: dumas-03665896

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03665896v1>

Submitted on 5 Oct 2022

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.



UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

UFR DE MEDECINE

Année : 2022

Numéro de thèse : 2022-3

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité biologie médicale

**LA CLONALITE HEMATOPOÏETIQUE DE
SIGNIFICATION INDETERMINEE EST-ELLE
ASSOCIEE AUX PATHOLOGIES CARDIO-
VASCULAIRES ?**

Soutenue publiquement le 24 janvier 2022

Par EVRARD Ophélie

PRESIDENT DU JURY : Professeur Loïc GARCON

DIRECTEURS DE THESE : Docteur Guillaume JEDRASZAK et Docteur Simon SOUDET

MEMBRES DU JURY : Professeur Marie-Antoinette SEVESTRE-PIETRI et Professeur Romuald MENTAVERRI

Remerciements

Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

(Hématologie - Transfusion)

Chef du service d'Hématologie Biologique

Chef du service de Génétique Constitutionnelle

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir permis de participer à ce projet. Je vous remercie pour vos conseils, votre accueil au sein du laboratoire, ainsi que de votre bienveillance.

Madame le Professeur Marie-Antoinette SEVESTRE-PIETRI

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

(Médecine Vasculaire)

Chef du service de Médecine Vasculaire

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail.

Monsieur le Professeur Romuald MENTAVERRI

Professeur des Universités

(Pharmacie)

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Guillaume JEDRASZAK

Praticien-Hospitalier

(Génétique Constitutionnelle)

Je te remercie de m'avoir confié ce travail, de m'avoir guidé dans sa réalisation, ainsi que pour ton implication.

Monsieur le Docteur Simon SOUDET

Chef de clinique

(Médecine vasculaire)

Je te remercie de m'avoir laissé participer à ce projet, d'avoir mis à ma disposition les réactifs, ainsi que de ton accompagnement lors de la rédaction de ma thèse.

A tous les techniciens de cytogénétique et de génétique moléculaire pour leur disponibilité lors de la réalisation des techniques, et pour tous les moments passés au sein de cette équipe.

A ma famille, pour son soutien.

Résumé

Introduction : La clonalité hématopoïétique de signification indéterminée (CHIP) est définie par la présence de mutations somatiques à une fréquence allélique d'au moins 1 à 2 % dans les cellules hématologiques. Elle favorise la survenue de cancers hématologiques.

La CHIP est rapportée comme associée aux pathologies cardio-vasculaires, elle favoriserait le processus d'athérosclérose. Le mécanisme physiopathologique n'est pas entièrement élucidé.

L'embolie pulmonaire (EP) et l'infarctus du myocarde (IDM) sont des pathologies fréquentes. Leur survenue chez des patients jeunes sans facteurs de risque rend nécessaire la recherche de nouveaux facteurs étiologiques, afin d'optimiser la prise en charge.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un lien entre la survenue d'un événement cardio-vasculaire prématuré et la présence d'une CHIP.

Matériel et méthodes : Nous avons étudié deux cohortes de façon rétrospective.

La première est constituée de 61 patients, âgés de 18 à 65 ans, et ayant présenté une EP idiopathique. La deuxième est constituée de 73 patientes ayant présenté un IDM avant l'âge de 50 ans. La proportion de CHIP parmi les patients de l'étude est recherchée par séquençage haut débit (NGS). Le panel de gène étudié contenait notamment *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*.

Résultats : Parmi les 61 patients de la première cohorte, nous avons retrouvé une ou plusieurs mutations somatiques relevant de la CHIP chez 12 patients, soit 20 % des patients. 15 mutations sont retrouvées dans le gène *DNMT3A*, 3 dans *ASXL1* et 1 dans *TET2*.

Parmi les 73 patientes de la deuxième cohorte, nous avons retrouvé une mutation relevant de la CHIP chez 11 patientes, soit 18 % de notre effectif. 6 mutations sont retrouvées dans le gène *DNMT3A*, 3 dans *ASXL1* et 1 dans *JAK2* et *SH2B3*.

Conclusion : Nous retrouvons pour ces deux cohortes un nombre important de mutations pour l'âge des patients. Le lien entre thrombose artérielle et veineuse, repose potentiellement sur l'inflammation. La CHIP peut être envisagée comme un potentiel facteur de risque aux pathologies cardio-vasculaires chez les sujets jeunes.

Mots clés : CHIP, embolie pulmonaire idiopathique, infarctus du myocarde, patient jeune, NGS

Table des matières

I. Introduction	9
1) La CHIP	9
1.1 Généralités	9
1.2 Rôle potentiel des gènes les plus fréquemment mutés.....	10
1.3 Lien entre CHIP et athérosclérose	11
1.4 Lien entre CHIP et thrombose : rôle des plaquettes	12
1.5 Lien entre CHIP et pathologies cardio-vasculaires : rôle de l'inflammation.....	13
2) Le séquençage de nouvelle génération et la CHIP	14
2.1 Le NGS par la méthode illumina	14
2.2 Le NGS et la CHIP	14
3) Objectif de ce travail	15
II. La CHIP et l'embolie pulmonaire	15
1) Généralités sur l'embolie pulmonaire	15
1.1 Physiopathologie.....	16
1.2 Étiologies : provoquée versus idiopathique	16
1.3 Principes thérapeutiques	17
2) Matériels et méthode pour la cohorte 1 (HEMEP)	17
2.1 Recrutement des patients de la cohorte HEMEP	17
2.2 Choix des panels de gènes	18
2.3 Technique de séquençage haut débit.....	18
2.4 Analyse bio-informatique	19
2.5 Aspects éthiques.....	19
3) Résultats pour la cohorte HEMEP	19
3.1 Caractéristiques cliniques de patients de l'étude	19
3.2 Contrôle qualité – qc report	20
3.3 Identification des variants	21
3.4 Caractéristiques des patients porteurs et non porteurs de CHIP	22
III. La CHIP et l'infarctus du myocarde	23
1) Généralités sur l'infarctus du myocarde	23
1.1 Physiopathologie.....	23
1.2 L'infarctus du myocarde chez la femme jeune	24
1.3 L'athérosclérose	24
2) Matériels et méthode pour la cohorte 2 (WAMIF)	24
2.1 Recrutement des patients de la cohorte WAMIF	24
2.2 Choix des panels de gènes	25
2.3 Techniques de séquençage haut débit	25
2.4 Analyse bio-informatique	25

2.5	Aspects éthiques.....	25
3)	Résultats pour la cohorte WAMIF.....	26
3.1	Caractéristiques cliniques des patientes de l'étude	26
3.2	Contrôle qualité – qc report	26
3.3	Identification des variants	27
3.4	Caractéristiques des patientes porteuses et non porteuses de CHIP	27
IV.	Discussion.....	28
V.	Conclusion.....	32
	Références bibliographiques	33
	Annexes	37
1)	<i>Annexe 1 : Principe de la technique de NGS</i>	<i>37</i>
2)	<i>Annexe 2 : Protocole d'après SureSelect XT HS – Agilent Technologies</i>	<i>40</i>
3)	<i>Annexe 3 : Tableau représentant les données QC obtenues (HEMEP).....</i>	<i>42</i>
4)	<i>Annexe 4 : Tableau représentant les données QC obtenues (WAMIF).....</i>	<i>44</i>
5)	<i>Annexe 5 : QC report pour le quatrième patient de la série 4.....</i>	<i>46</i>
6)	<i>Annexe 6 : Tableau représentant les tests statistiques concernant les caractéristiques des patients de la cohorte WAMIF</i>	<i>47</i>
7)	<i>Annexe 7 : Valorisation du travail effectué dans le cadre de ce projet</i>	<i>47</i>

Table des illustrations

FIGURE 1 : MODELE D'EVOLUTION ENTRE L'HEMATOPOÏESE NORMALE, LA CHIP, LES SYNDROMES MYELODYSPLASIQUES ET LES LEUCEMIES AIGUËS MYELOÏDES D'APRES D.P.STEENSMA ET ALL (2015) [4].	9
FIGURE 2 : LA MUTATION DE <i>TET2</i> RESULTANT DE LA CHIP EST A L'ORIGINE D'UNE PRODUCTION EXCESSIVE D'IL-1 β . ADAPTE DE SANO ET ALL (2018) [1].	10
FIGURE 3 : LA CHIP EST UN FACTEUR DE RISQUE POTENTIEL DE PATHOLOGIES CARDIO-VASCULAIRES. LES MUTATIONS DANS CERTAINS GENES SONT ASSOCIEES A UNE AUGMENTATION DU RISQUE ET DE LA PROGRESSION DE L'ATHEROSCLEROSE, DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE, DE LA STENOSE AORTIQUE ET DE LA THROMBOSE (ADAPTE DE CLONAL HEMATOPOIESIS, AGING, AND CARDIOVASCULAR DISEASES E. PARDALI ET ALL (2019)).	12
FIGURE 4 : LES MUTATIONS RELEVANT DE LA CHIP AFFECTENT LA FORMATION DES PLAQUETTES ET FAVORISENT LE RISQUE DE THROMBOSE (ADAPTE DE A. VENIQUA ET ALL (2019)) [24].	13
FIGURE 5 : LA PRESENCE DE CHIP EST LIEE A L'AGE, D'APRES HOERMANN ET ALL (2020) [43].	15
FIGURE 6 : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'EMBOLIE D'APRES S. LACAPIN	16
FIGURE 7 : FACTEURS DE RISQUE CLINIQUE DE MTEV D'APRES O. SANCHEZ, Y.BENHAMOU, L. BERTOLETTI ET AL (2019).	17
FIGURE 8 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LA PROFONDEUR MOYENNE D'APRES LES DONNEES DE L'ANNEXE 3.	20
FIGURE 9 : RESULTATS DE LA PRESENCE DE VARIANTS, EN FONCTION REGION CODANTE ET FREQUENCE VARIATION ALLELIQUE.	21
FIGURE 10 : TABLEAU RECAPITULANT LES VARIANTS RETROUVES DANS LES REGIONS CODANTES.	22
FIGURE 11 : CAPTURE D'ECRAN TIREE D'ALAMUT REPRESENTANT L'ALIGNEMENT DES FICHIERS BAM DE L'ECHANTILLON NUMERO 24 AU NIVEAU DE LA MUTATION RETROUVEE (92% DE G ET 8% DE A). FIGURE MONTRANT LA COUVERTURE POUR LA BASE D'INTERET, LE VARIANT IDENTIFIE ET LA DIVERSITE DE LECTURE.	22
FIGURE 12 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS PORTEURS DE MUTATIONS RELEVANT DE LA CHIP.	23
FIGURE 13 : PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFARCTUS D'APRES S. JACOPIN	23
FIGURE 14 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LES DONNEES D'INCLUSION	26
FIGURE 15 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LA PROFONDEUR MOYENNE D'APRES LES DONNEES DE L'ANNEXE 4.	26
FIGURE 16 : TABLEAU RECAPITULANT LES VARIANTS POUVANT ETRE CLASSES COMME RESPONSABLES DE CHIP	27
FIGURE 17 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTES PORTEUSES DE MUTATIONS RELEVANT DE LA CHIP.	28

Glossaire

ADN : acide désoxyribonucléique
AOD : anticoagulant oraux direct
CHIP : clonalité hématopoïétique de signification indéterminée
CHU : centre hospitalo-universitaire
CNIL : commission nationale de l'informatique et des libertés
CRP : C-reactive protein
CSH : cellules souches hématopoïétiques
DFG : débit filtration glomérulaire
dNTP : désoxyribonucléotides tri-phosphates
EP : embolie pulmonaire
IDM : infarctus du myocarde
LAM : leucémie aiguë myéloïde
LDL : lipoprotéine de base densité
MO : moelle osseuse
MTEV : maladie thrombo-embolique veineuse
NaOH : hydroxyde de sodium ou soude caustique
NETs : neutrophil extracellular traps
NGS : séquençage haut débit
PCR : polymérase chain réaction
SAPL : syndrome des anti-phospholipides
SMP : syndrome myéloprolifératif
SMD : syndrome myélodysplasique
TVP : thrombose veineuse profonde
WGS : whole genome sequencing

I. Introduction

1) La CHIP

1.1 Généralités

La clonalité hématopoïétique de signification indéterminée (CHIP) correspond au stade d'initiation des mutations somatiques nécessaires à l'expansion clonale dans le processus de leucémogénèse [1]. La CHIP est définie par la présence d'une mutation somatique pré-leucémique à une fréquence de variation allélique faible d'au moins 1 ou 2 % associée à l'absence de maladie hématologique sous-jacente et à un hémogramme normal (*figure 1*).

La prévalence de la CHIP augmente avec l'âge. La fréquence de la CHIP est inférieure à 1 % chez les sujets jeunes de moins de 40 ans et de l'ordre de 9.5 % chez les personnes âgées de plus de 70 ans [2]. Sa présence augmente le risque d'apparition future d'une pathologie hématologique maligne et la mortalité globale de ces patients [3].

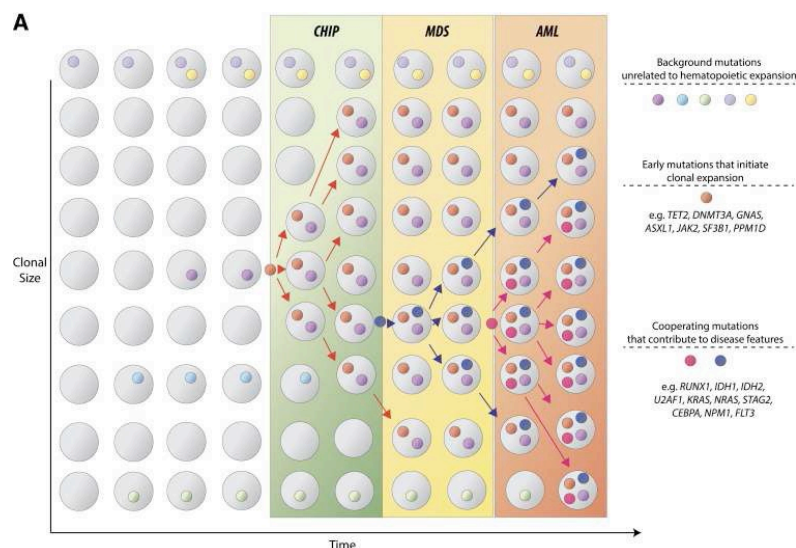


Figure 1 : Modèle d'évolution entre l'hématopoïèse normale, la CHIP, les syndromes myélodysplasiques et les leucémies aiguës myéloïdes d'après D.P.Steensma et all (2015) [4].

L'avènement des technologies de séquençage haut débit a permis de mettre en évidence ces mutations à un ratio allélique faible. Les gènes mutés les plus fréquemment retrouvés sont *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* et *SF3B1* [4]. Les mutations de ces gènes sont connues, dans la littérature, pour être associées à la leucémie aiguë myéloïde (LAM), au syndrome myéloprolifératif (SMP) ou encore au syndrome myélodysplasique (SMD) [5].

1.2 Rôle potentiel des gènes les plus fréquemment mutés

Le gène *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3a*) est situé sur le chromosome 2. Il a un rôle important dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Sa mutation entraîne une expansion des CSH, une dominance clonale, une méthylation aberrante de l'ADN, et est associé à certains cancers hématopoïétiques. Elle est retrouvée fréquemment en cas de LAM [6]. La présence de la mutation de *DNMT3A* chez les patients ayant une LAM est associée à une augmentation du nombre de plaquettes par rapport aux patients ayant cette hémopathie sans cette mutation [7]. Une étude récente montre une augmentation de l'incidence des mutations de *DNMT3A* avec l'âge, avec une prévalence de 15 % entre 60 et 69 ans [8]. Des études sur l'athérosclérose témoignent d'une augmentation de l'inflammation lors de la présence d'une mutation de *DNMT3A*, en lien avec une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires [9].

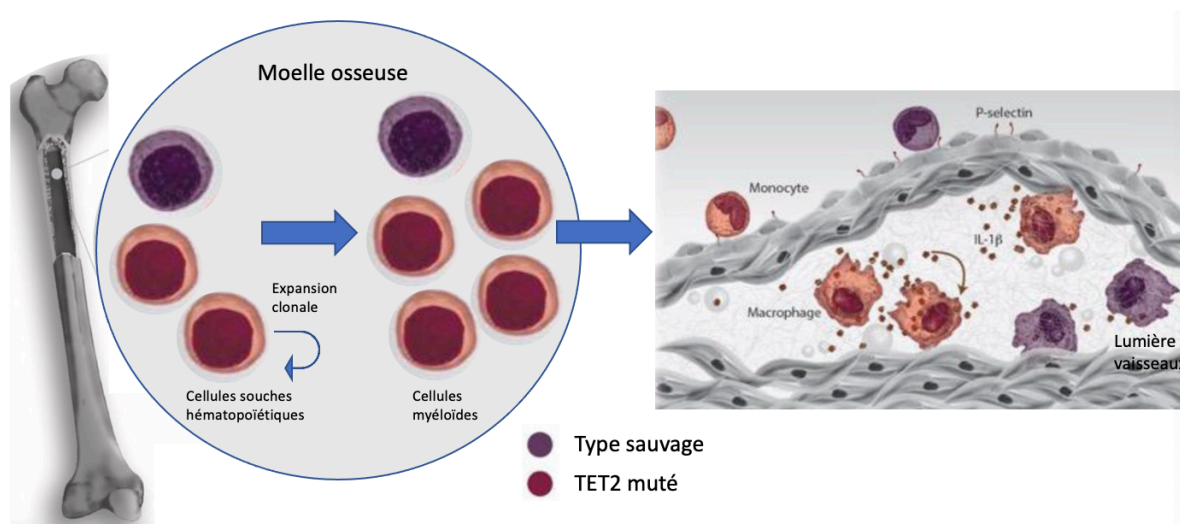


Figure 2 : La mutation de *TET2* résultant de la CHIP est à l'origine d'une production excessive d'IL-1 β . Adapté de Sano et al (2018) [1].

Le gène *TET2* (*protein Tet oncogene family member 2*) est situé sur le chromosome 4 en position q24. Il est impliqué dans la méthylation de l'ADN. Ce gène régule l'hématopoïèse physiologique et ses mutations sont d'apparition précoce dans les pathologies myéloïdes. Des mutations inactivatrices acquises du gène *TET2* ont été décrites dans environ 20 % des hémopathies myéloïdes humaines [10]. Des modèles murins déficients en *TET2* ont permis de comprendre les mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer le lien entre cette

mutation, une tendance pro-inflammatoire et l'augmentation du risque cardio-vasculaire (figure 2) [11].

Le gène *ASXL1* (*Additional sex combs like 1*) est situé sur le chromosome 20 en position q11. Il code pour une protéine, régulant le remodelage de la chromatine, impliquée dans l'hématopoïèse. Il est muté dans certaines hémopathies (LAM, SMD, SMP...) [12] [13]. La majorité des mutations décrites codent pour la partie C-terminale de la protéine. Des souris transgéniques, exprimant le mutant *ASXL1* tronqué en C-terminal, présentent une anémie, des thromboses et une dysplasie des précurseurs hématopoïétiques [14]. La prévalence d'une mutation acquise d'*ASXL1* est estimée à 1,5 % de la population âgée de 60 à 69 ans [14].

Le gène *TP53* (*suppressor tumor protein p53*) est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le développement des cancers. La protéine p53 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes. Elle a un rôle dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire [15]. La mutation de *TP53* est à l'origine d'une fonction défectueuse des plaquettes, en affectant la production des intégrines, des granules et des protéines du cytosquelette [16]. Une étude a montré une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes murins déficients en *TP53* [17].

Le gène *SF3B1* (*splicing factor 3B submit 1*) est un gène impliqué dans l'épissage. Il est très fréquemment muté dans les syndromes myéloprolifératifs. La mutation de ce gène entraîne une inhibition de la croissance et un arrêt du cycle cellulaire [18]. Des études sur le risque thrombotique ont relevé que les patients présentant une mutation de *SF3B1* ont un risque cardio-vasculaire plus élevé que les patients ne présentant pas de mutation [19].

1.3 Lien entre CHIP et athérosclérose

La relation entre CHIP et athérosclérose a été montrée dans plusieurs études rétrospectives. La présence de CHIP dans le sang périphérique est associée à un risque plus élevé d'infarctus et à une accélération du processus d'athérosclérose [20].

Des études *in vitro* et chez la souris ont également soulevé cette association. La présence de CHIP est associée à une augmentation de la calcification des artères coronaires et une augmentation du risque de survenue d'un IDM [8].

Les porteurs de CHIP ont un risque de mortalité toutes causes confondues, augmenté [2]. Cette étude cas-témoins, avec analyse rétrospective des données, incluant 4726 patients ayant présenté une maladie coronarienne et 3529 témoins, montre une augmentation du risque cardio-vasculaire pour les patients porteurs de mutation associée à la CHIP, indépendamment des facteurs de risque cardio-vasculaire habituels.

Une étude sur le lien avec l'insuffisance cardiaque chronique d'origine ischémique révèle un pronostic défavorable chez les patients porteurs de mutations relevant de la CHIP (figure 3) [21]. Un lien entre la CHIP et la présence d'une sténose de la valve aortique a également été montré [22].

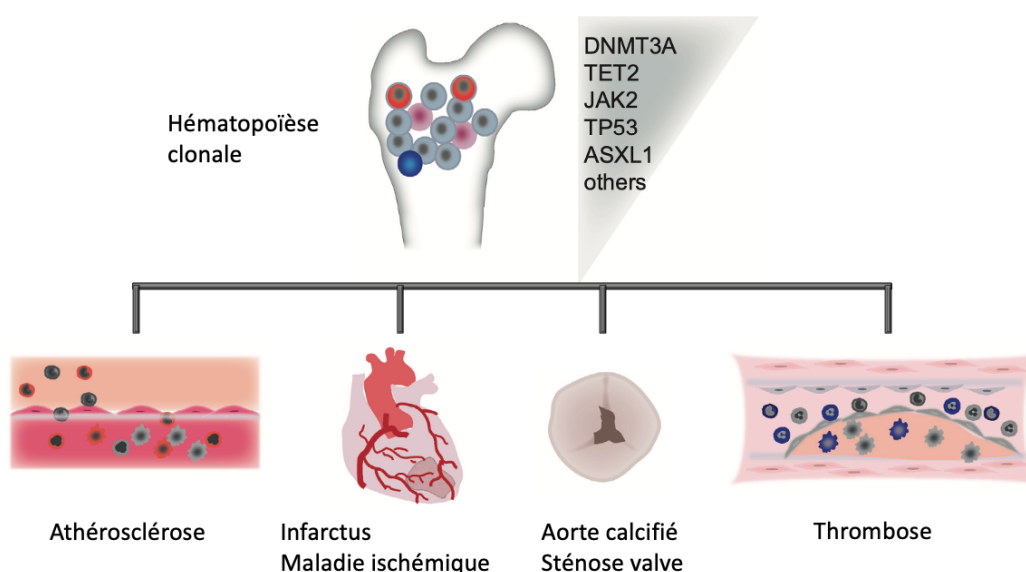


Figure 3 : La CHIP est un facteur de risque potentiel de pathologies cardio-vasculaires. Les mutations dans certains gènes sont associées à une augmentation du risque et de la progression de l'athérosclérose, de l'insuffisance cardiaque, de la sténose aortique et de la thrombose (adapté de clonal hematopoiesis, aging, and cardiovascular diseases E. Pardali et al (2019)).

1.4 Lien entre CHIP et thrombose : rôle des plaquettes

Les plaquettes sont des éléments clés de la thrombose, participant avec la fibrine à la constitution du thrombus. Elles sont impliquées dans la réaction inflammatoire [23].

Les mégacaryocytes issus de la moelle osseuse (MO) se différencient en plaquettes. Les mutations de la CHIP, touchant des gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse, ont des conséquences sur la production et la fonctionnalité des plaquettes. Elles sont importantes dans

le mécanisme physiopathologique de la thrombose (*figure 4*). Plusieurs gènes impliqués dans la CHIP entraînent une dysfonction plaquettaire.

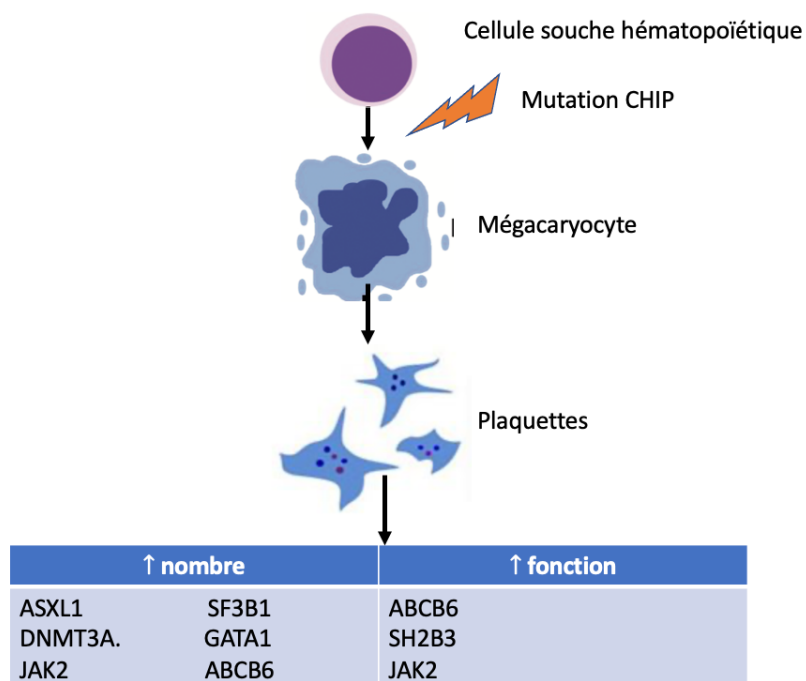


Figure 4 : Les mutations relevant de la CHIP affectent la formation des plaquettes et favorisent le risque de thrombose (adapté de a. Veniqua et all (2019)) [24].

1.5 Lien entre CHIP et pathologies cardio-vasculaires : rôle de l'inflammation

Il est envisagé que cette relation soit due à une dysfonction endothéliale médiée par des marqueurs pro-inflammatoires, induits au niveau endothélial. Lors de mutation des gènes impliqués dans la CHIP, il peut être observé une accumulation de macrophages et de cellules inflammatoires. Cette situation inflammatoire peut également être augmentée par altération de la fonction des cellules immunitaires [17, 25].

Des études ont montré que les patients porteurs de CHIP ont un taux d'IL6 et de TNF α plus élevé que les non porteurs [26, 27]. Par contre, les taux de marqueurs inflammatoires, tels que la C-reactive protein (CRP) et le taux de leucocytes, ne sont généralement pas plus élevés chez les patients porteurs de CHIP [8].

Les mécanismes sous-jacents à cette association ont été étudiés chez la souris et reposent sur l'interaction entre macrophages et monocytes [11]. La signalisation cellulaire, ainsi que la production de cytokines et de chimokines, sont modifiées.

2) Le séquençage de nouvelle génération et la CHIP

Le NGS permet le séquençage simultané de millions de séquences d'ADN de petites tailles (inférieures à 500pb). Les fragments d'ADN peuvent être obtenus par fragmentation d'un génome complet (WGS, Whole Genome Sequencing) ou par séquençage ciblé d'une partie du génome via une technique de « capture ».

Une étape d'amplification préalable au séquençage est nécessaire. L'ensemble des fragments sélectionnés lors d'une capture constitue une librairie. Les séquences obtenues sont ensuite traitées informatiquement et alignées sur le génome de référence [28].

2.1 Le NGS par la méthode Illumina

Le séquençage par la méthode Illumina correspond à l'amplification des fragments d'ADN sur une phase solide appelée Flow Cell. Il s'agit d'une plaque en verre à la surface de laquelle sont fixés des oligonucléotides complémentaires de la séquence des adaptateurs présents aux extrémités de chaque fragment d'ADN. Ces oligonucléotides servent d'amorce lors de la PCR. Lorsque l'on dépose les fragments d'ADN dénaturés sur la Flow Cell, ils s'hybrident par une extrémité sur une amorce, ceci permet la synthèse d'un nouveau brin via une polymérase. Le brin d'origine est éliminé après dénaturation. Le brin complémentaire du nouveau brin est synthétisé pour former un pont d'ADN double brin. A chaque cycle d'amplification les nouveaux fragments d'ADN doubles brins sont dénaturés et servent de substrats pour un nouveau cycle. Ceci permet la formation de clusters et donc une augmentation de l'intensité du signal lu pendant le séquençage.

Le séquençage par synthèse utilise des dNTP fluorescents. Ces nucléotides sont lus via la liaison d'un fluorophore en position 3'. Après excitation par un laser, une fluorescence spécifique à chaque nucléotide A, T, G et C est émise.

2.2 Le NGS et la CHIP

En 2014, le séquençage de l'exome d'une large cohorte de patients a permis de mettre en évidence la présence de mutations somatiques à un faible ratio allélique dans le sang périphérique d'individu ne présentant pas de pathologie hématologique [29].

Le NGS est la méthode clé pour la détection de la CHIP. Il permet la détection de variant à une fréquence allélique faible de l'ordre de 1 à 2 % [30]. Il peut également être détecté des clones hématopoïétiques jusqu'à une fréquence de variation allélique de l'ordre de 0.01 % [31]. Les clones de fréquence allélique inférieure à 0.05 % sont plus fréquents dans la population générale de 50 à 60 ans en bonne santé et les conséquences cliniques de la CHIP ne semblent pas applicables à ces clones [3].

Il est montré que la présence de mutation de la CHIP augmente avec l'âge. En population générale, la prévalence de CHIP est négligeable chez les sujets de moins de 40 ans, augmente entre 40 et 60 ans, et concerne plus de 10 % des sujets de plus de 70 ans (*figure 5*) [2].

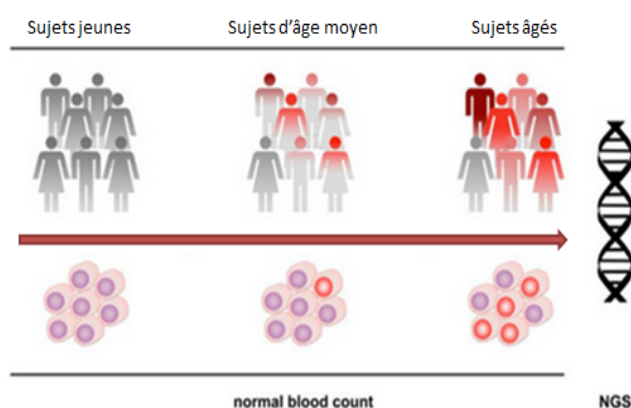


Figure 5 : La présence de CHIP est liée à l'âge, d'après Hoermann et al (2020) [43]

3) Objectif de ce travail

L'objectif principal de ce travail est d'étudier le lien entre la présence d'une CHIP et la survenue d'un évènement cardio-vasculaire de façon prématurée. L'obtention de nouveaux facteurs étiologiques apparaît comme un élément essentiel à une prise en charge thérapeutique optimale des patients jeunes.

II. La CHIP et l'embolie pulmonaire

1) Généralités sur l'embolie pulmonaire

L'EP est une pathologie fréquente, pouvant être grave et mortelle. Il s'agit de la manifestation majeure de la maladie thrombo-embolique veineuse (MTEV) [32].

1.1 Physiopathologie

L'EP est causée par l'obstruction d'une ou plusieurs artères pulmonaires par un thrombus fibrino-cruorique provenant le plus souvent de la circulation veineuse [33] (figure 6).

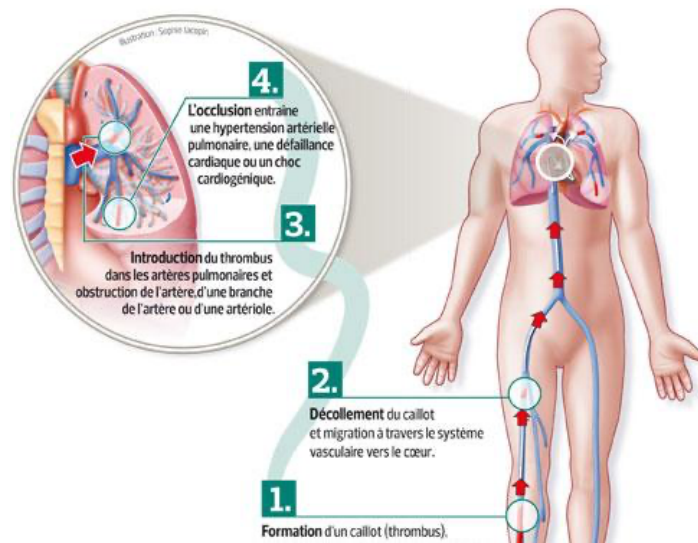


Figure 6 : Physiopathologie de l'embolie d'après S. Lacapin

Les thrombus sont formés par l'accumulation de facteurs activés de la coagulation qui aboutissent, typiquement à un caillot riche en fibrine et pauvre en plaquette. La coagulation met en jeu une cascade qui nécessite un équilibre subtil entre activateurs et inhibiteurs physiologiques [34].

1.2 Étiologies : provoquée versus idiopathique

L'EP est dite provoquée si elle est associée à des facteurs de risque acquis persistants ou transitoires (figure 7). L'EP peut également être associée à des facteurs de risque constitutionnels. La thrombophilie biologique correspond à une anomalie de la coagulation sanguine qui augmente le risque de thrombose veineuse [29]. Chez les patients âgés de moins de 50 ans et présentant des antécédents familiaux de thrombose, il est recommandé de rechercher la mutation R506Q du *facteur V* (*rs5025*), la mutation G20210A du *facteur II* (*rs1799963*), un déficit en protéine C, S ou en antithrombine et un syndrome des anti-phospholipides en cas d'apparition de thrombose non provoquée.

L'embolie pulmonaire est dite idiopathique en l'absence de facteurs de risque provoquant. Il s'agit d'un cas de figure fréquent, car un facteur de risque provoquant est retrouvé dans seulement 31 % des cas [35].

Les patients ayant une EP idiopathique ont un risque plus grand de récurrence [35].

Facteurs transitoires	Facteurs persistants
Contraception œstro-progestative	Antécédent de TVP ou EP
Immobilisation de plus de 3 jours	Age > 70 ans
Chirurgie avec anesthésie générale > 30 min	Néoplasie
Grossesse, post-partum	Troubles de l'hémostase
Traumatisme grave	Maladie inflammatoire chronique
Voyage > 6 heures	

Figure 7 : Facteurs de risque clinique de MTEV d'après O. Sanchez, Y.Benhamou, L. Bertoletti et al (2019).

1.3 Principes thérapeutiques

Le traitement de l'EP repose sur les anticoagulants. Il permet de prévenir le décès prématuré et la récurrence. La durée du traitement est déterminée sur le risque de récurrence qui varie en fonction du caractère provoqué ou non de l'EP et du caractère permanent ou transitoire des facteurs de risque. La durée de traitement anticoagulant pour l'EP provoquée est de 3 à 6 mois [36]. Il est proposé un traitement au long cours chez les patients ayant présentés une EP idiopathique. L'étude PADIS-PE a montré dans ce contexte qu'une extension à 18 mois de l'anticoagulation permettait d'éviter les récurrences durant la période de traitement, mais que celles-ci réapparaissent dès l'arrêt [37]. Il est proposé une anticoagulation prolongée chez ces patients, avec un risque hémorragique cumulatif, tant que la balance bénéfique risque de ce traitement est favorable.

2) Matériels et méthode pour la cohorte 1 (HEMEP)

2.1 Recrutement des patients de la cohorte HEMEP

Les patients éligibles ont présenté une embolie proximale idiopathique entre janvier 2018 et décembre 2019 ; et ont été suivis dans le service de médecine vasculaire du CHU Amiens Picardie. Les patients devaient être âgés de 18 à 65 ans, car l'incidence de CHIP est plus élevée chez les sujets âgés.

L'embolie pulmonaire devait être confirmée par angioscanner thoracique ou scintigraphie de ventilation/perfusion. Le caractère idiopathique est défini par l'absence de facteur provoquant majeur ou mineur retrouvé dans l'histoire clinique.

Une thrombophilie biologique, un antécédent d'atteinte athéromateuse, un antécédent personnel ou familiale de maladie thromboembolique veineuse, la présence d'une cytopénie ou une recherche de la mutation V617F (rs77375493) de *JAK2* positive étaient des critères d'exclusion. Le bilan de thrombophilie comprenait la recherche de la mutation R506Q du *FV*, de la mutation G20210A du *F2*, d'un déficit en protéine C, S ou en antithrombine et d'un syndrome des anti-phospholipides (anticorps anti cardiolipine, anticorps anti Beta2GP1 et anticoagulant lupique).

Les caractéristiques démographiques des patients ont été recueillies (âge, sexe) ; ainsi que les antécédents médicaux et thromboemboliques, la présence ou l'absence d'un tabagisme, la présence ou l'absence d'obésité qui est définie par un indice de masse corporelle supérieure à 30 kg/m².

L'ensemble des patients a donné son consentement éclairé pour participer à l'étude. Cette étude non interventionnelle a été approuvée par un comité d'éthique.

2.2 Choix des panels de gènes

Le panel de gènes étudié comprenait les cinq gènes les plus fréquemment associés à la CHIP dans la littérature (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *SFBI*, *TP53*, *CALR* et *MPL*). La recherche de la mutation V617F de *JAK2* n'est pas réalisée, car elle a été préalablement exclue par une PCR en temps réel.

2.3 Technique de séquençage haut débit

Le séquençage haut débit a été réalisé à partir de l'ADN extrait du sang périphérique des patients.

La technique de séquençage haut débit par la méthode Illumina est décrite en *annexe 1*. Le séquençage a été réalisé à l'aide du protocole SureSelect XT-HS (Agilent Technologies®), permettant la détection de variant à faible ratio allélique, selon les instructions du fabricant.

Le protocole de préparation des échantillons est décrit en *annexe 2*. Les sondes pour l'analyse ont été créées à partir de la séquence de référence des gènes sélectionnés à l'aide du logiciel SureDesign (Agilent Technologies®).

Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur de type MiSeq (Illumina). Le logiciel Alissa Align&Call (Alissa - Agilent Technologies®) a été utilisé pour l'analyse bio-informatique et un filtre de détection des variants à un ratio allélique de 1 % a été utilisé. L'interprétation des variants retrouvés est basée sur le « catalog of somatic mutations in Cancer » (COSMIC) et les données de la littérature.

2.4 Analyse bio-informatique

L'alignement a été réalisé sur Alissa Align&Call (Alissa - Agilent Technologies®) avec l'algorithme BWA. La qualité minimale des bases a été fixée à 25. Le nombre minimum de lecture a été fixé à 10 lectures pour un variant hétérozygote. La profondeur devait donc être supérieure à 1000 pour une bonne viabilité dans la recherche de variant à un ratio allélique de 1 %.

Le fichier .vcf permettait l'analyse et le filtrage des variants sur le logiciel Alissa Align&Call (Alissa - Agilent Technologies®). Le logiciel reportait en premier le nombre de variants retrouvés au total pour chaque patient par rapport au génome de référence. Ensuite, nous avons appliqué un filtre pour obtenir le nombre de variants présents à un ratio allélique faible à partir de 1%. Parmi ces variants, nous avons relevé ceux issus des régions codantes.

2.5 Aspects éthiques

Une déclaration à la commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) a été effectuée. L'ensemble des patients a signé un consentement écrit quant à l'utilisation de leurs prélèvements à des fins de recherche. Une fiche d'information a été fournie à chaque patient (selon la méthode de référence de la CNIL MR004).

3) Résultats pour la cohorte HEMEP

3.1 Caractéristiques cliniques de patients de l'étude

Au total 61 patients ayant présenté une embolie pulmonaire proximale entre janvier 2018 et décembre 2019 ont été inclus dans l'étude. Il y avait 41 hommes et 20 femmes. Les patients avaient entre 18 et 65 ans. L'âge médian des patients à l'inclusion était de 54 ans [47 – 59.5].

La médiane de numération plaquettaire était de 247.10^9 par litre [170 – 250], la médiane de l'hématocrite était de 43 % [39 – 45.2] et la médiane du nombre de blancs était de $5.5.10^9$ par litre [5 - 7].

Tous les patients ont bénéficié d'un traitement par anticoagulant oraux direct (AOD), 24 (40 %) recevaient du rivaroxaban et 37 (60 %) recevaient de l'apixaban selon des posologies adaptées aux recommandations en vigueur.

Durant une période de suivi de 2 ans [1.5 - 2], il n'a pas été noté de récurrence d'embolie pulmonaire, de survenue d'hypertension artérielle pulmonaire ou de décès chez les patients. Il n'a également pas été diagnostiqué d'hémopathie ou de cancer solide chez les patients de l'étude.

3.2 Contrôle qualité - qc report

Les QC report étaient variables entre les différentes techniques. Ils montraient des données qualité dans les objectifs fixés. Un tableau représentant les données obtenues est donné en *annexe 3*. Les régions à analyser sont lues en moyenne 1279 fois (*figure 8*). L'ensemble des gènes d'intérêt était analysé pour chaque patient.

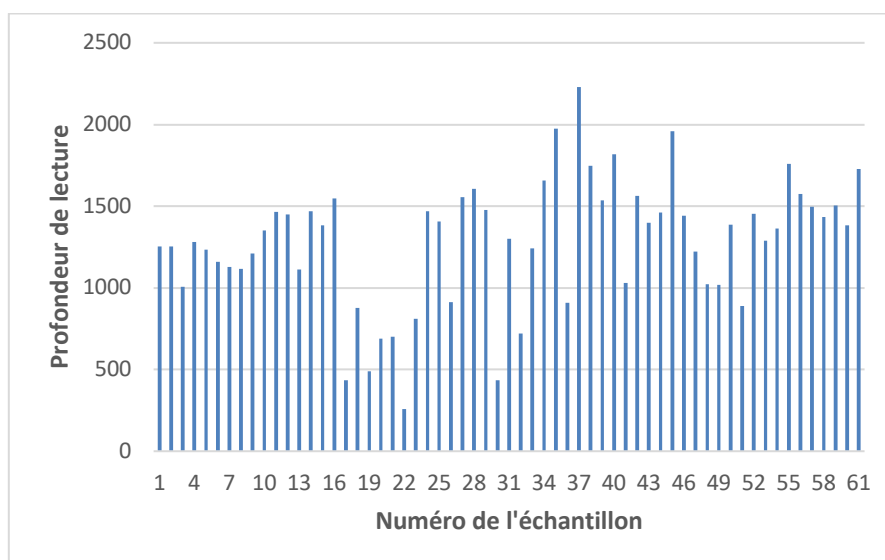


Figure 8 : Graphique représentant la profondeur moyenne d'après les données de l'annexe 3.

Pour les 5 patients pour lesquels, la profondeur était inférieure à 700, les résultats pouvaient de ce fait être sous-estimés. Pour les autres, les données qualité étaient dans les objectifs fixés.

3.3 Identification des variants

Les résultats de la présence de variation allélique sont présentés dans la *figure 9*.

Parmi les variants présents à un ratio allélique faible dans les régions codantes retrouvés chez les patients, trois sont situés sur le gène *ASXL1* et créaient un codon stop ; quinze sont situés sur le gène *DNMT3A* et étaient de type faux sens ; un est situé dans le gène *TET2* et créait également un codon stop (*figure 10 et figure 11*). Parmi les douze patients présentant des mutations, deux étaient de sexe féminin.

Aucune mutation responsable de CHIP, selon les connaissances actuelles, n'a été identifiée dans les gènes *SF3B1*, *TP53* et *JAK2*.

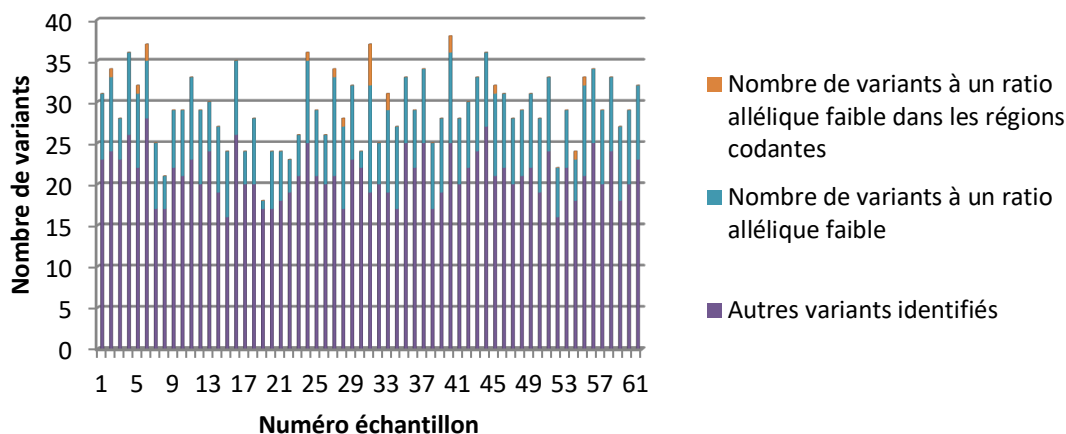


Figure 9 : Résultats de la présence de variants, en fonction région codante et fréquence variation allélique

N° échantillon	Gènes mutés	Localisation	Position génomique	Position ADN codant	Position protéique	Fréquence allélique (%)
2	<i>ASXL1</i>	Chr20(GRCh37)	g.31022449del	NM_015338.5:c.1934del	p.(Gly645Valfs*58)	1.2
5	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25470473C>T	NM_022552.4:c.1001G>A	p.(Gly334Asp)	1.3
6	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25471019G>A	NM_022552.4:c.742C>T	p.(Gln248*)	26
	<i>TET2</i>	Chr4(GRCh37)	g.106156230del	NM_001127208.2:c.1131del	p.(Asn377Lysfs*50)	26
24	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25463265G>A	NM_022552.4:c.2228C>T	p.(Pro743Leu)	7.8
27	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25462020C>G	NM_022552.4:c.2387G>C	p.(Gly796Ala)	5
28	<i>ASXL1</i>	Chr20(GRCh37)	g.31022791del	NM_015338.5:c.2276del	p.(Cys759Serfs*13)	1.4
31	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25463248G>A	NM_022552.4:c.2245C>T	p.(Arg749Cys)	1.5
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25466800G>A	NM_022552.4:c.1903C>T	p.(Arg635Trp)	3.1
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25467140-25467143del	NM_022552.4:c.1735_1732del	p.(Asp579Lysfs*73)	1.2
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25467164del	NM_022552.4:c.1711del	p.(Ala571Leufs*80)	1.4
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25470956dup	NM_022552.4:c.805dup	p.(Ala269Glyfs*12)	1.6
33	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25466800G>A	NM_022552.4:c.1903C>T	p.(Arg635Trp)	12.2
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25469581_25469583delinsT	NM_022552.4:c.1185-1197delinsA	p.(Ala396Glnfs*12)	1.2

40	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25467522C>T	NM_022552.4:c.1555-1G>A	p. ?	1.4
	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25463229A>G	NM_022552.4:c.2264T>C	p.(Phe755Ser)	11.4
45	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25457242C>T	NM_022552.4:c.2645G>A	p.(Arg882His)	3.5
55	<i>ASXLI</i>	Chr20(GRCh37)	g.31022449dup	NM_015338.5:c.1934dup	p.(Gly646Trpfs*12)	12
56	<i>DNMT3A</i>	Chr2(GRCh37)	g.25457242C>T	NM_022552.4:c.2645G>A	p.(Arg882His)	26.1

Figure 10 : Tableau récapitulatif des variants retrouvés dans les régions codantes



Figure 11 : Capture d'écran tirée d'Alamut représentant l'alignement des fichiers BAM de l'échantillon numéro 24 au niveau de la mutation retrouvée (92% de G et 8% de A). Figure montrant la couverture pour la base d'intérêt, le variant identifié et la diversité de lecture.

3.4 Caractéristiques des patients porteurs et non porteurs de CHIP

Les caractéristiques des patients porteurs de mutations relevant de la CHIP sont résumées dans la *figure 12*. Ils avaient un âge médian de 59.5 ans [56.25 – 65]. Il n'est pas noté de différence entre les porteurs et les non-porteurs de mutations en termes d'âge et de localisation de l'embolie pulmonaire. Parmi les patients présentant des mutations, dix étaient de sexe masculin et deux de sexe féminin.

Huit patients (66.7 %) étaient porteurs d'une unique mutation, trois patients (25 %) étaient porteurs de deux mutations et une patiente (8 %) était porteuse de cinq mutations. Les mutations multiples sont localisées dans le gène *DNMT3A*. Une mutation de *DNMT3A* est également retrouvée en association avec une mutation de *TET2*.

N° échantillon	Âge	Sexe	Localisation EP	Association à thrombose veineuse
2	58	M	Segmentaire bilatérale	Proximale
5	37	M	Segmentaire bilatérale	/
6	65	M	Proximale bilatérale	/
24	66	M	Proximale bilatérale	Proximale
27	47	M	Proximale bilatérale	/
28	58	M	Proximale bilatérale	Proximale
31	57	F	Proximale bilatérale	/
33	61	M	Proximale bilatérale	/
40	65	F	Proximale bilatérale	Proximale
45	63	M	Segmentaire bilatérale	/
55	54	M	Proximale bilatérale	Proximale
56	65	M	Segmentaire bilatérale	/

Figure 12 : Caractéristiques cliniques des patients porteurs de mutations relevant de la CHIP

III. La CHIP et l'infarctus du myocarde

1) Généralités sur l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IDM) est une pathologie fréquente, pouvant être grave et mortelle. Chaque année 60 000 personnes sont hospitalisées pour un IDM et 15 000 en décèdent [38].

1.1 Physiopathologie

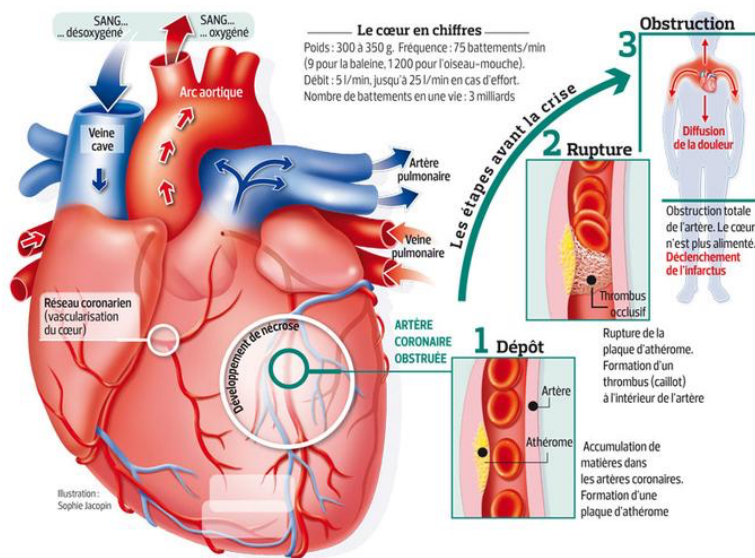


Figure 13 : Physiopathologie de l'infarctus d'après S. Jacopin

L'IDM correspond à la destruction partielle et soudaine du muscle cardiaque. Il est dû à l'obstruction d'une artère alimentant le cœur (*figure 13*). L'ischémie induite dans le territoire correspondant, brusquement privé de sang et d'oxygène, entraîne de profondes perturbations métaboliques et ioniques [39].

La majeure partie des IDM (80%) est causée par la rupture ou l'érosion d'une plaque d'athérome favorisée par l'athérosclérose.

1.2 L'infarctus du myocarde chez la femme jeune

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité chez la femme. L'IDM représente 18 % des décès féminins. Les données françaises pour la période 2002-2008 mettent en évidence une augmentation des taux d'hospitalisation pour IDM particulièrement chez les femmes âgées de 35 à 54 ans [40]. Cette augmentation est due, en partie, au changement de mode de vie. Le tabagisme, facteur de risque majeur d'infarctus du myocarde, est en augmentation chez la femme jeune. La mortalité des femmes touchée par un infarctus est supérieure à celle des hommes. Cette différence n'est pas expliquée totalement par le retard de prise en charge des patientes, de ce fait il faut envisager de nouveaux facteurs de risque, spécifiques à cette population [41].

1.3 L'athérosclérose

L'athérosclérose est la principale cause d'infarctus du myocarde. Elle est caractérisée par la formation progressive d'un amas graisseux, riche en cholestérol, correspondant à la plaque d'athérome. Cette plaque est à l'origine d'une perte d'élasticité des artères, car elle entraîne la migration des cellules musculaires. La plaque peut se rompre entraînant la formation d'un thrombus pouvant obstruer la lumière artérielle ou migrer [39].

2) Matériels et méthode pour la cohorte 2 (WAMIF)

2.1 Recrutement des patients de la cohorte WAMIF

Les patients éligibles ont présenté un infarctus du myocarde entre mai 2017 et juin 2019 et ont été recrutés dans 29 centres hospitaliers français (NCT03073447). Les patients devaient être

âgés entre 18 et 50 ans et de sexe féminin. La présence d'un tabagisme actif était un critère d'exclusion de l'étude.

Les caractéristiques démographiques des patients sont recueillies (âge, sexe) ; ainsi que les antécédents médicaux, la présence ou l'absence d'un tabagisme, la présence ou l'absence d'obésité qui est définie par un indice de masse corporelle supérieure à 30 kg/m², la prise de contraception orale oestro-progestative, la prise de toxique et les caractéristiques de l'IDM.

2.2 Choix des panels de gènes

Le panel de gènes étudié comprenait les cinq gènes les plus fréquemment associés au CHIP dans la littérature (*DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *SFB1* et *TP53*), ainsi que les gènes *JAK2*, *MPL*, *CBL*, *SH2B3*, *SRSF2*.

2.3 Techniques de séquençage haut débit

Le séquençage haut débit a été réalisé à partir de l'ADN extrait du sang périphérique des patients.

La technique de séquençage haut débit par la méthode Illumina était la même que pour la première cohorte. La technique est décrite en *annexe 1*. Le protocole de préparation des échantillons est décrit en *annexe 2*.

2.4 Analyse bio-informatique

L'analyse bio-informatique a été réalisé de façon identique à la cohorte HEMEP.

2.5 Aspects éthiques

Une déclaration au CNIL a été effectuée. L'ensemble des patients a signé un consentement écrit quant à l'utilisation de leurs prélèvements à des fins de recherche. Une fiche d'information a été fournie à chaque patient.

3) Résultats pour la cohorte WAMIF

3.1 Caractéristiques cliniques des patientes de l'étude

Au total 73 patientes qui ont présenté un infarctus du myocarde entre mai 2017 et juin 2019 ont été incluses dans l'étude. Les patientes avaient entre 25 et 50 ans à leur date d'inclusion. L'âge médian des patientes était de 45 ans [40 – 47]. Les données d'inclusion sont représentées dans la *figure 14*. Toutes les patientes étaient porteuses de la mutation R506Q du facteur V. 71 patientes en étaient porteuses à l'état homozygote et 2 patientes à l'état hétérozygote.

Parmi les patientes, 52 n'avaient jamais fumé et 22 étaient sevrées.

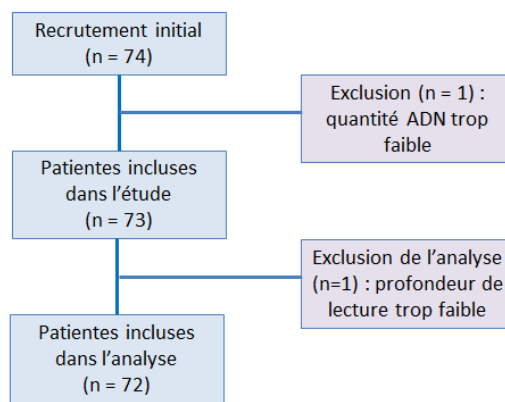


Figure 14 : Graphique représentant les données d'inclusion

3.2 Contrôle qualité - qc report

Avant de débiter l'analyse des variants, il fallait vérifier la qualité des données obtenues après le séquençage. Nous nous référons donc au « QC report ». Un tableau représentant les données obtenues est disponible en *annexe 4*.

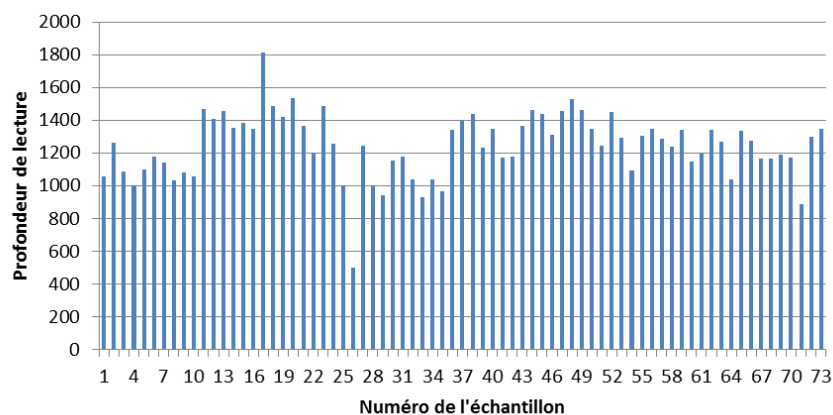


Figure 15 : Graphique représentant la profondeur moyenne d'après les données de l'annexe 4.

Les QC report montraient des données qualité dans les objectifs fixés. Les régions à analyser étaient lues en moyenne 1245 fois (*figure 15*). Une patiente (26) possédait une profondeur de lecture bien inférieure à 1000, les données n'étaient donc pas fiables lors de l'analyse des variants à un ratio allélique de 1 %. Elle a été exclue de l'analyse. L'ensemble des gènes d'intérêt était analysé pour chaque patient.

3.3 Identification des variants

Parmi les variants pouvant être classés comme responsables de CHIP, trois sont situés sur le gène *ASXL1* et créaient un codon stop ; six sont situés sur le gène *DNMT3A* et créaient un faux sens ; quatre variants faux sens sont situés sur le gène *SH2B3* et un variant est situé sur le gène *JAK2* (*figure 16*).

N° échantillon	Gènes mutés	Localisation	Position génomique	Position ADN codant	Ratio allélique (%)
6	SH2B3	Chr12(GRCh37)	g.111856193G>A	NM_005475.3(SH2B3):c.244G>A	5.6
21	ASXL1	Chr20(GRCh37)	g.31022441del	NM_015338.6(ASXL1):c.1926del	1.1
28	ASXL1	Chr20(GRCh37)	g.31022959del	NM_015338.6(ASXL1):c.2445del	1.2
34	ASXL1	Chr20(GRCh37)	g.31022441del	NM_015338.6(ASXL1):c.1926del	1.1
35	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25457243C>A	NM_022552.5(DNMT3A):c.2644C>A	2.4
47	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25458593 C>A	NM_022552.5(DNMT3A):c.2580G>T	2.7
50	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25463277T>G	NM_022552.5(DNMT3A):c.2216A>C	8.2
56	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25463247 C>T	NM_022552.5(DNMT3A):c.2246G>A	1.6
59	SH2B3	Chr12(GRCh37)	g.111885335A>G	NM_005475.3(SH2B3):c.1223A>G	1.4
61	SH2B3	Chr12(GRCh37)	g.111885211G>A	NM_005475.3(SH2B3):c.1099G>A	9.2
62	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25470498 G>A	NM_022552.5(DNMT3A):c.976C>T	6.9
64	DNMT3A	Chr2(GRCh37)	g.25457243G>A	NM_022552.5(DNMT3A):c.2644C>T	2.4
67	SH2B3	Chr12(GRCh37)	g.111885335A>G	NM_005475.3(SH2B3):c.1223A>G	1.5
68	JAK2	Chr9(GRCh37)	g.5073770G>T	NM_004972.4(JAK2):c.1849G>T	25.1

Figure 16 : Tableau récapitulant les variants pouvant être classés comme responsables de CHIP

3.4 Caractéristiques des patientes porteuses et non porteuses de CHIP

Les caractéristiques des patientes porteuses de mutations relevant de la CHIP sont résumées dans la *figure 17*. Elles avaient un âge médian de 45 ans [39 – 48]. Il n'est pas noté de différence entre les porteuses et les non-porteuses de mutations en termes d'âge, de statut pour le tabac, d'antécédents cardio-vasculaires (dyslipidémie, antécédents familiaux, diabète), de la présence de plaques d'athéromes, du bilan biologique (LDL, triglycérides, glycémie,

hémoglobine, plaquettes, leucocytes, sodium, potassium, DFG, CRP) et de la prise de contraception œstro-progestative (*annexe 6*). Les patientes déclaraient ne consommer aucun autre toxique. La coronarographie de plus de 60 % des patientes porteuses de mutations relevant de la CHIP mettait en évidence la présence de plaques d'athérome. Toutes les patientes présentant une mutation de CHIP étaient porteuses de la mutation R506Q du facteur V à l'état homozygote.

N° Echantillon	Age	Statut tabac	Antécédents cardio-vasculaires				Diabète	Contraception oestro-progestative	Présence d'athérome coronarographie
			HTA	IMC >30	Dyslipidémie	ATCD familiaux coronariens			
6	45	Non fumeuse	oui	/	/	/	/	/	oui
21	49	Sevré	oui	/	/	/	/	oui	oui
28	47	Non fumeuse	/	/	/	/	/	oui	/
34	36	Sevré	/	/	/	/	/	/	/
35	40	Sevré	oui	oui	/	/	/	/	oui
47	39	Non fumeuse	/	/	/	oui	/	/	/
50	50	Non fumeuse	oui	oui	oui	/	oui	/	oui
56	33	Non fumeuse	/	oui	/	/	/	/	/
62	47	Non fumeuse	/	/	/	/	/	oui	oui
64	48	Non fumeuse	oui	/	/	/	/	/	oui
68	45	Non fumeuse	/	/	/	/	/	/	oui

Figure 17 : Caractéristiques cliniques des patientes porteuses de mutations relevant de la CHIP.

IV. Discussion

L'objectif principal de ce travail est d'étudier le lien entre la présence d'une CHIP et la survenue d'un évènement cardio-vasculaire prématuré.

Nous avons retrouvé respectivement pour la cohorte 1 (HEMEP) et la cohorte 2 (WAMIF) une proportion de mutations liée à la CHIP de 20 % et 18 %, ce qui est supérieure à la fréquence attendue pour l'âge (environ 2 %) [2].

La prise en charge thérapeutique des EP idiopathiques représente un problème clinique majeur. La nécessité de découvrir de nouveaux facteurs étiologiques acquis est importante. Les bilans de thrombophilie réalisés ne permettent de donner un facteur explicatif que dans une minorité des cas [42]. D'autre part, la majorité des patients présentant une EP idiopathique n'ont pas d'antécédents familiaux, ce qui rend peu probable un facteur explicatif héréditaire. L'inflammation est un facteur de risque de thrombose bien défini [43]. En effet, l'inflammation active les voies de coagulation par augmentation du facteur tissulaire et par inactivation des inhibiteurs de la coagulation [44].

Il existe une prévalence élevée de thromboses artérielles et veineuses dans les syndromes myéloprolifératifs, tels que la maladie de Vaquez et la thrombocytopénie essentielle. Les complications thrombotiques veineuses et artérielles sont la première cause de mortalité chez ses patients [45]. La mutation V617F de *JAK2*, associée à ces hémopathies et décrite comme responsable de CHIP, affecte la prolifération des cellules myéloïdes et augmente la réponse inflammatoire [46].

La CHIP pourrait être envisagée comme un nouveau facteur de risque de survenue d'évènement veineux.

La nécessité de découvrir de nouveaux facteurs étiologiques est également importante dans la survenue d'infarctus du myocarde chez la femme jeune. En effet, les données françaises pour la période 2002-2008 mettent en évidence une augmentation des taux d'hospitalisation pour IDM, de l'ordre en moyenne de 4 % par an chez les femmes âgées de 35 à 54 ans [40]. La mortalité des femmes présentant un infarctus du myocarde est supérieure à celle des hommes, à facteur de risque et à délai de prise en charge égaux [41, 47]. Les facteurs de risque traditionnel des pathologies cardio-vasculaires sont par exemple l'hypercholestérolémie, le diabète de type 2, l'hypertension ou encore le tabac. La présence de ces facteurs de risque est variable parmi les patientes porteuses de mutation relevant de la CHIP. La plupart des patientes porteuses de mutations présente des plaques d'athérome à la coronarographie. L'étude BioImage a montré que la détection de plaques d'athérome au niveau des carotides ou des coronaires permet une meilleure prédiction du risque d'infarctus du myocarde, que la simple prise en compte des facteurs de risques conventionnels [48].

La CHIP pourrait être envisagée comme un facteur accélérateur de survenue d'infarctus du myocarde. Elle pourrait favoriser la formation des plaques d'athérome via l'inflammation endothéliale.

Le lien physiopathologique entre thrombose artérielle et veineuse est établi, mais les causes restent débattues. L'infarctus du myocarde et l'embolie pulmonaire ont en commun de nombreux facteurs de risque tel que l'âge ou encore le sexe. De plus, les patients ayant présenté une embolie pulmonaire idiopathique ont un risque augmenté de présenter un évènement cardiovasculaire [49]. Le lien entre thrombose artérielle et veineuse, est possiblement lié à l'inflammation endothéliale. Étant donné que la CHIP induit une inflammation endothéliale, celle-ci pourrait être considérée comme un lien physiopathologique commun entre les deux maladies.

Les patients de la première cohorte HEMEP avaient en moyenne 54 ans. Ces données démographiques correspondent à une moyenne d'âge plus jeune que les patients présentant une EP dans la population générale [50]. Cependant, l'âge moyen est proche de celui des EP idiopathiques de la population de l'étude PADIS-PE (58 ans) [37]. Les patientes de la deuxième cohorte WAMIF avaient en moyenne 43 ans. Ces données démographiques correspondent à une moyenne d'âge plus jeune que les patients présentant un IDM dans la population générale [38]. La non-inclusion de patients âgés de plus de 65 ans permet de limiter un facteur de confusion puisque la prévalence de CHIP augmente avec l'âge [2].

Le panel de gènes utilisé pour la première cohorte est restreint en raison du coût, mais permettrait selon les données de la littérature d'identifier plus de 80 % des mutations responsables de CHIP [51]. Le séquençage haut débit est la seule technique fiable et reproductible capable à ce jour d'identifier les variations alléliques de 1 % décrites dans la CHIP [4] [52].

La mise en rapport des données techniques et des données qualités met l'accent sur une fiabilité optimale à la détection de variants à un ratio allélique faible, avec une profondeur de lecture supérieure à 1000 chez la quasi-totalité des patients.

Les variants responsables de CHIP identifiés ont soit déjà été identifiés dans des pathologies hématologiques acquises, soit impactent des acides aminés déjà décrits mutés dans la littérature (autres mutations du même acide aminé), ou encore modifient un nucléotide ou un acide aminé très proche d'autres acides aminés mutés décrits dans la littérature. Les mutations de *ASLXI* sont connues dans la littérature pour être des mutations de type frame shift créant un codon stop prématuré [53]. Les mutations de *DNMT3A* sont connues dans la littérature pour être des mutations de type faux sens, mais certaines peuvent également entraîner la survenue d'un codon stop prématuré. Les mutations de *SH2B3* sont dans la littérature, des mutations de type faux sens ou des délétions [54]. Il s'agit de mutations ayant un impact délétère et aboutissant à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle ou à l'absence de protéine.

Les principales faiblesses de nos deux cohortes sont le faible effectif constituant chacune d'elle et l'absence de population contrôle. Nos données ont été comparé aux données de la littérature obtenue sur des cohortes robustes en population générale.

Des études ont soulevé la possibilité d'une association entre la fréquence allélique du variant et l'augmentation du risque de développer une pathologie hématologique maligne ou une

pathologie coronarienne [2]. Le risque de développer une pathologie coronarienne est multiplié par 2.2 lorsque les mutations de CHIP sont présentes à un ratio allélique supérieur à 10 par rapport à ceux présentes à un ratio allélique inférieur [20]. Il existe selon cette étude une relation dose effet entre la fréquence allélique de la mutation et le taux d'athérosclérose chez les humains.

L'athérosclérose augmente l'infiltration des vaisseaux touchés par les monocytes et les macrophages. La présence de mutation de la CHIP pourrait favoriser ce processus inflammatoire en causant une altération au niveau des macrophages [55]. La présence de macrophages altérés pourrait favoriser le recrutement de monocyte et d'autres cellules sanguines circulantes favorisant l'augmentation du taux de chimokines. Des études sur des souris déficientes en *TET2* ont montré une augmentation des calcifications de l'aorte par rapport aux souris wild-type [11].

Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une situation pro-inflammatoire causée par la CHIP favorisant la survenue de thrombose veineuse. Cette hypothèse pourrait conduire à envisager des traitements aux propriétés anti-inflammatoires pour limiter le risque de récurrence. Des études suggèrent que la dérégulation de l'inflammation favorise l'expansion clonale et la survenue d'événements cardio-vasculaires. Dans les modèles animaux, les leucocytes mutants contribuent à l'inflammation du milieu et à l'avantage sélectif du clone. Une étude utilisant la technologie CRISPR/Cas9 montre que l'inactivation des gènes *TET2* et *DNMT3A* favorise la dysfonction cardiaque chez les souris [56]. Une étude a montré qu'un taux élevé d'IL6 et de TNF α favorise l'expansion des mutations de *TET2* chez la souris [11]. Chez l'homme, une étude a montré que les porteurs de CHIP ont un taux plus élevé de CRP, d'IL6 et de TNF α que les non porteurs [21]. Une étude a montré que la présence d'un taux élevé de cytokine, en particulier l'IL6, chez les patients suivis pour un SMD est associée à une diminution de la survie toute cause.

Si un lien avec l'inflammation est confirmé, il pourra potentiellement être proposé l'utilisation de traitements anti-inflammatoires pour protéger les patients de la récurrence d'un événement cardio-vasculaire. Plusieurs essais ont montré une efficacité de ce type de traitement. L'étude multicentrique COLCOT menée chez 5000 patients ayant présenté un IDM a montré que la prise de 0.5 mg de colchicine® par jour contre placebo, associée à la prise en charge habituelle, diminue le risque de récurrence d'un événement cardio-vasculaire [57]. Un essai clinique a montré une efficacité du Canakinumab, un anticorps monoclonal inhibiteur de l'interleukine 1 bêta, dans la prévention de la récurrence d'une complication

cardio-vasculaire chez des patients ayant présenté un IDM [58]. Ce traitement nécessite, de par la survenue d'évènements indésirables infectieux, une évaluation de la balance bénéfice-risque. Plusieurs études ont montré une diminution des évènements cardio-vasculaires lors de la supplémentation des patients en vitamine C. Une étude a montré que la vitamine C peut contribuer à la restauration de l'activité de *TET2* lorsqu'il est muté. Elle favorise la déméthylation de l'ADN et contribue à la diminution de la réplication des clones [59].

Pour compléter cette étude, il faut envisager des études contrôlées sur un plus grand effectif de patient pour valider la fiabilité des résultats obtenus. Une étude prospective non interventionnelle cas-témoins est en projet pour l'embolie pulmonaire. Les critères d'inclusion seront similaires à cette étude préliminaire. Les témoins seront des patients ayant présenté une embolie pulmonaire provoquée par un facteur déclenchant majeur.

V. Conclusion

La physiopathologie et les données de la littérature permettent d'envisager un lien entre la présence d'une CHIP et la survenue de façon prématurée de pathologies cardio-vasculaires, avec un mécanisme pro-inflammatoire probable. Les deux cohortes concernent une population réduite, mais représentative de la population cible. Ce travail montre notre capacité à mettre en évidence des mutations à un ratio allélique faible dans les gènes d'intérêt, référencées dans la littérature. Les données obtenues ne permettent pas de conclure formellement sur la relation de causalité entre EP ou IDM et présence de CHIP, mais retrouvent un nombre important de mutation pour l'âge des patients justifiant de poursuivre les investigations. La CHIP peut être envisagée comme un potentiel facteur de risque de pathologies cardio-vasculaires chez les sujets jeunes. La piste d'une utilisation de thérapeutique anti-inflammatoire pour limiter le risque de récurrence est également une des perspectives ouvertes par nos résultats.

Références bibliographiques

- 1- Boettcher, Steffen, et Benjamin L. Ebert. « Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential ». *Journal of Clinical Oncology* 37, n° 5 (10 février 2019): 419-22.
- 2- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *The New England Journal of Medicine* 371, n° 26 (25 décembre 2014): 2488-98.
- 3- Steensma, David P. « Clinical Implications of Clonal Hematopoiesis ». *Mayo Clinic Proceedings* 93, n° 8 (août 2018): 1122-30.
- 4- Steensma, David P., Rafael Bejar, Siddhartha Jaiswal, R. Coleman Lindsley, Mikkael A. Sekeres, Robert P. Hasserjian, et Benjamin L. Ebert. « Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential and Its Distinction from Myelodysplastic Syndromes ». *Blood* 126, n° 1 (2 juillet 2015): 9-16.
- 5- Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D McLellan, Kimberly J Johnson, Michael C Wendl, Joshua F McMichael, et al. « Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies ». *Nature Medicine* 20, n° 12 (décembre 2014): 1472-78.
- 6- Yang, Liubin, Rachel Rau, et Margaret A. Goodell. « DNMT3A in Haematological Malignancies ». *Nature Reviews Cancer* 15, n° 3 (mars 2015): 152-65.
- 7- Hou, Hsin-An, Yuan-Yeh Kuo, Chieh-Yu Liu, Wen-Chien Chou, Ming Cheng Lee, Chien-Yuan Chen, Liang-In Lin, et al. « DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Stability during Disease Evolution and Clinical Implications ». *Blood* 119, n° 2 (12 janvier 2012): 559-68.
- 8- Jaiswal, Siddhartha, et Peter Libby. « Clonal Haematopoiesis: Connecting Ageing and Inflammation in Cardiovascular Disease ». *Nature Reviews Cardiology* 17, n° 3 (mars 2020): 137-44.
- 9- Leoni, Cristina, Sara Montagner, Andrea Rinaldi, Francesco Bertoni, Sara Polletti, Chiara Balestrieri, et Silvia Monticelli. « *Dnmt3a* Restrains Mast Cell Inflammatory Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, n° 8 (21 février 2017): E1490-99.
- 10- Couronné, Lucile. « Rôle des anomalies de TET2 dans la transformation tumorale lymphoïde et myéloïde ». *Université Paris Sud*, 2012.
- 11- Fuster, José J., Susan MacLauchlan, María A. Zuriaga, Maya N. Polackal, Allison C. Ostriker, Raja Chakraborty, Chia-Ling Wu, et al. « Clonal Hematopoiesis Associated with TET2 Deficiency Accelerates Atherosclerosis Development in Mice ». *Science* 355, n° 6327 (24 février 2017): 842-47.
- 12- Asada, Fujino, Goyama, Kitamura, « The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies », *Cellular and molecular life sciences*, n°76 (30 mars 2019) : 2511-2523.
- 13- Carbuccia, N, A Murati, V Trouplin, M Brecqueville, J Adélaïde, J Rey, W Vainchenker, et al. « Mutations of ASXL1 Gene in Myeloproliferative Neoplasms ». *Leukemia* 23, n° 11 (novembre 2009): 2183-86.
- 14- Nagase, Reina, Daichi Inoue, Alessandro Pastore, Takeshi Fujino, Hsin-An Hou, Norimasa Yamasaki, Susumu Goyama, et al. « Expression of Mutant Asxl1 Perturbs Hematopoiesis and Promotes Susceptibility to Leukemic Transformation ». *Journal of Experimental Medicine* 215, n° 6 (4 juin 2018): 1729-47.
- 15- Lehmann-Che, Jacqueline, Elisabeth Turpin, Philippe Bertheau, Marc Espié, et Hugues de Thé. « La fonction de TP53: Facteur prédictif majeur de la réponse à une chimiothérapie dose-intense dans le cancer du sein ». *médecine/sciences* 23, n° 11 (novembre 2007): 1021-23.

- 16- Apostolidis, Pani A., Donna S. Woulfe, Massiel Chavez, William M. Miller, et Eleftherios T. Papoutsakis. « Role of Tumor Suppressor P53 in Megakaryopoiesis and Platelet Function ». *Experimental Hematology* 40, n° 2 (février 2012): 131-142.e4.
- 17- Sano, Soichi, Ying Wang, et Kenneth Walsh. « Clonal Hematopoiesis and Its Impact on Cardiovascular Disease ». *Circulation Journal* 83, n° 1 (25 décembre 2018): 2-11.
- 18- Dolatshad, H, A Pellagatti, M Fernandez-Mercado, B H Yip, L Malcovati, M Attwood, B Przychodzen, et al. « Disruption of SF3B1 Results in Deregulated Expression and Splicing of Key Genes and Pathways in Myelodysplastic Syndrome Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *Leukemia* 29, n° 5 (mai 2015): 1092-1103.
- 19- Lin, Chien-Chin, Hsin-An Hou, Wen-Chien Chou, Yuan-Yeh Kuo, Shang-Ju Wu, Chieh-Yu Liu, Chien-Yuan Chen, et al. « SF3B1 Mutations in Patients with Myelodysplastic Syndromes: The Mutation Is Stable during Disease Evolution: SF3B1 Mutations in MDS ». *American Journal of Hematology* 89, n° 8 (août 2014): E109-15.
- 20- Jaiswal, Siddhartha, Pradeep Natarajan, Alexander J. Silver, Christopher J. Gibson, Alexander G. Bick, Eugenia Shvartz, Marie McConkey, et al. « Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease ». *New England Journal of Medicine* 377, n° 2 (13 juillet 2017): 111-21.
- 21- Dorsheimer, Lena, Birgit Assmus, Tina Rasper, Christina A. Ortmann, Andreas Ecke, Khalil Abou-El-Ardat, Tobias Schmid, et al. « Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure ». *JAMA Cardiology* 4, n° 1 (1 janvier 2019): 25.
- 22- Mas-Peiro, Silvia, Jędrzej Hoffmann, Stephan Fichtlscherer, Lena Dorsheimer, Michael A. Rieger, Stefanie Dimmeler, Mariuca Vasa-Nicotera, et Andreas M. Zeiher. « Clonal Haematopoiesis in Patients with Degenerative Aortic Valve Stenosis Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation ». *European Heart Journal* 41, n° 8 (21 février 2020): 933-39.
- 23- Meijden, Paola E. J. van der, et Johan W. M. Heemskerk. « Platelet Biology and Functions: New Concepts and Clinical Perspectives ». *Nature Reviews Cardiology* 16, n° 3 (mars 2019): 166-79.
- 24- Veninga, Alicia, Ilaria De Simone, Johan W.M. Heemskerk, Hugo ten Cate, et Paola E.J. van der Meijden. « Clonal Hematopoietic Mutations Linked to Platelet Traits and the Risk of Thrombosis or Bleeding ». *Haematologica* 105, n° 8 (août 2020): 2020-31.
- 25- Basiorka, Ashley A., Kathy L. McGraw, Erika A. Eksioglu, Xianghong Chen, Joseph Johnson, Ling Zhang, Qing Zhang, et al. « The NLRP3 Inflammasome Functions as a Driver of the Myelodysplastic Syndrome Phenotype ». *Blood* 128, n° 25 (22 décembre 2016): 2960-75.
- 26- Sano, Soichi, Kosei Oshima, Ying Wang, et al. « TET2-mediated clonal hematopoiesis accelerates heart failure through a mechanism involving the IL-1b/NLRP3 inflammasome. *Journals of the American College of Cardiology*, n°71(27 février 2018) : 875-886.
- 27- Cook, Elina K., Terumi Izukawa, Sherylan Young, Gili Rosen, Mina Jamali, Liying Zhang, Dylan Johnson, et al. « Comorbid and Inflammatory Characteristics of Genetic Subtypes of Clonal Hematopoiesis ». *Blood Advances* 3, n° 16 (27 août 2019): 2482-86.
- 28- Behjati, Sam, et Patrick S. Tarpey. « What Is next Generation Sequencing? » *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition* 98, n° 6 (décembre 2013): 236-38.
- 29- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhom, Kimberly Chambert, et al. « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence ». *New England Journal of Medicine* 371, n° 26 (25 décembre 2014): 2477-87.

- 30- Danlos, Papo, Micol. « L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités ». *La revue de Médecine Interne* 40, n° 10 (22 mai 2019): 684-692.
- 31- Young, Andrew L., Grant A. Challen, Brenda M. Birmann, et Todd E. Druley. « Clonal Haematopoiesis Harbours AML-Associated Mutations Is Ubiquitous in Healthy Adults ». *Nature Communications* 7 (22 août 2016): 12484
- 32- Guerreiro, I., H. Magalhães, S. Coelho, A. Ribeiro, S. Ferreira, E. Araújo, P. Bettencourt, et P. Lourenço. « Long Term Prognosis of Acute Pulmonary Embolism ». *European Journal of Internal Medicine* 67 (septembre 2019): 84-88.
- 33- Martínez-Martínez, Irene. « Severe Thrombophilia in Idiopathic Fatal Pulmonary Embolism ». *EBioMedicine* 17 (mars 2017): 13-14.
- 34- Aiach, Martine, Martine Alhenc-Gelas, Delphine Borgel, Joseph Emmerich, Sophie Gandrille, et Véronique Picard. « Mutations des protéines de la coagulation et thromboses ». *médecine/sciences* 22, n° 11 (novembre 2006): 985-89.
- 35- Gjonbrataj, Endri, Ji Na Kim, Juarda Gjonbrataj, Hye In Jung, Hyun Jung Kim, et Won-Il Choi. « Risk Factors Associated with Provoked Pulmonary Embolism ». *The Korean Journal of Internal Medicine* 32, n° 1 (1 janvier 2017): 95-101.
- 36- Le Gal, Grégoire, Marc Righini, Pierre-Marie Roy, Olivier Sanchez, Drahomir Aujesky, Henri Bounameaux, et Arnaud Perrier. « Prediction of Pulmonary Embolism in the Emergency Department: The Revised Geneva Score ». *Annals of Internal Medicine* 144, n° 3 (7 février 2006): 165.
- 37- Couturaud, Francis, Olivier Sanchez, Gilles Pernod, Patrick Mismetti, Patrick Jegou, Elisabeth Duhamel, Karine Provost, et al. « Six Months vs Extended Oral Anticoagulation After a First Episode of Pulmonary Embolism: The PADIS-PE Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 314, n° 1 (7 juillet 2015): 31.
- 38- Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques/Santé publique France. Cardiopathies ischémiques. In L'état de santé de la population en France – Rapport 2017. *Drees/Santé publique France* (2017) : 243-5.
- 39- Falk, Erling. « Pathogenesis of Atherosclerosis ». *Journal of the American College of Cardiology* 47, n° 8 Suppl (18 avril 2006): C7-12.
- 40- Dreyer, Rachel P., Christopher Scirra, Erica S. Spatz, Basmah Safdar, Gail D'Onofrio, et Harlan M. Krumholz. « Young Women With Acute Myocardial Infarction: Current Perspectives ». *Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes* 10, n° 2 (février 2017): e003480.
- 41- Gabet, Danchin, Olie. « Myocardial infarction in women : trends of hospitalization and mortality rates ». *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* (2016) : 100-8.
- 42- Adhikari, Chandra Mani, K.C. Bishal, et Sobita Khadka. « Clinical Profile, Management and Outcome of Pulmonary Embolism in Shahid Gangalal National Heart Centre, Kathmandu, Nepal ». *The Egyptian Heart Journal* 70, n° 1 (mars 2018): 41-43.
- 43- Smeeth, Liam, Claire Cook, Sara Thomas, Andrew J Hall, Richard Hubbard, et Patrick Vallance. « Risk of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism after Acute Infection in a Community Setting ». *The Lancet* 367, n° 9516 (avril 2006): 1075-79.
- 44- Levi, Marcel, Tom van der Poll, et Harry R. Büller. « Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation ». *Circulation* 109, n° 22 (8 juin 2004): 2698-2704.
- 45- Tiziano Barbui, Guido Finazzi, Anna Falanga. « Myeloproliferative neoplasms and thrombosis ». *BLOOD VOLUME* 122, n° NUMBER 13 (26 septembre 2013).
- 46- Perner, Perner, Ernst, et Heidel. « Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation ». *Cells* 8, n° 8 (8 août 2019): 854.
- 47- Smilowitz, Mahajan, Roe, Hellkamp, Chiswell, Gulati, Reynolds, « Mortality of myocardial infarction by sex, age, and obstructive coronary disease status in the ACTION registry-GWTG », *Circulation*, n°12 (15 décembre 2017) ; 10

- 48- Baber, Usman, Roxana Mehran, Samantha Sartori, Mikkel Malby Schoos, Henrik Sillesen, Pieter Muntendam, Mario J. Garcia, et al. « Prevalence, Impact, and Predictive Value of Detecting Subclinical Coronary and Carotid Atherosclerosis in Asymptomatic Adults: The BioImage Study ». *Journal of the American College of Cardiology* 65, n° 11 (24 mars 2015): 1065-74.
- 49- Becattini, C., M. Cristina Vedovati, W. Ageno, F. Dentali, et G. Agnelli. « Incidence of Arterial Cardiovascular Events after Venous Thromboembolism. A Systematic Review and a Meta-Analysis ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, janvier 2010.
- 50- Münster, A.M., T.B. Rasmussen, A.M. Falstie-Jensen, L. Harboe, G. Stynes, L. Dybro, M.L. Hansen, A. Brandes, E.L. Grove, et S.P. Johnsen. « A Changing Landscape: Temporal Trends in Incidence and Characteristics of Patients Hospitalized with Venous Thromboembolism 2006–2015 ». *Thrombosis Research* 176 (avril 2019): 46-53.
- 51- Zehir, Ahmet, Ryma Benayed, Ronak H. Shah, Aijazuddin Syed, Sumit Middha, Hyunjae R. Kim, Preethi Srinivasan, et al. « Mutational Landscape of Metastatic Cancer Revealed from Prospective Clinical Sequencing of 10,000 Patients ». *Nature Medicine* 23, n° 6 (juin 2017): 703-13.
- 52- Mardis, Elaine R. « Next-Generation DNA Sequencing Methods ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, n° 1 (septembre 2008): 387-402.
- 53- Carbuccia, N, A Murati, V Trouplin, M Brecqueville, J Adélaïde, J Rey, W Vainchenker, et al. « Mutations of ASXL1 Gene in Myeloproliferative Neoplasms ». *Leukemia* 23, n° 11 (novembre 2009): 2183-86.
- 54- Pardnani, A. et al. « LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations ». *Leukemia*, n°24 (2010) : 1713–1718.
- 55- Veninga, Alicia, Ilaria De Simone, Johan W.M. Heemskerk, Hugo ten Cate, et Paola E.J. van der Meijden. « Clonal Hematopoietic Mutations Linked to Platelet Traits and the Risk of Thrombosis or Bleeding ». *Haematologica* 105, n° 8 (août 2020): 2020-31
- 56- Sano, Soichi, Kosei Oshima, Ying Wang, Yasufumi Katanasaka, Miho Sano, et Kenneth Walsh. « CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease ». *Circulation Research* 123, n° 3 (20 juillet 2018): 335-41.
- 57- Tardif, Jean-Claude, Simon Kouz, David D. Waters, Olivier F. Bertrand, Rafael Diaz, Aldo P. Maggioni, Fausto J. Pinto, et al. « Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction ». *New England Journal of Medicine* 381, n° 26 (26 décembre 2019): 2497-2505.
- 58- Ridker, Paul M, Jean G MacFadyen, Brendan M Everett, Peter Libby, Tom Thuren, Robert J Glynn, Paul M Ridker, et al. « Relationship of C-Reactive Protein Reduction to Cardiovascular Event Reduction Following Treatment with Canakinumab: A Secondary Analysis from the CANTOS Randomised Controlled Trial ». *The Lancet* 391, n° 10118 (janvier 2018): 319-28
- 59- Cimmino, Luisa, Igor Dolgalev, Yubao Wang, Akihide Yoshimi, Gaëlle H. Martin, Jingjing Wang, Victor Ng, et al. « Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression ». *Cell* 170, n° 6 (septembre 2017): 1079-1095.e20.

Annexes

1) Annexe 1 : Principe de la technique de NGS

La technique utilisée repose sur une amplification en pont des fragments d'ADN sur support solide suivi d'un séquençage par synthèse chimique des colonies d'ADN préalablement amplifiées (figure 1). L'automate Illumina MiSeq permet un séquençage ciblé.

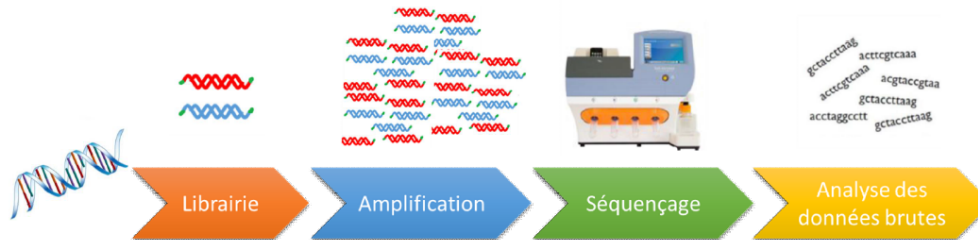


Figure 1 : Processus général du NGS d'après Audrey Gros.

1- Préparation des librairies par la technique Sure Select XT HS

Une librairie se définit par l'ensemble des fragments d'ADN que l'on veut séquencer.

Nous utilisons une stratégie de fabrication de librairies par capture qui correspond à une hybridation de l'ADN à des sondes couvrant la région cible, puis un lavage de l'ADN non hybridé (figure 2).

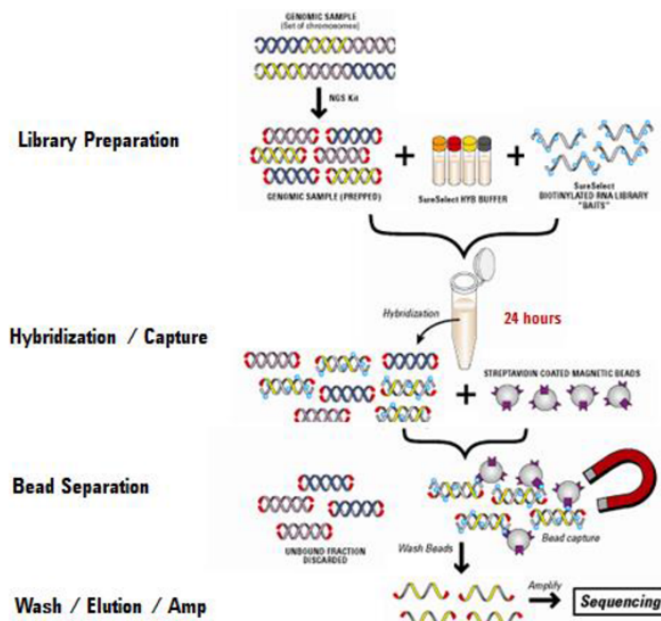


Figure 2 : Préparation des librairies par capture et hybridation d'après le catalogue agilent 2015.

Cette méthode se déroule en 4 étapes :

- Préparation de la librairie d'ADN (fragmentation, ligation des adaptateurs, purification ...),
- Hybridation des librairies à 65° avec les sondes ARN complémentaires biotinylées,
- Récupération des hybrides avec des perles de streptavidines complémentaires et spécifiques,
- Lavage et dégradation des sondes.

Les librairies ont été préparées en suivant les recommandations du fournisseur.

Cette méthode débute par un dosage de la quantité d'ADN contenue dans les échantillons des patients par une méthode de fluorométrie en utilisant le Qubit™ (ThermoFisher Scientific) ; afin de partir d'une quantité identique pour chaque patient par dilution.

2- Amplification des librairies capturées

Nous utilisons une stratégie d'amplification sur support solide. Il s'agit d'un support en verre qui est le lieu de la formation des clusters par amplification clonale ; un processus où chaque fragment de molécule est amplifié sans variation de température. Un cluster correspond à 1000 fragments de librairies (figure 3).

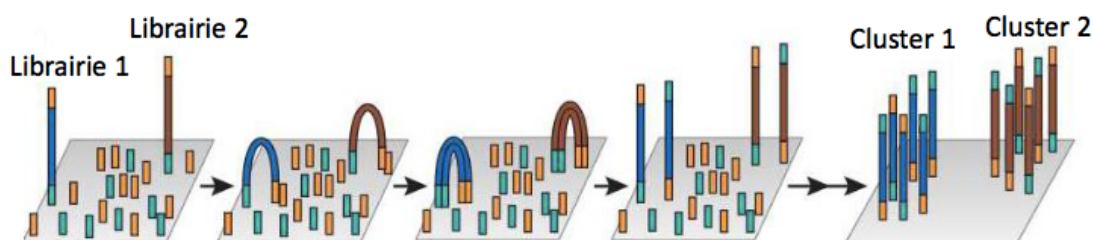


Figure 3 : Stratégie d'amplification sur support solide d'après Audrey Gros.

Sur le support solide deux types d'oligonucléotides sont présents. L'amplification est initiée par le premier type d'oligonucléotides qui est complémentaire des fragments. La région de l'adaptateur s'hybride avec le second type d'oligonucléotides. Une polymérase crée un fragment complémentaire d'un fragment hybridé sous forme de pont. La molécule est ensuite dénaturée, il en résulte l'apparition de deux fragments sur le support solide. Ce processus est répété de nombreuses fois, permettant de former simultanément des milliers de clusters résultant d'une amplification clonale.

3- Séquençage

Le séquençage par la méthode Illumina repose sur la détection de photons. Il se déroule sur vingt-quatre heures.

Avant de réaliser le séquençage, les échantillons obtenus à la fin du J2 sont regroupés dans des proportions définies à l'intérieur d'un tube constituant le « pool ».

Nous ajoutons ensuite du NaOH permettant la dénaturation de l'ADN contenue dans le pool pendant cinq minutes. La dénaturation est stoppée par l'ajout d'une solution tampon (figure 4).

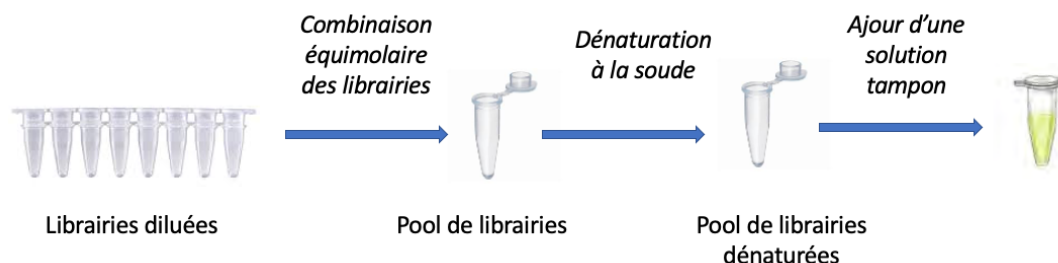


Figure 4 : Combinaison des librairies et préparation pour le séquençage.

Le séquençage est lancé sur l'automate Illumina MiSeq. Il débute lors de l'extension de la première séquence primer pour produire la première lecture. A chaque cycle, des nucléotides fluorescents

complètent la chaîne, et après le cluster est excité par une source lumineuse. Un signal fluorescent caractéristique est alors émis (figure 5).

Le nombre de cycles détermine la longueur de lecture. La quantité de fluorescence émise permet de déterminer la séquence en base. Plusieurs centaines de millions de clusters sont lus simultanément. Il s'agit d'un processus massivement parallèle.

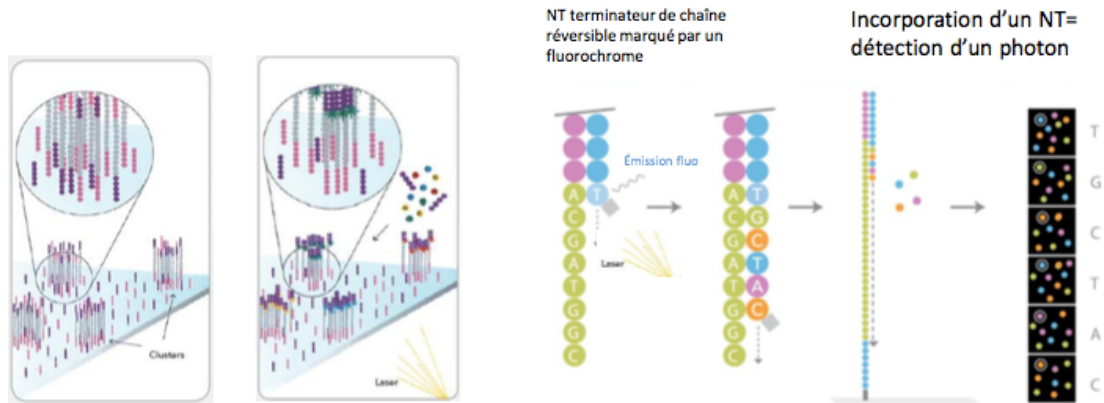


Figure 5 : Séquençage par détection de photons, d'après Audrey Gros.

4- Analyse bio-informatique

Le séquençage génère un grand nombre de séquences à lire. Il faut réaliser une filtration et enlever les données de mauvaise qualité. Nous créons un alignement des séquences lues sur les séquences de référence.

Le fichier brut est disponible au format « .bcl ». Le logiciel bcl2fastq permet d'obtenir les séquences de chaque échantillon et une filtration sur la qualité des données.

Les données « .fastq » sont ensuite analysées par le logiciel Alissa Align&Call (Agilent Technologies) qui permet un alignement des séquences sur un génome de référence sur un fichier « bam ». Puis une identification de l'ensemble des variations de séquence (figure 6).

Cela permet une identification des variants, en comparant les variations nucléotidiques détectées par rapport à un génome de référence. L'objectif est de voir s'il s'agit de mutations ou de polymorphismes.

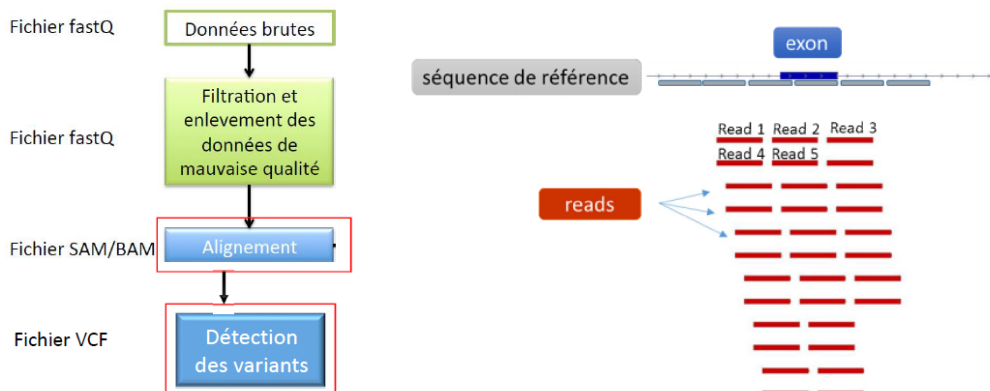


Figure 6 : Schéma représentant la conversion des données à partir du séquenceur et l'alignement des séquences d'ADN par rapport au génome de référence d'après Audrey Gros.

2) Annexe 2: Protocole d'après SureSelect XT HS - Agilent Technologies

Il faut mesurer la concentration de chaque échantillon au Qubit™ (ThermoFisher Scientific). L'ADN de chaque patient est ensuite dilué dans de l'eau, afin d'obtenir des concentrations homogènes pour l'ensemble des échantillons, pour un volume final de 7 µl dans chaque puit.

La première étape est la fragmentation enzymatique. Pour ce faire, nous préparons le mix de fragmentation qui contient le tampon de fragmentation et l'enzyme de fragmentation. Nous ajoutons 3 µl du mix d'hybridation dans chaque échantillon de 7 µl d'ADN dilués. Nous lançons le programme de fragmentation sur le thermocycleur (15 minutes à 37 degrés couvercle ouvert, puis 5 minutes à 65 degrés couvercle fermé). A la fin du programme, 40 µl d'eau est ajoutée dans chaque puit.

La deuxième étape correspond à la réparation des extrémités des fragments d'ADN et l'ajout de la desoxyadénosine 5'- monophosphate non matricée. Le mélange réactionnel permettant cette étape contient un tampon et une enzyme. 20 µl de ce mélange est ajouté dans chaque puit contenant l'ADN fragmenté. Nous lançons le programme dA TAIL sur le thermocycleur (15 minutes à 20 degrés et 15 minutes à 72 degrés, en laissant le couvercle ouvert).

La troisième étape correspond à la ligation et à l'ajout des adaptateurs d'oligonucléotides. Le mélange de ligation comprend un tampon et une enzyme devant être conservé 45 minutes à température ambiante pour être activé. 25 µl du mix de ligation est ajouté dans le tube, ainsi que 5 µl d'un tube prêt dans le kit contenant les adaptateurs. Les échantillons sont placés dans le thermocycleur pour 30 minutes à 20 degrés.

La quatrième étape est une purification des échantillons à l'aide de billes magnétiques appelées billes AMPure XP, conservées 30 minutes à température ambiante avant utilisation. On dépose 80 µl de billes dans chaque puit, le mélange est homogénéisé par aspiration refoulement et nous laissons incubé 5 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite placés sur le séparateur magnétique. Le surnageant est aspiré avec une pipette multicanaux et jeté. Puis, nous ajoutons, à deux reprises, 200 µl d'éthanol à 70 % dans chaque tube, et après 2 minutes ce dernier est retiré et jeté. Lorsque tout l'éthanol est retiré, nous ajoutons 36 µl d'eau. L'ADN se détache alors des billes. Nous plaçons à nouveau les échantillons sur le séparateur magnétique et nous récupérons 34,5 µl en 2 fois de la solution contenant les ADN purifiés. Nous jetons les billes.

La cinquième étape du premier jour de technique correspond à l'amplification des librairies et le marquage des échantillons par des index. Pour cela, nous réalisons un mix de pré-capture comprenant 90 µl de 5X Herculase Reaction Buffer, 4,5 µl de 100 nM dNTP Mix, 18 µl de Forward Primer et 9 µl d'Herculase II Fusion DNA Polymerase. 13,5 µl de ce mix est déposé dans chaque échantillon d'ADN. Nous lançons le programme suivant sur le thermocycleur : 2 minutes à 98°C puis 8 cycles avec 30 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C et 1 minute à 72°C puis 5 minutes à 72°C.

Une fois le cycle terminé, nous procédons à nouveau à une étape de purification comme précédemment, mais en utilisant cette fois 50 µl de billes magnétiques et 15 µl d'eau. A la fin, nous gardons 13 µl de surnageant.

A la fin du premier jour de technique, afin de s'assurer de la concentration des ADN, on dilue 1 µl d'échantillon dans 7 µl d'eau pour un dosage au Qubit™ (ThermoFisher Scientific).

La première étape de la deuxième journée de technique correspond à une hybridation des échantillons d'ADN avec la librairie de capture. L'ADN de chaque patient est dilué dans de l'eau pour obtenir 100 ng d'ADN dans un volume final de 12 µl. Dans chaque échantillon, on ajoute 5 µl d'un réactif permettant de bloquer les adaptateurs pour éviter des hybridations non spécifiques. Les échantillons

sont placés dans le thermocycleur pour 5 minutes à 95 degrés, 10 minutes à 65 degrés. Après 15 minutes, on ajoute 13 µl du mix d'hybridation de capture (RNase Block Solution à 25 %, Capture Library < 3 Mb et SS Fast Hybridation Buffer) dans les échantillons laissés à 65 degrés.

Le programme du thermocycleur se poursuit pendant une heure trente, par 60 cycles avec 1 minute à 65 degrés et 3 secondes à 37 degrés. Pendant ce temps, nous préparons 50 µl de billes de streptavidine par échantillon. Elles sont lavées à trois reprises dans SureSelect Binding Buffer, à chaque fois, nous les plaçons sur le séparateur magnétique et le surnageant est jeté. A la fin du programme du thermocycleur, l'intégralité de chaque échantillon est transférée dans les puits contenant 200 µl de billes lavées. Les tubes sont ensuite placés sur un agitateur de plaque pendant 30 minutes à 1800 tours par minute à température ambiante.

Pendant ce temps, on préchauffe à 70 degrés, six aliquots de 200 µl de Wash Buffer 2 par échantillon. A la fin de l'incubation, la barrette est placée sur le séparateur magnétique puis le surnageant est aspiré et jeté. Les billes (sur lesquelles l'ADN est fixé) sont ensuite remises en suspension dans 200 µL de SS Wash Buffer 1. A nouveau, on place les tubes sur le séparateur magnétique et on enlève le surnageant. On procède alors à six lavages avec 200 µL de Wash Buffer 2, en laissant incubé 5 minutes à 70 degrés à chaque fois avant de replacer les tubes sur le séparateur magnétique. Comme précédemment, entre chaque lavage, nous plaçons la barrette sur le séparateur magnétique et nous retirons le surnageant. Nous ajoutons, après un dernier lavage, 25 µL d'eau dans chaque tube.

La suite du protocole comprend une étape d'amplification des librairies capturées. Le mélange réactionnel de PCR post-capture (ENF, 5x Herculase II Reaction Buffer, Herculase II Fusion DNA Polymerase, 100 nM dNTP Mix et SureSelect Post Capture Primer Mix) est préparé et 25 µl de ce mélange est ajouté dans chaque puit. Le thermocycleur est lancé sur le programme suivant : 2 minutes à 98°C puis 14 cycles avec 30 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C et 1 minute à 72°C et enfin 5 minutes à 72°C pour réaliser une PCR sur bille.

A la fin du programme, nous mettons les tubes sur le séparateur magnétique et nous récupérons le surnageant (environ 50 µL) que nous disposons dans un nouveau tube. Nous pouvons alors jeter les billes.

Nous procédons alors à une nouvelle purification par des billes AMPure XP, cette fois avec 50 µL de billes, 200 µL d'éthanol à 70 %, et 25 µL d'eau. Nous récupérons les 25 µL de solution contenant l'ADN amplifié purifié, et nous jetons les billes.

Nous réalisons un premier contrôle au Qubit™ (ThermoFisher Scientific) pour doser les ADN ; et un deuxième contrôle au Bioanalyzer qui vérifie la taille des fragments.

3) Annexe 3: Tableau représentant les données QC obtenues (HEMEP).

	Metrics For Input File	Overall metrics for all reads in BAM file				Overall metrics related to analyse target region
N° Patient	Number of reads in untrimmed fastq file	Number of duplicate reads	Number of reads in bam file passing mapping quality filters	Number of reads +/- 200bp covered region	Percentage of covered regions with zero coverage	Median read depth in analyzable target region
1	1,593,150	16.17%	1,238,996	55.80%	0.00	1254
2	1,609,630	17.63%	1,258,172	56.51%	0.00	1253
3	1,706,042	9.04%	1,465,042	38.98%	0.00	1007
4	1,674,096	16.65%	1,323,519	55.19%	0.00	1280
5	1,553,484	15.00%	1,219,673	56.08%	0.00	1235
6	1,476,106	14.74%	1,194,595	55.17%	0.00	1159
7	1,514,872	14.51%	1,230,356	52.16%	0.00	1130
8	1,454,608	14.35%	1,188,068	52.99%	0.00	1116
9	1,232,930	14.10%	1,018,505	69.35%	0.00	1209
10	1,413,454	16.17%	1,117,246	69.09%	0.00	1353
11	1,469,568	17.87%	1,168,600	74.29%	0.00	1464
12	1,666,884	16.74%	1,301,762	62.37%	0.00	1450
13	1,803,470	9.72%	1,547,361	41.32%	0.00	1113
14	1,731,958	16.99%	1,349,386	61.33%	0.00	1468
15	1,705,732	15.87%	1,331,370	58.45%	0.00	1381
16	1,864,710	17.64%	1,421,048	60.74%	0.00	1547
17	1,295,942	41.72%	686,881	38.89%	0.00	433
18	1,475,280	26.90%	994,135	52.09%	0.00	876
19	1,248,962	41.32%	666,47	44.15%	0.00	488
20	1,386,006	24.46%	962,545	43.27%	0.00	691
21	1,418,016	35.23%	843,226	49.79%	0.00	700
22	1,042,812	51.71%	443,055	35.96%	0.00	258
23	1,473,642	27.23%	984,108	48.40%	0.00	812
24	1,709,460	17.58%	1,346,194	62.45%	0.00	1470
25	1,618,284	17.15%	1,259,067	62.97%	0.00	1405
26	1,669,384	8.14%	1,422,116	36.07%	0.00	913
27	1,978,526	16.38%	1,538,290	56.35%	0.00	1555
28	1,700,354	17.57%	1,324,562	67.71%	0.00	1607
29	1,596,936	16.81%	1,252,167	65.79%	0.00	1478
30	1,534,866	3.76%	1,333,909	18.31%	0.00	435
31	1,959,404	13.62%	1,580,562	46.60%	0.00	1302
32	1,671,560	6.15%	1,444,551	28.10%	0.00	720
33	1,502,980	17.11%	1,171,452	59.63%	0.00	1243
34	2,358,828	20.73%	1,746,191	54.03%	0.00	1659
35	2,457,688	26.86%	1,693,042	65.95%	0.00	1976
36	2,123,074	7.36%	1,812,456	28.21%	0.00	909
37	2,715,598	30.01%	1,800,620	69.67%	0.00	2229
38	1,993,758	22.91%	1,453,913	68.28%	0.00	1747

39	1,648,472	18.33%	1,276,743	67.55%	0.00	1537
40	2,380,518	30.07%	1,571,831	65.08%	0.00	1817
41	1,396,136	25.25%	979,89	60.37%	0.00	1029
42	1,778,446	22.31%	1,304,939	66.86%	0.00	1564
43	1,626,796	23.33%	1,195,649	66.87%	0.00	1400
44	1,598,712	20.56%	1,201,473	68.27%	0.00	1463
45	2,491,562	26.59%	1,716,272	64.83%	0.00	1958
46	1,601,954	19.93%	1,209,933	67.48%	0.00	1440
47	1,515,746	24.21%	1,086,515	66.85%	0.00	1223
48	1,366,652	28.42%	920,268	65.25%	0.00	1023
49	1,251,300	25.93%	876,675	68.57%	0.00	1019
50	1,822,226	19.95%	1,362,445	58.13%	0.00	1386
51	1,123,098	23.25%	810,112	64.65%	0.00	888
52	1,558,064	18.04%	1,209,774	68.13%	0.00	1452
53	1,274,082	14.99%	1,029,538	71.92%	0.00	1288
54	1,431,494	16.97%	1,128,057	68.99%	0.00	1364
55	1,922,460	23.14%	1,401,670	70.39%	0.00	1758
56	1,691,728	22.90%	1,240,606	71.30%	0.00	1573
57	1,538,902	19.63%	1,177,457	71.08%	0.00	1497
58	1,634,380	20.09%	1,234,842	65.01%	0.00	1433
59	1,776,900	19.58%	1,344,977	62.58%	0.00	1504
60	1,818,750	15.87%	1,430,711	54.41%	0.00	1382
61	1,969,742	23.23%	1,435,697	68.59%	0.00	1728

4) Annexe 4: Tableau représentant les données QC obtenues (WAMIF).

	Metrics For Input File	Overall metrics for all reads in BAM file				Overall metrics related to analyse target region
N° Patient	Number of reads in untrimmed fastq file	Number of duplicate reads	Number of reads in bam file passing mapping quality filters	Number of reads +/- 200bp covered region	Percentage of covered regions with zero coverage	Median read depth in analyzable target region
1	1,668,722	13.58%	1,368,030	79.13%	0.00	1057
2	1,909,126	14.29%	1,567,466	80.33%	0.00	1263
3	1,673,198	13.53%	1,371,072	81.09%	0.00	1086
4	1,580,368	14.31%	1,287,786	78.98%	0.00	1005
5	1,695,534	12.98%	1,391,675	80.39%	0.00	1100
6	1,824,650	13.44%	1,482,090	80.51%	0.00	1177
7	1,783,616	15.56%	1,442,660	79.59%	0.00	1143
8	1,693,650	13.84%	1,387,275	77.88%	0.00	1035
9	1,596,468	13.50%	1,325,422	79.96%	0.00	1080
10	1,519,806	12.42%	1,272,517	80.28%	0.00	1058
11	2,333,228	16.31%	1,855,950	79.75%	0.00	1470
12	2,202,848	16.08%	1,756,072	79.53%	0.00	1410
13	2,172,092	15.10%	1,766,890	80.98%	0.00	1458
14	2,027,886	14.67%	1,662,135	79.34%	0.00	1356
15	2,177,732	16.42%	1,723,354	77.98%	0.00	1383
16	2,172,962	15.50%	1,693,590	78.09%	0.00	1349
17	3,076,316	23.59%	2,251,638	78.58%	0.00	1812
18	2,435,974	21.21%	1,821,173	78.67%	0.00	1484
19	2,211,030	17.83%	1,729,852	79.34%	0.00	1422
20	2,449,546	18.79%	1,876,554	78.99%	0.00	1534
21	2,112,936	17.61%	1,656,595	79.62%	0.00	1365
22	1,764,780	15.44%	1,433,328	81.39%	0.00	1205
23	2,460,576	20.32%	1,864,571	77.15%	0.00	1486
24	1,955,350	15.56%	1,562,669	78.59%	0.00	1258
25	1,526,594	13.09%	1,271,941	81.39%	0.00	1005
26	1,313,798	24.99%	886,368	70.80%	0.00	499
27	1,880,186	14.61%	1,536,363	81.41%	0.00	1246
28	1,563,568	15.37%	1,267,555	79.52%	0.00	999
29	1,414,048	11.76%	1,199,833	80.32%	0.00	943
30	1,866,778	16.21%	1,477,042	79.41%	0.00	1152
31	1,824,550	14.21%	1,495,641	80.04%	0.00	1175
32	1,654,754	13.02%	1,366,452	78.22%	0.00	1038
33	1,385,150	11.78%	1,166,240	81.37%	0.00	932
34	1,547,242	12.99%	1,293,573	80.61%	0.00	1039
35	1,602,468	20.79%	1,200,510	80.02%	0.00	966
36	2,108,002	16.10%	1,693,592	80.22%	0.00	1342
37	2,224,894	16.51%	1,412,377	79.81%	0.00	1398
38	2,335,608	17.06%	1,842,378	79.86%	0.00	1439

39	2,085,526	18.01%	1,636,144	79.14%	0.00	1235
40	2,174,514	17.03%	1,733,479	79.43%	0.00	1346
41	1,856,980	15.14%	1,508,824	80.42%	0.00	1173
42	1,800,336	13.92%	1,478,413	80.34%	0.00	1175
43	2,167,044	16.86%	1,703,619	79.61%	0.00	1365
44	2,360,758	17.21%	1,854,935	80.01%	0.00	1465
45	2,362,632	16.56%	1,877,050	77.79%	0.00	1436
46	1,994,352	14.52%	1,635,501	79.94%	0.00	1312
47	2,356,006	16.06%	1,870,197	78.18%	0.00	1456
48	2,588,812	16.78%	1,973,912	77.88%	0.00	1529
49	2,304,712	17.49%	1,823,675	80.72%	0.00	1461
50	2,117,246	16.31%	1,682,207	79.74%	0.00	1348
51	1,936,618	15.38%	1,557,505	80.62%	0.00	1242
52	2,267,618	16.52%	1,788,971	81.25%	0.00	1449
53	2,144,090	19.37%	1,637,657	78.36%	0.00	1290
54	1,687,148	13.70%	1,395,181	80.38%	0.00	1096
55	2,034,444	15.40%	1,640,094	79.56%	0.00	1307
56	2,141,098	16.64%	1,688,218	79.58%	0.00	1349
57	1,983,064	14.98%	1,618,769	81.19%	0.00	1289
58	1,864,272	14.12%	1,537,037	81.51%	0.00	1239
59	2,100,082	16.07%	1,687,946	80.17%	0.00	1339
60	1,769,266	13.72%	1,464,017	80.18%	0.00	1146
61	1,812,276	14.11%	1,499,241	80.95%	0.00	1197
62	2,121,840	15.02%	1,711,987	79.79%	0.00	1343
63	2,070,698	16.49%	1,650,683	79.45%	0.00	1270
64	1,711,170	14.72%	1,387,269	78.83%	0.00	1036
65	2,251,256	17.19%	1,774,778	78.38%	0.00	1334
66	2,085,032	16.93%	1,660,725	79.53%	0.00	1275
67	2,002,278	16.63%	1,580,679	78.20%	0.00	1165
68	1,959,282	16.15%	1,564,616	78.36%	0.00	1163
69	2,060,752	17.18%	1,609,582	77.49%	0.00	1188
70	2,009,614	15.37%	1,599,515	78.15%	0.00	1173
71	1,685,202	20.18%	1,280,952	74.90%	0.00	887
72	2,247,614	17.94%	1,756,789	78.14%	0.00	1300
73	2,126,484	16.31%	1,711,212	80.38%	0.00	1350

5) Annexe 5 : QC report pour le quatrième patient de la série 4

QC METRICS

Metrics For Input File	Metrics Value
Number of reads in untrimmed fastq file	1,386,006
Number of reads in trimmed fastq file	1,386,006
Number of reads trimmed	348,874
Number of untrimmed reads in fastq file after trimming	1,037,132
Number of reads discarded	0
Number of Duplicate reads	339,295 (24.46%)

Overall metrics for all reads in BAM file	Metrics Value
Number of reads in bam file	993,455
Number of reads in bam file passing mapping quality filters *	962,545
Number of reads mapping to multiple genomic locations	54,455 (5.66%)
Number of reads in covered regions	351,404 (36.51%)
Number of reads +/- 100bp covered region	401,756 (41.74%)
Number of reads +/- 200bp covered region	416,464 (43.27%)
Percentage of covered regions with zero coverage	0.00
Median QV bases used in variant calling	38
Average Read Length	74
Total high quality mapped bases	71,334,331

Overall metrics related to analyzable target regions	Metrics Value
Number of genomic bases in analyzable target region	28,075
Number of sequenced bases in analyzable target regions	18,973,210
Number of reads	316,347 (32.87%)
Average read depth in analyzable target regions	675
Median read depth in analyzable target regions	691

6) **Annexe 6 : Tableau représentant les tests statistiques concernant les caractéristiques des patients de la cohorte WAMIF**

Caractéristiques	Patientes non porteuses CHIP	Patientes porteuses CHIP	p test
age (mean (SD))	42.69 (5.86)	44.69 (5.75)	0.268
tabac = 1 (%)	16 (27.1)	5 (38.5)	0.633
dyslipidemie = 1 (%)	11 (18.6)	1 (7.7)	0.584
HTA = 1 (%)	11 (18.6)	5 (38.5)	0.235
atd_fam = 1 (%)	16 (27.1)	2 (15.4)	0.596
diabete = 1 (%)	11 (18.6)	3 (23.1)	1.000
sédentarité = 1 (%)	18 (31.0)	6 (50.0)	0.355
grossesse_complicuée	15 (30.0)	5 (45.5)	0.526
ménopause = 1 (%)	9 (15.3)	2 (15.4)	1.000
atherome = 1 (%)	6 (10.2)	4 (30.8)	0.133
LDL (mean (SD))	1.15 (0.54)	1.26 (0.14)	0.476
trigly (mean (SD))	1.03 (0.51)	0.95 (0.62)	0.643
glycemie (mean (SD))	1.25 (0.69)	1.27 (0.61)	0.930
Hb\ n (mean (SD))	13.18 (1.70)	13.40 (1.32)	0.664
plaquettes\ n (mean (SD))	291642.86 (105446.83)	276923.08 (89562.33)	0.643
leucocytes\ n (mean (SD))	9749.82 (3142.36)	9903.33 (2406.30)	0.874
sodium\ n (mean (SD))	138.53 (2.31)	137.46 (2.76)	0.152
potassium\ n (mean (SD))	3.83 (0.37)	3.84 (0.29)	0.941
DFG\ n (mean (SD))	102.70 (21.65)	103.01 (20.67)	0.966
TCA = 1 (%)	28 (50.9)	7 (58.3)	0.883
contraception oestro-progestative = 1 (%)	19 (38.8)	6 (54.5)	0.535
récidive = 1 (%)	3 (5.1)	0 (0.0)	0.949

7) **Annexe 7 : Valorisation du travail effectué dans le cadre de ce projet**

Un article publié dans TH Open (PMID: 34414354) : Is hematopoietic clonality of indetermined potential a risk factor for pulmonary embolism? SOUDET S* (1, 2), JEDRASZAK G* (3, 4), EVRARD O (3,4), MAROLLEAU JP (3,4), GARCON L(3, 4), SEVESTRE PIETRI MA (1, 2)

Un article en cours de soumission : Myocardial infarction in pre-menopausal women : possible implication of clonal hematopoiesis of indetermined potential. Simon Soudet, Guillaume Jedraszak, Ludovic Drouet, Marie-Antoinette Sevestre, Loic Garcon, Ophelie Evrard, Estelle Vautrin, Stéphanie Marlière, ANNE bellemain-appaix, Claire Bal dit Sollier, Tessa Bergot, Anne Gompel, Francis Couturaud, and Stephane Manzo-Silberman

LA CLONALITE HEMATOPOÏËTIQUE DE SIGNIFICATION INDETERMINEE EST-ELLE ASSOCIEE AUX PATHOLOGIES CARDIO-VASCULAIRE ?

Introduction : La clonalité hématopoïétique de signification indéterminée (CHIP) est définie par la présence de mutations somatiques à une fréquence allélique d'au moins 1 à 2 % dans les cellules hématologiques. Elle favorise la survenue de cancers hématologiques. La CHIP est rapportée comme associée aux pathologies cardio-vasculaires, elle favoriserait le processus d'athérosclérose. Le mécanisme physiopathologique n'est pas entièrement élucidé.

L'embolie pulmonaire (EP) et l'infarctus du myocarde (IDM) sont des pathologies fréquentes. Leur survenue chez des patients jeunes sans facteurs de risque rend nécessaire la recherche de nouveaux facteurs étiologiques, afin d'optimiser la prise en charge. L'objectif de ce travail est de mettre en évidence un lien entre la survenue d'un événement cardio-vasculaire prématuré et la présence d'une CHIP.

Matériel et méthodes : Nous avons étudié deux cohortes de façon rétrospective. La première est constituée de 61 patients, âgés de 18 à 65 ans, et ayant présenté une EP idiopathique. La deuxième est constituée de 73 patientes ayant présenté un IDM avant l'âge de 50 ans. La proportion de CHIP parmi les patients de l'étude est recherchée par séquençage haut débit (NGS). Le panel de gène étudié contenait notamment *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*.

Résultats : Parmi les 61 patients de la première cohorte, nous avons retrouvé une ou plusieurs mutations somatiques relevant de la CHIP chez 12 patients, soit 20 % des patients. 15 mutations sont retrouvées dans le gène *DNMT3A*, 3 dans *ASXL1* et 1 dans *TET2*.

Parmi les 73 patientes de la deuxième cohorte, nous avons retrouvé une mutation relevant de la CHIP chez 11 patientes, soit 18 % de notre effectif. 6 mutations sont retrouvées dans le gène *DNMT3A*, 3 dans *ASXL1* et 1 dans *JAK2* et *SH2B3*.

Conclusion : Nous retrouvons pour ces deux cohortes un nombre important de mutations pour l'âge des patients. Le lien entre thrombose artérielle et veineuse, repose potentiellement sur l'inflammation. La CHIP peut être envisagée comme un potentiel facteur de risque aux pathologies cardio-vasculaires chez les sujets jeunes.

Mots clés : CHIP, embolie pulmonaire idiopathique, infarctus du myocarde, patient jeune, NGS

IS HEMATOPOIETIC CLONALITY OF INDETERMINED POTENTIAL A RISK FACTOR FOR CARDIO-VASCULAR DISEASE ?

Background : Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is defined as the acquisition of somatic mutations that drive clonal expansion. It is a precursor state for hematological neoplasms. The association between CHIP and atherosclerosis have been described. The pathophysiological mechanism is not understood. Pulmonary embolism (PE) and myocardial infarction (MI) are severe and frequent condition. News causatives factors are need for understand more this pathology and the occurrence among young patients. The objective of this study was to show that CHIP is potentially associated with premature cardio-vascular diseases.

Methods : We conducted two pilots retrospective observational studies.

The first study included 61 patients with idiopathic PE between 18 to 65 years old. The second study included 73 womens with MI antecedent before age of 50. CHIP proportion in studies patients were analysed using next generation sequencing. The panel is especially composed by *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*.

Results : Upon 61 patients with iPE included, a total of 19 somatics mutations were found in 12 patients (20 %). 15 mutations were found in *DNMT3A* gene, 3 in *ASXL1* and 1 in *TET2*. Upon 73 patientes included in second study, a total of 12 somatiques mutations were found (18%). 6 mutations were found in *DNMT3A* gene, 3 in *ASXL1* and 1 in *JAK2* and *SH2B3*.

Conclusion : We report the presence of high rates in relation to patient age. The link between arterial and venous thrombosis potentially lies to inflammation. CHIP can be considered as a potential risk factor for cardiovascular disease in young subjects.

Key Words : CHIP, idiopathic pulmonary embolism, myocardial infarction, young, NGS