



UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année : 2021

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Etude COVID CHIP : Impact de la présence d'une hématopoïèse  
clonale sur la survenue d'une COVID-19 sévère ou critique pendant la  
première vague épidémique**

Présentée et soutenue publiquement le 02 juillet 2021 à 14h  
au Pôle Formation

par **Jordane DEMONCHY**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Bruno QUESNEL**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Julien POISSY**

**Monsieur le Docteur Nicolas DUPLOYEZ**

**Madame le Docteur Céline BERTHON**

**Directeur de thèse :**

**Madame le Docteur Anne-Sophie MOREAU**

---

## **AVERTISSEMENT**

**LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION AUX OPINIONS  
EMISES DANS LES THESES : CELLES-CI SONT PROPRES A LEURS AUTEURS.**



# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
1. Généralités sur l'hématopoïèse .....	4
a. Site de l'hématopoïèse .....	4
b. Cellule souche hématopoïétique et cascade hématopoïétique .....	8
c. Régulation de l'hématopoïèse .....	11
2. Hématopoïèse clonale .....	13
a. Définition de l'hématopoïèse clonale .....	13
b. Détection de l'hématopoïèse clonale par séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS) : principe de la méthode .....	15
3. Hématopoïèse clonale de signification indéterminée ou <i>Clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i> (CHIP) .....	19
a. Définition et différence avec les autres « acronymes à 4 lettres » .....	19
b. Epidémiologie des CHIP et facteurs favorisants .....	22
c. Mutations somatiques retrouvées dans la CHIP .....	23
d. Conséquences cliniques de l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée .....	25
4. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ou Maladie à Coronavirus 2019 .....	28
a. Présentation du virus SARS-CoV-2 .....	28
b. Physiopathologie de la COVID-19 .....	30
c. Manifestations cliniques, biologiques et radiologiques de la COVID-19 .....	34
d. Diagnostic de la COVID-19 .....	40
e. Epidémiologie et facteurs de risque de COVID-19 sévère et critique .....	40
f. Traitements de la COVID-19 sévère et critique .....	42
5. Rationnel et objectifs de l'étude .....	45
<b>MATERIEL ET METHODE</b> .....	<b>47</b>
1. Type de l'étude .....	47
2. Sélection des patients .....	47
a. Cohorte COVID-19 .....	47
b. Cohorte contrôle non-COVID-19 .....	48
3. Recueil des données .....	49
4. Analyse des échantillons .....	49
a. Biologie standard .....	49
b. Biologie moléculaire .....	50
5. Analyses statistiques .....	51

## RESULTATS ..... 52

1. Caractéristiques des patients de la cohorte COVID-19.....	52
a. <i>Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques des patients de la cohorte COVID-19</i> .....	52
b. <i>Gravité, complications et devenir des patients de la cohorte COVID-19</i> .....	55
c. <i>Caractéristiques de l'hématopoïèse clonale chez les patients de la cohorte COVID-19</i> ...	59
2. Description de la cohorte contrôle et les caractéristiques de l'hématopoïèse clonale .....	61
3. Objectif principal de l'étude: Hématopoïèse clonale comme facteur de risque de COVID-19 sévère et critique .....	63
4. Objectifs secondaires de l'étude.....	64
a. <i>Hématopoïèse comme facteur de risque de complications liées à la COVID-19, au sein de la cohorte COVID-19</i> .....	64
b. <i>Profils inflammatoires en fonction de la présence ou de l'absence d'hématopoïèse clonale chez les patients atteints de COVID-19 sévère ou critique</i> .....	66

## DISCUSSION..... 67

1. Comparaison avec la littérature .....	68
a. <i>A propos des caractéristiques des patients</i> .....	68
b. <i>A propos de l'objectif principal de l'étude : hématopoïèse clonale comme facteur de risque de COVID-19 sévère et critique</i> .....	70
c. <i>A propos des objectifs secondaires de l'étude</i> .....	74
2. Limites et points forts de notre étude .....	77
3. Questions soulevées et perspectives .....	80

## CONCLUSION ..... 85

## BIBLIOGRAPHIE ..... 86

## ANNEXES..... 95

<u>Annexe 1</u> : Schéma récapitulatif des Recommandations Formalisées d'Experts de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) concernant la prise en charge du SDRA de l'adulte à la phase initiale .....	95
<u>Annexe 2</u> : Score <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> (SOFA).....	96
<u>Annexe 3</u> : Index de Gravité Simplifié (IGS II) .....	97
<u>Annexe 4</u> : Prévalence des mutations retrouvées chez les patients avec hématopoïèse clonale des cohortes COVID-19 et contrôle .....	99
<u>Annexe 5</u> : Article publié dans la revue <i>Cancers</i> .....	100
<u>Annexe 6</u> : Poster présenté à la 40 <sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) .....	117

## ABREVIATIONS

**ACE2** : *Angiotensine-Converting Enzyme 2* ou enzyme de conversion de l'angiotensine 2

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AOMI** : Artérite Oblitérante des Membres Inférieurs

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**AVC** : Accident Vasculaire Cérébral

**CCUS** : *Clonal Cytopenia of Undetermined Significance* ou cytopénie clonale de signification indéterminée

**CH** : *Clonal Hematopoiesis* ou hématopoïèse clonale

**CHIP** : *Clonal Hematopoiesis of Indetermined Potential* ou hématopoïèse clonale de signification indéterminée

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CLP** : *Common Lymphoid Progenitor* ou progéniteur commun lymphoïde

**COVID-19** : *Coronavirus Disease 2019* ou maladie à coronavirus 2019

**CRP** : *C-Reactive Protein* ou protéine C-réactive

**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique

**ECMO** : *Extracorporeal Membrane Oxygenation* ou oxygénation par membrane extracorporelle

**EP** : Embolie Pulmonaire

**GMP** : *Granulocyte-Macrophage Progenitor* ou progéniteur des granulocytes et des macrophages

**ICUS** : *Idiopathic Cytopenia of Uncertain Significance* ou Cytopénie idiopathique de signification indéterminée

**IGS II**: Index de Gravité Simplifié II

**IL-6** : Interleukine 6

**IMC** : Indice de Masse Corporelle

**IOT** : Intubation Orotrachéale

**MEP** : *Megacaryocyte-Erythrocyte Progenitor* ou progéniteur des mégacaryocytes et des érythrocytes

**MTEV** : Maladie Thromboembolique Veineuse

**NFS** : Numération Formule Sanguine

**NGS** : *Next Generation Sequencing* ou Séquençage de nouvelle génération

**NIH** : *National Institutes of Health* ou Instituts américains de la santé

**OR** : Odds Ratio

**PCT** : Procalcitonine

**PNN** : Polynucléaire Neutrophile

**RT-PCR** : *Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*

**SARS-CoV-2** : *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

**SMD** : Syndrome Myélodysplasique

**SOFA** : *Sequential Organ Failure Assessment*

**TCA** : Temps de Céphaline Activée

**TNF $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor alpha*

**TP** : Taux de prothrombine

**VAF** : *Variant Allele Frequency* ou fréquence allélique

**VM** : ventilation mécanique

**VNI** : ventilation non invasive

## RESUME

### Contexte

Un âge avancé et la présence de comorbidités cardio-vasculaires font partie des facteurs de risque associés aux formes graves de COVID-19. En parallèle, l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP) est récemment apparue comme responsable d'une inflammation chronique, conduisant à un sur-risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique, eux-mêmes facteurs de risque de formes graves de COVID-19. L'objectif de cette étude était de déterminer si les patients atteints de COVID-19 sévère et critique avaient une prévalence d'hématopoïèse clonale (*Clonal Hematopoiesis* ou CH) augmentée et si cette CH influençait leur évolution clinique.

### Méthode

La présence d'une CH a été recherchée par séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing* ou NGS) sur une cohorte de 122 patients hospitalisés pour la prise en charge d'une COVID-19 au CHU de Lille lors de la première vague épidémique et comparée à une cohorte contrôle rétrospective de 465 patients sans COVID-19. Dans la cohorte COVID-19, l'influence de la présence d'une CH sur le devenir des patients, les complications cliniques et biologiques et la mortalité a été analysée.

### Résultats

Au sein de la cohorte COVID-19, l'âge médian était de  $64,8 \pm 15,7$  ans avec un sex-ratio (H/F) de 3/1. 89 (73%) patients étaient admis en réanimation et 67 (54,9%) ont nécessité une intubation orotrachéale. Une CH était retrouvée chez 55 (45,1%) malades, avec des mutations de *DNMT3A* et *TET2* chez 28 (23%) et 26 (21,3%) patients respectivement. Dans la cohorte contrôle, une CH était mise en évidence chez 106 (22,8%) patients. Dans les deux groupes, la prévalence de CH augmentait avec l'âge. Après ajustement sur l'âge, la présence d'une CH était significativement associée aux formes sévères et critiques de COVID-19 (OR=3,09 [IC95% 1,95-4,88],  $p < 0,0001$ ). Dans la cohorte COVID-19, la présence de CH n'était pas significativement corrélée ni à la nécessité d'IOT (OR=0,84 [0,41-2,01],  $p=0,687$ ), ni au décès hospitalier (OR : 0,83 [0,27-3,22],  $p=0,901$ ), ni aux autres complications de la COVID-19.

### Conclusion

On retrouve une prévalence augmentée de CH chez les patients atteints de COVID-19. Les patients avec CH ont 3 fois plus de risque de développer une forme sévère ou critique de COVID-19 que les patients sans CH. Si la présence d'une CH pourrait influencer l'évolution naturelle de la maladie, les mécanismes sous-jacents restent néanmoins à identifier.

# INTRODUCTION

## 1. Généralités sur l'hématopoïèse

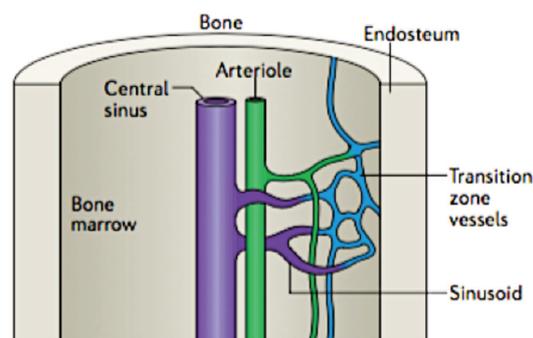
Les éléments figurés du sang périphérique, comprenant les cellules lymphoïdes (lymphocytes B et T, cellules NK) et les cellules myéloïdes (globules rouges, plaquettes, monocytes, granulocytes, cellules dendritiques), sont formés tout au long de la vie de l'individu selon un processus appelé « **hématopoïèse** ». Il comprend l'ensemble des mécanismes conduisant à la **production des différentes cellules sanguines** à partir de la **cellule souche hématopoïétique (CSH)**. Ceci est rendu possible par la capacité de la CSH d'auto-renouvellement et de différenciation vers l'ensemble des lignées cellulaires sanguines (1). L'hématopoïèse est un **processus adaptatif** qui augmente sa production cellulaire secondairement à des stimuli de stress, notamment en cas de saignement ou d'infection, permettant ainsi de maintenir un nombre constant de cellules sanguines (2).

### *a. Site de l'hématopoïèse*

Bien qu'au cours de la vie embryonnaire, l'hématopoïèse primitive se déroule dans des tissus extra- (placenta, sac vitellin et allantoïde) et intra-embryonnaires (aorte-gonade-mésonephros), puis que chez le fœtus l'hématopoïèse définitive se déroule dans la rate et le foie, la **moelle osseuse** sera le site principal de l'hématopoïèse dès le 7<sup>ème</sup> mois de grossesse et le site exclusif à partir de la naissance (3). Dans certaines circonstances pathologiques, l'hématopoïèse peut avoir lieu dans les **organes hématopoïétiques secondaires** comme la rate et le foie (4).

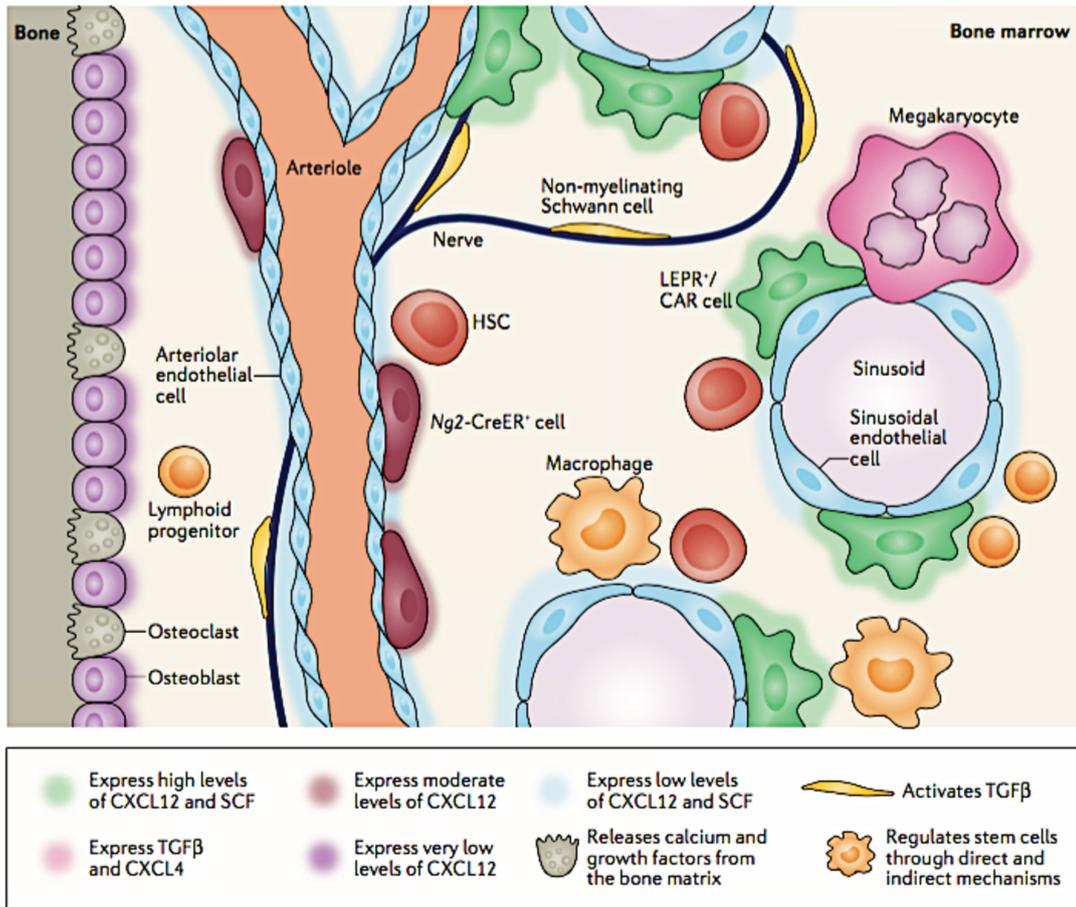
La cavité médullaire est soutenue par de l'os spongieux sous forme de trabécules, contenant les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes. La moelle osseuse est constituée de plusieurs composants :

- Les **cellules hématopoïétiques**
- La trame de soutien, appelée **stroma**, qui est composée d'une matrice extracellulaire (notamment collagène, fibronectine, laminine, thrombospondine...), produite par les cellules stromales (cellules endothéliales, macrophages, adipocytes, cellules souches mésenchymateuses, cellules osseuses et fibres nerveuses sympathiques)(4)(5)
- Un grand nombre de **vaisseaux sanguins** : les artères nourricières qui apportent le sang dans la moelle osseuse, s'affinent progressivement pour devenir des artérioles jusqu'à la zone de transition, qui connecte les artérioles aux sinusoides. Après les sinusoides, le diamètre vasculaire augmente pour le retour veineux vers le sinus central, qui draine le sang en dehors de la moelle osseuse, comportant notamment les cellules sanguines nouvellement produites (4)(Figure 1)



**Figure 1** : Schéma de la structure vasculaire de la moelle osseuse, d'après *Crane et al., 2017* (4)

Les **niches hématopoïétiques**, par définition, sont des zones où le microenvironnement tissulaire permet le maintien des cellules souches et/ou des autres progéniteurs hématopoïétiques. Elles influencent **la survie, la prolifération, l'orientation et les mouvements** de ces cellules. Les niches sont essentiellement localisées dans les zones péri-vasculaires de la moelle (6), avec 80% des CSH se trouvant au niveau des sinusoides, 10% au niveau des artérioles et 10% au niveau de la zone de transition vasculaire. Seul un très faible pourcentage se trouve proche de l'endosteum (**Figure 1**)(4). Le microenvironnement régule la fonction des CSH via des facteurs agissant directement sur ces cellules ou via des interactions entre les cellules stromales et la CSH (7). Parmi les facteurs sécrétés dans les niches par les cellules stromales, on retrouve notamment des **facteurs de croissance** nécessaires à la maintenance des CSH et non produits par la cellule elle-même : le **Stem Cell Factor (SCF ou kit-ligand)** qui se fixe sur le récepteur KIT, la **chimiokine CXC-chemokine ligand 12 (CXCL12)** qui conduit à l'attraction et la rétention des CSH - mais aussi d'autres progéniteurs - dans les niches en activant sa voie de signalisation via le récepteur CXCR4 (*CXC-Chemokine receptor 4*), et la **thrombopoïétine (TPO)** qui se fixe au récepteur MPL (*myeloproliferative leukemia protein*). De nombreux autres facteurs sont impliqués (4), notamment la cytokine TGF $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) qui favorise la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH. La niche hématopoïétique, les molécules solubles et les cellules stromales impliquées dans le maintien des CSH sont représentées schématiquement dans la **figure 2**.



**Figure 2 :** Schéma de la niche hématopoïétique au sein de la moelle osseuse, d'après *Crane et al., 2017* (4). HSC : hematopoietic stem cell = cellule souche hématopoïétique, LEPR<sup>+</sup> cell : leptin receptor expressing cell ou CAR cell : CXCL12 abundant reticular cell = cellules synthétisant une grande quantité de SCF et CXCL12, Ng2-creER<sup>+</sup> cell : neural-glia antigen 2, tamoxifen form of Cre-recombinase cell. LEPR<sup>+</sup> cell, CAR cell et Ng2-creER<sup>+</sup> cell sont des cellules souches mésenchymateuses.

b. *Cellule souche hématopoïétique et cascade hématopoïétique*

La cellule souche hématopoïétique est une cellule caractérisée par (8) :

- Sa **multipotence**, c'est à dire qu'elle est capable de donner naissance à toutes les lignées cellulaires de l'hématopoïèse
- Son **faible nombre** de cellule (estimé à 1 cellule pour  $10^5$  cellules de la moelle)
- Sa capacité de **quiescence**, qui la protège des agressions, notamment par la chimiothérapie ou la radiothérapie
- Sa **capacité d'auto-renouvellement**

Elle va également être capable de résister à la congélation à l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) et de se mobiliser dans la circulation sanguine (1).

Au sommet de la hiérarchie de l'hématopoïèse se trouve la CSH appelée « **long-term hematopoietic stem cell** » ou **LT-HSC**, capable d'auto-renouvellement tout le long de la vie de l'individu, puis se différencie en **progéniteurs multipotents (MPP : multipotent progenitor)** successifs avec une capacité limitée dans le temps d'auto-renouvellement (appelés « **intermediate-term** » et « **short-term hematopoietic stem cell** » ou **IT- et ST-HSC**)(1,3).

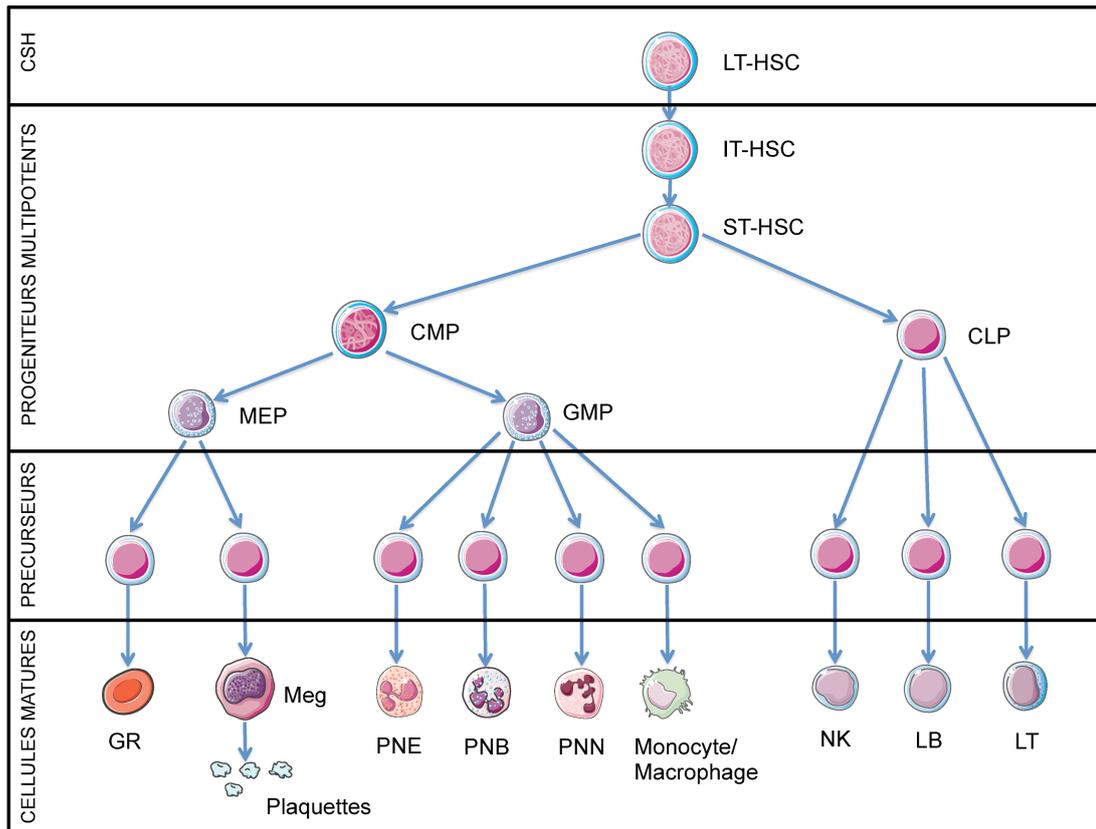
Les possibilités de devenir de la CSH sont multiples : elle peut rentrer dans un cycle de division cellulaire, entrer en différenciation et s'orienter vers une lignée cellulaire, ou se polariser et se mobiliser, sous l'influence de facteurs multiples (cytokines, facteurs de croissance et activation de voies de signalisation par interactions cellulaires directes) dans la niche hématopoïétique (3).

De plus, l'auto-renouvellement de ces cellules va se faire par une division cellulaire symétrique ou par une division cellulaire asymétrique conduisant à l'obtention simultanée d'une CSH et d'une cellule s'engageant dans une voie de différenciation, ceci permettant le **maintien d'une population constante de CSH** (9).

Ces progéniteurs multipotents vont donc ensuite s'orienter vers d'autres progéniteurs moins immatures et vont perdre leur capacité à reconstituer une hématopoïèse médullaire complète mais vont acquérir un grand potentiel d'amplification (2,3,10):

- Soit **vers la lignée myéloïde** en se différenciant en **progéniteur commun myéloïde (CMP : *common myeloid progenitor*)**, qui elle-même va donner naissance, soit au **progéniteur érythro- et mégacaryocytaire (MEP : *megacaryocyte-erythrocyte progenitor*)**, soit au **progéniteur des granulocytes et macrophages (GMP : *granulocyte-macrophage progenitor*)**. Ces progéniteurs se différencieront ensuite en précurseurs puis en cellules myéloïdes matures.
- Soit **vers la lignée lymphoïde** en se différenciant en **progéniteur commun lymphoïde (CLP : *common lymphoid progenitor*)**, qui donnera lui-même naissance aux progéniteurs des lymphocytes T, des cellules NK et des lymphocytes B, puis eux-mêmes se différencieront en cellules matures.

Cette cascade hématopoïétique est résumée dans la **figure 3**.

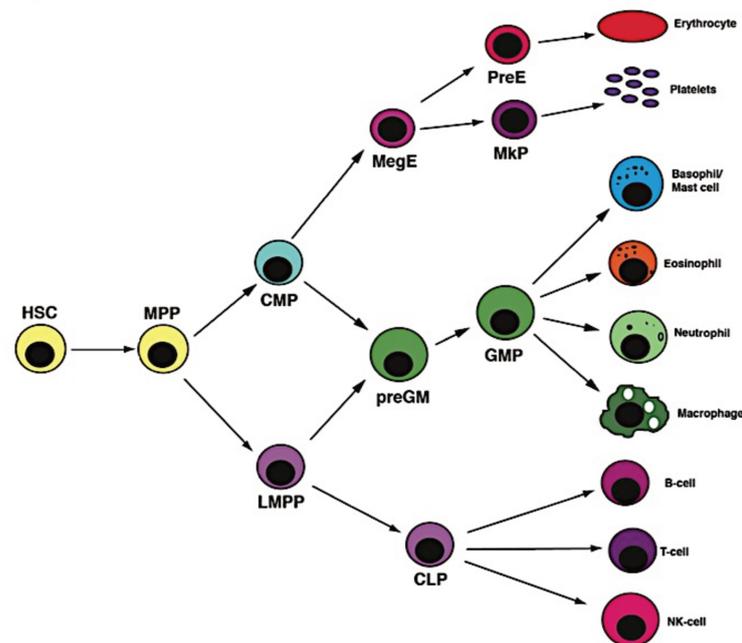


**Figure 3 : Schéma simplifié de la cascade hématopoïétique adapté de *Orkin et Zon, 2008 (10)*. LT-HSC : long-term hematopoietic stem cell, IT-HSC : intermediate-term hematopoietic stem cell, ST-HSC : short-term hematopoietic stem cell, CMP : common myeloid progenitor, CLP : common lymphoid progenitor, MEP : megacaryocyte-erythrocyte progenitor, GMP : granulocyte-macrophage progenitor, GR : globule rouge, Meg : mégacaryocyte, PNB : polynucléaire basophile, PNE : polynucléaire éosinophile, PNN : polynucléaire neutrophile, NK : cellule NK, LB : lymphocyte B, LT : lymphocyte T**

Alors que les cellules souches et les progéniteurs ne sont pas identifiables en cytologie, ces derniers sont reconnus par des colonies cellulaires qui se forment *in vitro*. A l'inverse, les précurseurs et les cellules matures ont des morphologies distinguables en cytologie.

De plus, ces différentes cellules peuvent être identifiées en cytométrie en flux grâce à la présence ou l'absence de marqueurs de surface appelés « cluster de différenciation », dont l'abréviation courante est CD. Par exemple, les **CSH** sont **CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>Lineage<sup>-</sup>** (3).

Néanmoins, il est important de souligner que cette représentation de l'hématopoïèse n'est qu'une version simplifiée des connaissances actuelles. En effet, d'autres voies de différenciation alternatives ont été décrites dans la littérature (3,11,12). Par exemple, un modèle incorpore un progéniteur avant le CLP et qui s'appelle LMPP (*lymphoid/myeloid-restricted progenitor population*), pouvant s'orienter soit vers le CLP, soit vers le GMP (**Figure 4**). De plus, la recherche sur cette thématique est abondante et les mécanismes de l'hématopoïèse sont constamment affinés.



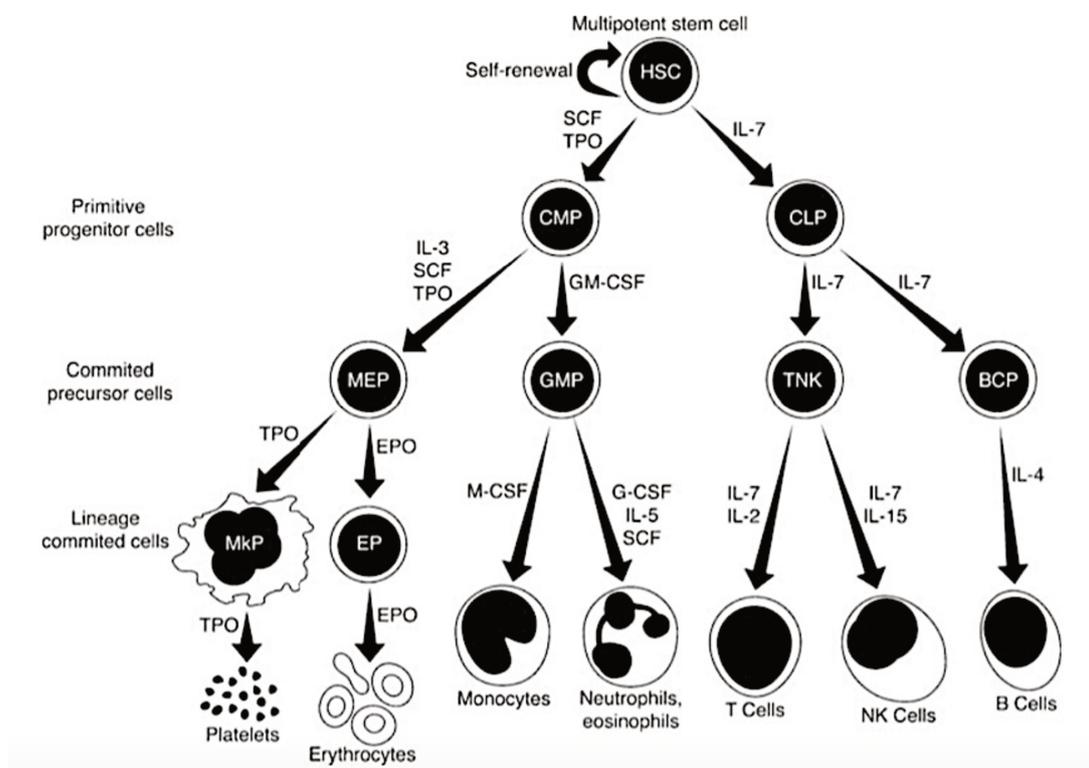
**Figure 4 : Schéma du modèle alternatif d'hématopoïèse incorporant la population de lymphoid/myeloid-restricted progenitor (LMPP), d'après Jacobsen et Nerlov, 2019 (11)**

### c. Régulation de l'hématopoïèse

Les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse sont très complexes et se mettent en jeu dans les niches hématopoïétiques par:

- Des **interactions entre les CSH et la matrice extracellulaire**
- Des **interactions entre les CSH et les cellules stromales**

- Des **cytokines** (telles que l'interleukine 3 (IL-3), l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-7) ayant un rôle à des stades de différenciation variés (2)(**Figure 5**)
- Des **facteurs de croissance** : soit de différenciation terminale, nécessaires à la fabrication des cellules matures (comme l'érythropoïétine (EPO) pour les érythrocytes, la thrombopoïétine (TPO) pour la lignée mégacaryocytaire, le *Granulocyte-Colony stimulating factor* (G-CSF) pour les granulocytes, le *Macrophage-Colony stimulating factor* (M-CSF) pour la lignée monocytaire, le SCF pour les basophiles), soit actifs en amont comme le *Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating factor* (GM-CSF) sur la GMP et la TPO ou le SCF qui vont influencer à la fois les CSH, les CMP et les MEP (**Figure 5**).



**Figure 5 :** Rôle des cytokines et facteurs de croissance dans la régulation de l'hématopoïèse, d'après Robb, 2007 (2). HSC : hematopoietic stem cell, CMP : common myeloid progenitor, CLP : common lymphoid progenitor, MEP : megacaryocyte-erythrocyte progenitor, GMP : granulocyte-macrophage progenitor, TNK : T-cell NK cell progenitor, BCP : B-cell progenitor, MkP : megakaryocyte progenitor, EP : erythrocyte progenitor, SCF : stem cell factor, TPO : thrombopoïétine, EPO : erythropoïétine, M-CSF : monocyte-colony stimulating factor, G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor

L'ensemble de ces mécanismes vont conduire à la **modification de l'expression de facteurs de transcription** (3,10,13), elle-même aboutissant à une modification du contrôle de la prolifération des CSH, des progéniteurs et des précurseurs. Ils peuvent conduire aussi à une modification de l'engagement vers une lignée cellulaire, à une maturation ou à une entrée en apoptose.

Par ailleurs, des **mécanismes épigénétiques** tels que la méthylation de l'ADN, la modification des histones et des microARN vont également être impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse (3,14).

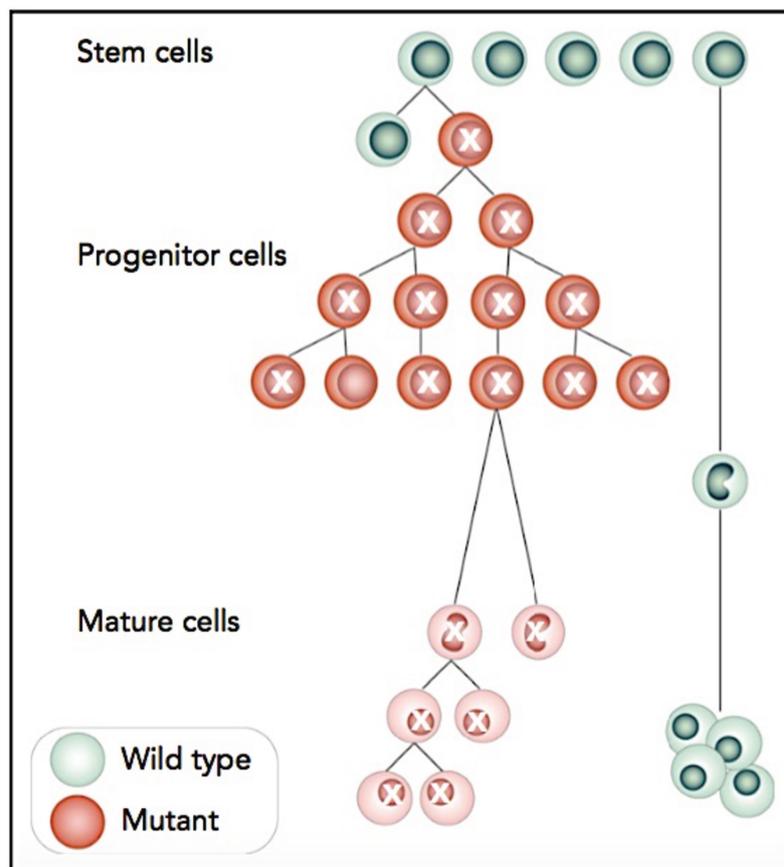
## 2. Hématopoïèse clonale

### a. Définition de l'hématopoïèse clonale

L'« **hématopoïèse clonale** » (ou CH : *clonal hematopoiesis*) correspond à une population de cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse qui partagent une **mutation somatique** (c'est à dire acquise) d'un gène, que l'on appelle « **variant du gène** ». A l'inverse, la version non mutée du gène s'appelle « gène sauvage ».

En effet, lors des divisions cellulaires, des mutations aléatoires peuvent avoir lieu dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs. On estime que la CSH acquiert environ **1,3 ± 0,2 variant d'un nucléotide exonique par décennie de vie** (15,16). Lorsque ces mutations confèrent un avantage en prolifération, en survie ou en auto-renouvellement, elles vont conduire à une **expansion clonale des cellules mutées** (17,18), comme schématisé dans la **Figure 6**.

Cette hématopoïèse clonale peut être retrouvée dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les hémopathies malignes. Cependant, ces mutations peuvent également être présentes de façon bénigne, chez des personnes sans cytopénie, permettant souvent de poser le diagnostic d'Hématopoïèse clonale de signification indéterminée ou *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential* (CHIP)(cf partie 3. de l'introduction). A l'inverse, ces mutations sont aussi mises en évidence chez des patients présentant des cytopénies non expliquées par un SMD ni une hémopathie maligne (15).



**Figure 6 :** Schéma de l'hématopoïèse clonale, d'après *Shlush, 2018* (18). En vert sont représentées les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs et les cellules matures non mutées. En rouge sont représentées les CSH, les progéniteurs et les cellules matures provenant d'une CSH avec une mutation somatique, conduisant à une expansion clonale.

*b. Détection de l'hématopoïèse clonale par séquençage à haut débit ou Next Generation Sequencing (NGS) : principe de la méthode*

Parmi les différentes techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique possibles (18), la technique communément utilisée pour détecter les mutations de l'hématopoïèse clonale est le **Next-Generation Sequencing (ou NGS)**, correspondant à une technique de séquençage haut débit, permettant de séquencer de grandes quantités d'ADN rapidement. Cette technique est capable d'analyser simultanément plusieurs échantillons en une seule réaction et ainsi de réduire les coûts (19). L'objectif est de détecter des « variants », correspondant à une variation génomique dans une séquence nucléotidique, en comparaison à un génome de référence (20).

Quelle que soit l'application clinique, le NGS se déroule en 6 étapes (19,21):

- 1<sup>ère</sup> étape : **Extraction du matériel génétique**

Les échantillons peuvent provenir de tissu sain ou pathologique. Ils dépendent du matériel biologique disponible (ADN ou ARN) mais aussi des cibles à analyser. Par exemple, on peut décider d'analyser le génome entier (Whole Genome Sequencing ou WGS ou Genome-Seq), uniquement l'ADN codant (Whole Exome Sequencing ou WES ou Exome-seq), ou un panel de gènes cibles (Targeted-gene sequencing ou Target-Seq).

Dans le cas de l'hématopoïèse clonale, les échantillons utilisés seront du **sang périphérique** ou de la **moelle**, dont l'**ADN double-brin des cellules sanguines** va être extrait (**Figure 7.1**).

- 2<sup>ème</sup> étape : **Préparation de la librairie**

La librairie correspond à l'ensemble des fragments d'ADN que l'on veut séquencer.

En premier lieu, l'ADN est **fragmenté**, soit mécaniquement par sonication (via l'utilisation d'ultra-sons à une fréquence précise), soit par une réaction enzymatique (via l'utilisation d'enzymes de restriction qui coupent l'ADN au niveau de certains motifs), soit par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) permettant de sélectionner des régions spécifiques du génome.

Ensuite, plusieurs étapes successives de PCR sont réalisées, permettant :

- L'ajout de séquences prédéfinies (appelées **adaptateurs**), qui sont nécessaires pour ancrer et immobiliser l'ADN sur le support sur lequel la réaction de séquençage aura lieu.
- L'ajout de séquences (appelées *barcodes*) permettant l'identification du patient une fois l'ensemble des échantillons mélangés (**étape de ligation**)
- D'enrichir les **régions d'intérêts**

Enfin, le produit d'amplification des différents échantillons est dosé, normalisé et mélangé avec l'ensemble des échantillons qui seront analysés en même temps.

Ces fragments d'ADN ainsi préparés constituent ce que l'on appelle la librairie de séquençage (**Figure 7.2**).

- 3<sup>ème</sup> étape : **Amplification**

Lors de cette étape, l'amplification par PCR permet de fixer les fragments sur un support solide, sur lequel aura lieu la réaction de séquençage, et de les séparer spatialement (**Figure 7.3**). Le support solide dépend de la méthode de séquençage.

- 4<sup>ème</sup> étape : **Séquençage**

Chaque plateforme de séquençage utilise des réactions chimiques répétitives, qui sont réalisées et détectées automatiquement. Pour chaque technique, le principe est le même : le brin complémentaire du fragment amplifié d'ADN est synthétisé et lors de l'incorporation d'un nucléotide, un signal est détecté (**Figure 7.4**). Il existe 2 principales techniques de séquençage :

- le **séquençage par synthèse** : détection de la fluorescence présente directement sur les nucléotides utilisés pour le séquençage
- le **séquençage par ion semi-conductif** : détection de changement de pH après libération d'ions H<sup>+</sup> lors de l'incorporation du nucléotide

- 5<sup>ème</sup> étape : **Analyse bio-informatique des données**

Au décours du séquençage, des millions de données générées sont à analyser. Tout d'abord, les données brutes du séquenceur sont transformées en séquence durant l'étape du « **base calling** ». Plusieurs filtres de qualité sont appliqués afin de générer des séquences nettoyées, ne sélectionnant que des séquences utiles. Puis, les séquences sont alignées sur un génome de référence si disponible (ou beaucoup plus rarement assemblées *de novo* si ce n'est pas le cas)(**Figure 7.5**). Ce processus est appelé « **mapping** » et aboutit à la mise au point de la cartographie d'alignement binaire ou *binary alignment map* (BAM), permettant ensuite la détection des variants (ou « **variant calling** »). Ces variants vont ensuite être filtrés (en fonction de leur fréquence dans la population, s'il affecte une séquence protéique ou non...) afin d'augmenter la probabilité de ne sélectionner que des variants pathogènes.

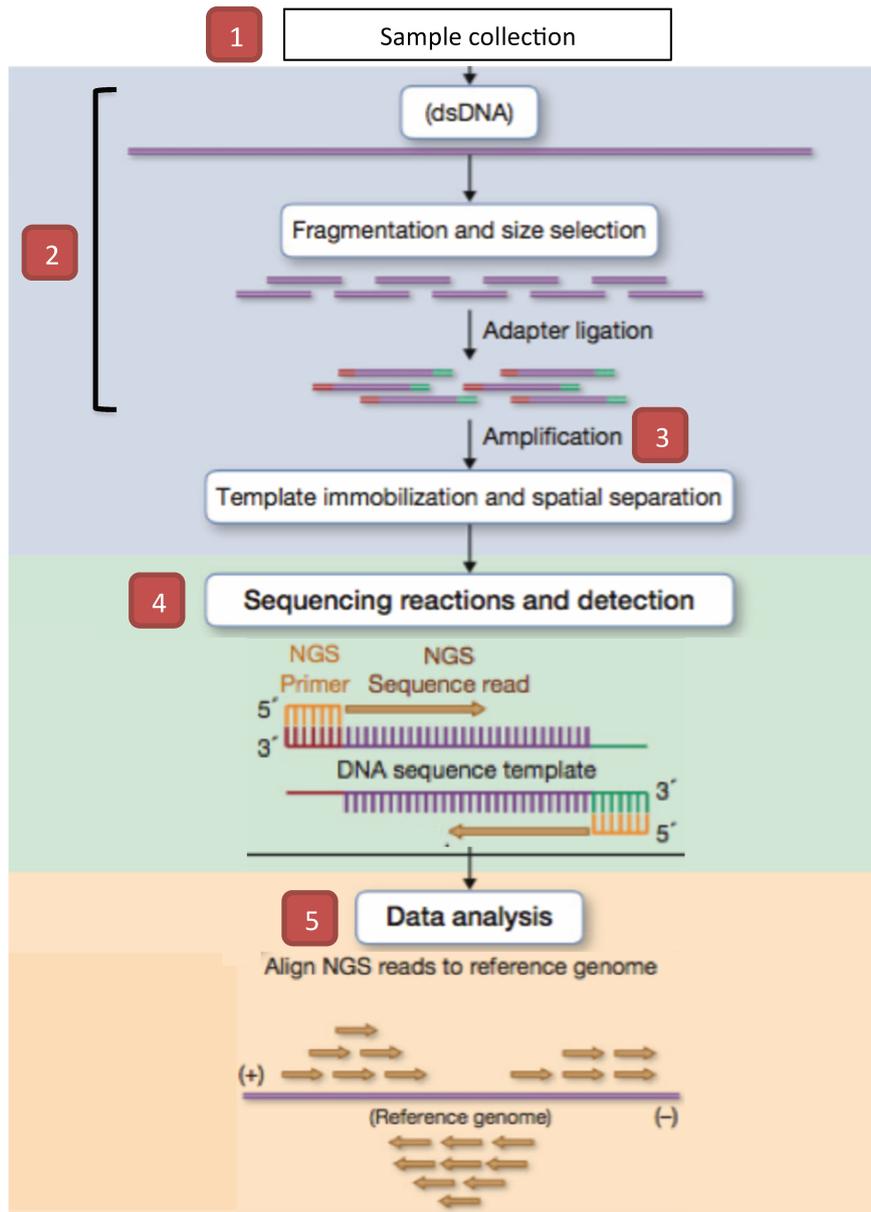


Figure 7 : Schéma des cinq premières étapes du NGS, adapté de *Rizzo et Buck, 2012 (19)*.

1. Extraction du matériel génétique. 2. Préparation de la librairie avec fragmentation et ligation des amorces 3. Amplification par PCR 4. Séquençage de l'ADN 5. Analyse bio-informatique des données

- 6<sup>ème</sup> étape : **Interprétation biologique**

Une fois un variant détecté sur le génome, l'exome ou un gène ciblé, il convient de déterminer si le **variant trouvé est pathogène**, c'est à dire avec un impact médical, ou s'il est sans utilité clinique. L'*American College of Medical Genetics (ACMG)* a proposé des recommandations sur l'interprétation des variants et a déterminé 5 classes de

variants : **variant neutre, variant probablement neutre, variant de signification inconnue, variant probablement pathogène et variant pathogène** (22). Seuls les variants probablement pathogènes et les variants pathogènes sont transmis aux cliniciens. Dans le cas des variants de signification inconnue, des recherches approfondies doivent être réalisées pour identifier leur éventuelle pathogénicité. Des bases de données telles que ClinVar et des communautés scientifiques comme ClinGen (23), ont été créées pour aider à leur interprétation et à déterminer leur implication clinique.

Lors de l'analyse, pour chaque variant, ce dernier est exprimé en ***Variant Allele Frequency (VAF) ou fréquence allélique***. Il s'agit du pourcentage correspondant au nombre de « lectures » (ou *read*) de séquence présentant le variant, divisé par le nombre total de lectures pour ce locus. Donc la VAF correspond au pourcentage d'allèles séquencés présentant le variant dans l'échantillon.

### **3. Hématopoïèse clonale de signification indéterminée ou *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)***

#### *a. Définition et différence avec les autres « acronymes à 4 lettres »*

Le développement en 2005 des techniques de séquençage haut débit et à faible coût tel que le NGS, a permis d'accélérer la découverte de mutations impliquées dans la pathogénèse de maladies dont le syndrome myélodysplasique. Ces mutations sont appelées « ***driver mutations*** ». Il est néanmoins apparu qu'un certain nombre de

mutations somatiques pouvait être présent chez le sujet sans hémopathie (15,17,24,25).

A l'instar de la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (ou *monoclonal gammopathy of undetermined significance* (MGUS)), Steensma *et al.* ont proposé en 2015 le terme de « **Clonal hematopoiesis of indeterminate potential** » (CHIP), traduit en français par « **Hématopoïèse clonale de signification indéterminée** », pour décrire les patients présentant une ou des mutations somatiques associées aux hémopathies malignes dans le sang ou dans la moelle, mais ne présentant pas de critère diagnostique pour ces maladies (15).

La définition de la CHIP comprend à la fois (15,26,27):

- Une **hématopoïèse clonale** avec la présence d'au moins 1 mutation somatique d'un gène associé aux hémopathies malignes (cf ci-dessous) dans le sang ou dans la moelle, avec une **Variant Allele Frequency (VAF)  $\geq$  2%**
- L'**absence de cytopénie**
- L'absence de critère diagnostique pour une hémoglobinurie paroxystique nocturne, une MGUS ou une lymphocytose monoclonale B

Néanmoins, la CHIP est également à distinguer d'autres entités hématologiques décrites, surnommées « Acronymes à 4 lettres » (**Tableau 1**).

	ARCH	CHIP	ICUS	CCUS
<b>Clonalité</b>	+	+	-	+
<b>Seuil VAF</b>	Pas de seuil	VAF ≥2%	/	VAF ≥2%
<b>Cytopénie</b>	-	-	+	+
<b>Dysplasie</b>	-	-	-	-

**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des « Acronymes à 4 lettres ». ARCH : Age-related clonal hematopoiesis, CHIP : Clonal hematopoiesis of indeterminate potential, ICUS : idiopathic cytopenia of undetermined significance, CCUS : clonal cytopenia of undetermined significance, VAF : variant allele frequency

Tout d'abord, l'*Age-Related Clonal Hematopoiesis* (ARCH) ou Hématopoïèse clonale liée à l'âge, décrit la présence d'une hématopoïèse clonale détectable chez le patient, dont l'incidence augmente avec l'âge, mais sans prévaloir d'un type de mutation ou d'un seuil de VAF (18). Cette définition recoupe donc en partie celle de la CHIP, rendant la distinction entre ces 2 entités parfois difficile.

Dans le cas de la présence d'une ou plusieurs cytopénies persistantes non expliquées par une cause hématologique (syndrome myélodysplasique, leucémie aiguë...) ou non-hématologique (dans le cadre d'une infection virale, d'une maladie auto-immune, d'une hépatopathie, d'une toxicité médicamenteuse...), la présence d'une hématopoïèse clonale peut orienter le diagnostic. En effet, en l'absence d'hématopoïèse clonale, on parle d'***Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS)*** ou **cytopénie idiopathique de signification indéterminée**. A l'inverse, si on retrouve la présence d'au moins une mutation somatique associée aux hémopathies malignes avec une VAF≥2%, on parle de ***Clonal cytopenia of undetermined significance (CCUS)*** ou **cytopénie clonale de signification indéterminée**. Cependant, les mutations impliquées semblent différer de celles des CHIP, avec une incidence plus importante et surtout un risque de transformation en hémopathie maligne significativement plus élevé (27,28). Dans ces pathologies, les cytopénies sont définies par une hémoglobine <10

g/dl, un taux de polynucléaires neutrophiles <1,8 G/l et un taux de plaquettes <100G/l, comme indiqué dans les recommandations de la *World Health Organization* (29).

Par ailleurs, on peut retrouver dans certaines publications les notions de *Clonal hematopoiesis of oncogenic potential* (CHIP) ou d'*Idiopathic dysplasia of undetermined significance* (IDUS) mais dont l'utilisation est beaucoup plus rare et limitée (26,27).

#### *b. Epidémiologie des CHIP et facteurs favorisants*

Bien que l'évaluation de la prévalence de la CHIP soit très dépendante des techniques de séquençage utilisées, notamment de leur sensibilité de détection des variants et des panels de gènes analysés, l'ensemble des études montrent que la **prévalence des CHIP augmente avec l'âge** (16,17,24,25,30). L'une d'elle portant sur 17182 patients sans hémopathie maligne montrait la présence d'hématopoïèse clonale dans les groupes <50 ans, 50-59 ans, 60-69 ans, 70-79 ans, 80-89 ans et ≥90 ans, de 0,09%, 1,7%, 5,6%, 9,5%, 11,7%, 18,4% respectivement (24). A noter que le seuil de sensibilité de la technique était une VAF≥3,5%, risquant de sous-estimer la prévalence. Une autre analysant 9350 sujets hollandais sans hémopathie maligne ni cancer, avec un seuil de sensibilité de séquençage à 1%, retrouvait une prévalence d'hématopoïèse clonale 2 fois plus importante (30).

Par ailleurs, Il ne semble **pas y avoir de différence entre les sexes** (30,31).

Parmi les facteurs favorisants la survenue d'une CHIP, l'**âge** est donc le principal facteur de risque. Ceci est expliqué à la fois par l'accumulation des mutations dans le temps en raison d'une altération de la réponse aux dommages de l'ADN lors du vieillissement, mais aussi par des modifications moléculaires et cellulaires des CSH

vieillissantes, augmentant ainsi l'avantage de prolifération et d'expansion cellulaire conféré par ces mutations (32). L'**inflammation**, parfois elle-même secondaire au vieillissement dans le processus appelé « *inflammaging* », promeut également l'émergence d'une hématopoïèse clonale (33), tout comme le stress immunitaire, causé par de l'**auto-immunité** ou **des infections** (34,35). D'autres évènements induisant une pression sélective de clones ont été décrits, comme la génotoxicité des **chimiothérapies et de la radiothérapie** (32,36), ou retrouvée chez les **fumeurs** (24,36,37). De plus, l'ensemble de ces facteurs sont associés à une altération du microenvironnement cellulaire, contribuant aussi à l'émergence des clones (5). Par ailleurs, il n'est pas exclu que la CHIP se développe aussi via des **processus stochastiques**, en dehors de ces facteurs favorisants (32,37).

*c. Mutations somatiques retrouvées dans la CHIP*

La grande majorité des patients ayant une CHIP ne présente **qu'une seule mutation somatique**. Cependant, 2 ou 3 mutations peuvent être parfois mises en évidence (24). Les mutations recherchées par NGS sont les mutations principalement retrouvées dans les hémopathies myéloïdes et peuvent intéresser des gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires, comme présenté dans le **Tableau 2**.

Fonction	Gènes mutés
Méthylation de l'ADN	<i>DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2</i>
Modification de la chromatine	<i>ASXL1, EZH2, PHF6, BCOR, BCORL1</i>
Epissage de l'ARN	<i>SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2</i>
Facteurs de transcription	<i>RUNX1, ETV6, GATA2, CEBPA, WT1</i>
Voies de signalisation	<i>NRAS, KRAS, CBL, CALR, CSF3R, FLT3, JAK2, KIT, MPL, PTPN11, RIT1, SETBP1</i>
Gènes suppresseurs de tumeur	<i>TP53, PPM1D, PHF6</i>
Complexe cohésine	<i>STAG2, SMC1A, SMC3, RAD21</i>
Autre	<i>NPM1</i>

Tableau 2 : Gènes présentant les principales « *driver mutations* » associées aux hémopathies malignes et leurs catégories fonctionnelles, adapté de *DeZern et al., 2019* et *Sperling et al., 2017* (26)(38)

Les gènes les plus souvent mutés dans la CHIP sont principalement le gène ***DNMT3A*** (environ 50%), suivi par les gènes ***TET2*** (environ 10%) et ***ASXL1*** (environ 8%) (24,25,38).

*DNMT3A* et *TET2* sont des gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation épigénétique de l'ADN, par la méthylation des cytosines, jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. ***DNMT3A*** est une enzyme appartenant à la famille des DNA methyltransférases. Sa fonction est la **méthylation *de novo* des cytosines** au niveau des ilots CpG, permettant l'obtention de molécules de 5-méthylcytosines (5-mc)(32). Cette méthylation entraîne une **diminution de la transcription du gène**.

***TET2*** est une enzyme appartenant à la famille des Ten-Eleven-Translocation (TET). A l'inverse de *DNMT3A*, sa fonction est de catalyser la conversion des 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmc), conduisant par des réactions intermédiaires à la **déméthylation des cytosines**, favorisant donc la **transcription des gènes** (32). La perte de fonction de *DNMT3A* a donc pour conséquence une hypométhylation de l'ADN, alors que la perte de fonction de *TET2* a pour conséquence une

hyperméthylation de l'ADN. Bien que les mécanismes soient mal expliqués, les mutations de ces deux gènes confèrent un **avantage d'expansion aux CSH**, conduisant au développement d'une hématoïèse clonale (16).

**ASXL1** est un gène codant pour une protéine également impliquée dans la régulation épigénétique, induisant une diminution de la transcription et de la formation de l'hétérochromatine, via une **modification post-traductionnelle des histones** (32).

*d. Conséquences cliniques de l'hématoïèse clonale de signification indéterminée*

Bien que l'hématoïèse clonale de signification indéterminée soit asymptomatique et ne se traduise que par une anomalie retrouvée en biologie moléculaire, elle est associée à plusieurs conséquences cliniques.

Tout d'abord, la CHIP est considérée comme un **état précancéreux d'hémopathies malignes** avec un risque de développer ces maladies 3 à 10 fois supérieur à la population générale (en fonction des études et de la sensibilité de détection des clones selon les techniques de biologie moléculaire utilisées) (25,24,39,40). En effet, la plupart des mutations retrouvées dans la CHIP sont des « *drivers mutations* » des leucémies aiguës, des syndromes myélodysplasiques, des syndromes myéloprolifératifs mais aussi de certains lymphomes (16). Par exemple, le **risque global de transformation en leucémie aiguë est estimé à 0,5-1% par an** (15,26,24). Ce risque augmente avec la taille du clone, et certaines mutations sont associées à un plus fort risque de transformation (16). Bien que les transformations en hémopathies myéloïdes soient plus

fréquentes, certains patients présentant une CHIP développeront un **lymphome** (24,25).

Concernant les **cancers non-hématologiques**, il a été montré dans une étude portant sur 5649 patients atteints de cancer solide, dont la plupart a été traité par radiothérapie et/ou chimiothérapie, que la présence d'une **CHIP diminuait la survie globale** de ces patients, principalement en raison de la progression de leur cancer primaire (36). De plus, la présence d'une CHIP avant le traitement d'un cancer solide, serait associée à une **augmentation du risque de syndrome myélodysplasique ou de leucémie aiguë myéloïde secondaire** (41,42).

Ensuite, la CHIP est considérée comme un **facteur de risque des maladies cardiovasculaires** (43). En effet, la CHIP est associée à une augmentation de 40% de la mortalité toute cause, principalement liée à des **cardiopathies ischémiques** et des **accidents vasculaires cérébraux ischémiques** (43). Une étude montrait que le risque de pathologie coronaire était augmenté de 4 fois en cas de mutation de *TET2*, *DNMT3A* et *ASXL1*, et qu'il était augmenté de 12 fois en cas de mutation de *JAK2* (44). De plus, la CHIP augmente le risque d'infarctus du myocarde précoce (44). Mais encore, il a été montré dans une étude de petit effectif, que la CHIP est également associée à une progression et à un moins bon pronostic des insuffisances cardiaques chroniques ischémiques, avec une dose-effet entre VAF et pronostic des patients, principalement en cas de mutation de *TET2* et *DNMT3A* (45). Pour expliquer ce phénomène, les mécanismes décrits sur des modèles murins, montrent une **augmentation et une accélération de l'athérosclérose**, médiée par une inflammation de l'endothélium vasculaire par les monocytes et les macrophages issus de la population clonale (46).

A noter, que parmi l'ensemble des conséquences cliniques de la CHIP étudiées, il a été

retrouvé une association entre CHIP et probabilité de développer un diabète de type 2 ou une broncho-pneumopathie chronique obstructive. Cependant ceci reste controversé en raison de nombreux biais et facteurs confondants (16,47).

Par ailleurs, l'analyse de sérums de patients présentant une CHIP a retrouvé une **augmentation des cytokines pro-inflammatoires**, notamment des taux d'interleukine-6 (IL-6) (surtout chez les patients ayant plusieurs mutations, ou une mutation de *TET2*) et des taux de *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), comparés aux sérums de patients ne présentant pas de CHIP (33,47). Cette même découverte a été constatée sur une augmentation des taux d'IL-8 chez des patients ayant une mutation de *TET2* (33). Cependant, dans ces études, il est difficile de déterminer la chronologie d'augmentation de ces cytokines, c'est-à-dire de savoir si elle précède, est contemporaine ou suit l'apparition de l'hématopoïèse clonale. Néanmoins, les **marqueurs habituels de l'inflammation** tels que le nombre de leucocytes, la protéine C-réactive (CRP) et la vitesse de sédimentation (VS) ne sont habituellement **pas modifiés chez les patients avec CHIP** (33,47).

En résumé, la CHIP se retrouve à la **croisée des pathologies d'onco-hématologie et des pathologies cardiovasculaires**, en étant à la fois associée à une augmentation des hémopathies malignes, des cardiopathies et/ou AVC ischémiques et en influençant le pronostic des patients atteints de cancer solide. Evidemment, d'autres facteurs renforcent ces interactions comme le mode de vie (obésité, tabagisme), la présence d'autres comorbidités (diabète, dyslipidémie, hypertension) ou les antécédents de radio- ou chimiothérapie, ces derniers favorisant eux-mêmes l'apparition d'une CHIP (**Figure 8**)(43).

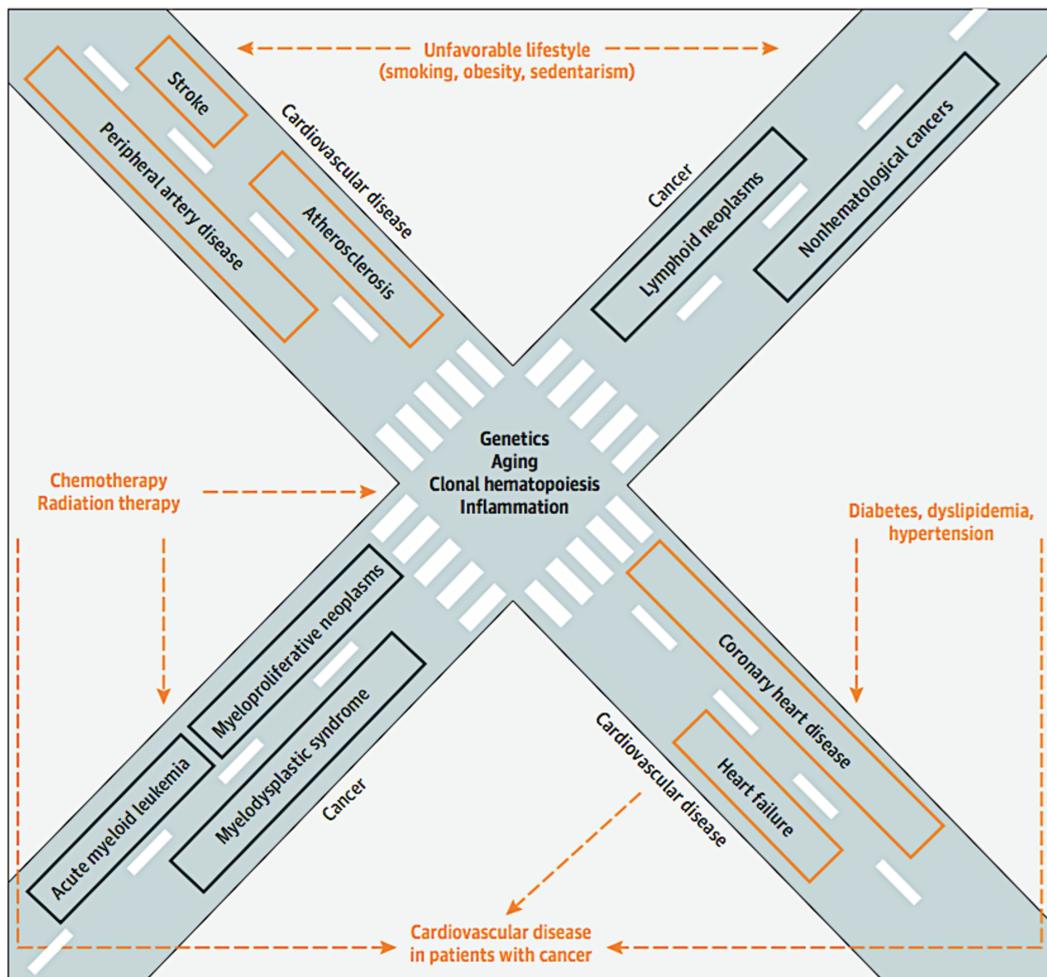


Figure 8 : L'hématopoïèse clonale de signification indéterminée à la croisée des pathologies cardio-vasculaires et des cancers, d'après Calvillo-Argüeles et al., 2019 (43).

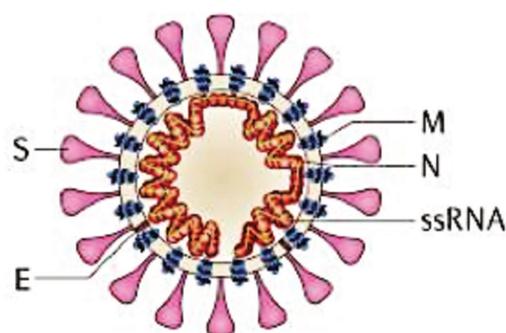
#### 4. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) ou Maladie à Coronavirus 2019

##### a. Présentation du virus SARS-CoV-2

Depuis décembre 2019, le monde fait face à une pandémie de **Maladie à Coronavirus 2019** ou **Coronavirus disease 2019**, mieux connue sous le nom de **COVID-19**, secondaire à l'infection par un virus émergent appelé **SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)**.

Le virus SARS-CoV-2 appartient à la famille des coronavirus, plus précisément à la lignée des *bêtacoronavirus* (48). Il s'agit d'un grand virus encapsulé à ARN simple brin, contenant **4 protéines structurelles : les protéines N, S, E et M**. La protéine de nucléocapside (protéine N) forme la capsidie autour du génome, elle-même entourée d'une enveloppe formée par 3 types de protéines : la protéine de membrane (M), la protéine d'enveloppe (E) et la protéine spike (S) (**Figure 9**)(48,49). Le réservoir naturel de ce nouveau virus serait la chauve-souris, mais la principale hypothèse serait qu'il ait infecté l'homme via un hôte intermédiaire, tel que le pangolin (50).

La **transmission du virus est interhumaine**, principalement par **transmission directe** par voie aérienne par des gouttelettes lors d'un contact rapproché avec un patient porteur (50), ou par aérosolisation lors de l'intubation orotrachéale, de l'utilisation de ventilation non invasive ou d'aérosolthérapie (51). Une transmission aéroportée du virus est suspectée, mais plus controversée (52). **Une transmission indirecte croisée par manuportage** est également possible, de façon plus accessoire, via des surfaces contaminées (53).



**Figure 9 : Représentation schématique d'une particule virale du virus SARS-CoV-2, d'après V'kovski et al., 2020 (49). Présentation des 4 protéines structurelles N, S, E et M et de l'ARN simple brin (ssRNA)**

b. *Physiopathologie de la COVID-19*

- 1<sup>ère</sup> étape : **Entrée du virus (Figure 10.A)**

Le virus SARS-CoV-2 entre dans la cellule de l'hôte par endocytose, après **liaison de son domaine de liaison au récepteur (*receptor binding domain* ou RBD) de la protéine S au récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (*angiotensine-converting enzyme 2* ou ACE2)**. La protéine transmembranaire à sérine 2 (*type 2 transmembrane serine protease* ou TMPRSS2), présente dans les cellules de l'hôte, favorise l'absorption virale en clivant ACE2 et en activant la protéine S (50). Le virus cible principalement les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures et inférieures, les cellules épithéliales alvéolaires de type II (ou pneumocytes de type II), les cellules endothéliales vasculaires et les macrophages présents dans le poumon, exprimant tous le récepteur à l'ACE2 à leur surface (54). Ce récepteur est également retrouvé sur les cellules du cœur, du foie et de l'intestin (55). Après endocytose, le virus **libère son ARN dans la cellule hôte** et utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer et fabriquer de nombreux virions, qui sont ensuite libérés en dehors de la cellule.

- 2<sup>ème</sup> étape : **Réponse immunitaire innée (Figure 10.B)**

Le cycle réplicatif du virus induit la mort cellulaire des cellules infectées et la libération à cette occasion de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern* ou PAMPs), de motifs moléculaires associés aux dégâts (*damage-associated molecular pattern* ou DAMPs) comme de l'ATP ou de l'ADN et de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Ces molécules sont reconnues par les cellules épithéliales voisines, les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires, déclenchant la

**libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.** Ces dernières **recrutent les cellules immunitaires innées**, notamment les monocytes et les macrophages mais aussi les **lymphocytes T**, favorisant elles-mêmes une inflammation locale, via une boucle de rétroaction positive (54). Ce recrutement pulmonaire de cellules immunitaires et l'infiltration lymphocytaire au niveau de la zone de l'infection pourrait expliquer la lymphopénie présente chez les patients atteints de la COVID-19.

Chez la plupart des individus, développant une COVID-19 légère ou modérée, les cellules recrutées attirent secondairement des lymphocytes T spécifiques du virus, et des anticorps neutralisants sont produits par les lymphocytes B, permettant de détruire le virus et les cellules infectées. La réponse inflammatoire diminue ensuite et le patient guérit (**Figure 10.C**)(54).

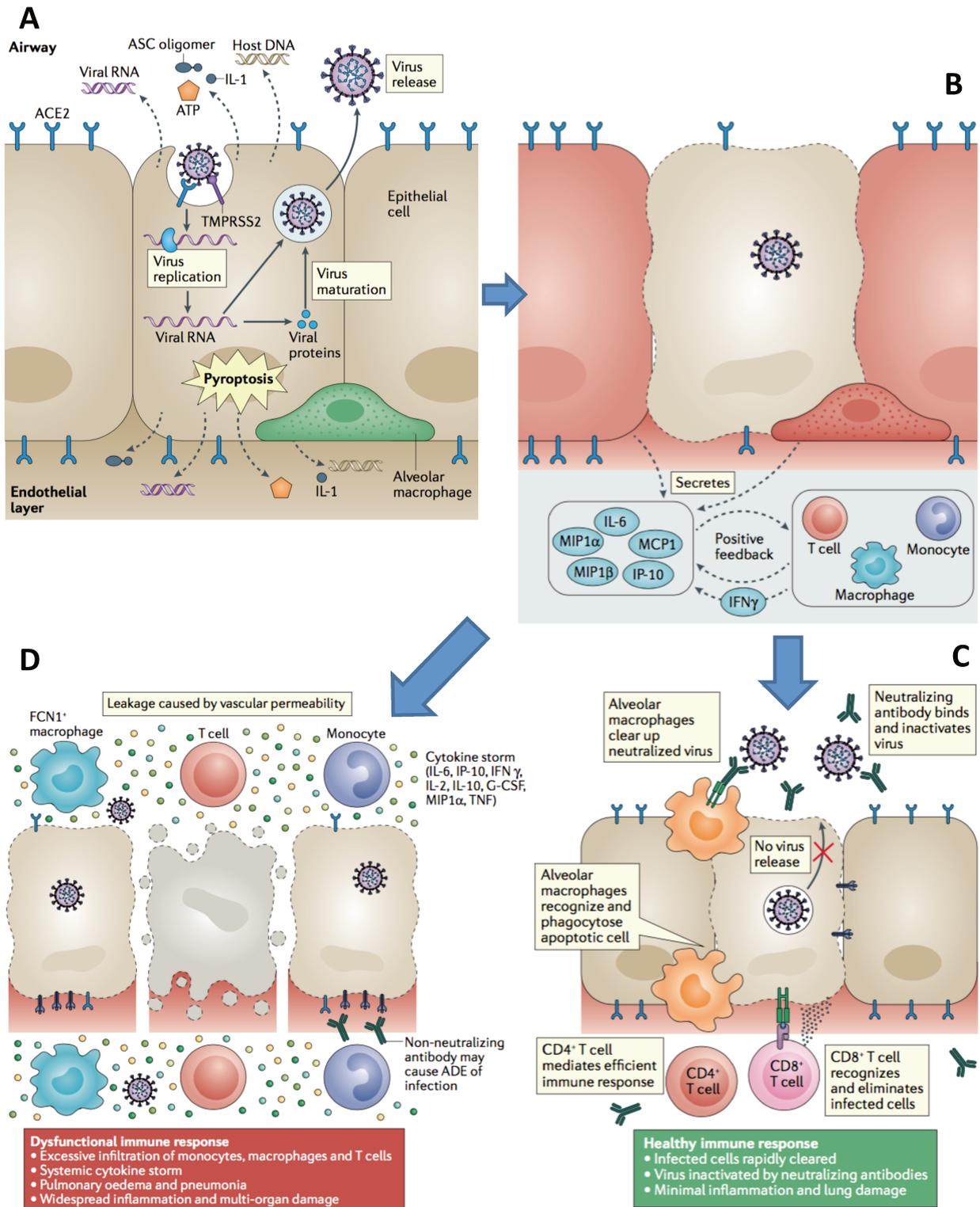
L'étape suivante a lieu en cas de COVID-19 sévère ou critique.

- 3<sup>ème</sup> étape : **Emballement inflammatoire ou orage cytokinique (Figure 10.D)**

Chez certains patients, une **réponse immunitaire dysfonctionnelle** se produit, conduisant à un orage cytokinique, avec notamment une augmentation des taux plasmatiques de **cytokines** telles que l'IL-6, l'IL-2, l'IL-10, l'IL-2, l'IFN $\gamma$ , et le TNF $\alpha$ , mais aussi une augmentation de G-CSF et de chimiokines telles que l'IP-10 et MCP-1. Cette inflammation non contrôlée, en plus des dégâts directs liés au virus, conduit à un dommage pulmonaire via une sécrétion excessive de protéases et de radicaux libres. Ceci conduit à un afflux et une **infiltration de monocytes, de macrophages et de lymphocytes T**, une augmentation de la **perméabilité endothéliale**, une **desquamation des cellules alvéolaires**, un **œdème pulmonaire** et à la formation de

**membranes hyalines** (54). Ensemble, cela conduit à une rupture de la barrière endothéliale, à une diminution de la transmission alvéolo-capillaire en oxygène et une capacité de diffusion en oxygène diminuée. En plus des dommages locaux, l'orage cytokinique devient systémique pouvant conduire à des **défaillances d'organe multiples**. Par ailleurs, il est supposé que des anticorps non neutralisants, produits par les lymphocytes B, participeraient à un renforcement de l'infection à SARS-CoV-2 par un mécanisme de facilitation de l'infection par des anticorps (*antibody-dependent enhancement* ou ADE) (54). Cependant, les causes de dysfonction immunitaire ne sont pas encore tout à fait élucidées.

Au niveau histologique, des séries autopsiques de poumons de patients décédés de la COVID-19 (56,57,58), retrouvent des **lésions de dommages alvéolaires diffus** et une **infiltration lymphocytaire T périvasculaire**. D'autres lésions pulmonaires caractérisées par des dépôts de fibrine extensifs intra-alvéolaires, associé à une perte du tissu conjonctif dans les conduits alvéolaires et les bronchioles ont été constatées, mettant en évidence une **pneumonie organisée fibrineuse aiguë** (*Acute Fibrinous and Organizing Pneumonia* ou AFOP). Il était également noté des **dommages endothéliaux** avec notamment la présence de virus intracellulaires et une destruction membranaire, mais aussi une prévalence plus augmentée de **micro-thrombi dans les capillaires alvéolaires** comparés aux patients atteints de grippe grave.



**Figure 10 :** Schéma représentatif de la physiopathologie de la COVID-19. (A) Entrée du virus, réplication virale et libération de PAMPs et DAMPs. (B) Réponse immunitaire innée avec boucle de rétroaction positive de cytokines inflammatoires. (C) Cas de la réponse immunitaire adaptée et résolution de l'infection (D) Cas de la réponse immunitaire dysfonctionnelle et orage cytokinique. D'après *Tay et al., 2020 (54)*

*c. Manifestations cliniques, biologiques et radiologiques de la COVID-19*

La **durée moyenne d'incubation** de la COVID-19, correspondant au temps entre l'exposition au virus et l'apparition des symptômes, est de **5 jours** (Intervalle interquartile : 2-7)(59,60). On estime que les patients sont **contagieux de 1 à 3 jours avant les symptômes**, avec un pic de charge virale le jour d'apparition des symptômes (61). Bien que l'ARN du SARS-CoV-2 soit détectable jusqu'à 6 semaines après le début des symptômes, plusieurs études ont montré que les **cultures virales sont négatives après J8** (50,62,63). Néanmoins, ces considérations semblent plus incertaines chez les patients immunodéprimés ou pris en charge en réanimation, pour lesquels la résolution des symptômes est souvent retardée (50).

La COVID-19 a des manifestations cliniques variées, pouvant aller d'une présentation asymptomatique à des défaillances d'organe nécessitant une prise en charge en réanimation.

Chez les patients symptomatiques, la présentation clinique la plus fréquente associe: des **signes généraux marqués** avec de la fièvre, une asthénie et une anorexie, des **signes fonctionnels respiratoires** avec une rhinorrhée et une toux sèche, un **syndrome algique** diffus avec des céphalées et des myalgies et des **signes fonctionnels digestifs** avec des diarrhées ou des nausées/vomissements. Des **signes ORL** peuvent être fréquemment retrouvés tels que des dysfonctions gustatives et olfactives, allant (plus rarement) jusqu'à l'anosmie et l'agueusie (50).

Les **principales complications de la COVID-19** qui ont été décrites sont :

- Complications respiratoires: Pneumonie aiguë avec un tableau allant de l'**hypoxémie** jusqu'au **Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA)**. Le SDRA, qui est la complication majeure de la COVID-19, est défini selon la définition de Berlin (64). Il correspond à l'apparition, dans les 7 jours après le début d'une pathologie pulmonaire ou extra-pulmonaire, d'une hypoxémie aiguë (rapport Pression partielle artérielle en oxygène ( $\text{PaO}_2$ ) sur Fraction inspirée en oxygène ( $\text{FiO}_2$ )  $\leq 300$  mmHg, chez un patient ventilé avec une pression expiratoire positive (PEP)  $\geq 5$  cmH<sub>2</sub>O) associée à des infiltrats radiologiques bilatéraux non expliqués complètement par une défaillance cardiaque ou une surcharge volémique. On parle de SDRA léger quand  $200 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg, de SDRA modéré quand  $100 < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$  mmHg et de SDRA sévère quand  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$  mmHg. Cette complication est celle qui met principalement en jeu le pronostic vital des patients atteints de la COVID-19. Elle représente environ 3% des malades totaux et environ 20% des patients hospitalisés (59,65).
- Complications cardiaques: Une insuffisance cardiaque aiguë avec une cardiomyopathie, des troubles du rythme ventriculaire et une instabilité hémodynamique ont été retrouvés chez certains patients les plus graves, probablement en relation avec une **myocardite ou atteinte microvasculaire** (66,67).
- Complications thromboemboliques: la COVID-19 prédispose les patients à des **complications emboliques**, à la fois **artérielles** (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ischémique) et **veineuses** (thrombose veineuse profonde, thrombose de cathéter et de filtre d'épuration extra-rénale, embolie

pulmonaire), secondaire à une inflammation excessive, une hypercoagulabilité, une activation plaquettaire, une dysfonction endothéliale et à une immobilisation prolongée (68,69). L'incidence de maladie thromboembolique veineuse est estimée entre 10 et 40% chez les patients atteints de COVID-19 sévère et critique (avant l'avènement du traitement systématique par DEXAMETHASONE) (50,68,70,71,72).

- Complications neurologiques : la complication neurologique la plus fréquemment retrouvée est l'**encéphalopathie**, notamment chez les patients de réanimation ou chez les personnes âgées (73,74)
- Complications infectieuses : Bien que la surinfection ne soit pas la principale complication de la COVID-19, il est suspecté une augmentation du risque d'**aspergillose pulmonaire invasive** chez des patients immunocompétents et ventilés pour leur COVID-19 (75). De plus, les patients intubés ayant une infection à SARS-CoV-2 semblent plus susceptibles aux **pneumopathies acquises sous ventilation mécanique** (76).
- Les patients hospitalisés vont également développer une **insuffisance rénale aiguë** dans 9% des cas et une **atteinte hépatique** dans 19% des cas (50)

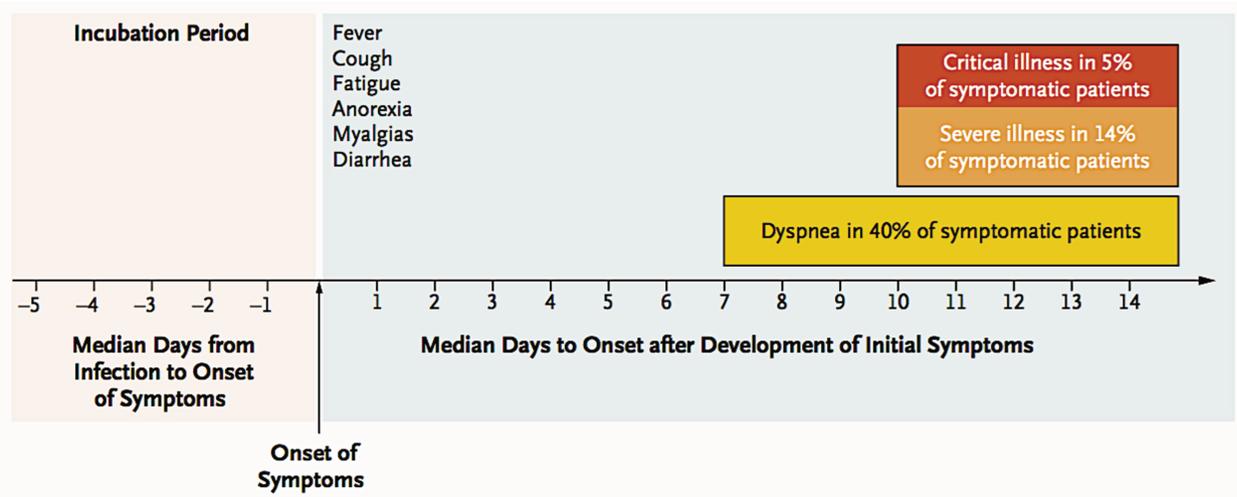
C'est pourquoi, du fait d'un spectre large de présentation clinique, différentes **catégories de gravité** ont été définies par la *National Institutes of Health* (77) :

- Infection asymptomatique ou pré-symptomatique
- COVID-19 légère : le patient présente tout ou partie des symptômes décrits précédemment, **sans polypnée, dyspnée ou anomalie radiologique**. Leur prise en charge est ambulatoire.
- COVID-19 modérée : elle est définie par la présence d'une **atteinte respiratoire**

**basse** lors de l'examen clinique ou du bilan radiologique, mais avec une  $SpO_2 \geq 94\%$  en air ambiant. Leur prise en charge est principalement ambulatoire, sauf en cas de fragilité.

- COVID-19 sévère : elle est définie par une  **$SpO_2 < 94\%$  en air ambiant** et/ou une **fréquence respiratoire  $> 30$  cycles/min** et/ou un **rapport  $PaO_2/FiO_2 \leq 300$  mmHg** et/ou un **infiltrat pulmonaire  $> 50\%$**  sur le scanner thoracique. Leur prise en charge est réalisée soit en hospitalisation conventionnelle en cas d'oxygénothérapie nasale, soit en service de réanimation si le patient requiert un débit d'oxygène important en oxygénothérapie nasale ( $> 4-6$  L/min lors de la première vague épidémique au CHU de Lille par exemple) ou en cas de nécessité d'oxygénothérapie à haut débit (OPTIFLOW<sup>®</sup>) ou de ventilation non invasive (VNI).
- COVID-19 critique : on parle de COVID-19 critique en cas de **syndrome de détresse respiratoire aiguë**, de **choc septique**, de **défaillance cardiaque**, de la présence d'arguments en faveur d'un **orage cytokinique systémique** et/ou de **l'exacerbation de comorbidités préexistantes**. En plus de l'atteinte pulmonaire, les patients atteints de COVID-19 critique peuvent également présenter des défaillances rénales, hépatiques, neurologiques, ou des complications thromboemboliques. Leur prise en charge est réalisée principalement dans un service de réanimation, en l'absence de limitation thérapeutique préalable.

Au cours de l'histoire de la maladie, ces états peuvent se succéder. **L'aggravation clinique survient en moyenne 7 à 10 jours** après le début des symptômes, avec la présence d'une dyspnée, d'une COVID-19 sévère ou critique chez 40%, 14% et 5% des patients symptomatiques respectivement (78)(**Figure 11**).



**Figure 11** : Frise chronologique des symptômes de la COVID-19 d'après *Berlin et al., 2020* (78)

Certaines anomalies biologiques sont fréquemment présentes dans la COVID-19 sévère et critique et semblent associées dans certaines études à un moins bon pronostic des malades (79,80,81,82) :

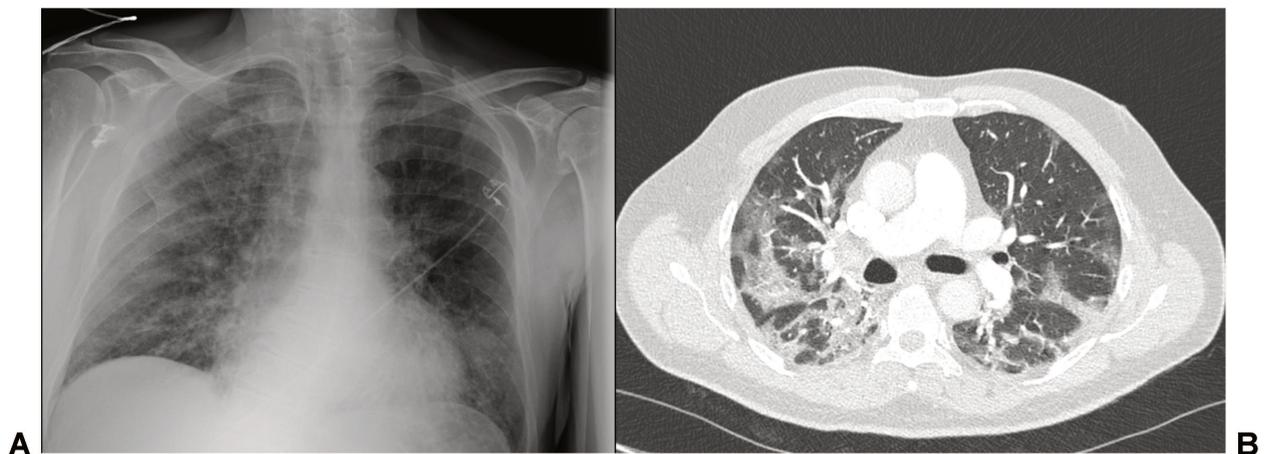
- Anomalies de la numération formule sanguine : **lymphopénie** (lymphocytes < 1 G/l), syndrome inflammatoire biologique avec **hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles**, **thrombopénie** (plaquettes <100 G/l)
- Anomalie du bilan d'hémostase : **diminution du taux de prothrombine (TP)**, **augmentation des D-dimères** (>1000 ng/ml)
- Marqueurs de l'inflammation : augmentation de la **protéine C-réactive (CRP)** et de la **procalcitonine (PCT)**, augmentation de la **ferritine** (>500 µg/l), augmentation du fibrinogène (≥ 6 g/l)

Il est également parfois retrouvé chez ces patients une rhabdomyolyse avec augmentation de la créatine phosphokinase (CPK) et/ou une augmentation du lactate déshydrogénase (LDH)(82,81,80).

De plus, il a été montré dans une étude portant sur 1484 patients hospitalisés pour COVID-19, que **l'élévation des cytokines pro-inflammatoires interleukine-6 (IL-6) et Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ )** étaient des facteurs prédictifs de la gravité de la pathologie et de décès (83).

Bien que l'imagerie thoracique soit normale la plupart du temps, et donc non recommandée chez les patients pauci-symptomatiques ou présentant une COVID-19 légère (84), certaines anomalies sont retrouvées chez les patients les plus sévères :

- Radiographie thoracique : opacités alvéolo-interstitielles bilatérales (**Figure 12A**)(78)
- Scanner thoracique : les manifestations caractéristiques sont du verre dépoli bilatéral et plutôt périphérique, associé à des condensations pulmonaires, parfois de morphologie arrondie et de distribution périphérique (**Figure 12B**)(85)



**Figure 12:** (A) Radiographie de thorax de face et (B) scanner thoracique en fenêtre parenchymateuse d'un patient atteint d'une COVID-19 sévère

#### *d. Diagnostic de la COVID-19*

L'examen de référence pour le diagnostic d'infection à SARS-CoV-2 est la **real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)**, permettant la détection de l'ARN viral sur des échantillons respiratoires (par exemple sur un écouvillon nasopharyngé principalement, ou sur une aspiration trachéale). Cependant, la sensibilité du test varie en fonction du temps après l'exposition et du début des symptômes. Les **faux-négatifs** dépendent surtout de la bonne réalisation du prélèvement, du temps par rapport à l'exposition virale et à la zone de prélèvement. De ce fait, plusieurs échantillons provenant de différentes sources peuvent être utiles pour confirmer le diagnostic de COVID-19 lorsque la suspicion clinique est forte. Les **prélèvements des voies respiratoires basses**, comme le lavage broncho-alvéolaire, sont plus sensibles que les échantillons des voies aériennes supérieures (50). Le SARS-CoV-2 peut également être détecté dans le sang, les selles ou la salive, mais pas dans les urines.

D'autres tests sont également disponibles pour le diagnostic tels que la sérologie recherchant la présence d'anticorps anti-protéine S et anti-protéine N, des tests antigéniques ou même des techniques basées sur l'utilisation de nanomatériaux ou l'utilisation de nanotechnologie (86).

#### *e. Epidémiologie et facteurs de risque de COVID-19 sévère et critique*

Au 1<sup>er</sup> juin 2021, selon le rapport hebdomadaire épidémiologique de l'Organisation Mondiale de la Santé (87), près de **170 millions de cas de COVID-19** et plus de **3,5 millions de décès** ont été recensés dans le monde entier depuis le début de la

pandémie. En ce qui concerne la France, le nombre s'élève à **5,5 millions de cas déclarés** et près de **109000 décès**.

Sur une large cohorte chinoise de plus de 72000 patients, lors de la première vague épidémique de décembre 2019 à février 2020, toutes catégories de gravité de la COVID-19 confondues hormis les cas asymptomatiques, il était estimé que **81% des cas étaient modérés, 14% étaient sévères et 5% étaient des COVID-19 critiques** (88).

Néanmoins la mortalité de la COVID-19 dépend à la fois de facteurs dépendants du patient, dépendants de l'équipe soignante mais aussi de facteurs concernant l'organisation des soins et la saturation du système de santé secondaire à un afflux de patient sans précédent (89). Ainsi, lors de la première vague épidémique en France, le **taux de mortalité des patients admis en réanimation était évalué à 31%**, avec une tendance à la diminution au cours de cette période (89,90).

De nombreuses études menées dans le monde entier ont mis en évidence des facteurs de risques associés à une COVID-19 sévère et critique (65,79,90,91). Les principaux sont : un **âge  $\geq 65$  ans** (particulièrement  $\geq 75$  ans), le **sexe masculin** et la présence de comorbidités telles que le **diabète, l'insuffisance rénale chronique, l'obésité** et les **pathologies cardiovasculaires** (notamment l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque chronique), mais aussi l'**immunodépression**. La nécessité de recours à la ventilation mécanique était particulièrement associée à l'obésité sévère (92). L'**antécédent de cancer**, notamment d'hémopathie maligne, de cancer pulmonaire et de cancer du sein, est également un facteur de risque de COVID-19 grave. Ceci peut être à la fois expliqué par un état général du patient altéré par le cancer, par le fait que

les patients atteints de cancer présentent plus fréquemment les facteurs de prédisposition (obésité, diabète de type 2, hypertension artérielle) et sont en général plus âgés, mais aussi par l'aggravation des comorbidités et l'immunodépression induite par les thérapeutiques anti-cancéreuses (93).

*f. Traitements de la COVID-19 sévère et critique*

- Traitements de support :

De nombreuses sociétés savantes ont écrit des **recommandations** pour le traitement de support de la défaillance respiratoire induite par la COVID-19 allant de l'hypoxémie aiguë au SDRA. La grande majorité des patients hospitalisés pour COVID-19 requiert une **oxygénothérapie conventionnelle**. En cas de non-réponse à ce traitement de support ou d'aggravation de l'oxygénorequérance, une **oxygénothérapie haut débit** (avec le dispositif OPTIFLOW<sup>®</sup> par exemple) peut être proposée ou la réalisation de séances de **ventilation non invasive** (VNI).

Pour les patients qui nécessitent une ventilation mécanique, la prise en charge du SDRA fait également l'objet de **Recommandations Formalisées d'Experts** de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) (**Annexe 1**)(94). Bien qu'antérieures à la pandémie, ces recommandations sont toujours valables pour la prise en charge de cette pathologie, même en cas de persistance d'une bonne compliance pulmonaire (95). En cas d'échappement aux thérapeutiques usuelles du SDRA comme la curarisation ou la réalisation de séances de décubitus ventral, d'autres thérapeutiques peuvent être essayées comme le monoxyde d'azote (NO) inhalé ou l'ALMITRINE, mais leur utilisation reste discutée et sont plutôt utilisées comme « traitement de sauvetage » (96,97,98). En dernier recours, l'oxygénation par

membrane extra-corporelle (*Extracorporeal membrane oxygenation* ou ECMO), thérapeutique d'exception dont la place est peu codifiée, peut être proposée pour certains patients jeunes et avec peu de comorbidités.

Mais encore, le point d'interrogation reste le **seuil d'oxygénorequérance** à partir duquel il est nécessaire d'intuber les patients. En effet, beaucoup de patients présentent une hypoxémie sévère mais une mécanique ventilatoire conservée. Ce seuil est controversé et il existe un manque de preuve concernant le bénéfice entre une intubation précoce versus une intubation tardive (50).

Une autre thématique controversée est celle de l'**anticoagulation préventive** du fait de la prévalence augmentée de complications emboliques chez les patients atteints de COVID-19 sévère ou critique. Initialement, les recommandations d'experts allaient dans le sens d'une **anticoagulation préventive renforcée** en cas d'oxygénothérapie haut débit, de ventilation mécanique ou d'obésité, **voire curative** chez les patients ayant des marqueurs de syndrome inflammatoire marqué ou d'hypercoagulabilité (99,100). Néanmoins, une étude récente suggère une utilisation large chez tous les malades d'une anticoagulation préventive simple (101).

- Traitements spécifiques de la COVID-19 :

Mettre au point des thérapeutiques spécifiques de la COVID-19 étant le nouvel enjeu récent, de très nombreuses études ont porté sur ce sujet depuis 1 an et plusieurs catégories de traitement ont été étudiées, parmi lesquelles :

- **Traitements antiviraux** comme le REMDESIVIR (102), LOPINAVIR-RITONAVIR (103) ou l'HYDROXYCHLOROQUINE (104)

- **Immunothérapie médiée par des anticorps anti-SARS-CoV-2** : plasma de patient convalescent (105), BAMLANIVIMAB (106,107)
- **Traitements anti-inflammatoires** comme la DEXAMETHASONE (108)
- **Thérapies immunomodulatrices ciblées** comme le TOCILIZUMAB (109), l'ANAKINRA (110)

Dans cet ensemble d'études, la corticothérapie systémique par DEXAMETHASONE, à la dose de 6 mg par jour pendant 10 jours, est apparue comme un traitement permettant de **réduire la mortalité toute cause à J28** des patients hospitalisés pour COVID-19 recevant une oxygénothérapie ou une ventilation mécanique, conduisant à son utilisation large dans cette indication (108). L'autre molécule intéressante semble être le TOCILIZUMAB, mais son utilisation reste pour le moment controversée avec des plusieurs études contradictoires (109,111,112).

- Prévention :

Dans ce contexte de pandémie mondiale, la protection générale de la population, mais aussi la diminution de la tension hospitalière, repose sur des mesures de **distanciation sociale**, le **port du masque** de protection faciale, **l'isolement des personnes** contaminées et parfois même sur des **mesures de fermeture de lieux publics voire de confinement des populations**.

Cependant, le développement récent de **vaccins anti-COVID-19** permettra d'avoir un moyen de prévention à grande échelle et sur une durée plus longue.

## 5. Rationnel et objectifs de l'étude

En avril 2020, au moment où ce projet de recherche a été mis au point, la première vague épidémique de COVID-19 touchait la France, dont la région des Hauts-de-France et la ville de Lille, centre où les patients de cette étude ont été inclus. A cette période, cette maladie était peu décrite, et les prises en charge évoluaient à mesure des retours des autres pays touchés quelques mois ou semaines avant la France, comme la Chine ou l'Italie, mais aussi grâce aux études descriptives et aux retours d'expérience des autres centres français. Il n'existait peu ou pas de prise en charge standardisée, et aucun traitement n'avait encore prouvé son efficacité dans cette maladie. L'enjeu du moment était donc de comprendre la physiopathologie de cette nouvelle pathologie, de savoir comment la traiter et la soigner au mieux, mais aussi de connaître les facteurs de risque de forme grave, permettant d'anticiper une éventuelle aggravation.

Bien qu'une majeure partie des patients atteints de la COVID-19 présentaient une forme légère ou modérée, il est rapidement apparu que les formes sévères et critiques étaient, au moins en partie, liées à une inflammation incontrôlée et à ce qui s'apparentait à un orage cytokinique. De plus, parmi les facteurs de risque mis en exergue, on retrouvait notamment l'âge avancé, les pathologies cardio-vasculaires et le diabète.

En parallèle, il nous est apparu que l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée était décrite comme favorisant une inflammation chronique, conduisant à un sur-risque d'athérosclérose, d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique et avec une association (certes controversée) avec le diabète, eux-mêmes facteurs de risque de COVID-19 sévère et critique. Considérant un éventuel lien

entre ces deux pathologies, le but de ce projet était donc d'analyser **l'association entre CHIP et COVID-19 sévère et critique.**

Tout d'abord, **l'objectif principal** de cette étude était donc de déterminer si les patients atteints de COVID-19 sévère et critique avaient un **taux d'hématopoïèse clonale supérieur à la population générale, avec une association entre forme grave de COVID-19 et présence d'une hématopoïèse clonale.**

Ensuite, les **objectifs secondaires** étaient :

- De décrire la population atteinte de COVID-19 sévère et critique, dans son ensemble et en fonction de la présence ou non d'hématopoïèse clonale
- De déterminer si la présence d'une hématopoïèse clonale était associée dans cette population à une gravité clinique plus importante, une mortalité toute cause (à J28 et en hospitalisation) plus importante, à la survenue de dysfonctions d'organe ou d'évènements thromboemboliques
- De déterminer si ces patients présentaient des profils inflammatoires distincts et si ces profils étaient particulièrement associés à plus d'hématopoïèse clonale

## MATERIEL ET METHODE

### 1. Type de l'étude

Cette étude est une étude observationnelle, descriptive et analytique, monocentrique, réalisée au Centre Hospitalier Universitaire de Lille entre le 08 Avril 2020 et le 23 Avril 2020. Elle a été conduite selon la méthodologie de référence MR-004 et approuvée par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL)(n°DEC20-086) et le Comité de Protection des Personnes (CPP)(ID-CRB 2020-A00763-36). Le protocole a été enregistré comme étude clinique (n°NCT-04327180 pour les patients admis en réanimation, n°NCT-04341792 pour les patients admis au Service d'Accueil des Urgences).

### 2. Sélection des patients

#### a. Cohorte COVID-19

122 patients âgés de 18 ans et plus, hospitalisés pour la prise en charge d'une COVID-19 au CHU de Lille (33 patients en hospitalisation conventionnelle et 89 patients en réanimation) et ayant eu une numération formule sanguine (NFS) réalisée entre le 08 Avril 2020 et le 23 Avril 2020, ont été inclus dans l'étude. Le diagnostic d'infection à SARS-CoV-2 de chaque patient était réalisé par une *reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-PCR) naso-pharyngée ou trachéale.

*b. Cohorte contrôle non-COVID-19*

Une cohorte contrôle non-COVID-19, rétrospective de 465 patients, sans hémopathie maligne et prélevés avant la pandémie de COVID-19, a été utilisée pour comparaison à la cohorte COVID-19.

Afin de constituer cette cohorte, l'ensemble des 2362 échantillons qui avaient été analysés en NGS entre Janvier 2019 et Janvier 2020 au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille, en utilisant le même panel de gène, les mêmes méthodes de séquençage et les mêmes méthodes d'analyse bio-informatique que la cohorte COVID-19, ont été criblés. Le logiciel d'analyse bio-informatique du laboratoire avait été changé en décembre 2018, ne permettant donc pas d'inclure les échantillons antérieurs à cette modification, afin que les résultats de séquençage entre cohorte COVID-19 et cohorte contrôle non-COVID-19 soient comparables.

Parmi ces échantillons, 638 (27%) patients présentaient une leucémie aiguë myéloïde, 164 (7%) présentaient une forme frontière entre syndrome myélodysplasique et un syndrome myéloprolifératif, 287 (12%) patients présentaient un syndrome myéloprolifératif et 573 patients (24%) présentaient un syndrome myélodysplasique, et ont donc été exclus de la cohorte. Parmi les patients restants, les 30 patients mineurs ont également été exclus. Les 465 (20%) patients restants ne présentaient pas de critère d'hémopathie maligne, et étaient donc inclus dans la cohorte contrôle. Les caractéristiques disponibles pour ces patients étaient l'âge, le sexe et le NGS.

### 3. Recueil des données

Les données recueillies ont été collectées dans le dossier médical informatisé du patient, ces données étaient : les données épidémiologiques, les antécédents médicaux, la durée d'hospitalisation et en réanimation, les données cliniques et thérapeutiques, le devenir des malades (décès à J28, décès en réanimation, décès hospitalier), la gravité à l'admission par le score *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)(Annexe 2)(113). L'Index de Gravité Simplifié (IGSII) était également calculé pour les patients admis en réanimation (Annexe 3) (114). La gravité de la COVID-19 était classée selon la définition de la *National Institutes of Health*, telle que présentée dans l'introduction, en COVID-19 modérée, sévère ou critique. Tous les patients décédés de COVID-19, même sans passage en réanimation, étaient classés COVID-19 critique. Le devenir des patients a été suivi jusqu'à leur sortie d'hospitalisation (séjours en Soins de Suite et Réadaptation ou en Médecine Physique et Réadaptation compris) ou leur décès. Les données biologiques étaient extraites du logiciel le jour d'entrée en hospitalisation et le jour du NGS, si ces données étaient disponibles.

### 4. Analyse des échantillons

#### *a. Biologie standard*

Le bilan biologique de chaque patient a été analysé selon les méthodes de dosage biologique standard du Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille. Dans notre étude, il comprenait les dosages suivants:

- Numération Formule Sanguine : taux de leucocytes et de polynucléaires neutrophiles

- Bilan d'hémostase : fibrinogène, D-dimères
- Bilan inflammatoire : Protéine C-réactive (CRP), procalcitonine (PCT), ferritine

Le dosage des taux d'IL-6 sérique a été réalisé par une méthode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

#### *b. Biologie moléculaire*

L'analyse moléculaire des cellules du sang périphérique a été réalisée par séquençage nouvelle génération (*Next Generation Sequencing* ou NGS), selon la méthode par ion semi-conductif (technologie IonTorrent™). La librairie a été élaborée à l'aide du kit Ion AmpliSeq™ selon les recommandations du fabricant. 36 gènes fréquemment mutés dans les hémopathies myéloïdes ont été étudiés, après extraction de l'ADN des cellules du sang périphérique.

Le panel de mutations à l'étude comprenait donc :

- Des gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation de kinases : *CBL* (exons 8-9), *JAK2* (exons 12,14), *NRAS* (exons 2-3), *PTPN11* (exons 3,13)
- Un facteur de transcription : *GATA2* (exons 2-6)
- Des gènes suppresseurs de tumeur : *PHF6* (exons 2-10), *TP53* (exons 3-11),
- Des gènes codant pour des protéines modifiant la conformation de la chromatine : *ASXL1* (exons 11-12), *EZH2* (exons 2-20), *BCORL1* (exons 1-12)
- Des gènes impliqués codant pour des protéines impliquées dans la méthylation de l'ADN : *DNMT3A* (exons 2-23), *TET2* (exons 3-11), *IDH2*
- Des gènes codant pour des protéines du complexe Cohésine : *SMC1A* (exons 1-25), *STAG2* (exons 3-35)

- Des gènes codant pour des protéines impliqués dans l'épissage de l'ARN :  
*SF3B1* (exons 13-16), *SRSF2* (exon 1), *U2AF1* (exons 2,6), *ZRSR2* (exons 1-11)

Pour la définition d'hématopoïèse clonale, il a été décidé d'un seuil de *variant allele frequency* (VAF) ou fréquence allélique de chaque mutation à  $\geq 2\%$ . Cette fréquence est celle utilisée dans la littérature pour la définition de la CHIP (15,24).

## 5. Analyses statistiques

Les variables qualitatives ont été décrites en termes de fréquences et de pourcentages. Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne et l'écart type ou par la médiane et l'intervalle interquartile en cas de distribution non Gaussienne. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

L'effet de la présence d'une hématopoïèse clonale sur le risque de COVID-19 sévère ou critique et sur la survenue de différents événements a été évalué à l'aide d'un modèle de régression logistique ajusté sur l'âge. Les caractéristiques des patients en variables continues et les variables mesurant l'inflammation le jour du NGS ont été comparées entre les patients présentant une hématopoïèse clonale et ceux n'en présentant pas par le test t de Student ou U de Mann-Whitney en cas de distribution non Gaussienne. Les caractéristiques des patients en variable qualitative ont été comparées par le test du Chi-2 ou le test exact de Fisher.

Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4).

# RESULTATS

## 1. Caractéristiques des patients de la cohorte COVID-19

### *a. Caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques des patients de la cohorte COVID-19*

L'ensemble des caractéristiques démographiques, les antécédents des patients et leurs signes cliniques de COVID-19 sont détaillés dans le **tableau 3**.

La cohorte de patients à l'étude, appelée « cohorte COVID-19 » comprenait 122 patients hospitalisés pour la prise en charge d'une COVID-19 au CHU de Lille et ayant eu une numération formule sanguine (NFS) réalisée entre le 08 Avril 2020 et le 23 Avril 2020. Au sein de cette cohorte, il y avait 93 (76,2%) hommes et 29 (23,8%) femmes, soit un sex-ratio (H/F) de 3/1. L'âge moyen des patients était de  $65 \pm 16$  ans, allant de 22 à 95 ans.

Parmi l'ensemble des antécédents de ces patients, 49 (44,5%) malades présentaient une obésité et 40 (36,4%) un surpoids. Six (4,9%) patients avaient présenté une hémopathie maligne : 2 patients ayant présenté un syndrome lymphoprolifératif post-transplantation d'organe (l'un dans un contexte de greffe pulmonaire, l'autre de greffe cardiaque, en rémission complète tous les deux), un patient sous surveillance simple pour un syndrome myélodysplasique, un patient ayant une leucémie lymphoïde chronique en rémission complète après traitement, un patient ayant un myélome multiple IgGk en cours de traitement de maintenance par LENALIDOMIDE et un patient ayant présenté un plasmocytome amygdalien (en rémission complète après traitement

par chirurgie et radiothérapie). Parmi ces malades aux antécédents d'hémopathie maligne, une hématoïèse clonale était uniquement mise en évidence que chez ces 2 derniers patients. Par ailleurs, 10 (8,2%) patients avaient présenté un cancer solide, dont 2 étaient évolutifs au moment de leur prise en charge pour la COVID-19.

Les caractéristiques ont également été comparées selon deux groupes de patients, en fonction de la présence ou non d'une hématoïèse clonale retrouvée au NGS (**tableau 3**). Sur les données démographiques et les antécédents, il existait uniquement une différence significative sur l'âge et sur les antécédents d'infarctus du myocarde et d'artérite oblitérante des membres inférieurs (AOMI) entre ces deux groupes. En effet, la population COVID-19 avec hématoïèse clonale était significativement plus âgée ( $72,3 \pm 13,5$  ans contre  $58,6 \pm 14,7$  ans sans hématoïèse clonale,  $p < 0,0001$ ) et ces patients avaient significativement plus d'antécédents d'infarctus du myocarde et d'AOMI (10 (18,2%) patients contre 4 (6,0%) sans hématoïèse clonale,  $p = 0,046$ ). Par ailleurs, les patients avec CH avaient significativement moins de signes cliniques digestifs de leur COVID-19 (9 (16,4%) patients contre 25 (37,3%) sans CH,  $p = 0,014$ ).

**Tableau 3 : Caractéristiques générales des patients de la cohorte COVID-19, décrite également en fonction de la présence ou l'absence d'hématopoïèse clonale.**

	Tous les patients COVID-19	Patients avec hématopoïèse clonale	Patients sans hématopoïèse clonale	<i>p</i>
<b>DONNEES DEMOGRAPHIQUES</b>				
Nb de patient	122	55	67	
Sexe, n (%)				0,831
Homme	93 (76,2)	41 (74,5)	52 (77,6)	
Femme	29 (23,8)	14 (25,5)	15 (22,4)	
Age (moy ± ET)	64,8 ± 15,7	72,3 ± 13,5	58,6 ± 14,7	<0,0001
Groupe d'âge, n (%)				<0,0001
<60 ans	43 (35,2)	11 (20,0)	32 (47,8)	
60-69 ans	32 (26,2)	11 (20,0)	21 (31,3)	
70-79 ans	26 (21,3)	15 (27,3)	11 (16,4)	
≥80 ans	21 (17,2)	18 (32,7)	3 (4,5)	
<b>ANTECEDENTS MEDICAUX, n (%)</b>				
Tabagisme	21 (17,2)	11 (20,0)	10 (14,9)	0,480
Diabète	34 (27,9)	16 (29,1)	18 (26,9)	0,841
Pathologie respiratoire chronique	30 (24,6)	13 (23,6)	17 (25,4)	1,000
Insuffisance cardiaque chronique	17 (13,9)	9 (16,4)	8 (11,9)	0,601
HTA	65 (53,3)	34 (61,8)	31 (46,3)	0,102
AVC	10 (8,2)	7 (12,7)	3 (4,5)	0,183
IDM et/ou AOMI	14 (11,5)	10 (18,2)	4 (6,0)	<b>0,046</b>
Antécédent de MTEV	7 (5,7)	5 (9,1)	2 (3,0)	0,242
Cirrhose	3 (2,5)	1 (1,8)	2 (3,0)	1,000
Insuffisance rénale chronique	11 (9,0)	6 (10,9)	5 (7,5)	0,541
Hémopathie maligne	6 (4,9)	2 (3,6)	4 (6,0)	0,689
Cancer solide	10 (8,2)	7 (12,7)	3 (4,5)	0,183
Traitement immunosuppresseur	9 (7,4)	2 (3,6)	7 (10,4)	0,183
Indice de masse corporelle (IMC)				0,363
<25 kg/m <sup>2</sup>	21 (19,1)	11 (24,4)	10 (15,4)	
25-29,9 kg/m <sup>2</sup>	40 (36,4)	18 (40,0)	22 (33,8)	
30-34,9 kg/m <sup>2</sup>	25 (22,7)	10 (22,2)	15 (23,1)	
35-39,9 kg/m <sup>2</sup>	13 (11,8)	4 (8,9)	9 (13,8)	
>40 kg/m <sup>2</sup>	11 (10,0)	2 (4,4)	9 (13,8)	
<b>SIGNES CLINIQUES DE COVID-19, n (%)</b>				
Fièvre/frissons	101 (82,8)	44 (80,0)	57 (85,1)	0,480
Toux	82 (67,2)	39 (70,9)	43 (64,2)	0,446
Expectorations	14 (11,5)	7 (12,7)	7 (10,4)	0,779
Dyspnée	111 (91,0)	47 (85,5)	64 (95,5)	0,064
Céphalées	7 (5,7)	2 (3,6)	5 (7,5)	0,456
Asthénie	80 (65,6)	34 (61,8)	46 (68,7)	0,450
Myalgies	28 (23,0)	12 (21,8)	16 (23,9)	0,832
Signes digestifs	34 (27,9)	9 (16,4)	25 (37,3)	<b>0,014</b>
Signes ORL	16 (13,1)	9 (16,4)	7 (10,4)	0,422
<b>DELAI HOSPITALISATION (jours, moy ± ET)</b>				
Délai symptômes-hospitalisation	6,5 ± 4,9	6,3 ± 4,5	6,7 ± 5,3	0,70
Délai symptômes-réanimation	8,2 ± 4,7	8,5 ± 5,0	8,1 ± 4,5	0,67

Moy ± ET : moyenne ± écart-type, HTA : hypertension artérielle, AVC : accident vasculaire cérébral, IDM : infarctus du myocarde, AOMI : artérite oblitérante des membres inférieurs, MTEV : maladie thromboembolique veineuse

Les données biologiques des patients de la cohorte COVID-19 sont détaillées dans le **tableau 4**. Un syndrome inflammatoire biologique était mis en évidence à l'entrée et le jour du NGS. En effet, le bilan biologie prélevé à l'entrée du patient en hospitalisation retrouvait une élévation du dosage médian de CRP (80 (40-135) mg/l), de ferritine (829 (462-1647) ng/ml), de fibrinogène (6,4 (5,3-7,4) g/l), de D-dimères (1175 (950-2410) ng/ml) et d'IL-6 (63,2 (24,5-124,4) pg/ml). Ces mêmes constatations étaient mises en évidence lors du bilan biologique prélevé le jour de réalisation du NGS.

**Tableau 4 : Données biologiques des patients de la cohorte COVID-19 en médiane (intervalle interquartile)**

BILAN INFLAMMATOIRE	Tous les patients COVID-19			
	A L'ENTREE		LE JOUR DU NGS	
Taux de leucocytes (G/l) (N:4-10)	7,1	(5,1-9,5)	9,6	(5,8-11,9)
Taux de PNN (G/l) (N:1,5-7)	5,0	(3,6-6,9)	6,2	(3,9-9,0)
<b>CRP (mg/l) (N&lt;3)</b>	80	(40-135)	57	(25-119)
<b>PCT (ng/ml) (N&lt;0,5)</b>	0,2	(0,1-0,5)	0,2	(0,1-0,6)
Ferritine (ng/ml) (N : 30-400)	929	(462-1647)	962	(590-1694)
Fibrinogène (g/l) (N:2-4)	6,4	(5,3-7,4)	6,5	(5,2-7,7)
D-dimères (ng/ml) (N<500)	1175	(950-2410)	2620	(1605-4000)
IL-6 (pg/ml)	63,2	(24,5-124,4)	38,6	(21,7-63,2)

N : norme laboratoire

*b. Gravité, complications et devenir des patients de la cohorte COVID-19*

L'ensemble des caractéristiques de la cohorte COVID-19 sur la gravité, les complications et le devenir des malades est détaillé dans le **tableau 5**.

Dans la cohorte COVID-19, d'après la classification de gravité de la NIH, 7 (5,7%) patients présentaient une COVID-19 modérée et étaient hospitalisés du fait de leur fragilité, 29 (23,8%) patients présentaient une COVID-19 sévère et 86 (70,5%)

présentaient une COVID-19 critique. Le score SOFA moyen des malades était de  $3 \pm 2,9$  (sur 24). Sur l'ensemble de ces patients, 89 (73%) étaient pris en charge en réanimation, avec un score IGS II moyen à  $45 \pm 17,5$ , soit une mortalité prédite de 34,8%. Parmi les patients COVID-19 critique, 4 d'entre eux n'ont pas été transférés en réanimation du fait de limitations thérapeutiques et sont décédés de leur COVID-19 en hospitalisation conventionnelle.

Parmi ces malades, dans le cadre de la prise en charge de leur défaillance respiratoire, 37 (30,3%) ont nécessité une oxygénothérapie à haut débit, 43 (45,2%) ont nécessité une ventilation non invasive (VNI) et 67 (54,9%) ont nécessité une intubation orotrachéale et une ventilation mécanique, correspondant à 67/89 (75,3%) des patients admis en réanimation. Une oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO), plus haut niveau de suppléance respiratoire de notre arsenal thérapeutique, a été réalisée chez 17 (13,9%) malades. Parmi les patients admis en réanimation, deux patients avaient une indication théorique d'intubation orotrachéale mais cette dernière n'a pas été réalisée du fait de limitations thérapeutiques. Ces patients sont décédés en réanimation.

Concernant les traitements spécifiques de la COVID-19, 54 (44,3%), 20 (16,4%) et 4 (3,3%) patients ont reçu une corticothérapie systémique, un traitement antiviral et/ou du TOCILIZUMAB respectivement (**Tableau 5**). L'initiation de la corticothérapie était tardive avec un délai moyen entre entrée en hospitalisation et début du traitement de  $9,7 \pm 7,0$  jours. La durée de traitement était également hétérogène avec une médiane à 7 (4-10) jours. Le traitement antiviral était administré dans le cadre du protocole de recherche DisCoVeRy (115).

Concernant le devenir des malades, le taux de décès à J28 était de 11,5% alors que le taux de décès hospitalier était de 15%. Au sein des patients admis en réanimation, le taux de mortalité en réanimation était de 14/89 (15,7%).

Ces caractéristiques ont également été comparées selon les deux groupes de patients, en fonction de la présence ou non d'une hématopoïèse clonale (**Tableau 5**). Il existait uniquement une différence significative sur le transfert en réanimation. En effet, les patients avec CH étaient significativement moins transférés en réanimation (33 (60%) patients contre 56 (83,6%) patients sans CH).

**Tableau 5 : Gravité, complications, traitement et devenir des patients de la cohorte COVID-19, décrite également en fonction de la présence ou absence d'hématopoïèse clonale**

	Tous les patients COVID-19 (n=122)	Présence Hématopoïèse clonale (n=55)	Absence Hématopoïèse clonale (n=67)	p
<b>GRAVITE</b>				
<b>Gravité clinique, n (%)</b>				0,207
COVID-19 modérée	7 (5,7)	5 (9,1)	2 (3,0)	
COVID-19 sévère	29 (23,8)	15 (27,3)	14 (20,9)	
COVID-19 critique	86 (70,5)	35 (63,6)	51 (76,1)	
<b>Score SOFA admission*</b>	3,0 ± 2,9	3,5 ± 2,8	4,0 ± 3,0	0,341
<b>Transfert en réanimation, n (%)</b>	89 (73,0)	33 (60,0)	56 (83,6)	<b>0,004</b>
<b>Score IGS II*</b>	45 ± 17,5	45,7 ± 15,8	44,8 ± 18,5	0,807
<b>DEFAILLANCES D'ORGANE, n (%)</b>				
<b>Défaillance respiratoire</b>				
Oxygénothérapie haut débit	37 (30,3)	15 (27,3)	22 (32,8)	0,557
VNI	43 (35,2)	17 (30,9)	26 (38,8)	0,447
Intubation orotrachéale et VM	67 (54,9)	25 (45,5)	42 (62,7)	0,069
ECMO	17 (13,9)	5 (9,1)	12 (17,9)	0,195
<b>Défaillance hémodynamique</b>				
Amines	59 (48,4)	22 (40,0)	37 (55,2)	0,105
<b>Défaillance rénale</b>				
Insuffisance rénale aiguë	57 (46,7)	25 (45,5)	32 (47,8)	0,856
Epuration extra-rénale	21 (17,2)	6 (10,9)	15 (22,4)	0,147
<b>Anomalies du bilan hépatique</b>	48 (39,3)	17 (30,9)	31 (46,3)	0,096
<b>COMPLICATIONS EMBOLIQUES, n (%)</b>				
Embolie pulmonaire	18 (14,8)	7 (12,7)	11 (16,4)	0,617
Thrombose veineuse profonde	4 (3,3)	3 (5,5)	1 (1,5)	0,326
Thrombose artérielle	6 (4,9)	3 (5,5)	3 (4,5)	1,000
<b>TRAITEMENT SPECIFIQUE, n (%)</b>				
<b>Corticothérapie</b>				
Solumédrol	54 (44,3)	22 (40,0)	32 (47,8)	0,465
Dexaméthasone	24 (19,7)	9 (16,4)	15 (22,4)	0,495
Dexaméthasone	28 (23,0)	13 (23,6)	15 (22,4)	1,000
HSHC	4 (3,3)	2 (3,6)	2 (3,0)	1,000
Prednisone	1 (0,8)	0 (0,0)	1 (1,5)	1,000
<b>Traitement antiviral</b>				
Lopinavir	20 (16,4)	5 (9,1)	15 (22,4)	0,054
Lopinavir	7 (5,7)	2 (3,6)	5 (7,5)	0,456
Lopinavir-IFN	4 (3,3)	0 (0,0)	4 (6,0)	0,126
Remdesivir	5 (4,1)	1 (1,8)	4 (6,0)	0,377
Hydroxychloroquine	4 (3,3)	2 (3,6)	2 (3,0)	1,000
<b>Tocilizumab</b>	4 (3,3)	2 (3,6)	2 (3,0)	1,000
<b>DEVENIR DES PATIENTS</b>				
Durée réanimation <sup>§</sup>	19 (9-37)	25 (9-40)	18,5 (9-25)	0,145
Durée hospitalisation <sup>§</sup>	24 (11-42)	20 (9-46)	24,5 (14-41)	0,935
Décès à J28, n (%)	14 (11,5)	7 (12,7)	7 (10,4)	0,779
Décès en réanimation, n (%)	14 (11,5)	4 (7,3)	10 (14,9)	0,256
Décès hospitalier, n (%)	18 (15,0)	8 (14,8)	10 (15,2)	1,000

\*Moy ± ET : moyenne ± écart-type, <sup>§</sup>en jours, méd (Q1-Q3) : médiane (intervalle interquartile) VNI : ventilation non invasive, VM : ventilation mécanique, ECMO : oxygénation par membrane extracorporelle, HSHC : hémisuccinate d'hydrocortisone, IFN : interféron

c. *Caractéristiques de l'hématopoïèse clonale chez les patients de la cohorte COVID-19*

Les caractéristiques de l'hématopoïèse clonale dans la cohorte COVID-19 sont détaillées dans le **tableau 6**.

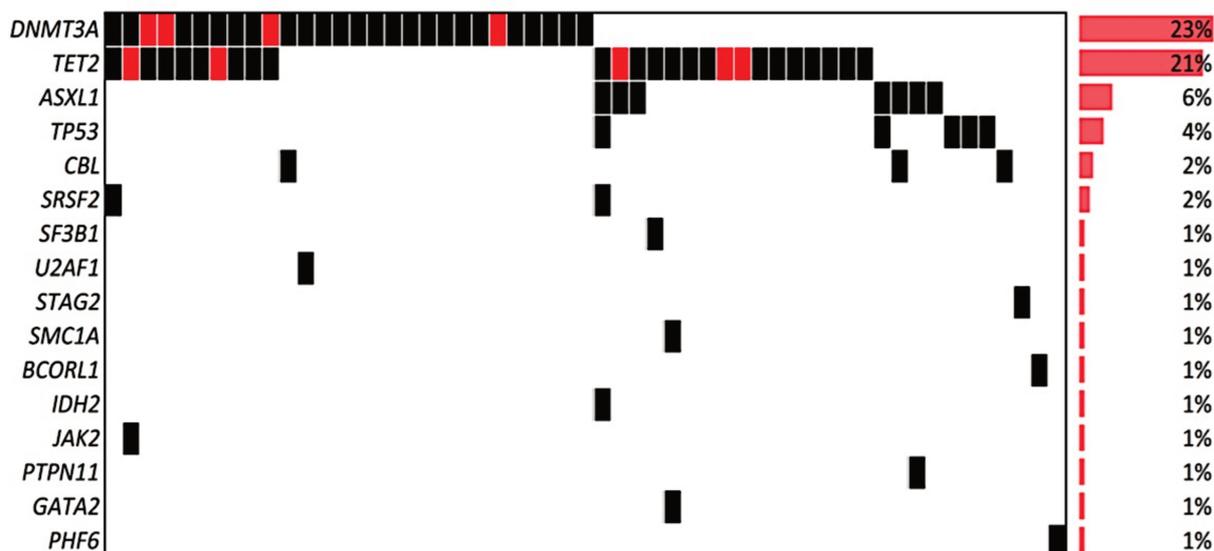
On retrouvait une hématopoïèse clonale chez 55 (45,1%) patients. Les principales mutations mises en évidence étaient : une mutation de *DNMT3A* chez 28 (23%) patients, une mutation de *TET2* chez 26 (21,3%) patients, une mutation d'*ASXL1* chez 7 (5,7%) patients et une mutation de *TP53* chez 5 (4,1) patients. Les mutations de *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* et *TP53* représentaient respectivement donc 50,9%, 47,3%, 12,7% et 9,1% des patients avec hématopoïèse clonale.

L'ensemble des mutations retrouvées chez les malades de la cohorte COVID-19 est représenté dans la **figure 13** et est détaillé en **annexe 4**.

**Tableau 6 : Hématopoïèse clonale dans la cohorte COVID-19**

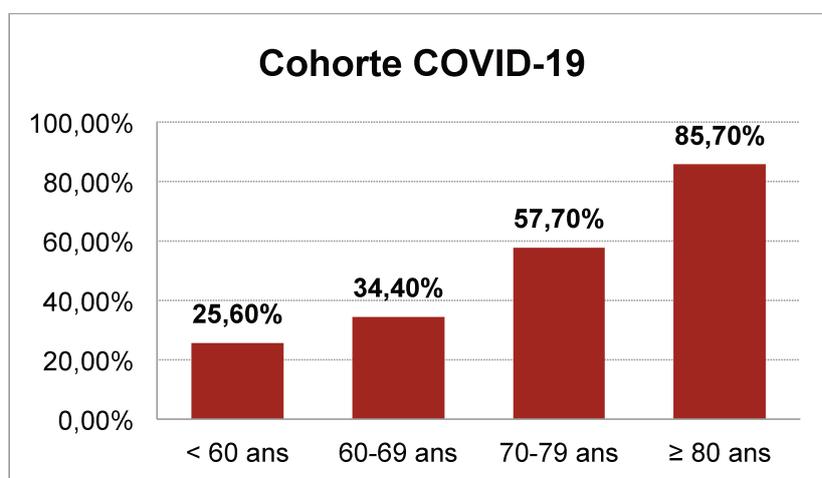
	<b>Tous les patients COVID-19 n=122</b>	
<b>HEMATOPOIESE CLONALE, n (%)</b>		
Présence hématopoïèse clonale	55	(45,1)
<b>DELAI REALISATION NGS en jours, méd (Q1-Q3)</b>		
Délai symptômes-NGS	16	(10-23)
Délai hospitalisation-NGS	7,5	(4-16)
Délai réanimation-NGS	9	(5-15)
<b>DETAIL DES PRINCIPALES MUTATIONS, n (%)</b>		
<i>DNMT3A</i>	28	(23,0)
<i>TET2</i>	26	(21,3)
<i>ASXL1</i>	7	(5,7)
<i>TP53</i>	5	(4,1)
Nb de mutation >1	23	(18,9)

**NB : l'ensemble des mutations retrouvées est détaillé en annexe 4**



**Figure 13 :** Représentation des mutations (partie de gauche) retrouvées chez les 55 patients présentant une hématoïèse clonale dans la cohorte COVID-19 et leur prévalence dans la cohorte (partie de droite). Les rectangles rouges représentent la présence de plusieurs mutations sur le même gène. Schéma extrait de *Duployez et al., 2020* (116), article présenté en Annexe 5.

La prévalence de l'hématoïèse clonale augmentant avec l'âge, elle a été analysée par groupe d'âge dans notre cohorte, comme représenté en **figure 14**. Elle était de 11/43 (25,6%), 11/32 (34,4%), 15/26 (57,7%) et 18/21 (85,7%) dans les groupes < 60 ans, 60-69 ans, 70-79 ans et ≥ 80 ans respectivement. Le nombre de patient avec hématoïèse clonale dans chaque groupe d'âge est détaillé en **annexe 4**.



**Figure 14 :** Prévalence de l'hématoïèse clonale par groupe d'âge dans la cohorte COVID-19

## 2. Description de la cohorte contrôle et les caractéristiques de l'hématopoïèse clonale

L'ensemble des caractéristiques des patients de la cohorte contrôle est représenté dans le **tableau 7** et l'ensemble des mutations retrouvées est détaillé en **annexe 4**.

La « cohorte contrôle » non-COVID-19 rétrospective comprenait 465 patients, sans hémopathie maligne et prélevés avant la pandémie de COVID-19, dont 227 (48,8%) hommes et 238 (51,2%) femmes. L'âge moyen était de  $63 \pm 15,7$  ans, allant de 21 à 94 ans.

Dans cette cohorte, une hématopoïèse clonale était mise en évidence chez 106 (22,8%) patients. Les principales mutations constatées étaient : une mutation de *DNMT3A* chez 68 (14,6%) patients et une mutation de *TET2* chez 32 (6,9%) patients. Une mutation d'*ASXL1* était retrouvée chez seulement 3 (0,6%) patients et une mutation de *TP53* chez 1 (0,2%) patient.

Ainsi, les mutations de *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* et *TP53* étaient donc présentes chez 65,2%, 30,2%, 2,8% et 0,9% des patients avec hématopoïèse clonale respectivement.

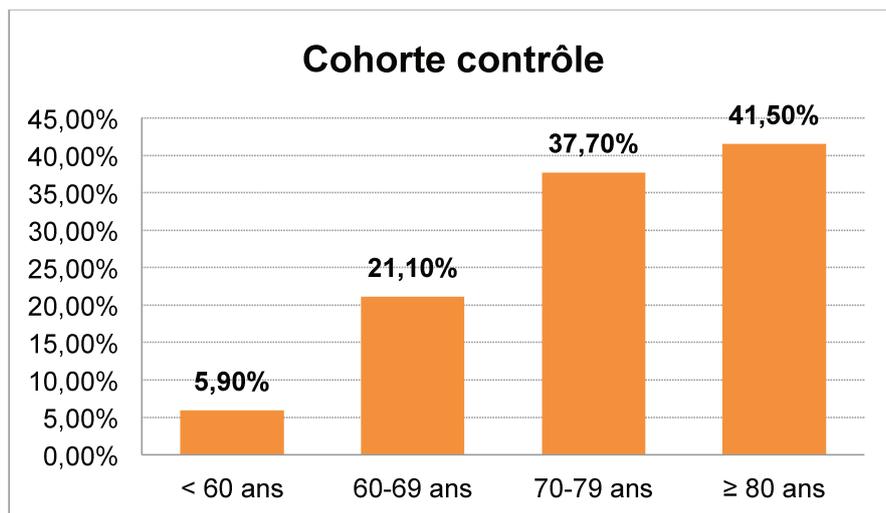
La prévalence de l'hématopoïèse clonale augmentant avec l'âge, elle a été également analysée par groupe d'âge dans cette cohorte, comme représenté en **figure 15**. Elle était de 10/169 (5,9%), 23/109 (21,1%), 46/122 (37,7%) et 27/65 (41,5%) dans les groupes < 60 ans, 60-69 ans, 70-79 ans et  $\geq 80$  ans respectivement. Le nombre de patient avec hématopoïèse clonale dans chaque groupe d'âge est également détaillé en **annexe 4**.

**Tableau 7 : Caractéristiques démographiques et caractéristiques de l'hématopoïèse clonale des patients de la cohorte contrôle**

	<b>Cohorte contrôle (n = 465)</b>
<b>DONNEES DEMOGRAPHIQUES</b>	
<b>Sexe, n (%)</b>	
Homme	227 (48,8)
Femme	238 (51,2)
<b>Age (moy ± ET)</b>	63,6 ± 15,7
<b>Groupe d'âge, n (%)</b>	
<60 ans	169 (36,3)
60-69 ans	109 (23,4)
70-79 ans	122 (26,2)
≥80 ans	65 (14,0)
<b>HEMATOPOIESE CLONALE, n (%)</b>	
Présence hématopoïèse clonale	106 (22,8)
<b>DETAIL DES MUTATIONS, n (%)</b>	
<i>DNMT3A</i>	68 (14,6)
<i>TET2</i>	32 (6,9)
<i>ASXL1</i>	3 (0,6)
<i>TP53</i>	1 (0,2)
Nb de mutation >1	28 (6,0)

Moy ± ET : moyenne ± écart-type

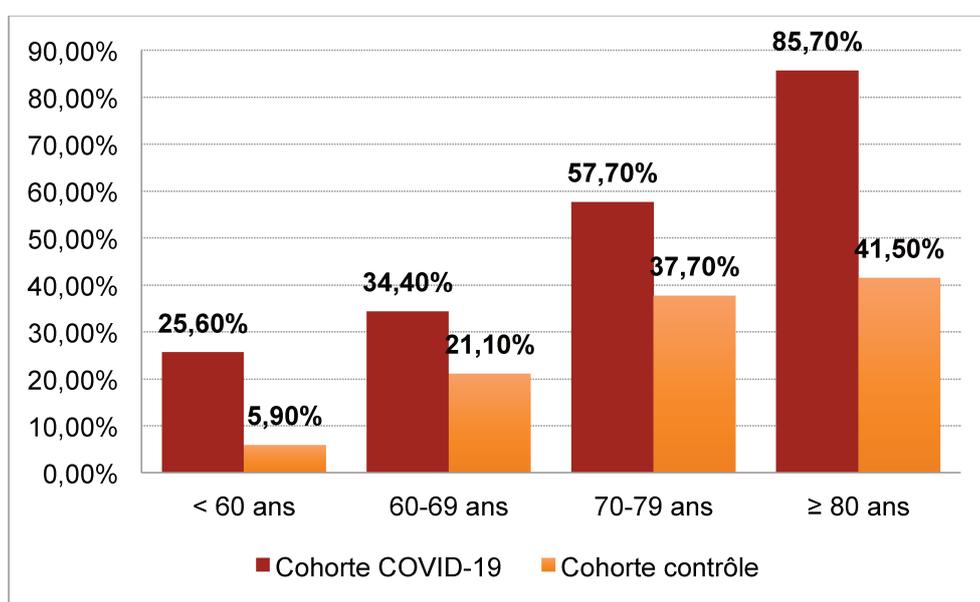
**NB : l'ensemble des mutations est détaillé en annexe 4**



**Figure 15 : Prévalence de l'hématopoïèse clonale par groupe d'âge dans la cohorte contrôle**

### 3. Objectif principal de l'étude: Hématopoïèse clonale comme facteur de risque de COVID-19 sévère et critique

Si on compare les chiffres de prévalence d'hématopoïèse clonale entre la cohorte COVID-19 (45,1%) et la cohorte contrôle non-COVID-19 (22,8%), il apparaît que cette prévalence est nettement augmentée chez les patients atteints de COVID-19 sévère et critique. Cette constatation est la même si on compare les prévalences par groupe d'âge, comme représenté dans la **figure 15**.



**Figure 15 : Comparaison des prévalences d'hématopoïèse clonale par groupe d'âge entre la cohorte COVID-19 et la cohorte contrôle**

Par conséquent, nous avons cherché à déterminer si la présence d'une hématopoïèse clonale était associée au risque de développer une COVID-19 sévère ou critique.

**En comparant les deux cohortes**, on retrouvait 15,73% de patients COVID-19 sévère ou critique dans l'ensemble des patients SANS hématopoïèse clonale contre 34,16% de patients COVID-19 sévère ou critique dans l'ensemble des patients AVEC hématopoïèse clonale.

Dans notre étude, il y a donc plus de COVID-19 sévère ou critique chez les patients avec hématoïèse clonale.

L'âge étant un facteur de confusion majeure d'hématoïèse clonale, la comparaison a été réalisée après ajustement sur l'âge. Ainsi, l'odds ratio ajusté sur l'âge, avec intervalle de confiance à 95% (OR [IC95%]), de développer une COVID-19 sévère ou critique en cas d'hématoïèse clonale était :

OR = 3,09 [1,95-4,88], $p < 0,0001$
-------------------------------------

Ainsi, on peut dire qu'il y a 3,09 fois plus de cas de COVID-19 sévère ou critique chez les patients présentant une hématoïèse clonale.

#### 4. Objectifs secondaires de l'étude

- a. *Hématoïèse comme facteur de risque de complications liées à la COVID-19, au sein de la cohorte COVID-19*

**Au sein de la cohorte COVID-19**, nous avons donc cherché à déterminer si la présence d'une hématoïèse clonale était associée au risque de développer des complications de la COVID-19 ou d'impacter le devenir des patients. Pour les mêmes raisons que dans l'objectif principal de l'étude, toutes les comparaisons ont été ajustées sur l'âge. Elles sont représentées dans le **tableau 8**.

Ainsi, concernant le devenir des malades, il n'a pas été montré de différence significative sur le risque de forme critique comparé à une forme sévère de COVID-19

en cas d'hématopoïèse clonale. De même, il n'y avait pas de différence significative concernant le risque de transfert en réanimation, le risque de décès à J28 ou de décès hospitalier en cas de présence d'une hématopoïèse clonale.

De plus, il n'a pas non plus été mis en évidence de différence significative de risque de recours aux différentes suppléances respiratoires (oxygénothérapie haut débit, VNI, IOT et VM, ECMO), ni de risque d'insuffisance rénale aiguë et de recours à l'épuration extra-rénale, ni de risque de survenue d'anomalie du bilan hépatique.

La survenue de maladie thromboembolique veineuse, notamment une embolie pulmonaire, n'était pas significativement associée à la présence d'une hématopoïèse clonale.

Par ailleurs, l'association entre thrombose artérielle et présence d'une CH n'a pas pu être analysée du fait d'un nombre d'évènements trop faible dans notre cohorte.

**Tableau 8 : Odds ratio ajustés sur l'âge de la gravité clinique, de la survenue de complications et du devenir des patients présentant une COVID-19 sévère ou critique**

	Présence d'une hématopoïèse clonale	
	OR [IC 95%]	<i>p</i>
<b>Gravité clinique</b>		
COVID-19 critique	1,10 [0,42-2,86]	0,848
<b>Transfert en réanimation</b>	0,62 [0,24-1,60]	0,318
<b>Défaillance respiratoire</b>		
Oxygénothérapie haut débit	0,97 [0,41-2,31]	0,944
VNI	1,03 [0,44-2,39]	0,948
Intubation orotrachéale et VM	0,84 [0,37-1,91]	0,687
ECMO	0,86 [0,25-2,93]	0,803
<b>Défaillance rénale</b>		
Insuffisance rénale aiguë	0,91 [0,41-2,01]	0,812
Épuration extra-rénale	0,85 [0,27-2,67]	0,779
<b>Anomalies du bilan hépatique</b>	0,91 [0,39-2,11]	0,821
Maladie thromboembolique veineuse	1,24 [0,44-3,48]	0,682
Embolie pulmonaire	0,81 [0,26-2,52]	0,722
Décès à J28	0,92 [0,27-3,22]	0,901
Décès en hospitalisation	0,83 [0,27-2,54]	0,737

VNI : ventilation non invasive, VM : ventilation mécanique ECMO : oxygénation par membrane extracorporelle

b. *Profils inflammatoires en fonction de la présence ou de l'absence d'hématopoïèse clonale chez les patients atteints de COVID-19 sévère ou critique*

Dans la cohorte COVID-19, nous avons cherché à mettre en évidence des profils inflammatoires distincts chez nos patients par la méthode statistique de « clustering », afin de les comparer à la présence d'une hématopoïèse clonale. Cependant, en prenant comme variables à analyser le taux de leucocytes, le taux de PNN, le dosage de CRP, de PCT, de ferritine, de fibrinogène, de D-dimères et d'IL-6, il n'a pas été mis en évidence de groupes dissociables.

Nous avons donc comparé séparément les différents marqueurs inflammatoires en fonction de la présence ou de l'absence d'hématopoïèse clonale, comme représenté dans le **tableau 9**. Pour chacun de ces marqueurs, il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les deux groupes.

**Tableau 9 : Comparaison des marqueurs inflammatoires en fonction de la présence ou non d'hématopoïèse clonale dans la cohorte COVID-19**

	Patients avec hématopoïèse clonale		Patients sans hématopoïèse clonale		<i>p</i>
<b>Bilan inflammatoire le jour du NGS (méd (Q1-Q3))</b>					
Taux de leucocytes (G/l)	7,8	(5,5-12,7)	8,8	(5,9-11,6)	0,58
Taux de PNN (G/l)	5,6	(3,3-9,2)	6,4	(4,1-9,0)	0,65
<b>CRP (mg/ml)</b>	55	(25-93)	61	(24-166)	0,62
<b>PCT (ng/ml)</b>	0,2	(0,1-0,5)	0,2	(0,1-0,6)	0,89
Ferritine (ng/ml)	814	(499-1373)	1010	(634-1808)	0,13
Fibrinogène (g/l)	6,1	(4,9-7,5)	6,6	(24-166)	0,15
D-dimères (ng/ml)	2640	(2000-4000)	2210	(1320-4000)	0,43
IL-6 (pg/ml)	44,2	(28,8-63,2)	32,8	(20,3-72,6)	0,66

Méd (Q1-Q3) : médiane (intervalle interquartile)

## DISCUSSION

Dans la littérature, seulement trois publications se sont intéressées à la relation entre l'hématopoïèse clonale et la COVID-19: Bolton *et al.* et Hameister *et al.* ont analysé le lien entre hématopoïèse clonale (CH) et la sévérité clinique de la COVID-19 (117,118), alors que Shivarov et Ivanova ont étudié l'association entre la mortalité par COVID-19 et la présence d'une CH (119).

Dans notre étude, la prévalence de CH dans la cohorte COVID-19 était significativement plus importante en comparaison avec la cohorte contrôle, après ajustement sur l'âge. **Les patients avec hématopoïèse clonale avaient 3 fois plus de risque de développer une forme sévère ou critique de COVID-19 que les patients sans hématopoïèse clonale.**

En analysant les patients au sein de la cohorte COVID-19, nous avons mis en évidence que les patients avec une CH étaient significativement plus âgés, avec une prévalence augmentant avec l'âge. Ils avaient significativement plus d'antécédents d'infarctus du myocarde et d'AOMI que les patients sans hématopoïèse clonale. Étonnamment, les patients avec hématopoïèse clonale étaient significativement moins admis en réanimation. Plus précisément, la présence d'une CH semblerait protectrice du transfert en réanimation, malgré un résultat non significatif après analyse par régression logistique ajustée sur l'âge.

A l'inverse, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les patients avec et sans hématopoïèse clonale sur le risque de recours à l'intubation orotrachéale et à la ventilation mécanique, ni sur le risque de recours aux autres

suppléances respiratoires (oxygénothérapie haut débit, VNI, ECMO). Cette constatation était la même concernant le risque de survenue d'une défaillance rénale, d'anomalie du bilan hépatique ou de complications thromboemboliques veineuses. La présence d'une CH n'avait pas non plus d'influence sur le risque de décès.

## 1. Comparaison avec la littérature

### a. *A propos des caractéristiques des patients*

**Dans l'ensemble**, notre cohorte présente des caractéristiques comparables à celles retrouvées dans la littérature à propos de patients COVID-19 sévère et/ou critique (65,79,81,90,91) sur :

- les données démographiques, notamment avec l'âge médian de 65 ans et la surreprésentation d'hommes dans les formes graves de COVID-19
- les antécédents médicaux, avec un pourcentage marqué d'antécédents démontrés comme étant des facteurs de risque de forme grave
- les signes cliniques et le délai d'aggravation
- les signes biologiques en faveur d'un syndrome inflammatoire biologique

Cependant, nos patients avec CH avaient significativement moins de signes digestifs de leur COVID-19. Ce résultat est très surprenant, sans véritable explication physiopathologique et peut être le fruit d'un biais de sélection de nos patients.

**Concernant les complications de la COVID-19**, dans notre cohorte, un peu moins d'un patient sur 5 avait présenté une complication thromboembolique veineuse, ce chiffre était concordant avec les données de la littérature (70,71). Les pourcentages élevés de patients ayant reçu une suppléance respiratoire et plus précisément une intubation orotrachéale, sont expliqués par l'enrichissement en patients admis en réanimation dans notre cohorte. Toutefois, le taux de mortalité est particulièrement bas. Cela peut éventuellement s'expliquer par l'inclusion à la fois de quelques patients COVID-19 modérée et d'un quart de patients COVID-19 sévère (les patients décédés de la COVID-19 étant systématiquement classés COVID-19 critique), tendant à faire diminuer ce pourcentage. Néanmoins, au sein des patients admis en réanimation, trois-quarts étaient intubés mais seulement 15,7% d'entre eux sont décédés, correspondant à un taux de mortalité en réanimation très inférieur à celui de 30% rapporté dans la littérature (90,120). Deux hypothèses expliquant ce taux de mortalité bas peuvent être proposées : Premièrement, l'absence de randomisation des patients à l'inclusion a pu créer un biais de sélection de patients moins graves au sein de l'étude. Deuxièmement, ce taux de décès bas malgré un taux d'intubation de 75% pourrait être expliqué par une intubation précoce des malades COVID-19 dans notre centre à cette période, conduisant potentiellement à une intubation orotrachéale de patients avec une atteinte moins sévère que dans d'autres centres. Ce chiffre de mortalité en réanimation est certes surprenant mais cohérent avec celui retrouvé dans notre service à la même période.

**Concernant l'hématopoïèse clonale**, comme retrouvé dans les études portant sur ce sujet (24,25,30), la prévalence de CH augmentait avec l'âge dans nos deux cohortes. Cela permet d'expliquer l'âge significativement plus élevé des patients porteurs d'une

CH dans la cohorte COVID-19.

Cependant, dans la cohorte COVID-19, il a été constaté une surreprésentation de mutations de *TET2* (présente chez 47,3% des patients avec CH), à la fois en comparaison à la cohorte contrôle et à la littérature (où *TET2* représente habituellement environ 10 % des mutations). La mutation de *DNMT3A*, l'autre mutation la plus fréquemment retrouvée dans la CHIP, était retrouvée dans une proportion habituelle (de l'ordre de 50%).

A noter par ailleurs que les panels de gènes, les technologies de séquençage et d'analyses bio-informatiques peuvent différer en fonction des études, peuvent ainsi modifier la sensibilité de détection des mutations, et donc limiter les comparaisons à la littérature.

*b. A propos de l'objectif principal de l'étude : hématopoïèse clonale comme facteur de risque de COVID-19 sévère et critique*

Seules deux études de la littérature se sont penchées sur la recherche d'une association entre la présence d'une hématopoïèse clonale et la sévérité clinique de la COVID-19 : une étude réalisée par l'équipe suisse de Hameister *et al.* (118) et une étude portée par les équipes américaines et coréennes de Bolton *et al.* (117), en cours de soumission, dont nous avons l'accès que sous format « *preprint* », avant révision par les pairs.

Tout d'abord, de façon étonnante, Hameister *et al.* n'ont pas montré dans leur étude d'augmentation de prévalence de CH, ni de risque de forme grave de COVID-19 associé à la CH, au cours de la première vague épidémique. En effet, dans une cohorte de 102 patients âgés de plus de 50 ans, atteints de COVID-19 « modérée » et

« sévère » (ainsi décrit dans leur étude, correspondant probablement à « sévère » et « critique » selon la définition du NIH d'après leur description), la prévalence de CH était de 23,4% dans le groupe « modérée » et de 27,3% dans le groupe « sévère », soit une prévalence de 24,5% pour l'ensemble des patients COVID-19. La prévalence de CH était de 23,8% dans leur cohorte contrôle non-COVID-19 (appariée sur l'âge, le sexe et les comorbidités). En comparaison, nous avons retrouvé une prévalence bien plus importante (45,1%) pour les patients COVID-19 sur une population proche, mais un pourcentage similaire dans notre cohorte contrôle (22,8%). Certes, nous n'avons pas limité nos inclusions aux patients de plus de 50 ans, mais les médianes d'âge (67 ans contre 65 ans dans notre étude), la surreprésentation d'hommes, la plupart des comorbidités et le paysage mutationnel des patients étaient similaires. Comme la prévalence de CH augmente avec l'âge, la présence de patients plus jeunes dans notre étude aurait plutôt tendance à faire diminuer la prévalence de CH. De plus, dans leurs analyses de biologie moléculaire, les mutations étaient prises en compte à partir d'une VAF  $\geq 1\%$ , favorisant la détection d'un clone et ainsi, augmentant la probabilité d'avoir une hématoïèse clonale, ce qui aurait normalement tendance à augmenter leur prévalence de CH.

Deux principales hypothèses peuvent être proposées pour expliquer les différences de résultats entre l'étude d'Hameister *et al.* et la notre : 1) Les patients inclus dans leur étude étaient des patients hospitalisés pour COVID-19 (le groupe « modérée » correspondait à une hospitalisation conventionnelle et le groupe « sévère » correspondait à une hospitalisation en réanimation, les patients décédés en hospitalisation conventionnelle étaient classés « sévère »), mais les critères d'indication d'hospitalisation pour COVID-19 dans leurs centres n'étaient pas définis, et différent

probablement entre la Suisse et la France. 2) Bien que les cohortes COVID-19 de nos deux études paraissent proches dans l'ensemble (même sex-ratio, même proportion d'HTA, de diabète par exemple), quand on les analyse plus finement, on note 2 fois plus de patients ayant une pathologie respiratoire chronique dans leur étude que dans la nôtre. De plus, aucune donnée sur l'IMC des patients suisses n'est présentée, ne permettant pas de comparer les 2 populations sur ce point. L'obésité est un facteur de risque majeur de COVID-19 grave et 44,5% des malades de notre cohorte présentent un IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, rendant cette comparaison importante pour l'extrapolation des données.

Ces deux hypothèses pourraient expliquer une différence de population à l'étude et donc expliquer également, au moins en partie, les différences de prévalence d'hématopoïèse clonale entre nos deux études. Ce résultat très différent du nôtre sur la prévalence de CH chez les COVID-19 sévères et critiques de Hameister *et al.* reste néanmoins surprenant.

Ensuite, de façon concordante avec notre étude, l'équipe de Bolton *et al.* a mis en évidence que l'hématopoïèse clonale était associée à une COVID-19 sévère avec un OR à 1,9 (IC95%[1,2-2,9],  $p=0,01$ ). Toutefois, cette étude est en cours de soumission et nous avons accès uniquement à une version « *preprint* », avant relecture par les pairs, dont les résultats doivent être interprétés avec précaution.

Cette étude incluait deux cohortes de patients, tous atteints de la COVID-19 au cours de la première vague épidémique : une cohorte américaine (cohorte MSK) du *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* de 403 patients suivis dans ce centre pour un cancer solide et ayant eu un NGS avant leur COVID-19 et une cohorte coréenne (cohorte KoCH) de 112 patients hospitalisés, sans antécédent de cancer, séquencés au cours

de leur hospitalisation. Ces patients positifs au SARS-CoV-2 étaient considérés comme COVID-19 sévère en cas d'oxygénorequérance  $>1\text{L}/\text{min}$  ou de  $\text{SpO}_2 <94\%$ . Aucune donnée sur l'aggravation clinique, sur une éventuelle prise en charge en réanimation, sur le devenir des malades ni sur le taux de mortalité n'était décrite dans cette étude. Les analyses statistiques étaient ajustées sur l'âge, le tabac, les comorbidités considérées comme facteur de risque de COVID-19 grave et les traitements anti-cancéreux antérieurs. L'IMC des patients n'était cependant pas disponible dans l'article et non pris en compte dans l'ajustement. L'analyse de la cohorte MSK retrouvait 23% de forme sévère, et la prévalence de CH était de 51% et 30% dans les groupes COVID-19 sévère et COVID-19 non-sévère respectivement (OR ajusté à 1,85 IC95% [1,10-3,12]). Ce résultat montre que les patients aux antécédents de cancer solide avec hématoïèse clonale avait presque 2 fois plus de risque de développer une forme sévère (contre une forme non-sévère) que les patients sans CH. Ce résultat est concordant avec notre résultat, tant sur la prévalence de CH, que sur la mise en évidence du sur-risque de forme grave de la COVID-19 en présence de CH. Cependant, cette différence était non significative dans la cohorte KoCH. Les deux cohortes ont été analysées ensemble par le modèle de « *fixed-effect* » utilisé dans les méta-analyses, retrouvant de nouveau une augmentation significative de CH entre les groupes COVID-19 sévère et COVID-19 non sévère.

Bien que les populations ne soient pas tout à fait superposables à notre étude (patients moins graves avec une moitié de patients ambulatoires dans chaque cohorte, pas de patient de réanimation, surreprésentation des antécédents de cancer par rapport à la population générale), les données de cette étude renforcent néanmoins les résultats de notre travail.

A noter que dans cette étude, tous les variants retrouvés sur chaque gène du panel NGS ont été pris en compte et ont été classés en « CH réputée comme étant une *driver mutation* » et « CH non réputée comme étant une *driver mutation* » (121). Il semblerait que ces dernières seraient particulièrement associées aux formes sévères de COVID-19. Ceci pourrait montrer que si certaines mutations sont connues pour être des précurseurs d'hémopathie maligne, d'autres mutations différentes et non prises en compte habituellement pourraient être en fait des mutations favorisant de pathologies infectieuses ou inflammatoires.

En résumé, malgré des résultats opposés dans les deux seules études de la littérature portant sur ce sujet, nous sommes les premiers à montrer une augmentation du risque par 3 de forme sévère ou critique de la COVID-19 en cas de présence d'une hématoïèse clonale, sur une population bien décrite de patients d'hospitalisation conventionnelle et de réanimation.

*c. A propos des objectifs secondaires de l'étude*

Aucune des études précédemment décrites n'a étudié l'impact de la présence de l'hématoïèse clonale sur le devenir des patients, sur la survenue de défaillance d'organe ou de complication thromboembolique.

**Concernant les complications thromboemboliques**, il a été démontré que les syndromes myéloprolifératifs associés à une mutation de *JAK2* avaient un risque nettement augmenté de thromboses, à la fois artérielles et veineuses (122,123). La

CHIP avec mutation de *JAK2*, donc sans syndrome myéloprolifératif, est elle aussi associée à plus de maladies thromboemboliques veineuses et d'infarctus du myocarde (26,124). Parmi nos patients de la cohorte COVID-19, un seul présentait une mutation de *JAK2*, avec dans ses antécédents un AVC ischémique mais il n'avait pas présenté de thrombose au cours de son hospitalisation. L'effectif de patients mutés *JAK2* étant trop faible dans notre étude, on ne peut pas conclure sur un éventuel sur-risque thrombotique lié à cette mutation au cours de la COVID-19. Néanmoins, on peut dire qu'il n'y avait pas de surreprésentation de mutation de *JAK2* chez les patients qui ont développé une thrombose dans notre étude. Ce sur-risque thrombotique n'a pas non plus été mis en évidence en cas de présence de CH de façon générale, suggérant une physiopathologie indépendante de la présence de CHIP, lié au syndrome inflammatoire et l'hypercoagulabilité induits par la COVID-19 elle-même (69).

**Concernant la mortalité**, au sein de notre cohorte COVID-19, la présence d'une hématoïèse clonale n'était pas associée à une surmortalité. Shivarov et Ivanova (119), contrairement à nos résultats, ont montré dans leur étude une association statistique entre la présence d'une hématoïèse clonale et la mortalité par COVID-19. Afin de montrer ce résultat, ils ont analysé le lien entre l'augmentation de prévalence de CH avec l'âge et l'augmentation de mortalité avec l'âge de la COVID-19, via une analyse de corrélation statistique (119). En effet, ils ont comparé d'une part les données des deux plus grandes cohortes de la littérature décrivant l'épidémiologie de la CHIP (24,25) et d'autre part les taux de mortalité de la COVID-19 par classe d'âge rapportés par 4 pays (Chine, Italie, Suède et Etats-Unis) jusqu'au 11 mai 2020. Une corrélation linéaire parfaite entre les données épidémiologiques de CH et les taux de mortalité par COVID-19 a été retrouvée, suggérant une association statistique entre les deux.

Néanmoins, il s'agit d'une analyse statistique entre des populations très distinctes, à partir d'études non réalisées pour cette analyse, permettant uniquement d'ouvrir des pistes de recherche, sans pouvoir prédire d'un véritable lien de cause à effet. En effet, de nombreux facteurs confondants, notamment l'âge en lui-même, ne sont pas pris en compte dans l'analyse statistique et peuvent influencer grandement cette corrélation.

**Concernant les différents profils inflammatoires des patients COVID-19**, nous n'avons pas retrouvé de profils inflammatoires distincts dans notre population, en analysant les marqueurs inflammatoires recueillis (taux de leucocytes, taux de PNN, dosage de CRP, de PCT, de ferritine, de fibrinogène, de D-dimères et d'IL-6). Dans leur étude, Dupont *et al.* n'avaient pas non plus mis en évidence de profils inflammatoires distincts sur ces marqueurs (hormis sur l'IL-6) mais avaient mis en évidence 3 immunophénotypes de patients COVID-19 (120). Dans leur étude monocentrique de 96 patients de réanimation atteints de COVID-19, ils ont analysé un ensemble de variables immunologiques par méthode de « *clustering* ». Ainsi, il est apparu 3 groupes de malades aux phénotypes immunologiques dissociables : le phénotype de « déficit immunitaire humoral » avec une lymphopénie B et une hypogammaglobulinémie marquée, le phénotype « hyperinflammatoire » avec des taux de cytokines pro-inflammatoires élevés (augmentation d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$ ) et une lymphopénie T CD<sup>4+</sup> et CD<sup>8+</sup> et enfin le phénotype « dépendant du complément » avec augmentation du C3 et du C5-b9. Les patients au phénotype « hyperinflammatoire » avaient un taux de décès et une proportion d'insuffisance rénale aiguë significativement augmentés par rapport aux 2 autres phénotypes. Néanmoins, il n'y avait pas de différence entre les 3 groupes sur le recours à la ventilation mécanique, à l'épuration extra-rénale et à l'ECMO. La recherche à l'admission de ces différents phénotypes

permettrait d'individualiser les prises en charge de la COVID-19.

Toutefois, en comparaison à notre travail, les patients de cette étude étaient uniquement des patients de réanimation, avec des atteintes de la COVID-19 plus sévères que dans notre cohorte. De plus, lors de notre analyse de « *clustering* », le taux d'IL-6 était analysé uniquement de façon conjointe aux autres marqueurs inflammatoires, pouvant expliquer que nous n'ayons pas trouvé de profil inflammatoire dissociable sur cette variable de façon isolée.

## 2. Limites et points forts de notre étude

La méthode de notre étude peut être discutée.

De façon générale, notre étude est une étude observationnelle, sans randomisation des patients à l'inclusion, nous ne pouvons donc pas éliminer une hétérogénéité sur la population étudiée et sur les procédures reçues, avec de potentiels biais de sélection. De plus, c'est une étude monocentrique, occasionnant un biais effet-centre, diminuant les possibilités d'extrapolation des résultats. A l'inverse, l'inclusion des patients a été faite sur une durée courte, permettant de diminuer le biais effet-temps dans ce contexte de prise en charge thérapeutique rapidement évolutive.

**Concernant la cohorte contrôle**, cette cohorte a été réalisée à partir de données rétrospectives de NGS réalisés au laboratoire de Biologie moléculaire du CHU de Lille. Cependant, les NGS étaient envoyés depuis plusieurs centres et nous n'avions à notre disposition que l'âge et le sexe de ces patients. Nous n'avons donc pas pu confronter les comorbidités de ces patients à la cohorte COVID-19, risquant une diminution de comparabilité des groupes. De ce fait, l'absence d'appariement sur les comorbidités a

pu générer un facteur de confusion dans l'analyse statistique. Néanmoins, l'âge étant le facteur de risque majeur de COVID-19 grave et de CHIP, l'analyse statistique a été ajustée sur l'âge afin de permettre d'éviter ce facteur confondant. Mais encore, nous n'avons inclus que des patients ayant bénéficié d'un NGS avant la pandémie de COVID-19, permettant d'éliminer de façon certaine une éventuelle COVID-19 non diagnostiquée, qui serait également un facteur de confusion majeur. De plus, le grand nombre de patients inclus dans la cohorte contrôle, proche de 1 cas pour 4 témoins, renforce la puissance de l'étude.

**Concernant la cohorte COVID-19**, la majeure limite de notre étude est la mortalité particulièrement basse dans cette population, peu concordante avec la littérature, tendant à diminuer la validité externe de notre étude et donc rendant potentiellement difficile l'extrapolation des données. Cette constatation est probablement due à l'inclusion dans notre étude de cas prévalents, mélangeant nouveaux cas et cas déjà malades, constituant un biais de sélection important. Elle était néanmoins cohérente avec le chiffre de mortalité du centre à cette même période. L'ensemble des autres caractéristiques des malades restait néanmoins comparable à la littérature, permettant de maintenir une certaine validité externe.

Par ailleurs, les quelques patients classés COVID-19 modérés, non exclus de l'analyse statistique, peuvent constituer également un biais de sélection. Ceci est atténué par leur faible nombre.

Une autre limite concerne la réalisation du NGS en elle-même. En effet, la date de réalisation du NGS est hétérogène dans notre population, avec des délais entre entrée en hospitalisation et prélèvement du NGS très variables, diminuant la reproductibilité de l'étude.

**Concernant le diagnostic d'hématopoïèse clonale**, les patients de notre cohorte contrôle ne peuvent pas être complètement considérés comme des patients sains. En effet, les NGS de ces patients ont été réalisés pour la plupart dans le cadre de bilan de cytopénies inexplicées, conduisant donc à poser le diagnostic soit de CCUS soit d'ICUS (26). Pour rappel, le diagnostic de CHIP ne peut être retenu qu'en l'absence de cytopénie (15). Cependant, ce mélange de CCUS, d'ICUS et de CHIP tendrait à enrichir la population en hématopoïèse clonale et ainsi, augmenter la prévalence de CH dans la cohorte contrôle. Cela diminuerait donc l'effet retrouvé sur le risque de développer une forme sévère ou critique de COVID-19 en cas d'hématopoïèse clonale. Ainsi, la conclusion de notre étude n'est pas affectée.

De plus, dans la cohorte COVID-19, seule l'hématopoïèse clonale de façon générale a été analysée. En effet, dans ce contexte de pathologie aiguë, tous les critères diagnostiques de la CHIP n'ont pas pu être vérifiés (absence de cytopénie, absence de critère pour une hémoglobinurie paroxystique nocturne, une MGUS ou une lymphocytose monoclonale B) et pour poser le diagnostic, une consultation à distance du syndrome inflammatoire serait nécessaire. C'est donc bien l'association entre hématopoïèse clonale de façon générale et la COVID-19 sévère et/ou critique qui a été recherchée.

A noter par ailleurs, que le patient ayant dans ses antécédents un syndrome myélodysplasique (SMD) sous surveillance simple n'avait pas de mutation retrouvée sur notre panel NGS. Ce SMD peut être expliqué soit par une anomalie retrouvée uniquement sur le caryotype oncologique, soit par une *driver mutation* non recherchée sur notre panel. Malheureusement, le patient était suivi dans un centre différent du CHU

de Lille et ces informations n'ont pas pu être vérifiées. Par soucis d'uniformité, notre étude portant sur les mutations de notre panel NGS, ce patient a été classé « absence d'hématopoïèse clonale » dans notre analyse statistique. Ce choix est néanmoins discutable, mais a peu d'influence sur les analyses statistiques.

En résumé, la méthodologie de notre étude est critiquable, avec plusieurs sources de biais possibles, mais il est toutefois important de rappeler le contexte de réalisation de ce projet. Lors de la mise en place de cette étude, les systèmes de soins étaient à la fois saturés par un afflux de patients sans précédent, et en même temps l'urgence était de comprendre cette nouvelle maladie, afin de mieux prendre en charge les malades. Dans un contexte de course à la publication et d'émulation de la recherche clinique, cette étude a été mise en place sur un court délai dans le souci de faire avancer rapidement la compréhension de la COVID-19. La méthodologie pourrait donc être améliorée mais néanmoins cette étude est novatrice, permet de soulever des questions intéressantes et d'ouvrir sur de nouvelles perspectives de recherche.

### **3. Questions soulevées et perspectives**

**La principale question soulevée** par cette étude est la suivante : l'hématopoïèse clonale chez nos patients est-elle préexistante et favorise-t-elle donc la forme sévère ou critique de la COVID-19 ou est-elle secondaire à l'inflammation induite par l'infection à SARS-CoV-2?

Tout d'abord, l'inflammation favorise le développement de CH, notamment via un stimulus infectieux. L'infection exerce une pression de sélection sur les CSH, avec une

destruction des CSH sans mutation au profit des CSH mutées, plus susceptibles de survivre dans ces conditions inflammatoires grâce aux avantages en survie et en prolifération conférés par les mutations (33). Dans notre étude, les NGS ont été réalisés en cours d'hospitalisation, avec un délai médian entre début des symptômes et réalisation du NGS de 16 jours, soit pendant la période où l'inflammation induite par la COVID-19 est la plus importante. Donc l'augmentation de prévalence de CH retrouvée dans la cohorte COVID-19 pourrait être, au moins en partie, expliquée par le stimulus inflammatoire et infectieux. De plus, il a été montré sur des modèles murins que les mutants *TET2* avaient un avantage d'expansion dans des conditions d'inflammation (33,125,126). Ceci pourrait expliquer la prévalence particulièrement marquée de mutations de *TET2* dans notre population.

A l'inverse, la CHIP peut elle-même occasionner un état inflammatoire chronique avec notamment une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (47) et une inflammation de l'endothélium vasculaire par les monocytes et les macrophages issus de la population clonale (46). Cet état pourrait favoriser la survenue de formes graves de COVID-19, elles-mêmes conséquences d'un emballement inflammatoire et de lésions endothéliales. Par exemple, les mutations de *TET2* sont associées au développement de macrophages hyperinflammatoires et une sécrétion augmentée de d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-1 $\beta$  (33,125). Les patients avec CH *TET2* auraient donc une inflammation chronique particulièrement marquée et pourraient donc être plus susceptibles de développer une forme grave de COVID-19. La survenue d'une COVID-19 sévère ou critique pourrait donc induire une sélection des patients avec mutation de *TET2*, permettant également d'expliquer la prévalence augmentée de mutation de *TET2* dans notre cohorte.

Dans notre travail, nous ne disposons pas de séquençage réalisé avant la survenue de la pathologie infectieuse, ce qui ne nous permet pas de trancher formellement entre ces deux hypothèses. Néanmoins, l'étude de Bolton *et al.* a montré que l'hématopoïèse clonale était significativement associée aux formes sévères de COVID-19 chez des patients séquencés avant d'avoir développé leur infection (117). Ceci orienterait donc plus vers une hématopoïèse clonale préexistante à l'infection à SARS-CoV-2 et augmentant le risque de forme grave. Cette affirmation nécessiterait d'être confirmée par d'autres études.

A noter qu'il n'a pas été retrouvé de différence de taux d'IL-6 entre les groupes « présence » ou « absence d'hématopoïèse clonale » dans notre cohorte COVID-19. Néanmoins, l'état inflammatoire marqué induit par la COVID-19 pourrait masquer les différences de taux d'IL-6 à l'état basal. Ce dosage devrait être réalisé à distance de l'infection pour confirmer cette hypothèse chez nos patients.

**L'autre question soulevée** par notre étude est celle de l'impact de l'hématopoïèse clonale sur le grade de sévérité de la COVID-19.

En effet, lorsqu'on compare la cohorte COVID-19 à la cohorte contrôle, on constate que la présence d'une hématopoïèse clonale est associée à une augmentation du risque de forme sévère ou critique de COVID-19. Mais quand on regarde au sein de la cohorte COVID-19, on retrouve une proportion nettement moins importante de patients COVID-19 critique dans le groupe « présence de CH », comparé au groupe « absence de CH ». Le taux de transfert en réanimation était également significativement diminué.

Comme les patients avec CH sont significativement plus âgés, cette différence pourrait

être expliquée, au moins en partie, par la présence de limitations thérapeutiques préexistantes, contre-indiquant le transfert en réanimation. C'était le cas seulement pour 4 patients du groupe CH, ayant une indication théorique de transfert en réanimation mais qui sont décédés de leur COVID-19 en hospitalisation (et donc classés COVID-19 critique). Les autres patients de ce groupe n'avaient pas d'indication de transfert avec une oxygénothérapie nasale à  $\leq 4\text{L/min}$ . Aucun patient du groupe sans CH n'a eu de limitation thérapeutique.

Toutefois, cette différence de transfert en réanimation suggère également que la présence d'une hématopoïèse clonale est associée au développement d'une forme sévère de COVID-19, sans pour autant être le facteur favorisant d'une aggravation clinique vers la forme critique. L'hématopoïèse clonale ne serait donc pas impliquée dans les événements déclenchants de l'aggravation clinique (conduisant à l'intubation orotrachéale et aux autres défaillances d'organe par exemple). C'est donc d'autres comorbidités ou d'autres éléments de physiopathologie qui conduiraient à la forme critique.

Donc dans ce contexte d'inflammation chronique induit par la CHIP, l'hématopoïèse clonale augmente le risque d'être hospitalisé pour COVID-19 de façon indépendante de l'âge, mais ne prédispose pas à l'intubation orotrachéale, aux autres complications et défaillances d'organe, ni à la mortalité par COVID-19.

Par ailleurs, les formes critiques sont secondaires à un emballement inflammatoire, donc ces patients seraient plus susceptibles de développer une CH secondaire. Comme les patients critiques sont moins représentés dans le groupe « présence de CH », c'est un argument supplémentaire pour supposer qu'une majeure partie des CH dans notre cohorte était préexistante à l'infection.

**Ainsi, cette étude ouvre plusieurs perspectives :**

- **De recherche** : Afin de pouvoir vérifier de façon formelle si la CH est préexistante ou secondaire à la COVID-19, il faudrait réaliser une étude sur des patients ayant bénéficié d'un séquençage NGS avant le développement de leur COVID-19, puis contrôlé à un temps systématisé de la prise en charge (à l'admission en hospitalisation par exemple). De plus, une nouvelle étude permettrait également de comparer la prévalence des CHIP depuis l'avènement du traitement par DEXAMETHASONE dans les formes graves, ce traitement ayant pour objectif de diminuer le syndrome inflammatoire des patients. En effet, la diminution de prévalence de CH dans de telles conditions serait un argument en faveur de CH secondaire. Mais encore, une étude sur une plus grande population permettrait de confirmer ou d'infirmer le caractère protecteur de l'hématopoïèse clonale sur le transfert en réanimation des patients COVID-19 sévères. Cependant, depuis la réalisation de notre étude, l'évolution naturelle de la COVID-19 au sein de la population et le développement de la vaccination à grande échelle, conduisent l'un et l'autre à une immunité grandissante et cela rendra difficile la mise en place d'une telle étude.
- **Pour nos patients** : Que l'hématopoïèse clonale soit préexistante ou secondaire, la mise en évidence de cette grande proportion (45,1%) de CH chez nos patients COVID-19 sévère ou critique suggère un intérêt du dépistage de l'hématopoïèse clonale chez ces patients. En effet, en cas de présence d'une CH, un suivi médical au long cours pourrait être proposé, axé sur la surveillance de survenue d'hémopathies malignes et de complications cardio-vasculaires.

## CONCLUSION

Les données issues de notre étude montrent que les patients présentant une hématopoïèse clonale, même sans pathologie hématologique sous-jacente, ont un risque multiplié par trois de développer une forme grave de COVID-19. Cette étude, malgré une littérature pauvre sur le sujet et aux résultats discordants, soulève un concept nouveau, suggérant un lien entre la présence d'une mutation au NGS et l'évolution naturelle d'une maladie infectieuse et inflammatoire. Ces résultats ouvrent un champ de recherche clinique afin d'en préciser les mécanismes. Ils soulignent également la nécessité de dépister cette hématopoïèse clonale chez les patients atteints de COVID-19 sévère ou critique, afin de proposer un suivi médical et d'ainsi prévenir les complications cardiovasculaires et surveiller la survenue d'une hémopathie maligne.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Weissman IL. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell*. 7 janv 2000;100(1):157-68.
2. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. oct 2007;26(47):6715-23.
3. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. déc 2012 [cité 20 janv 2021];4(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504436/>
4. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. sept 2017;17(9):573-90.
5. Medyouf H. The microenvironment in human myeloid malignancies: emerging concepts and therapeutic implications. *Blood*. 23 mars 2017;129(12):1617-26.
6. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*. 1 juill 2005;121(7):1109-21.
7. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 16 janv 2014;505(7483):327-34.
8. 5. Hematopoietic Stem Cells | stemcells.nih.gov [Internet]. [cité 14 mai 2021]. Disponible sur: <https://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter5.htm>
9. Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*. 15 juin 2007;109(12):5494-501.
10. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 22 févr 2008;132(4):631-44.
11. Jacobsen SEW, Nerlov C. Haematopoiesis in the era of advanced single-cell technologies. *Nat Cell Biol*. janv 2019;21(1):2-8.
12. Görgens A, Ludwig A-K, Möllmann M, Krawczyk A, Dürig J, Hanenberg H, et al. Multipotent Hematopoietic Progenitors Divide Asymmetrically to Create Progenitors of the Lymphomyeloid and Erythromyeloid Lineages. *Stem Cell Rep*. 23 oct 2014;3(6):1058-72.
13. Orkin SH. Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol*. janv 1995;7(6):870-7.
14. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*. 1 févr 2012;97(2):160-7.
15. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2 juill 2015;126(1):9-16.
16. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* [Internet]. 1 nov 2019 [cité 20 janv 2021];366(6465). Disponible sur: <http://science.sciencemag.org/content/366/6465/eaan4673>
17. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related cancer mutations associated with clonal hematopoietic expansion. *Nat Med*. déc 2014;20(12):1472-8.
18. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood*. 1 févr 2018;131(5):496-504.
19. Rizzo JM, Buck MJ. Key Principles and Clinical Applications of “Next-Generation” DNA Sequencing. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 1 juill 2012;5(7):887-900.

20. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* mars 2016;13(1):3-11.
21. Bellanné-Chantelot C. « Le NGS pour les nuls » Les neutropénies congénitales à l'ère du NGS. :42. Filère Santé Maladies Rares MaRIH, vidéo disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=HCAIjwSCdw0>
22. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* mai 2015;17(5):405-24.
23. Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, Bustamante CD, Evans JP, Landrum MJ, et al. ClinGen — The Clinical Genome Resource. *N Engl J Med.* 4 juin 2015;372(23):2235-42.
24. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-98.
25. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-87.
26. DeZern AE, Malcovati L, Ebert BL. CHIP, CCUS, and Other Acronyms: Definition, Implications, and Impact on Practice. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 1 mai 2019;(39):400-10.
27. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia.* sept 2017;31(9):1869-71.
28. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood.* 22 juin 2017;129(25):3371-8.
29. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016;127(20):16.
30. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeneij LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet.* 6 juill 2017;101(1):50-64.
31. Guermouche H, Ravalet N, Gallay N, Deswarte C, Foucault A, Beaud J, et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv.* 6 août 2020;4(15):3550-7.
32. Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell.* 1 févr 2018;22(2):157-70.
33. Cook EK, Luo M, Rauh MJ. Clonal hematopoiesis and inflammation: Partners in leukemogenesis and comorbidity. *Exp Hematol.* 1 mars 2020;83:85-94.
34. Kobayashi H, Suda T, Takubo K. How hematopoietic stem/progenitors and their niche sense and respond to infectious stress. *Exp Hematol.* 1 févr 2016;44(2):92-100.
35. Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. Chronic Immune Stimulation Might Act As a Trigger for the Development of Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol.* 20 juill 2011;29(21):2897-903.

36. Coombs CC, Zehir A, Devlin SM, Kishtagari A, Syed A, Jonsson P, et al. Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell*. 7 sept 2017;21(3):374-382.e4.
37. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 10 août 2017;130(6):742-52.
38. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. janv 2017;17(1):5-19.
39. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Cohen NM, Niemeyer E, et al. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. *Nature*. juill 2018;559(7714):400-4.
40. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med*. juill 2018;24(7):1015-23.
41. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, Doss D, Khanna K, Thompson E, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol*. 1 janv 2017;18(1):100-11.
42. Gillis NK, Ball M, Zhang Q, Ma Z, Zhao Y, Yoder SJ, et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study. *Lancet Oncol*. 1 janv 2017;18(1):112-21.
43. Calvillo-Argüelles O, Jaiswal S, Shlush LI, Moselehi JJ, Schimmer A, Barac A, et al. Connections Between Clonal Hematopoiesis, Cardiovascular Disease, and Cancer: A Review. *JAMA Cardiol*. 1 avr 2019;4(4):380-7.
44. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal hematopoiesis and risk for atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 13 juill 2017;377(2):111-21.
45. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. janv 2019;4(1):32-40.
46. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv*. 27 nov 2018;2(22):3404-10.
47. Cook EK, Izukawa T, Young S, Rosen G, Jamali M, Zhang L, et al. Comorbid and inflammatory characteristics of genetic subtypes of clonal hematopoiesis. *Blood Adv*. 27 août 2019;3(16):2482-6.
48. Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J, Gao X-F, Wang D-P, Cao J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 25 nov 2020 [cité 29 mars 2021];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723891/>
49. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 28 oct 2020;1-16.
50. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 25 août 2020;324(8):782.

51. Chan VW-S, Ng HH-L, Rahman L, Tang A, Tang KP, Mok A, et al. Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1 and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 During Aerosol-Generating Procedures in Critical Care: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Crit Care Med* [Internet]. 1 mars 2021 [cité 24 mars 2021]; Publish Ahead of Print. Disponible sur: <https://journals.lww.com/10.1097/CCM.0000000000004965>
52. Lewis D. Is the coronavirus airborne? Experts can't agree. *Nature*. 2 avr 2020;580(7802):175-175.
53. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, Ong SWX, Gum M, Lau SK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun*. 29 mai 2020;11(1):2800.
54. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. juin 2020;20(6):363-74.
55. Jamilloux Y, Henry T, Belot A, Viel S, Fauter M, El Jammal T, et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmun Rev*. juill 2020;19(7):102567.
56. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 9 juill 2020;383(2):120-8.
57. Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, Fitzek A, Heinemann A, Heinrich F, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med*. 4 juin 2020;1-10.
58. Copin M-C, Parmentier E, Duburcq T, Poissy J, Mathieu D. Time to consider histologic pattern of lung injury to treat critically ill patients with COVID-19 infection. *Intensive Care Med*. 23 avr 2020;1-3.
59. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 28 févr 2020 [cité 4 avr 2021]; Disponible sur: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2002032>
60. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 10 mars 2020;172(9):577-82.
61. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. mai 2020;26(5):672-5.
62. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. mai 2020;581(7809):465-9.
63. Sun J, Xiao J, Sun R, Tang X, Liang C, Lin H, et al. Prolonged Persistence of SARS-CoV-2 RNA in Body Fluids - Volume 26, Number 8—August 2020 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [cité 5 avr 2021]; Disponible sur: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1097\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/8/20-1097_article)
64. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 20 juin 2012;307(23):2526-33.
65. Petrilli CM, Jones SA, Yang J, Rajagopalan H, O'Donnell L, Chernyak Y, et al. Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. *BMJ*. 22 mai 2020;m1966.

66. Hendren Nicholas S., Drazner Mark H., Bozkurt Biykem, Cooper Leslie T. Description and Proposed Management of the Acute COVID-19 Cardiovascular Syndrome. *Circulation*. 9 juin 2020;141(23):1903-14.
67. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. *Am J Emerg Med*. 1 juill 2020;38(7):1504-7.
68. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up. *J Am Coll Cardiol*. 16 juin 2020;75(23):2950-73.
69. Spiezia L, Boscolo A, Poletto F, Cerruti L, Tiberio I, Campello E, et al. COVID-19-Related Severe Hypercoagulability in Patients Admitted to Intensive Care Unit for Acute Respiratory Failure. *Thromb Haemost*. juin 2020;120(06):998-1000.
70. Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 4 mai 2020;1-10.
71. Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E, Duburcq T, Lassalle F, et al. Pulmonary Embolism in Patients With COVID-19: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation*. 14 juill 2020;142(2):184-6.
72. Suh YJ, Hong H, Ohana M, Bompard F, Revel M-P, Valle C, et al. Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology*. 15 déc 2020;298(2):E70-80.
73. Kennedy M, Helfand BKI, Gou RY, Gartaganis SL, Webb M, Moccia JM, et al. Delirium in Older Patients With COVID-19 Presenting to the Emergency Department. *JAMA Netw Open* [Internet]. 19 nov 2020 [cité 5 avr 2021];3(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7677760/>
74. Pun BT, Badenes R, Heras La Calle G, Orun OM, Chen W, Raman R, et al. Prevalence and risk factors for delirium in critically ill patients with COVID-19 (COVID-D): a multicentre cohort study. *Lancet Respir Med*. mars 2021;9(3):239-50.
75. Bartoletti M, Pascale R, Cricca M, Rinaldi M, Maccaro A, Bussini L, et al. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* [Internet]. 28 juill 2020 [cité 5 avr 2021]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7454393/>
76. Rouzé A, Martin-Loeches I, Pova P, Makris D, Artigas A, Bouchereau M, et al. Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Med*. 3 janv 2021;1-11.
77. Clinical Spectrum. COVID-19 Treatment Guidelines. Disponible sur: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
78. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 15 mai 2020;0(0):null.
79. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 1 juill 2020;180(7):934.
80. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl*. 2020;395(10229):1054-62.

81. Liao D, Zhou F, Luo L, Xu M, Wang H, Xia J, et al. Haematological characteristics and risk factors in the classification and prognosis evaluation of COVID-19: a retrospective cohort study. *Lancet Haematol.* sept 2020;7(9):e671-8.
82. Rauch A, Labreuche J, Lassalle F, Goutay J, Caplan M, Charbonnier L, et al. Coagulation biomarkers are independent predictors of increased oxygen requirements in COVID-19. *J Thromb Haemost JTH.* nov 2020;18(11):2942-53.
83. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med.* oct 2020;26(10):1636-43.
84. Akl EA, Blažić I, Yaacoub S, Frija G, Chou R, Appiah JA, et al. Use of Chest Imaging in the Diagnosis and Management of COVID-19: A WHO Rapid Advice Guide. *Radiology.* 30 juill 2020;298(2):E63-9.
85. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology.* 20 févr 2020;295(3):200463.
86. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nat Mater.* 15 févr 2021;1-13.
87. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 1 June 2021. Disponible sur: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---1-june-2021>
88. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 7 avr 2020;323(13):1239.
89. Rimmelé T, Pascal L, Polazzi S, Duclos A. Organizational aspects of care associated with mortality in critically ill COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 1 janv 2021;47(1):119-21.
90. COVID-ICU Group on behalf of the REVA Network and the COVID-ICU Investigators. Clinical characteristics and day-90 outcomes of 4244 critically ill adults with COVID-19: a prospective cohort study. *Intensive Care Med.* janv 2021;47(1):60-73.
91. Ko JY, Danielson ML, Town M, Derado G, Greenlund KJ, Kirley PD, et al. Risk Factors for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)–Associated Hospitalization: COVID-19–Associated Hospitalization Surveillance Network and Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Clin Infect Dis.* 18 sept 2020;ciaa1419.
92. Simonnet A, Chetboun M, Poissy J, Raverdy V, Noulette J, Duhamel A, et al. High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. *Obes Silver Spring Md* 9 avr 2020 Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7262326/>
93. Derosa L, Melenotte C, Griscelli F, Gachot B, Marabelle A, Kroemer G, et al. The immuno-oncological challenge of COVID-19. *Nat Cancer.* 2 oct 2020;1-19.
94. Papazian L, Aubron C, Brochard L, Chiche J-D, Combes A, Dreyfuss D, et al. Management of early Acute Respiratory Distress Syndrome in adults. :34.
95. Hager DN, Krishnan JA, Hayden DL, Brower RG. Tidal Volume Reduction in Patients with Acute Lung Injury When Plateau Pressures Are Not High. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 nov 2005;172(10):1241-5.

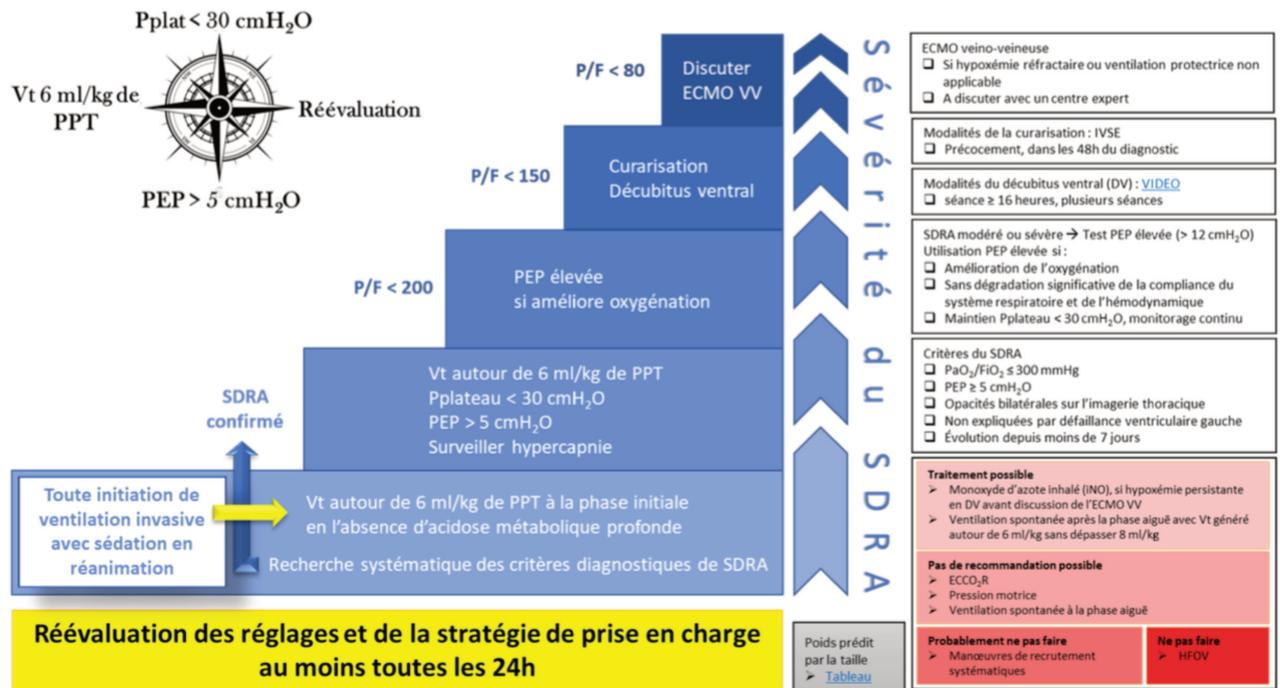
96. Robba C, Ball L, Battaglini D, Cardim D, Moncalvo E, Brunetti I, et al. Early effects of ventilatory rescue therapies on systemic and cerebral oxygenation in mechanically ventilated COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome: a prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 19 mars 2021;25(1):111.
97. Tavazzi G, Pozzi M, Mongodi S, Dammassa V, Romito G, Mojoli F. Inhaled nitric oxide in patients admitted to intensive care unit with COVID-19 pneumonia. *Crit Care Lond Engl*. 17 août 2020;24(1):508.
98. Caplan M, Goutay J, Bignon A, Jaillette E, Favory R, Mathieu D, et al. Almitrine Infusion in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome: A Single-Center Observational Study\*. *Crit Care Med*. févr 2021;49(2):e191.
99. Susen S, Tacquard CA, Godon A, Mansour A, Garrigue D, Nguyen P, et al. Prevention of thrombotic risk in hospitalized patients with COVID-19 and hemostasis monitoring. *Crit Care Lond Engl*. 19 juin 2020;24(1):364.
100. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*. 4 juin 2020;135(23):2033-40.
101. INSPIRATION Investigators, Sadeghipour P, Talasaz AH, Rashidi F, Sharif-Kashani B, Beigmohammadi MT, et al. Effect of Intermediate-Dose vs Standard-Dose Prophylactic Anticoagulation on Thrombotic Events, Extracorporeal Membrane Oxygenation Treatment, or Mortality Among Patients With COVID-19 Admitted to the Intensive Care Unit: The INSPIRATION Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 18 mars 2021;
102. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*. mai 2020;395(10236):1569-78.
103. Horby PW, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Emberson J, et al. Lopinavir-ritonavir in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *The Lancet*. 5 oct 2020;0(0). Disponible sur: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)32013-4/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)32013-4/abstract)
104. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Mafham M, Linsell L, Bell JL, Staplin N, et al. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 19 nov 2020;383(21):2030-40.
105. Simonovich VA, Burgos Prats LD, Scibona P, Beruto MV, Vallone MG, Vázquez C, et al. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia. *N Engl J Med*. 18 févr 2021;384(7):619-29.
106. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med* [Internet]. 28 oct 2020 [cité 24 mars 2021]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7646625/>
107. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, et al. Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination With Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 16 févr 2021;325(7):632.
108. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 25 févr 2021;384(8):693-704.

109. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet Lond Engl.* 1 mai 2021;397(10285):1637-45.
110. CORIMUNO-19 Collaborative group. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* mars 2021;9(3):295-304.
111. Hermine O, Mariette X, Tharaux P-L, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, et al. Effect of Tocilizumab vs Usual Care in Adults Hospitalized With COVID-19 and Moderate or Severe Pneumonia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 1 janv 2021;181(1):32-40.
112. REMAP-CAP Investigators, Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, Rowan KM, Nichol AD, et al. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 22 avr 2021;384(16):1491-502.
113. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on « sepsis-related problems » of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med.* nov 1998;26(11):1793-800.
114. Gall J-RL, Lemeshow S, Saulnier F. A New Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) Based on a European/North American Multicenter Study. *JAMA.* 22 déc 1993;270(24):2957-63.
115. Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, France. Multi-centre, Adaptive, Randomized Trial of the Safety and Efficacy of Treatments of COVID-19 in Hospitalized Adults [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 avr. Report No.: NCT04315948. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04315948>
116. Duployez N, Demonchy J, Berthon C, Goutay J, Caplan M, Moreau A-S, et al. Clinico-Biological Features and Clonal Hematopoiesis in Patients with Severe COVID-19. *Cancers.* 21 juill 2020;12(7).
117. Bolton KL, Koh Y, Foote MB, Im H, Jee J, Sun CH, et al. Clonal hematopoiesis is associated with risk of severe Covid-19. *MedRxiv Prepr Serv Health Sci.* 27 nov 2020;
118. Hameister E, Stolz SM, Fuhrer Y, Thienemann F, Schaer DJ, Nemeth J, et al. Clonal Hematopoiesis in Hospitalized Elderly Patients With COVID-19. *HemaSphere.* août 2020;4(4):e453.
119. Shivarov V, Ivanova M. Clonal haematopoiesis and COVID-19: A possible deadly liaison. *Int J Immunogenet.* août 2020;47(4):329-31.
120. Dupont T, Caillat-Zucman S, Fremeaux-Bacchi V, Morin F, Lengliné E, Darmon M, et al. Identification of Distinct Immunophenotypes in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients. *Chest [Internet].* 11 déc 2020 [cité 27 mars 2021]; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831685/>
121. Bolton KL, Ptashkin RN, Gao T, Braunstein L, Devlin SM, Kelly D, et al. Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* nov 2020;52(11):1219-26.
122. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020;95(12):1599-613.

123. Zhang Y, Zhou Y, Wang Y, Teng G, Li D, Wang Y, et al. Thrombosis among 1537 patients with JAK2V617F-mutated myeloproliferative neoplasms: Risk factors and development of a predictive model. *Cancer Med.* 28 janv 2020;9(6):2096-105.
124. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med.* 11 avr 2018;10(436).
125. Abegunde SO, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. An inflammatory environment containing TNF $\alpha$  favors Tet2-mutant clonal hematopoiesis. *Exp Hematol.* 1 mars 2018;59:60-5.
126. Cai Z, Kotzin JJ, Ramdas B, Chen S, Nelanuthala S, Palam LR, et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis. *Cell Stem Cell.* 6 déc 2018;23(6):833-849.e5.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Schéma récapitulatif des Recommandations Formalisées d'Experts de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF) concernant la prise en charge du SDRA de l'adulte à la phase initiale (94)



**Annexe 2 : Score Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), d'après Vincent et al., 1998 (113)**

Le score SOFA est une méthode de description des dysfonctions ou défaillances d'organe des patients et permet, de façon simple, la comparaison de gravité des patients dans les études cliniques. Ce score est détaillé dans le tableau ci-dessous.

	SOFA Score				
	0	1	2	3	4
<b>Respiration</b>					
Pao <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> (torr)	>400	≤400	≤300	≤200 With respiratory support	≤100 With respiratory support
<b>Coagulation</b>					
Platelets (×10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	>150	≤150	≤100	≤50	≤20
<b>Liver</b>					
Bilirubin (mg/dL)	<1.2	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0–11.9	>12.0
(μmol/L)	<20	20–32	33–101	102–204	>204
<b>Cardiovascular</b>					
Hypotension	No hypotension	MAP <70 mm Hg	Dopamine ≤5 or dobutamine (any dose) <sup>a</sup>	Dopamine >5 or epi ≤0.1 or norepi ≤0.1 <sup>a</sup>	Dopamine >15 or epi >0.1 or norepi >0.1 <sup>a</sup>
<b>Central Nervous System</b>					
Glasgow Coma Score	15	13–14	10–12	6–9	<6
<b>Renal</b>					
Creatinine (mg/dL)	<1.2	1.2–1.9	2.0–3.4	3.5–4.9	>5.0
(μmol/L)	<110	110–170	171–299	300–440	>440
or urine output				or <500 mL/day	or <200 mL/day

epi, epinephrine; norepi, norepinephrine.

<sup>a</sup>Adrenergic agents administered for at least 1 hr (doses given are in μg/kg/min).

To convert torr to kPa, multiply the value by 0.1333.

### **Annexe 3 : Index de Gravité Simplifié (IGS II), d'après Le Gall et al., 1993 (114)**

L'Index de Gravité Simplifié (IGS II) ou Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) comprend 17 variables :

- 12 variables cliniques et biologiques (fréquence cardiaque, pression artérielle, température, ratio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , diurèse des 24h, urémie, taux de leucocytes, kaliémie, natrémie, bilirubinémie totale, taux de bicarbonates sanguins, Glasgow Coma Score)
- Age
- Type d'admission (Chirurgie programmée, chirurgie non programmée, médical)
- 3 variables sur les antécédents médicaux (syndrome d'Immunodéficience acquise, hémopathie maligne, cancer métastatique)

Le score obtenu, calculé sur les premières 24h d'hospitalisation, en utilisant le tableau ci-dessous, est ensuite converti par un modèle de régression logistique multiple en probabilité de mortalité hospitalière, sans nécessité d'avoir obtenu le diagnostic.

Table 3.—SAPS II Scoring Sheet\*

Variable	Points:	26	13	12	11	9	7	6	5	4	3	2	0
Age, y													<40
Heart rate, beats/min					<40							40-69	70-119
Systolic BP, mm Hg			<70						70-99				100-199
Body temperature, °C (°F)													<39° (<102.2°)
Only if ventilated or continuous pulmonary artery pressure PaO <sub>2</sub> , mm Hg/FiO <sub>2</sub>					<100	100-199			≥200				
PaO <sub>2</sub> , kPa/FiO <sub>2</sub>					<13.3	13.3-26.5			≥26.6				
Urinary output, L/d					<0.500					0.500-0.999			≥1.000
Serum urea level, mmol/L (g/L) or serum urea nitrogen level, mg/dL													<10.0 (<0.60) <28
WBC count (10 <sup>9</sup> /cu mm)				<1.0									1.0-19.9
Serum potassium, mmol/d											<3.0		3.0-4.9
Serum sodium level, mmol/L									<125				125-144
Serum bicarbonate level, mEq/L								<15			15-19		≥20
Bilirubin level, μmol/L (mg/dL)													<68.4 (<4.0)
Glasgow Coma Score	<6	6-8					9-10			11-13			14-15
Chronic diseases													
Type of admission													Scheduled surgical
Sum of points													

\*SAPS indicates Simplified Acute Physiology Score; BP blood pressure; FiO<sub>2</sub>, fraction of inspired oxygen; kPa, kilopascal; WBC, white blood cell; and AIDS, acquired immunodeficiency syndrome.

1	2	3	4	6	7	8	9	10	12	15	16	17	18
					40-59				60-69	70-74	75-79		≥80
			120-159		≥160								
	≥200												
		≥39° (≥102.2°)											
				10.0-29.9 (6.0-1.79) 28-83				≥30.0 (≥1.80) ≥84					
		≥20.0											
		≥5.0											
≥145													
			68.4-102.5 (4.0-5.9)					≥102.6 (≥6.0)					
							Metastatic cancer	Hematologic malignancy					AIDS
				Medical		Unscheduled surgical							
										Total SAPS II Score =		Points	
										Risk of Hospital Death =		%	

**Annexe 4 : Prévalence des mutations retrouvées chez les patients avec hématoïèse clonale des cohortes COVID-19 et contrôle**

	<b>Cohorte COVID-19 n=122</b>	<b>Cohorte contrôle n=465</b>
<b>Mutations, n (%)</b>		
<i>DNMT3A</i>	28 (23,0)	68 (14,6)
<i>TET2</i>	26 (21,3)	32 (6,9)
<i>ASXL1</i>	7 (5,7)	3 (0,6)
<i>TP53</i>	5 (4,1)	1 (0,2)
<i>CBL</i>	3 (2,5)	3 (0,6)
<i>SF3B1</i>	1 (0,8)	2 (0,4)
<i>SRSF2</i>	2 (1,6)	1 (0,2)
<i>IDH2</i>	1 (0,8)	0
<i>U2AF1</i>	1 (0,8)	3 (0,6)
<i>STAG2</i>	1 (0,8)	1 (0,2)
<i>SMC1A</i>	1 (0,8)	1 (0,2)
<i>BCORL1</i>	1 (0,8)	1 (0,2)
<i>JAK2</i>	1 (0,8)	NA
<i>PTPN11</i>	1 (0,8)	NA
<i>GATA2</i>	1 (0,8)	NA
<i>PHF6</i>	1 (0,8)	NA
<i>EZH2</i>	NA	1 (0,2)
<i>ZRSR2</i>	NA	3 (0,6)
<b>Hématopoïèse clonale par groupe d'âge, n (%*)</b>		
< 60 ans	11 (25,6)	10 (5,9)
60-69 ans	11 (32)	23 (21,1)
70-79 ans	15 (57,7)	46 (37,7)
≥ 80 ans	18 (85,7)	27 (41,5)

NA : non acquis. \*Prévalence par groupe d'âge, % calculé par rapport au nombre de patient dans chaque groupe d'âge

# **Clinico-Biological Features and Clonal Hematopoiesis in Patients with Severe COVID-19**

Nicolas Duployez <sup>1,2,\*†</sup>, Jordane Demonchy <sup>1,2,3,†</sup>, Céline Berthon <sup>1,2,†</sup>, Julien Goutay <sup>3</sup>, Morgan Caplan <sup>3</sup>, Anne-Sophie Moreau <sup>3</sup>, Anne Bignon <sup>4</sup>, Alice Marceau-Renaut <sup>1,2</sup>, Delphine Garrigue <sup>4,5</sup>, Imelda Raczkiewicz <sup>1,2</sup>, Sandrine Geayroy <sup>2</sup>, Maxime Bucci <sup>2</sup>, Kazali Alidjinou <sup>6</sup>, Julie Demaret <sup>7</sup>, Myriam Labalette <sup>7</sup>, Thierry Brousseau <sup>8</sup>, Annabelle Dupont <sup>9,10</sup>, Antoine Rauch <sup>9,10</sup>, Julien Poissy <sup>3</sup>, Sophie Susen <sup>9,10</sup>, Claude Preudhomme <sup>1,2</sup>, Bruno Quesnel <sup>1,2</sup> and on behalf of the Lille Covid Research Network (LICORNE)

<sup>1</sup>UMR 9020–UMR-S 1277–Canther–Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France; jordane.demonchy@gmail.com (J.D.); celine.berthon@chru-lille.fr (C.B.); alice.marceau@chru-lille.fr (A.M.-R.); imelda.raczkiewicz.etu@univ-lille.fr (I.R.); claude.preudhomme@chru-lille.fr (C.P.); bruno.quesnel@chru-lille.fr (B.Q.)

<sup>2</sup>Department of Hematology, CHU Lille, F-59000 Lille, France; sandrine.vandermeersch@chru-lille.fr (S.G.); maxime.bucci@chru-lille.fr (M.B.)

<sup>3</sup>Department of Intensive Care, CHU Lille, F-59000 Lille, France; julien.goutay@chru-lille.fr (J.G.); morgan.caplan@chru-lille.fr (M.C.); annesophie.moreau@chru-lille.fr (A.-S.M.); julien.poissy@chru-lille.fr (J.P.)

<sup>4</sup>Department of Anesthesia and Critical Care, CHU Lille, F-59000 Lille, France; anne.bignon@chru-lille.fr (A.B.); delphine.garrigue@chru-lille.fr (D.G.)

<sup>5</sup>Department of Emergency, CHU Lille, F-59000 Lille, France

<sup>6</sup>Department of Virology, CHU Lille, F-59000 Lille, France; enagnonkazali.alidjinou@chru-lille.fr

<sup>7</sup>Department of Immunology, CHU Lille, F-59000 Lille, France; julie.demaret@chru-lille.fr (J.D.); myriam.labalette@chru-lille.fr (M.L.)

<sup>8</sup>Department of Biochemistry, CHU Lille, F-59000 Lille, France; thierry.brousseau@chru-lille.fr

<sup>9</sup>UMR1011-EGID, Pasteur Institute of Lille, University Lille, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France; annabelle.dupont@chru-lille.fr (A.D.); antoine.rauch@chru-lille.fr (A.R.); sophie.susen@chru-lille.fr (S.S.)

<sup>10</sup>Department of Hemostasis, CHU Lille, F-59000 Lille, France

\* Correspondence: nicolas.duployez@chru-lille.fr † These authors equally contributed to this work.

**Abstract:** Advanced age or preexisting comorbidities have been characterized as risk factors for severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases requiring hospitalization and intensive care. In recent years, clonal hematopoiesis (CH) of indeterminate potential (CHIP) has emerged as a risk factor for chronic inflammatory background and subsequent aging-associated diseases. The purpose of this study was to identify biological factors (particularly leukocyte subtypes and inflammatory markers) associated with a risk of clinical deterioration (i.e., orotracheal intubation (OTI)) and to determine whether CH was likely to influence clinical and biological behavior in patients with severe COVID-19 requiring hospitalization. Here, we describe clinical and biological features, including the screening of CHIP mutants in a well-annotated cohort of 122 hospitalized patients with a laboratory-confirmed diagnosis of COVID-19 (55% requiring OTI). We showed that elevated white blood cell counts, especially neutrophils and high C-reactive protein (CRP) levels at admission, were associated with an increased requirement of OTI. We noticed a high prevalence of CH (25%, 38%, 56%, and 82% of patients aged <60 years, 60–70 years, 70–80 years, and >80 years) compared to a retrospective cohort of patients free of hematological malignancy explored with the same pipelines (10%, 21%, 37%, and 44%). However, the existence of CH did not significantly impact clinical outcome, including OTI or death, and did not correlate with other laboratory findings.

**Keywords:** SARS-CoV-2; COVID-19; clonal hematopoiesis; CHIP; sequencing; *DNMT3A*; *TET2*

## Introduction

In December 2019, the world faced an outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Although a large proportion of affected patients present with little or mild flu-like symptoms, the disease may cause severe or fatal complications in some people. This has led to research efforts to identify people at higher risk of severe illness and death. Advanced age or preexisting diseases, such as hypertension, cardiovascular diseases, obesity, diabetes, chronic respiratory diseases, or cancers, have been characterized as risk factors for severe COVID-19 cases requiring hospitalization and intensive care [1]. Severe complications have been attributed, at least in part, to hyperinflammation and inappropriate cytokine release [2]. Serum profiling of COVID-19 patients has revealed a distinct inflammatory response characterized by high levels of interleukin-6 (IL-6) and reduced type I interferon [3].

In recent years, large-scale sequencing studies have demonstrated that detectable somatic mutations are common in the peripheral blood of healthy individuals, especially at advanced ages [4–7]. This condition, named clonal hematopoiesis (CH) of indeterminate potential (CHIP), implies that genes recurrently mutate in myeloid hematological malignancies, among which the master epigenetic regulators DNA-

methyltransferase 3A (*DNMT3A*) and its partner Tet-methylcytosine dioxygenase 2 (*TET2*) are the most frequently involved [8]. The etiology, biological impact on hematopoiesis, and evolution of individuals with CHIP currently represent notable fields of research. Case control studies have shown that CHIP was associated with a higher risk of hematological cancer [4,5], as expected, but also with an increase in incident coronary heart disease, ischemic stroke and all-cause mortality [4,9,10], and chronic obstructive pulmonary disease [6,7]. Interestingly, further studies have suggested a connection between cytokine-mediated processes and CHIP [6,9,11–14], with higher serum IL-6 [15] and C-reactive protein (CRP) [16] levels in CHIP carriers. Studies using murine models have also demonstrated that *Dnmt3a*- and *Tet2*-deficient animals were characterized by impaired production of type I interferon and increased IL-6 production, respectively, compared to wild-type mice [12,17].

Considering the putative connection between CHIP and comorbidities or inappropriate inflammatory responses (both of which have been associated with more severe forms of COVID-19), we assumed that patients with severe COVID-19 could be characterized by a distinct CHIP profile. We therefore conducted an observational study of individuals referred to our center during the COVID-19 pandemic. In this report, we describe clinical and biological features, including the screening of CHIP mutants, in a well-annotated cohort of 122 hospitalized patients with a laboratory-confirmed diagnosis of COVID-19 (55% requiring orotracheal intubation (OTI) in the intensive care unit (ICU)) at the Centre Hospitalier Universitaire de Lille (CHU Lille, France).

## **Méthods**

### *Patients and samples*

All patients with a laboratory-confirmed diagnosis of COVID-19 who were hospitalized at the CHU Lille and had a complete blood count (CBC) performed between 8 April and 23 April 2020 were enrolled in this study ( $n = 122$ ). The CHU Lille is the tertiary care center for Nord-Pas-de-Calais, France (approximately 4 million inhabitants). All patients were positive for SARS-CoV-2 infection, as determined using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [18]. Samples used for CBC were stored for DNA extraction. A trained team of physicians prospectively collected and reviewed the epidemiological data, past medical history, treatments, clinical and biological data, and outcomes in these patients [19]. This observational study was based on medical records and was in strict compliance with the French reference methodology MR-004 and approved by the Institutional Data Protection Authority of CHU Lille. This study was approved by the French institutional authority for personal data protection (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL), registration number DEC20-086), and ethics committee (ID-CRB 2020-A00763-36). The protocol was registered as a

clinical trial (registration numbers NCT-04327180 and NCT-04341792 for patients admitted to ICU and patients who consulted in the emergency department, respectively).

A retrospective cohort of 376 patients free of hematological malignancy and screened for mutations with the same pipeline before the COVID-19 pandemic was used for comparison. Briefly, samples from 1833 patients were sequenced between January 2019 and January 2020 at the Laboratory of Hematology of CHU Lille (see details of gene panel and pipeline below). Samples obtained prior to January 2019 were not selected because of subtle changes in bioinformatics pipelines that could have affected the sensitivity threshold of the sequencing. Physicians who performed the analyses prospectively registered final diagnoses during this period. Among these patients, 479 (26%) were diagnosed with acute myeloid leukemia, 152 (8%) with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, 253 (14%) with myeloproliferative neoplasms, and 573 (31%) with myelodysplastic syndromes. The 376 remaining patients (21%) did not meet sufficient criteria for a diagnosis of hematological malignancy and were considered to have ICUS (idiopathic cytopenia of undetermined significance), CCUS (clonal cytopenia of undetermined significance), or CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) and were used for comparison. High-throughput sequencing (HTS) technology and pipelines were identical to those used for COVID-19-positive individuals. This retrospective cohort comprised 185 males and 191 females. Median age was 69 years (range, 50–93). Age groups were distributed as follows: <60 years:  $n = 82$  (22%); (60–70 years):  $n = 108$  (29%); (70–80 years):  $n = 129$  (34%); >80 years:  $n = 57$  (15%).

### *Molecular analyses*

Genomic DNA extracted from whole blood was studied by HTS of 36 genes recurrently mutated in myeloid malignancies. The studied panel included genes encoding proteins involved in kinase signaling (*CALR* (exon 9), *CBL* (exons 8–9), *CSF3R* (exons 14–18), *FLT3* (exon 20), *JAK2* (exons 12, 14), *KIT* (exons 8–11, 17), *KRAS* (exons 2–3), *MPL* (exon 10), *NRAS* (exons 2–3), *PTPN11* (exons 3, 13), *RIT1* (exon 5), *SETBP1* (exon 4)), transcription factors (*ETV6* (exons 1–8), *GATA2* (exons 2–6), *RUNX1* (exons 1–6)), tumor suppressors (*PHF6* (exons 2–10), *TP53* (exons 3–11), *WT1* (exons 7, 9)), chromatin modifiers (*ASXL1* (exons 11–12), *BCOR* (exons 2–15), *BCORL1* (exons 1–12), *EZH2* (exons 2–20)), DNA methylation (*DNMT3A* (exons 2–23), *IDH1* (exon 4), *IDH2* (exon 4), *TET2* (exons 3–11)), cohesin complex (*NIPBL* (exons 2–47), *RAD21* (exons 2–14), *SMC1A* (exons 1–25), *SMC3* (exons 1–29), *STAG2* (exons 3–35)), RNA splicing (*SF3B1* (exons 13–16), *SRSF2* (exon 1), *U2AF1* (exons 2, 6), *ZRSR2* (exons 1–11)), and *NPM1* (exon 11). Notably, our panel did not include *PPM1D*, for which mutations have been frequently reported in CHIP, especially in patients treated for prior non-hematological cancer. Libraries were prepared using the Ampliseq System, according to the manufacturer's instructions, and run on Ion S5 (Thermo Fisher,

Waltham, MA, USA). Raw data were analyzed with both Torrent Browser (Thermo Fisher) and SeqNext (JSI Medical System, Los Angeles, CA, USA) and visualized with the homemade NGS report software v1 (CHU Lille). Due to technical limitations of the HTS technology on Ion S5, sequencing of the *ASXL1* hotspot (c.1934dupG) was screened by fragment analysis and subsequent Sanger sequencing in all samples. Thus, the sensitivity threshold for this mutational hotspot was supposed to be 10% of the variant allele frequency (VAF).

Most reports use a VAF of at least 2% to define CHIP, which represents the sensitivity threshold of current HTS technologies used in the clinical setting [20]. Sequencing data variability and threshold of our HTS technology were determined by serial sequencing of the multiplex NGS Tru-Q DNA 7 (Horizon Diagnostics, Cambridge, UK). In our hands, the measured VAF for a variant with an expected VAF of 2% will be between 1.1% and 2.9%. A high depth of coverage (>1500 X) was obtained for all CHIP-associated genes [4] in this panel (Figure S1) and mutations were detected until a filtered VAF of 1.5%–2% was obtained, with at least 20 reads carrying the variant (Table S1). The median depth of coverage was 3720 X and 2629 X for *DNMT3A* and *TET2* full genes, respectively.

Variant interpretation was performed considering minor allele frequencies (MAF) in the public GnomAD database of polymorphisms (variants with MAF > 0.02 in overall population/global ancestry or sub-continental ancestry were excluded), prevalence, and interpretation in our in-house database of more than 8000 samples validated for a clinical purpose and VAF compatibility with a somatic state. Additional in silico predictions were performed when possible. Frameshift and nonsense variants were always considered as relevant mutations. Single nucleotide variant effects on protein function were predicted using SIFT (Sorting Tolerant from Intolerant) and PolyPhen-2. The effects of splicing variants were predicted with Human Splicing Finder version 3.1. Additional criteria for the classification of variants as somatic driver mutations are given in Table S2. The exclusion of sequencing artifacts was performed by estimating the sequencing noise at identified variants' positions in other DNA samples. No variants identified in the present study were found in 65 serial sequencings of a commercial genomic negative DNA (CytoScan™ Reagent Kit Components, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Since genetic background and polymorphisms could give rise to some artifacts, we also ensured that no identified variants were found more than expected in a series of 4240 DNA samples from patients suspected of myeloid malignancies (Table S3). Finally, in 9 patients with identified variants (12 different somatic mutations), we repeated the sequencing in another sample (DNA sampled on the day of admission, i.e., between 7 and 16 days before the first analysis) and confirmed the results (Figure S2).

### *Laboratory blood dosages and CBC*

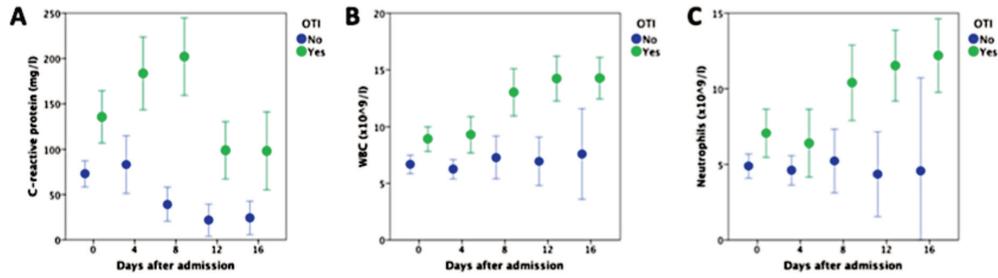
Laboratory blood dosages and CBC were prospectively assessed by standard methods as part of patient care at the Biology and Pathology Center (CHU Lille). Serum IL-6 levels were determined using a human IL-6 BD OptEIA enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. This assay had a range of 2.5–300 pg/mL.

### *Statistical analyses*

The purpose of this study was to identify biological factors (particularly leukocyte subtypes and inflammatory markers) associated with a risk of clinical deterioration (i.e., OTI) and to determine whether CH was likely to influence clinical and biological behavior in patients with severe COVID-19 requiring hospitalization. Hospitalization in the ICU per se was not considered appropriate since the criteria for admission changed during the pandemic. Total CH rate, *DNMT3A*, and *TET2* mutations were tested successively. The Mann–Whitney U test or t-test (continuous variables) and chi-square test or Fisher's exact test (categorical variables) were used for comparisons between groups. Binary logistic regression was used to determine odds ratios (ORs). A 2-sided *p*-value of 0.05 or less was considered to be statistically significant. All statistical tests were performed with the SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) software package.

## **Results**

The cohort of hospitalized COVID-19 patients included 93 males and 29 females. The median age was 65 years (range, 22–95). Among these patients, 89 (73%) were transferred to the ICU during hospitalization and 67 (55%) required OTI. Twenty-two (18%) and six (5%) patients experienced venous thromboembolic disease (pulmonary embolism, *n* = 18; deep vein thrombosis, *n* = 4) and arterial disease (strokes, *n* = 4; myocardial infarction, *n* = 2), respectively. At the time of this report, 95 patients were cured (defined by discharge from the hospital), 17 died (mortality rate: 15%), and 10 were still hospitalized. High levels of white blood cell count (WBC), especially neutrophils and C-reactive protein, were associated with more severe forms, defined by an increased requirement of OTI (Figure 1). ORs for OTI were 3.647 (95% CI: 1.264–10.529, *p* = 0.017), 1.196 (95% CI: 1.054–1.358, *p* = 0.006), and 1.286 (95% CI: 1.053–1.570, *p* = 0.013) for logCRP, WBC, and neutrophil counts (considered as continuous variables), respectively. Other characteristics of COVID-19 patients are reported in Table 1. In the absence of samples collected prior to the COVID-19 outbreak, we assumed that the observed biological data were the result of both the patient's previous condition and infectious disease.



**Figure 1.** Kinetics of laboratory values (mean (95% CI)) during hospitalization in COVID-19 patients according to the requirement (green) or not (blue) of orotracheal intubation (OTI). (A) C-reactive protein; (B) white blood cell count (WBC); (C) neutrophils.

**Table 1.** Clinical and biological characteristics of COVID-19 patients.

Characteristics	All COVID-19 Patients	Clonal Hematopoiesis-Negative	Clonal Hematopoiesis-Positive	p-Value
Number of patients	122	67	55	
Male/Female, sex ratio (%)	93/29 (76%)	52/15 (78%)	41/14 (75%)	0.831
Median age, years (range)	65 (22–95)	60.2 (22.2–87.3)	71.7 (29.5–94.6)	<0.001
<60 years	44 (36%)	33 (49%)	11 (20%)	<0.001
(60–70 years)	29 (24%)	18 (27%)	11 (20%)	
(70–80 years)	27 (22%)	12 (18%)	15 (27%)	
>80 years	22 (18%)	4 (6%)	18 (33%)	
Body-mass index, kg/m <sup>2</sup> (median (range))	28.9 (15.1–53.3)	29.8 (16.6–53.3)	28 (15.1–41.9)	0.249
Medical history (n (%))				
Smoking	21 (17%)	10 (15%)	11 (20%)	0.480
Diabete	34 (28%)	18 (27%)	16 (29%)	0.841
Respiratory illness	30 (25%)	17 (25%)	13 (24%)	1.000
Cardiac failure	17 (14%)	8 (12%)	9 (16%)	0.601
Arterial hypertension	65 (53%)	31 (46%)	34 (62%)	0.102
Stroke	10 (8%)	3 (4%)	7 (13%)	0.183
Myocardial infarction, obliterative arterial disease	14 (11%)	4 (6%)	10 (18%)	0.046
Cirrhosis	3 (2%)	2 (3%)	1 (2%)	1.000
Renal insufficiency	11 (9%)	5 (7%)	6 (11%)	0.541
Hematological malignancy	6 (5%)	4 (6%)	2 (4%)	0.689
Solid tumor	10 (8%)	3 (4%)	7 (13%)	0.183
Immunodepression	9 (7%)	7 (10%)	2 (4%)	0.183
Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) *, median (range)	40 (12–83)	39 (12–83)	41 (21–81)	0.807
Symptoms at admission (n (%))				
Fever	101 (83%)	57 (85%)	44 (80%)	0.480
Cough	82 (67%)	43 (64%)	39 (71%)	0.446
Expectorations	14 (11%)	7 (10%)	7 (13%)	0.779
Dyspnea	111 (91%)	64 (96%)	47 (85%)	0.064
Headache	7 (6%)	5 (8%)	2 (4%)	0.453
Tiredness	80 (66%)	46 (69%)	34 (62%)	0.450
Muscle pain	28 (23%)	16 (24%)	12 (22%)	0.832
Gastrointestinal symptoms	34 (28%)	25 (37%)	9 (16%)	0.014
Otolaryngeal symptoms	16 (13%)	7 (10%)	9 (16%)	0.422
Measures at admission (median (range))				
Heart rate (bpm)	94 (50–147)	93.5 (50–141)	95.5 (59–147)	0.756
Systolic blood pressure (mm Hg)	124 (58–200)	127 (80–200)	118 (58–160)	0.111
Diastolic blood pressure (mm Hg)	66.5 (40–124)	67.5 (41–124)	66 (40–124)	0.751
Mean blood pressure (mm Hg)	83 (51–141)	84.5 (55–141)	81.5 (51–133)	0.722
Body temperature (°C)	37.7 (34.5–40.6)	37.7 (35.5–40.6)	37.6 (34.5–39.7)	0.525
Respiratory rate (rpm)	24 (10–47)	24 (13–51)	23 (10–47)	0.819

Table 1. Cont.

Characteristics	All COVID-19 Patients	Clonal Hematopoiesis-Negative	Clonal Hematopoiesis-Positive	p-Value
Laboratory findings (median (range))				
White blood cell count (number $\times 10^9/L$ )	8.1 (2–28.2)	8.8 (2–28.2)	7.8 (2.5–26.8)	0.762
Neutrophils (number $\times 10^9/L$ )	6.2 (0.9–24.3)	6.4 (0.9–24.3)	5.6 (1.5–22.5)	0.931
Lymphocytes (number $\times 10^9/L$ )	1 (0–4.2)	1.2 (0–4.2)	1 (0.3–2.4)	0.254
Monocytes (number $\times 10^9/L$ )	0.6 (0–1.5)	0.6 (0–1.3)	0.7 (0–1.5)	0.801
Red blood cell count (number $\times 10^{12}/L$ )	3.5 (1.9–5.1)	3.4 (1.9–5.1)	3.6 (2.4–5.1)	0.175
Hemoglobin concentration (g/L)	10.3 (5.7–15.1)	10.2 (5.7–15.1)	10.4 (7.1–14.4)	0.291
Hematocrit (%)	31.7 (18.2–44.5)	31.6 (18.2–44)	32.6 (22.4–44.5)	0.184
Mean cell volum (fl)	90.3 (80–107.5)	90.6 (80–107.5)	89.6 (80.5–99)	0.350
Mean cell hemoglobin (pg)	29.6 (22.5–37.2)	29.8 (24.8–37.2)	29.4 (22.5–33.6)	0.277
Mean cell hemoglobin concentration (g/L)	32.6 (27.3–36.8)	32.6 (29.5–36.8)	32.6 (27.3–35.3)	0.589
Platelet count (number $\times 10^9/L$ )	294 (18–1006)	296.5 (18–763)	281 (62–1006)	0.220
Mean platelet volume (fl)	10.4 (8–14.5)	10.4 (8.4–14.5)	10.4 (8–12.4)	0.445
C-reactive protein (mg/L)	57 (2–345)	61 (2–322)	55 (6–345)	0.284
Procalcitonin ( $\mu g/L$ )	0.2 (0.1–188)	0.2 (0.1–188)	0.2 (0.1–16)	0.194
Ferritin ( $\mu g/L$ )	962 (69–9900)	1009.5 (140–9900)	814 (69–2637)	0.360
Fibrinogen (g/L)	6.5 (1.6–10.3)	6.6 (2.5–10.3)	6.1 (1.6–9.7)	0.153
Interleukine-6 (ng/L)	38.6 (2.5– $\geq 300$ )	32.8 (2.5–300)	44.2 (4.6–300)	0.365
During hospitalization (n (%))				
Admission in reanimation intensive care unit	89 (73%)	56 (84%)	33 (60%)	0.004
Orotracheal intubation	67 (55%)	42 (63%)	25 (45%)	0.069
High-flow nasal cannula oxygenation	37 (30%)	22 (33%)	15 (27%)	0.557
Noninvasive ventilation	43 (35%)	26 (39%)	17 (31%)	0.447
ExtraCorporeal Membrane Oxygenation	17 (14%)	12 (18%)	5 (9%)	0.195
Sympathomimetic amines	59 (48%)	37 (55%)	22 (40%)	0.105
Extrarenal epuration	21 (17%)	15 (22%)	6 (11%)	0.147
Use of corticosteroids	54 (44%)	32 (48%)	22 (40%)	0.465
Outcome (n (%))				
Venous thromboembolic disease	22 (18%)	12 (18%)	10 (18%)	1.000
Arterial disease	6 (5%)	3 (4%)	3 (5%)	1.000
Death †	17 (15%)	10 (17%)	7 (13%)	0.793

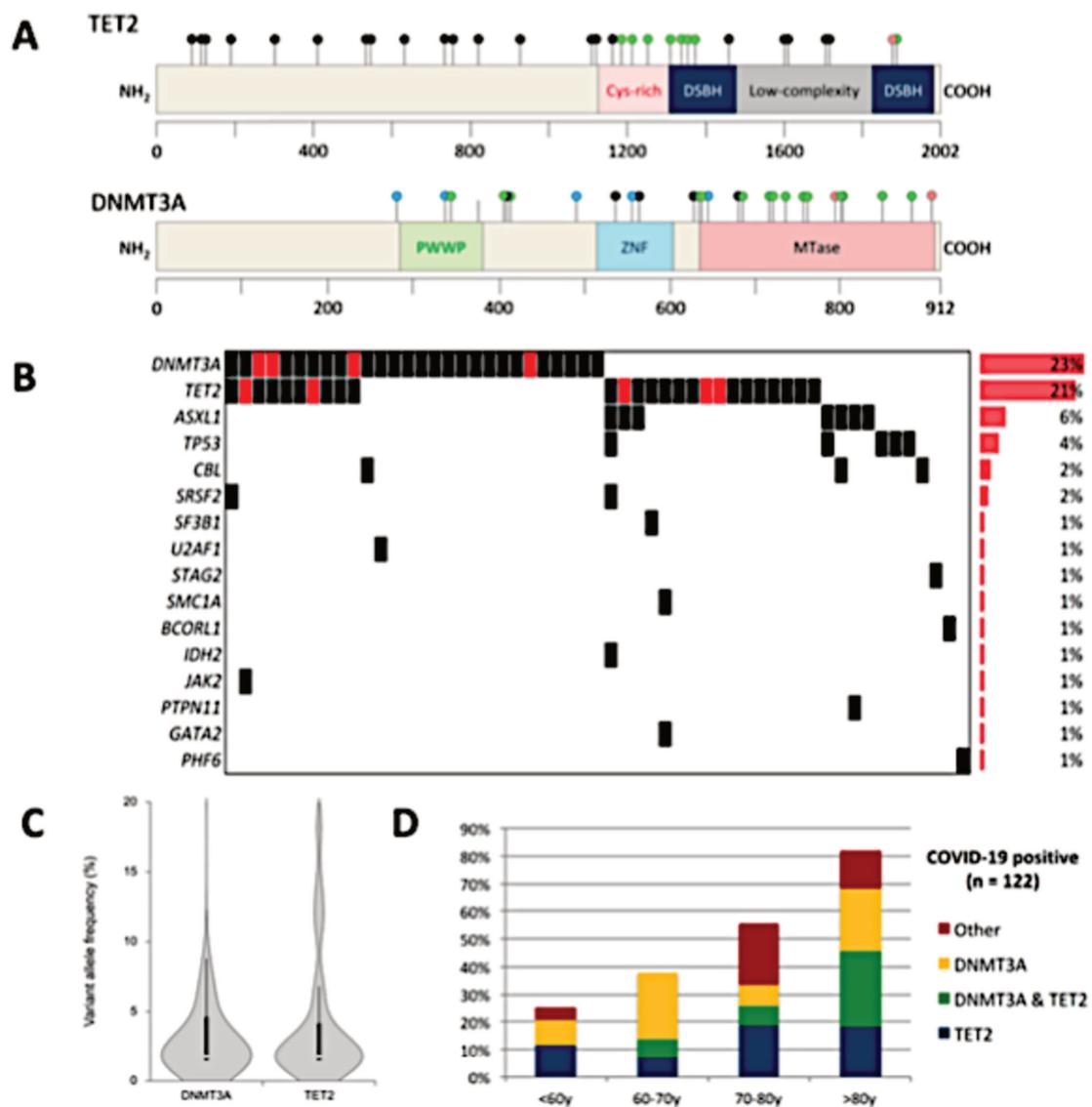
\* Determined only at admission to the ICU. † At time of this report, 10 patients were still hospitalized and were excluded from the measurement of mortality rates.

A total of 91 mutations were found in 55 individuals (45% of the whole cohort) (Figure 2A,B, Table S4). *DNMT3A* and *TET2* mutations were by far the most common, concerning 28 (23%) and 26 patients (21%), respectively. Overall, mutations in *DNMT3A* and/or *TET2* were present in 36% (44/122) of COVID-19 patients and were found in 80% (44/55) of those with CH. Ten patients had both *DNMT3A* and *TET2* mutations. Other recurrently mutated genes included *ASXL1* ( $n = 7$ ; 6%) and *TP53* ( $n = 5$ ; 4%). The average number of detected mutations among patients with CH was one (range, 1–5). The median variant allele frequency (VAF) was 2% (Figure 2C), but 10 patients had mutations with VAFs higher than 10% (none of them were known to have a hematological malignancy). Particular attention was paid to other CBCs during management, especially for the existence of monocytosis, blasts or evolution of cytopenias. None of them had additional argument for an active malignancy. As expected, CH was more frequent in elderly people, and its prevalence increased with age (Figure 2D). CH affected 25%, 38%, 56%, and 82% of patients aged <60 years, 60–70 years, 70–80 years, and >80 years, respectively. The median age of CH-positive and CH-negative patients was 72 years and 60 years, respectively ( $p < 0.001$ ). Laboratory values from CBC and inflammatory markers did not differ significantly between CH-positive and CH-negative patients (Table 1, Figure S3). Serum levels of IL-

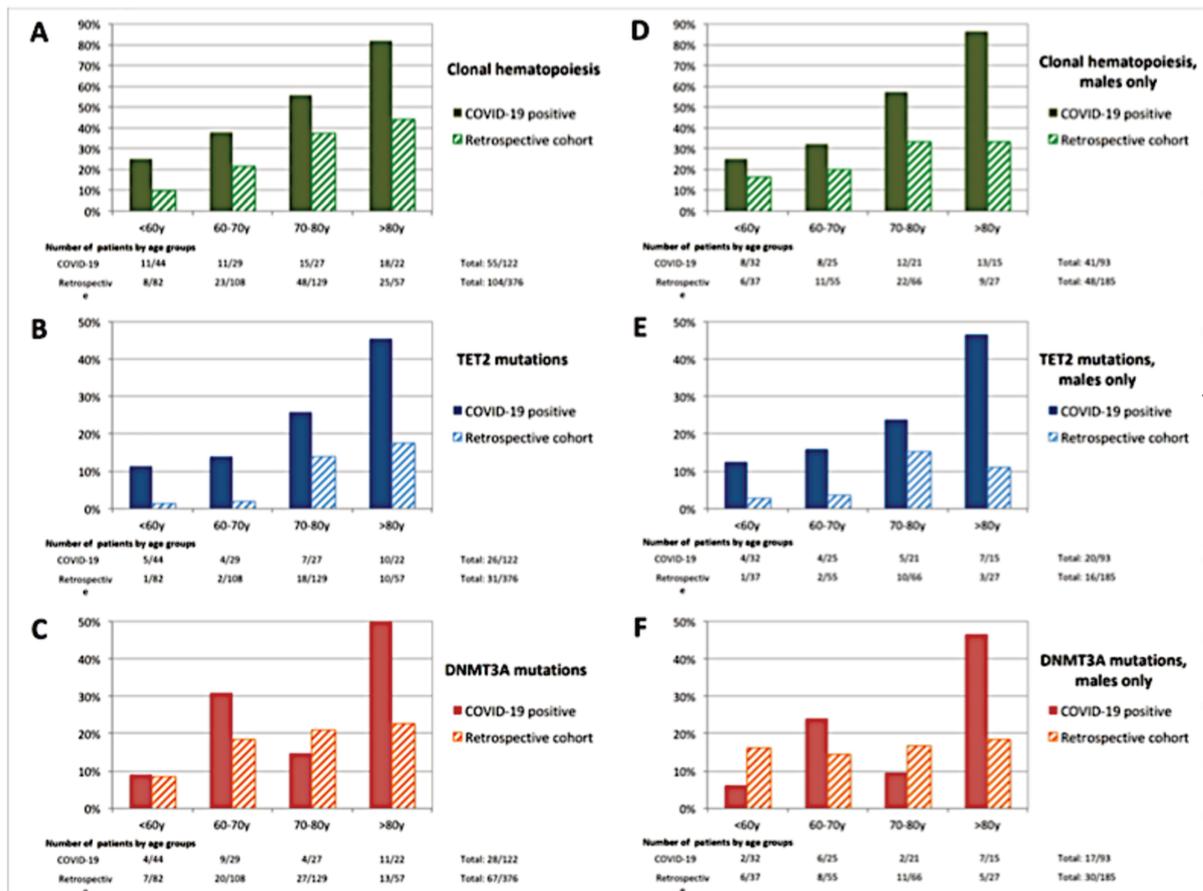
6 in patients with available material were not different between CH-positive vs. CH-negative, *DNMT3A*-positive vs. *DNMT3A*-negative, and *TET2*-positive vs. *TET2*-negative patients. Data about other cytokine levels were not available. Univariate analyses showed no significant difference in outcome, clinical symptoms, or comorbidities between the two groups, except for myocardial infarction and obliterative arterial disease, which were reported more frequently in the medical history of CH-positive patients ( $p = 0.046$ ). Intriguingly, OTI requirement was less frequent in patients with *DNMT3A* mutations (10/28 (36%) vs. 57/94 (61%) in mutated vs. Unmutated; OR=0,361, 95% CI : 0,150-0,867,  $p=0,023$ ) but the small size of our cohort and the absence of a validation cohort do not allow further speculations. This was not observed for *TET2* mutant carriers (12/26 (46%) vs 55/96 (57%) in mutated vs unmutated; OR=0,639, 95% CI : 0,268-1,526,  $p=0,313$ ).

We then compared the frequency of CH in hospitalized COVID-19 patients with a retrospective cohort of 376 patients free of hematological malignancy sequenced with the same pipelines before the COVID-19 pandemic. CH prevalence among age groups appeared higher in COVID-19 patients compared to patients from this cohort (10%, 21%, 37%, and 44% of patients aged <60 years, 60–70 years, 70–80 years, and >80 years, respectively; Figure 3), especially due to a higher rate of *TET2* mutations in COVID-19 patients. Since the cohort of COVID-19-patients was male biased, comparisons were also performed in males only, showing the same trends. Notably, there was no specific pattern of mutation according to gender in the retrospective cohort (Table S5).

After adjustment for age, the prevalence OR of CH was 3.182 (95% CI: 1.944–5.209,  $p < 0.001$ ) in COVID-19 patients. The same analyses were performed for *DNMT3A* (presence vs. absence) and *TET2* mutations (presence vs. absence) and showed prevalence ORs of 1.735 (95% CI: 1.000–3.010,  $p = 0.050$ ) and 3.940 (95% CI: 2.095–7.410,  $p < 0.001$ ), respectively.



**Figure 2.** CH in COVID-19 patients requiring hospitalization. (A) Lollipop plots depicting *TET2* and *DNMT3A* mutations in COVID-19 patients. Black, green, pink, and blue dots indicate frameshift/nonsense, missense, in frame, and splicing mutations, respectively. (B) Molecular landscape showing co-mutations in 55 clonal hematopoiesis-positive patients. Red boxes indicate several mutations within the same gene. (C) Violin plot showing the distributions of variant allele frequencies for *TET2* and *DNMT3A* mutations. (D) Frequency of CH among age groups in COVID-19 patients.



**Figure 3.** Frequency of individuals with (A,D) clonal hematopoiesis, (B,E) *TET2* mutations, and (C,F) *DNMT3A* mutations in COVID-19 positive patients and patients from the retrospective cohort. Subfigures (D–F) show frequency for males only.

## Discussion

In this report, we describe the clinical and biological findings, including the extensive screening of CH in hospitalized COVID-19 patients, of our institution. We confirmed high CRP levels and WBC/neutrophil counts as biological predictors of OTI requirement in patients with severe COVID-19 requiring hospitalization, in line with previous reports [21].

Our results show a higher rate of CH, especially *TET2* mutations, in both COVID-19 patients and people from the retrospective cohort compared to data from the literature [4,5]. However, it is important to note that different panels, sequencing technologies, or bioinformatics pipelines may introduce biases in the sensitivity threshold of CH detection, thereby greatly limiting such comparisons. This may in part be related to a broader *TET2* coverage in the present study. Additionally, it should be noted that certain regions, including the *ASXL1* hotspot, are prone to technical artifacts with IonTorrent sequencing platforms, which could have limited *ASXL1* mutant detection in our study. Finally, individuals in our retrospective cohort should not be considered as healthy people since most of them had unexplained cytopenia. However, this would likely

increase the prevalence of CH in our control population and therefore not affect the conclusions regarding the higher CH frequency in COVID-19 patients. We acknowledge that this finding may suffer from several biases, including the absence of sampling prior to COVID-19, the relatively small size of the studied group, and the absence of matched controls for confounding factors including comorbidities. Notably, the impact of acute inflammatory states on CH (possibly affecting clone selection or expansion) in COVID-19 patients remains unknown. Indeed, it has been suggested that the emergence of CH (especially *TET2* mutants) may be facilitated in response to inflammatory stress [22,23]. Given the lack of samples collected prior to COVID-19 infection and in non-hospitalized patients, we were not able to determine whether the high frequency of CH in these patients could be associated with a higher rate of hospitalization for COVID-19 or reflect a consequence of the acute inflammatory state. Additionally, although all biological and clinical were prospectively collected and reviewed, we could not exclude the existence of other undiagnosed pathological conditions in our patients. Overall, we show that CH does not significantly impact clinical and biological findings in COVID-19 patients or outcomes, including OTI or death. Given that 75% of CH variants were identified with a VAF below 5%, it was expected that this would have little or minimal clinical consequence. Due to the low number of individuals presenting with larger clones, we were not able to perform analyses regarding higher VAF cutoffs.

## Conclusion

In conclusion, we describe clinical and biological findings in patients with severe COVID-19 requiring hospitalization. Elevated white blood cell counts, especially neutrophils and high CRP levels at admission, were associated with an increased requirement of OTI. We also report a high frequency of CH in this population, with a lack of impact on clinico-biological findings and outcome. A longer follow-up period will be necessary to estimate the long-term consequences of CH on the outcome of patients, including the occurrence of hematological malignancies or aging-associated comorbidities.

## Abbreviations

CBC Complete blood count

CH Clonal hematopoiesis

CHIP Clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CI Confidence interval

COVID-19 Coronavirus disease 2019

CRP C-reactive protein

HTS High-throughput sequencing

ICU Intensive care unit

IL-6 Interleukin-6

OR Odds ratio

OTI Orotracheal intubation

SARS-CoV-2 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

VAF Variant allele frequency

WBC White blood cell count

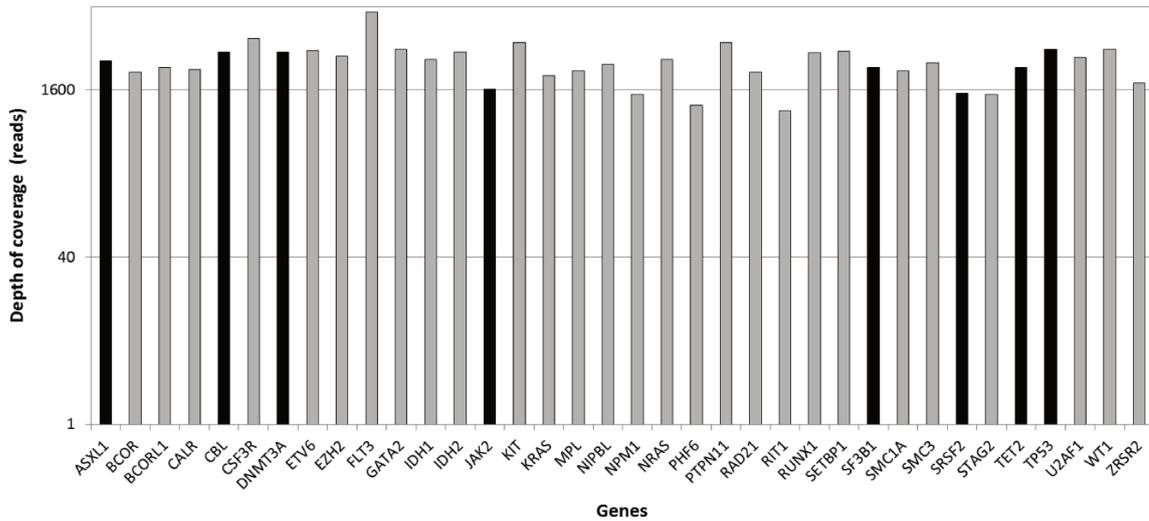
## References

1. Simonnet, A.; Chetboun, M.; Poissy, J.; Raverdy, V.; Noulette, J.; Duhamel, A.; Labreuche, J.; Mathieu, D.; Pattou, F.; Jourdain, M.; et al. High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity* **2020**, *28*, 1195–1199.
2. Chen, G.; Wu, D.; Guo, W.; Cao, Y.; Huang, D.; Wang, H.; Wang, T.; Zhang, X.; Chen, H.; Yu, H.; et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 2620–2629.
3. Blanco-Melo, D.; Nilsson-Payant, B.E.; Liu, W.-C.; Uhl, S.; Hoagland, D.; Møller, R.; Jordan, T.X.; Oishi, K.; Panis, M.; Sachs, D.; et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **2020**, *181*, 1036–1045.e9.
4. Jaiswal, S.; Fontanillas, P.; Flannick, J.; Manning, A.; Grauman, P.V.; Mar, B.G.; Lindsley, R.C.; Mermel, C.H.; Burt, N.; Chavez, A.; et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2488–2498.
5. Genovese, G.; Köhler, A.K.; Handsaker, R.E.; Lindberg, J.; Rose, S.A.; Bakhoum, S.F.; Chambert, K.; Mick, E.; Neale, B.M.; Fromer, M.; et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2477–2487.
6. Buscarlet, M.; Provost, S.; Zada, Y.F.; Barhdadi, A.; Bourgoin, V.; Lépine, G.; Mollica, L.; Szuber, N.; Dubé, M.-P.; Busque, L. *DNMT3A* and *TET2* dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood* **2017**, *130*, 753–762.
7. Zink, F.; Stacey, S.N.; Norddahl, G.L.; Frigge, M.L.; Magnusson, O.T.; Jonsdottir, I.; Thorgeirsson, T.E.; Sigurdsson, A.; Gudjonsson, S.A.; Gudmundsson, J.; et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* **2017**, *130*, 742–752.
8. López-Moyado, I.F.; Rao, A. *DNMT3A* and *TET2* mutations reshape hematopoiesis in opposing ways. *Nat. Genet.* **2020**, *52*, 554–556.
9. Jaiswal, S.; Natarajan, P.; Silver, A.J.; Gibson, C.J.; Bick, A.G.; Shvartz, E.; McConkey, M.; Gupta, N.; Gabriel, S.; Ardissino, D.; et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 111–121.

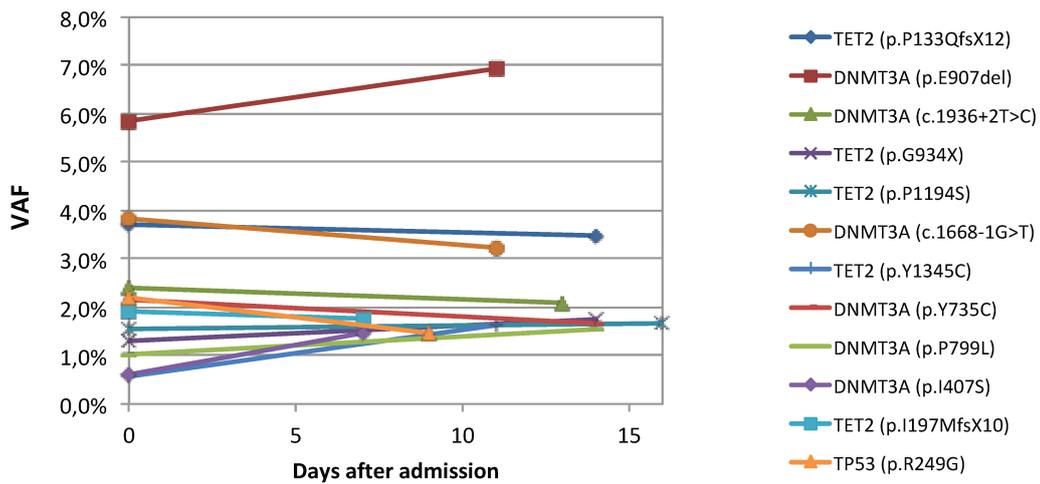
10. Dorsheimer, L.; Assmus, B.; Rasper, T.; Ortmann, C.A.; Ecke, A.; Abou-El-Ardat, K.; Schmid, T.; Brüne, B.; Wagner, S.; Serve, H.; et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis with Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* **2019**, *4*, 25–33.
11. Sano, S.; Oshima, K.; Wang, Y.; Katanasaka, Y.; Sano, M.; Walsh, K. CRISPR-Mediated Gene Editing to Assess the Roles of Tet2 and Dnmt3a in Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 335–341.
12. Zhang, Q.; Zhao, K.; Shen, Q.; Han, Y.; Gu, Y.; Li, X.; Zhao, D.; Liu, Y.; Wang, C.; Zhang, X.; et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature* **2015**, *525*, 389–393.
13. Sano, S.; Oshima, K.; Wang, Y.; MacLauchlan, S.; Katanasaka, Y.; Sano, M.; Zuriaga, M.A.; Yoshiyama, M.; Goukassian, D.; Cooper, M.A.; et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 /NLRP3 Inflammasome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *71*, 875–886.
14. Cull, A.H.; Snetsinger, B.; Buckstein, R.; Wells, R.A.; Rauh, M.J. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Exp. Hematol.* **2017**, *55*, 56–70.e13.
15. Cook, E.K.; Izukawa, T.; Young, S.; Rosen, G.; Jamali, M.; Zhang, L.; Johnson, D.; Bain, E.; Hilland, J.; Ferrone, C.K.; et al. Comorbid and inflammatory characteristics of genetic subtypes of clonal hematopoiesis. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 2482–2486
16. Busque, L.; Sun, M.; Buscarlet, M.; Ayachi, S.; Feroz Zada, Y.; Provost, S.; Bourgoin, V.; Mollica, L.; Meisel, M.; Hinterleitner, R.; et al. High-sensitivity C-reactive protein is associated with clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 2430–2438.
17. Li, X.; Zhang, Q.; Ding, Y.; Liu, Y.; Zhao, D.; Zhao, K.; Shen, Q.; Liu, X.; Zhu, X.; Li, N.; et al. Methyltransferase Dnmt3a upregulates HDAC9 to deacetylate the kinase TBK1 for activation of antiviral innate immunity. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 806–815.
18. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506.
19. Poissy, J.; Goutay, J.; Caplan, M.; Parmentier, E.; Duburcq, T.; Lassalle, F.; Jeanpierre, E.; Rauch, A.; Labreuche, J.; Susen, S.; et al. Pulmonary Embolism in COVID-19 Patients: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation* **2020**.
20. Cook, E.K.; Luo, M.; Rauh, M.J. Clonal hematopoiesis and inflammation: Partners in leukemogenesis and comorbidity. *Exp. Hematol.* **2020**, *83*, 85–94.
21. Terpos, E.; Ntanasias-Stathopoulos, I.; Elalamy, I.; Kastritis, E.; Sergentanis, T.N.; Politou, M.; Psaltopoulou, T.; Gerotziapas, G.; Dimopoulos, M.A. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am. J. Hematol.* **2020**, *95*, 834–847.
22. Abegunde, S.O.; Buckstein, R.; Wells, R.A.; Rauh, M.J. An inflammatory environment containing TNFalpha favors Tet2-mutant clonal hematopoiesis. *Exp. Hematol.* **2018**, *59*, 60–65.

23. Cai, Z.; Kotzin, J.J.; Ramdas, B.; Chen, S.; Nelanuthala, S.; Palam, L.R.; Pandey, R.; Mali, R.S.; Liu, Y.; Kelley, M.R.; et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **2018**, *23*, 833–849.e5.

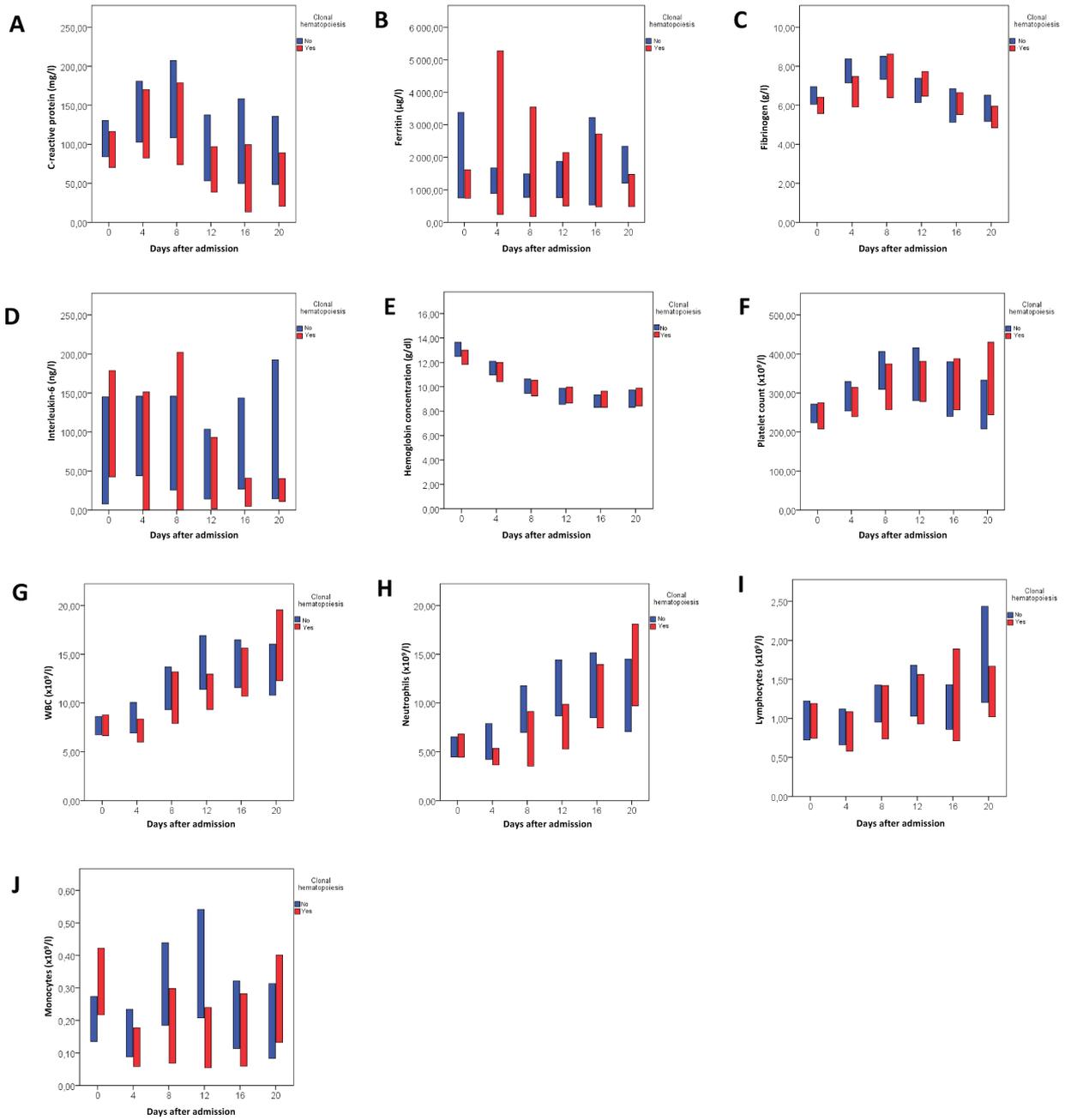
**Supplementary materials (excerpt)**



**Figure S1:** Median depth of sequencing coverage per gene. Black bars indicate genes that are frequently involved in clonal hematopoiesis.



**Figure S2:** Repeated sequencing in 9 CH-positive patients.



**Figure S3:** Kinetics of laboratory values during hospitalization in COVID-19 patients according to the presence (red boxes) or absence (blue boxes) of CH. Boxes indicate the mean values (95% CI) observed in patients at different timepoints (D0, D4, D8, D12, D16, D20). (A) C-reactive protein; (B) ferritin; (C) fibrinogen; (D) interleukine-6; (E) hemoglobin concentration; (F) platelet count; (G) WBC; (H) neutrophils; (I) lymphocytes; (J) monocytes.

**Table S5.** Frequency of clonal hematopoiesis, DNMT3A mutations and TET2 mutations among age groups in the retrospective cohort according to gender.

<b>Mutations</b>	<b>Age Groups</b>	<b>Females</b>	<b>Males</b>	<b>Total</b>	<b><i>p</i>-Value</b>
Clonal hematopoiesis	All	56 (29%)	48 (26%)	104 (28%)	0.490
	<60 y	2 (4%)	6 (16%)	8 (10%)	
	60–70 y	12 (23%)	11 (20%)	23 (21%)	
	70–80 y	26 (41%)	22 (33%)	48 (37%)	
	>80 y	16 (53%)	9 (33%)	25 (44%)	
<i>DNMT3A</i>	All	37 (19%)	30 (16%)	67 (18%)	0.501
	<60 y	1 (2%)	6 (16%)	7 (9%)	
	60–70 y	12 (23%)	8 (15%)	20 (19%)	
	70–80 y	16 (25%)	11 (17%)	27 (21%)	
	>80 y	8 (27%)	5 (19%)	13 (23%)	
<i>TET2</i>	All	15 (8%)	16 (9%)	31 (8%)	0.852
	<60 y	0 (0%)	1 (3%)	1 (1%)	
	60–70 y	0 (0%)	2 (4%)	2 (2%)	
	70–80 y	8 (13%)	10 (15%)	18 (14%)	
	>80 y	7 (23%)	3 (11%)	10 (18%)	

# Annexe 6 : Poster présenté à la 40<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI) les 14 et 15 décembre 2020

## 40<sup>e</sup>

RÉUNION INTERDISCIPLINAIRE DE  
CHIMIOTHÉRAPIE ANTI-INFECTIEUSE

LUNDI 14 & MARDI 15  
DÉCEMBRE 2020

RICAI DIGITALE

www.ricai.fr

P-168

PA-11 – COVID 19 : Divers

PREVALENCE AUGMENTEE D'HEMATOPOIESE CLONALE CHEZ LES  
PATIENTS COVID-19 SEVERES

**J. Demonchy<sup>1,2</sup>, N. Duployez<sup>1</sup>, C. Berthon<sup>1</sup>, A-S. Moreau<sup>2</sup>, C. Preudhomme<sup>1</sup> et B. Quesnel<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Service des Maladies du Sang, CHU de Lille, <sup>2</sup>Pôle de Réanimation médicale, CHU de Lille, France  
 jordane.demonchy@gmail.com

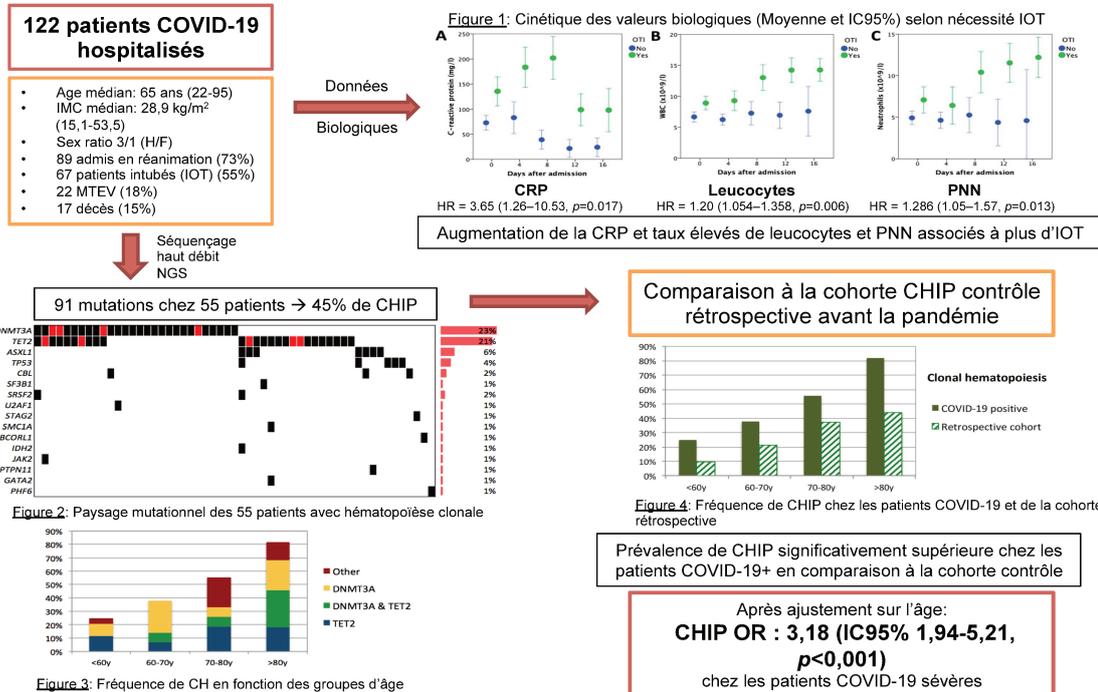
### Introduction/Objectifs

Un âge avancé, une obésité et la présence de comorbidités cardio-vasculaires sont des facteurs de risque de COVID-19 sévère et critique, nécessitant une hospitalisation. Récemment, l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP), définie par la présence de mutations somatiques dans les cellules du sang périphérique sans cytopénie ni hémopathie maligne, est apparue comme un facteur de risque d'inflammation chronique, conduisant à un sur-risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique, eux-mêmes facteurs de risque de COVID-19 grave. Nous avons donc cherché à déterminer si les patients atteints de COVID-19 sévère et critique présentaient plus fréquemment une CHIP et si la présence d'une CHIP influençait leur évolution clinique.

### Méthodes

Analyse des données clinico-biologiques et recherche de mutations de CHIP par séquençage haut débit chez 122 patients atteints de la COVID-19 hospitalisés (33 en hospitalisation conventionnelle et 89 en réanimation) en comparaison à une cohorte contrôle rétrospective de 376 patients avant la pandémie de COVID-19.

### Résultats



### Conclusion

La prévalence de CHIP est significativement augmentée chez les patients atteints de la COVID-19 sévère et critique. Si la présence d'une CHIP pourrait influencer l'évolution immédiate des patients (transfert en réanimation, nécessité de VM), les mécanismes biologiques sous-jacents restent à identifier. Ces résultats suggèrent l'intérêt d'un suivi médical des patients COVID-19 sévères et critiques, axé sur le dépistage de la survenue d'hémopathies malignes et de complications cardiovasculaires liées à l'âge.



AUTEUR : Nom : **DEMONCHY**

Prénom : **Jordane**

**Date de soutenance** : 02 juillet 2021

**Titre de la thèse** : Etude COVID CHIP : Impact de la présence d'une hématopoïèse clonale sur la survenue d'une COVID-19 sévère ou critique pendant la première vague épidémique

**Thèse - Médecine - Lille 2021**

**Cadre de classement** : *Hématologie et Réanimation médicale*

**DES + spécialité** : *DES Hématologie*

**Mots-clés** : Hématopoïèse clonale ; hématopoïèse clonale de signification indéterminée ; CHIP ; NGS ; COVID-19 ; SARS-CoV-2

**Résumé : Contexte** : Un âge avancé et la présence de comorbidités cardio-vasculaires font partie des facteurs de risque associés aux formes graves de COVID-19. En parallèle, l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP) est récemment apparue comme responsable d'une inflammation chronique, conduisant à un sur-risque d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral ischémique, eux-mêmes facteurs de risque de formes graves de COVID-19. L'objectif de cette étude était de déterminer si les patients atteints de COVID-19 sévère ou critique avaient une prévalence d'hématopoïèse clonale (*Clonal Hematopoiesis* ou CH) augmentée et si cette CH influençait leur évolution clinique.

**Méthode** : La présence d'une CH a été recherchée par séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing* ou NGS) sur une cohorte de 122 patients hospitalisés pour la prise en charge d'une COVID-19 au CHU de Lille lors de la première vague épidémique et comparée à une cohorte contrôle rétrospective de 465 patients sans COVID-19. Dans la cohorte COVID-19, l'influence de la présence d'une CH sur le devenir des patients, les complications cliniques et biologiques et la mortalité a été analysée.

**Résultats** : Au sein de la cohorte COVID-19, l'âge médian était de  $64,8 \pm 15,7$  ans avec un sex-ratio (H/F) de 3/1. 89 (73%) patients étaient admis en réanimation et 67 (54,9%) ont nécessité une intubation orotrachéale. Une CH était retrouvée chez 55 (45,1%) malades, avec des mutations de *DNMT3A* et *TET2* chez 28 (23%) et 26 (21,3%) patients respectivement. Dans la cohorte contrôle, une CH était mise en évidence chez 106 (22,8%) patients. Dans les deux groupes, la prévalence de CH augmentait avec l'âge. Après ajustement sur l'âge, la présence d'une CH était significativement associée aux formes sévère et critique de COVID-19 (OR=3,09 [IC95% 1,95-4,88],  $p < 0,0001$ ). Dans la cohorte COVID-19, la présence de CH n'était pas significativement corrélée ni à la nécessité d'IOT (OR=0,84 [0,41-2,01],  $p=0,687$ ), ni au décès hospitalier (OR : 0,83 [0,27-3,22],  $p=0,901$ ), ni aux autres complications de la COVID-19.

**Conclusion** : On retrouve une prévalence augmentée de CH chez les patients atteints de COVID-19. Les patients avec CH ont 3 fois plus de risque de développer une forme sévère ou critique de COVID-19 que les patients sans CH. Si la présence d'une CH pourrait influencer l'évolution naturelle de la maladie, les mécanismes sous-jacents restent néanmoins à identifier.

**Composition du Jury** :

**Président** : Pr Bruno QUESNEL

**Assesseurs** : Pr Julien POISSY, Dr Nicolas DUPLOYEZ, Dr Céline BERTHON

**Directrice de thèse** : Dr Anne-Sophie MOREAU