

Université de Montréal

**Étude des déterminants moléculaires associés à l'intolérance orthostatique dans la
pathogenèse de l'encéphalomyélite myalgique**

Par

Corinne Leveau

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science
en biochimie, option génétique moléculaire

Décembre 2021

© Leveau, 2021

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Étude des déterminants moléculaires associés à l'intolérance orthostatique dans la pathogenèse de l'encéphalomyélite

Présenté par

Corinne Leveau

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr Gerardo Ferbeyre

Président-rapporteur

Dr Alain Moreau

Directeur de recherche

Dr Stéphane Roy

Membre du jury

Résumé

L'encéphalomyélite myalgique (EM) est une maladie complexe, multi-systémique et débilitante, dont l'étiologie est inconnue. D'une personne atteinte d'encéphalomyélite myalgique (PAEM) à l'autre, les symptômes varient en fréquence et en sévérité créant ainsi une grande hétérogénéité clinique entre les individus. Un sous-groupe de PAEM vivent des épisodes d'intolérance orthostatique (IO) ou vivent avec une comorbidité de syndrome de tachycardie orthostatique posturale (POTS), deux conditions qui sont mal comprises. Le malaise après-effort (PEM), un des symptômes phare de l'EM, survient après une activité physique ou mentale minimale. Le malaise après-effort entraîne une dégradation générale de l'état de l'individu, peut entraîner une exacerbation des autres symptômes et va durer de plusieurs heures à plusieurs jours. Chez les individus souffrant de POTS ou d'IO, le malaise après-effort peut déclencher des épisodes d'intolérance orthostatique.

Le gène SLC6A2 codant pour le transporteur de norépinephrine NET a été identifié comme potentiel mécanisme dans pathophysiologie du POTS, tout comme les protéines impliquées dans la vasodilatation, comme la thrombospondine-1 (TSP-1). Notre laboratoire a identifié un panel de onze microARN (miARN) exprimés différemment chez les PAEM. Parmi ceux-ci, le miR-150-5p a comme cible prédite SLC6A2. Notre hypothèse était qu'une plus grande expression du miR-150-5p après un effort ou qu'une chute de thrombospondine-1 pourrait induire une vasodilatation soudaine contribuant aux symptômes d'IO ou de POTS.

Nous avons mesuré les niveaux plasmatiques du miR-150-5p et de TSP-1 avant (T_0) et après (T_{90}) l'induction du malaise après-effort chez des PAEM avec POTS/IO ($n = 20$), chez des PAEM sans POTS/IO ($n = 117$) et chez des témoins sédentaires associés pour le sexe et l'âge ($n = 48$). Nous avons démontré que les sujets atteints de POTS/IO avaient des niveaux plus importants du miR-150-5p et des symptômes plus sévères. Finalement, nous avons également utilisé la veste intelligente Hexoskin (Carré Technologies Inc., Montreal, Qué., Canada) pour suivre un sous-groupe d'individus ($n = 10$) sur une plus longue période après l'induction du malaise après-effort. Avec cet outil, nous avons pu monitorer les symptômes au quotidien, permettant un meilleur suivi clinique de ces patients.

Ce projet de maîtrise a permis une meilleure compréhension de la pathophysiologie de l'EM et de celle du POTS.

Mots-clés : encéphalomyélite myalgique (EM), syndrome de tachycardie orthostatique posturale (POTS), intolérance orthostatique (IO), malaise après-effort, thrombospondine-1 (TSP-1), miR-150-5-p.

Abstract

Myalgic encephalomyelitis (ME) is a complex chronic disease with debilitating symptoms and unknown etiology. Symptoms vary in frequency and severity from a person with ME (PwME) to another, thus creating a highly clinically heterogeneous patient population. Some PwME also experience orthostatic intolerance (OI) episodes or live with a comorbidity of postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS), two conditions that are not well understood. Post-exertional malaise (PEM) causes patients to experience a worsening of their symptoms following an effort, whether it be physical or mental. PEM can last from a few hours to several days. In PwME with POTS/OI, PEM can trigger orthostatic intolerance episodes.

SLC6A2 is a gene coding for the norepinephrine transporter NET. Its contribution to the POTS pathophysiology has been mentioned several times in literature. A biochemical milieu prone to vasodilation was also reported as a contributing element to POTS pathophysiology. Recently, our laboratory published an article identifying a panel of eleven microRNAs (miRNAs) differentially expressed in PwME. Among these miRNAs, miR-150-5p has been predicted to target SLC6A2. Our hypothesis was that higher expression of miR-150-5p following an effort or a decrease in circulating thrombospondin-1 (TSP-1) inducing vasodilation could contribute to POTS/OI symptoms.

We measured circulating levels of miR-150-5p and TSP-1 before (T_0) and after (T_{90}) PEM induction in PwME ($n = 117$), PwME with POTS/OI ($n = 20$) and age and sex matched sedentary controls ($n = 48$). We demonstrated that PwME with POTS/OI have higher levels of miR-150-5p at both T_0 and T_{90} , while also having more severe symptoms. Furthermore, we used the connected vest Hexoskin (Carré Technologies Inc., Montreal, Qué., Canada) to follow a subgroup ($n = 10$) of patients for a longer period following PEM induction. With this tool, we were able to monitor symptoms on a daily basis, allowing better clinical follow-up. Overall, this project allowed better understanding of ME and POTS' pathophysiology.

Keywords : Myalgic encephalomyelitis (ME), Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS), Orthostatic intolerance (OI), Post-exertional malaise (PEM), Thrombospondin-1 (TSP-1), miR-150-5p.

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des sigles et abréviations	17
Remerciements	23
Chapitre 1 – Introduction et revue de la littérature	25
1.1 Encéphalomyélite myalgique	25
1.1.1 Étiologie	25
1.1.1.1 Agents Infectieux	26
1.1.1.2 Génétique	26
1.1.2 Critères de diagnostic et symptômes de l’EM.....	27
1.1.3 Comorbidités	30
1.1.3.1 Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale.....	30
1.1.4 Pathophysiologie	30
1.1.4.1 Système immunitaire et inflammation	31
1.1.4.1.1 Cellules NK.....	31
1.1.4.1.2 Lymphocytes B et T	31
1.1.4.1.3 Cytokines.....	32
1.1.4.2 Mitochondries.....	32
1.1.4.2.1 Espèces réactives.....	33

1.1.4.3 Microbiote	34
1.1.4.4 Neurologie, neuro-inflammation et système neuroendocrinien	34
1.1.4.4.1 Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	35
1.1.4.5 Métabolisme et métabolome	35
1.1.4.5 Malaise après-effort.....	36
1.2 Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale.....	36
1.2.1 Définition et critère de diagnostic	37
1.2.2 Pathophysiologie	38
1.2.2.1 SLC6A2 – NET	40
1.2.3 Intolérance orthostatique et encéphalomyélite myalgique	41
1.3 microARN	41
1.3.1 Généralités sur les microARN.....	41
1.3.2 hsa-miR-150-5p.....	43
1.4 Thrombospondine-1	44
1.4.1 Généralités sur la thrombospondine-1	44
1.4.2 La thrombospondine-1 comme vasoconstricteur	45
1.5 Hypothèses et objectifs de recherche	47
1.5.1 Problématique.....	47
1.5.2 Hypothèses et objectifs.....	49
Chapitre 2 – Manuscrit	51
Chapitre 3 – Discussion.....	87
3.1 Groupes à l'étude	87
3.1 hsa-miR-150-5p.....	88
3.1 Thrombospondine-1	90

3.1 Perspectives91

Chapitre 4 – Conclusion93

Références bibliographiques97

Annexes115

Liste des tableaux

Tableau 1. – Critères requis pour un diagnostic clinique d'encéphalomyélite myalgique en fonction du CCC tel que décrit par Carruthers <i>et al.</i> (20) en 2003.	29
Tableau 2. – Définition clinique du syndrome de tachycardie orthostatique posturale telle que présenté dans le National Institutes of Health Expert Consensus Meeting. Tiré de Vernino <i>et al.</i> (64).....	37

Liste des figures

Figure 1. – Schéma des symptômes nécessaires au diagnostic de l'EM selon les critères du consensus canadien.....	28
Figure 2. – Représentation schématique des pathophysiologies du POTS et de la tachycardie orthostatique.....	39
Figure 3. – Schéma de la biogénèse des microARN.....	42
Figure 4. – Prédiction de l'interaction entre hsa-miR-150-5p et SLC6A2 selon TargetScan (114).	44
Figure 5. – Schématisation des domaines de la thrombospondine-1, des ligands principaux et de leurs effets.....	45

Liste des sigles et abréviations

3'UTR: 3' untranslated region

5'UTR: 5' untranslated region

ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN: acide désoxyribonucléique

Ago2: argonaute-2

Ala: alanine

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ATP: adenosine triphosphate

BPM: battements par minute

CCC: critères du consensus canadien

CD20: cluster de différenciation 20

CD36: cluster de différenciation 36

CD4⁺: cluster de différenciation 4

CD47: cluster de différenciation 47

CD8⁺: cluster de différenciation 8

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CMV: cytomégalovirus

COVID-19: coronavirus disease 19

DSQ: DePaul Symptom Questionnaire

EBV: Epstein - Barr virus

ECG: électrocardiogramme

EM/SFC: encéphalomyélite myalgique/syndrome de fatigue chronique

ESCC: enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes

EZH2: enhancer of zest homolog 2

FM: fibromyalgie

HHV: human herpesvirus

HPA: hypothalamic-pituitary-adrenal axis

IDO1/IDO2: indolamine-2,3-dioxygénase 1, indolamine-2,3-dioxygénase 2

IFN γ : interféron γ

IgG : immunoglobuline G

IO: intolérance orthostatique

IOM: Institute of Medicine

IST: inappropriate sinus tachycardia

MFI-20: Multidimensional Fatigue Inventory-20

miARN: microARN

miR: microARN

NET: norepinephrine transporter

NK: natural killer

NO: nitric oxide, monoxyde d'azote

NS : non-significatif

OMS: organisation mondiale de la santé

PAEM: personne atteinte d'encéphalomyélite myalgique

PEM: post-exertional malaise

POTS: postural orthostatic tachycardia syndrome

Pro: proline

RISC: RNA-induced silencing complex

ROS: reactive oxygen species

RNS: reactive nitrogen species

SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SF-36: 36-Item Short Form Survey

SLC6A2: solute carrier family 6 member 2

SNP: single nucleotide polymorphism

SNRI: serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor

TSP-1: thrombospondin-1

TSR: thrombospondin structural repeat

TT3R: thrombospondin type 3 repeat

VEGF: vascular endothelial growth factor

*À mes parents et ma grand-mère,
Pour les encouragements et la personne que vous m'avez permis de devenir*

Remerciements

Je remercie d'abord et avant tout mon directeur de recherche Alain Moreau. Il m'a ouvert la porte de son laboratoire pour un stage de recherche au baccalauréat et ça a été le début d'une longue histoire. Merci pour l'accueil, l'écoute, les suggestions, les histoires et tout simplement la personne que vous êtes.

Merci à toute l'équipe du laboratoire avec qui j'ai cheminé tout ce temps : Abdellatif, Amélie, Anita, Atefeh, Bita, DaShen, Diana, Evguenia, Iurie, Lynda, Marie-Yvonne, Mohamed, Nasrin, Renata, Viorica, Wesam, Yaned. Mention spéciale aux stagiaires qui ont marqué ma maîtrise : Rim, Zainab ainsi que Geneviève mon aide-technique préférée. Un merci particulier à Bita et à Wesam. Bita pour ses chansons, les rires, les balades avec Peanut et les séjours à Brossard. Wesam pour ses conseils, son support et son amour.

Merci à tous mes amis, cette deuxième famille que j'aime et que je chéris à tout moment. La liste est bien longue, mais une mention spéciale à mes thons d'amour avec qui je partage un unique neurone et aux Femmes Matures et nos 15 ans d'amitié. Pensée pour mes douces colocs, Sarita et Ari, qui m'écoutent pendant des heures chialer ou dire que je ne comprends rien et qui me donnent des conseils d'analyse ou de mise en page. Merci pour ses conseils à celle avec qui je partage le rap, le brunch, la radio, les blagues douteuses, les idées rocambolesques et une longue liste d'autres choses : Marie-Françoise. Finalement merci à celles vers qui je me suis tournée très souvent récemment vu leur expérience dans le domaine des études supérieures: Alexandra, Clothilde, Julie et Sarah.

Finalement, merci à ma famille, la première. Mes parents, merci pour tout, ma sœur d'amour, ma grand-mère à qui je dédie entre autres ce mémoire, mes oncles, tantes et mes deux petits cousins. Pour tout ce temps passé ensemble, champagne en main plus souvent qu'autrement, qui me permet de décompresser et d'oublier la recherche (pour mieux me recentrer plus tard).

Toutes ces personnes avec qui je passe le plus clair de mon temps et qui contribuent d'une manière ou d'une autre à la personne que je suis. Ce mémoire représente une partie de ma vie, le fruit de plus de deux ans de travail, j'y laisse donc également un peu de vous dedans.

Chapitre 1 – Introduction et revue de la littérature

1.1 Encéphalomyélite myalgique

L'encéphalomyélite myalgique (EM), aussi connue sous le nom de syndrome de fatigue chronique (SFC), est une maladie chronique débilitante, complexe et multi-systémique caractérisée notamment par une fatigue prolongée sans raison apparente et la présence d'un malaise après effort. L'enquête de Statistique Canada sur la santé dans les collectivités canadiennes (ESCC) indique que l'EM est plus répandue que beaucoup de maladies chroniques bien connues. Cette étude a révélé en 2014 que 408 000 Canadiens étaient atteints de l'EM, tandis que ce nombre augmentait de 2015 et 2016 à 561 000 et 582 000 respectivement (1). Aux États-Unis, l'EM affecte de 1 à 2,5 millions de personnes et coûte entre 17 et 24 milliards de dollars annuellement (1, 2). La prévalence mondiale de l'EM oscille entre 0,1 et 1% (3, 4), mais pourrait aller jusqu'à 2,6% (5, 6) selon les études épidémiologiques et en fonction des critères d'inclusion appliqués. Parmi les individus affectés, on en retrouve de tous âges et de tous groupes ethniques ainsi que parmi les différentes strates socio-économiques (3, 6). La plupart des études indiquent une prévalence plus élevée chez les individus de sexe féminin que ceux de sexe masculin, avec un ratio qui varie de 2:1 jusqu'à 6:1 (3, 6). Pour l'EM, il n'existe ni méthode diagnostique directe, ni médicament, ni traitement (5, 7, 8). Son étiologie reste inconnue et un grand nombre de patients ne reçoivent ni diagnostic, ni soins adéquats (5). Malgré les études de plus en plus nombreuses sur l'EM, il subsiste une confusion quant au type de pathologie dont il s'agit. Selon la classification internationale des maladies de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'EM fait partie des maladies neurologiques (9). Le Center for Disease Control (CDC) américain la classifie comme un trouble du cerveau (3) et l'Institute of Medicine (IOM) a statué que l'EM est une maladie physique bien réelle et non un trouble psychiatrique (6).

1.1.1 Étiologie

Bien que l'étiologie de la pathologie soit inconnue, il existe différentes pistes quant aux causes possibles. Il est à noter que souvent les patients affirment avoir été en bonne santé avant le début de la maladie (5).

1.1.1.1 Agents Infectieux

Plusieurs groupes de chercheurs avancent que chez certains patients, l'EM pourrait se développer à la suite d'une infection virale. L'hypothèse provient du fait que près de 75% des personnes atteintes de l'EM (PAEM) ont déclaré que leur maladie a débuté avec des symptômes similaires à ceux d'une vilaine grippe ou d'une sévère mononucléose dont ils ne se sont jamais remis (3, 4, 8). Dans ce contexte, plusieurs travaux de recherche ont porté sur la détection de diverses infections de type viral, notamment le virus de l'hépatite C, les entérovirus Coxsackie B, le parvovirus B19, ainsi que plusieurs membres de la famille HHV (herpesviridae), soit le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV-4), le cytomégalovirus (CMV ou HHV-5), HHV-6, HHV-7 et HHV-8 (4, 8, 10). On associe aussi des bactéries ou des parasites à la maladie comme *Coxiella burnetti*, *Chlamydomphila pneumoniae* ou *Toxoplasma gondii* (3, 4). Plus récemment, avec la pandémie de COVID-19, certains individus souffrent de symptômes persistants (COVID longue) qui sont très similaires de ceux de l'EM. Bien qu'il soit trop tôt pour déterminer si le SARS-CoV-2 peut causer l'EM, il est évident qu'il y a un important chevauchement des symptômes entre ces deux conditions (11). Il est suggéré que de telles infections (virales ou bactériennes) puissent déclencher une activation immunitaire chronique, qui pourrait évoluer en EM (12). Cela dit, il n'existe toujours pas de preuve que la maladie soit directement causée par un agent infectieux (4), bien qu'on puisse soupçonner que chez certains sous-groupes de patients les infections y soient liées (8).

1.1.1.2 Génétique

La possibilité de prédispositions génétiques a été également investiguée compte tenu que les cas sévères d'EM se retrouve plus fréquemment dans certaines familles. Ceci a été établi par diverses études sur des couples de jumeaux et des familles. Dans le cas des études sur les jumeaux mono ou dizygotes, concordants ou discordants, celles-ci ont apporté de l'information quant à l'apport des variations induites par la génétique versus celles induites par les facteurs environnementaux et indiquent qu'il semble y avoir une influence génétique chez certains patients (5, 13-16). Plusieurs études ont d'ailleurs illustré que l'EM avait une forte tendance familiale (13). La détection de certains polymorphismes ou *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) a permis d'identifier certains variants associés de manière significative à l'EM et qui pourraient avoir un rôle dans son développement ou sa progression (17-19).

1.1.2 Critères de diagnostic et symptômes de l'EM

À ce jour, il n'existe aucun test diagnostique qui permet d'établir si un patient est atteint, ou non, d'EM (10). Les patients ne semblent pas converger vers une cause unique ou une pathophysiologie commune (12). Ainsi, les médecins procèdent par exclusion, en éliminant les pathologies possibles une à une, ce qui aboutit à un diagnostic d'EM par défaut (3). Ce processus par exclusion entraîne une errance médicale et des délais importants dans l'établissement d'un diagnostic pouvant nécessiter entre cinq et huit années dans certains cas. Il est donc primordial d'établir des critères objectifs et spécifiques pour le diagnostic de l'EM.

En 1994, le CDC établit une définition révisée pour l'EM, aussi connue comme les critères de Fukuda ou CDC-94 (21). Elle peut être utilisée par les professionnels dans un cadre de recherche clinique afin d'établir des critères standards pour la maladie. Cependant, cette définition est limitée puisqu'elle met l'accent sur la fatigue prolongée et diminue les autres symptômes qui ont pourtant une importance clinique (21). Mettre l'accent sur la fatigue uniquement est problématique dans la mesure où il faut faire la distinction entre la fatigue généralisée et celle associée à l'EM (22). Un des enjeux de la fatigue est qu'elle est auto-déclarée par les patients, ce qui est donc difficile à mesurer et à évaluer. De plus, la fatigue est omniprésente dans la population et pas uniquement chez les individus atteints d'EM (10).

En 2003, une équipe dirigée par Bruce M. Carruthers publie les critères du consensus canadien (CCC) sur l'EM, qui offrent une liste de critères et de définitions cliniques de la maladie à l'intention des médecins (20). Ceci dit, il existe d'autres critères plus ou moins différents selon la région comme le critère d'Oxford de 1991 qui regroupe le syndrome de fatigue chronique et le syndrome post-viral, mais qui n'implique que la fatigue (21) ou encore le critère du consensus international, dérivé du consensus canadien (22). Une étude chez 6,175 patients démontre que seulement 15% de ceux qui répondent au critère d'Oxford répondent aux critères de Fukuda pour l'EM (23), indiquant la différence entre un critère large ou inclusif. Finalement, comme les critères d'inclusion varient, il est difficile d'établir la prévalence globale de la pathologie (3).

L'hétérogénéité clinique de l'EM se traduit par une grande variation des symptômes et de leur sévérité entre les PAEM mais aussi au cours du temps chez un même individu. Par conséquent, une meilleure stratification des patients devient nécessaire afin de trouver des diagnostics et éventuellement des traitements qui soient bien adaptés (24).

Malgré l'établissement de critères d'inclusion, on retrouve une grande hétérogénéité clinique dans les cohortes puisque les patients ne ressentent pas tous les mêmes symptômes et sont affectés à différents degrés (3). Un des aspects les plus compliqués de ne pas avoir de test diagnostique et de ne pouvoir se fier qu'aux symptômes est l'extrême subjectivité que cela amène. Par exemple, la perception de la douleur est très difficile à mesurer puisque le seuil de tolérance à la douleur est propre à chaque individu. De plus, la majorité des symptômes comme la fatigue ou le brouillard mental sont auto-déclarés et difficilement quantifiables.

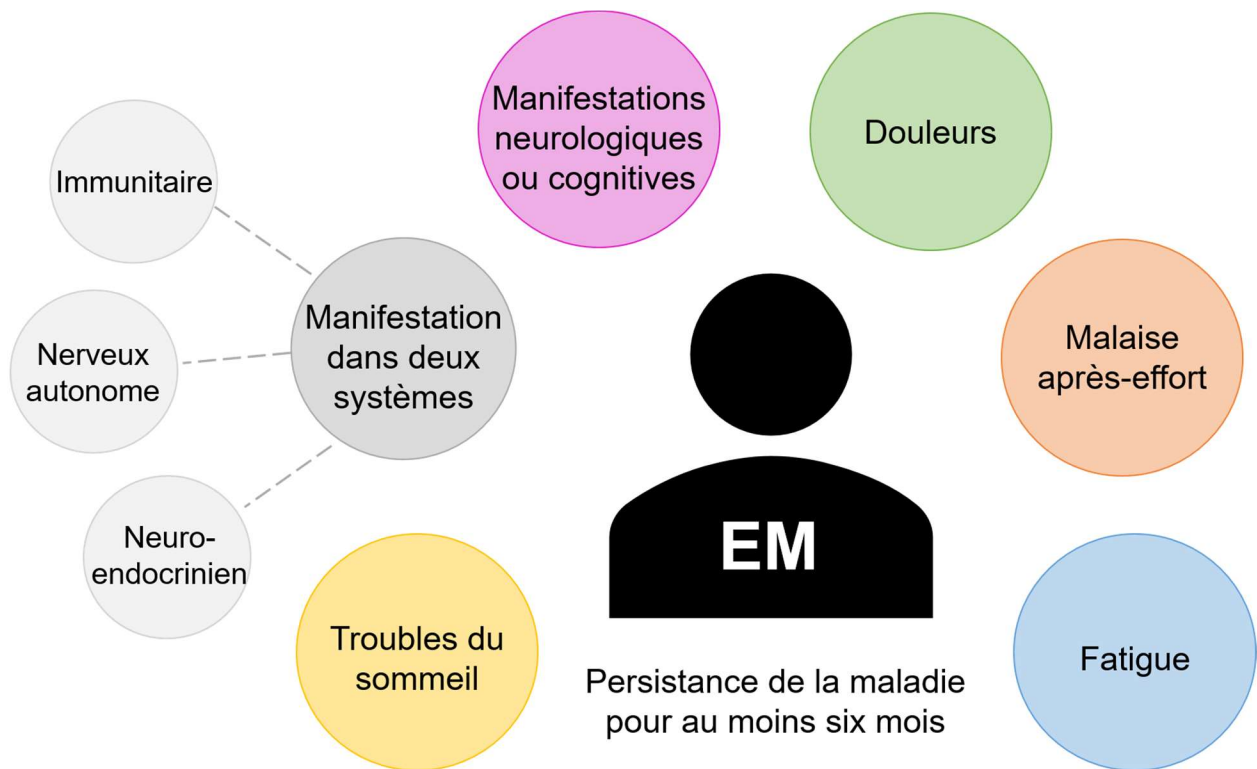


Figure 1. – Schéma des symptômes nécessaires au diagnostic de l'EM selon les critères du consensus canadien.

1. Fatigue	Degré important de fatigue physique et mentale réduisant le niveau d'activité de façon substantielle ; doit être nouvelle et inexplicquée ; persistante ou récurrente
2. Malaise après-effort (post-exertional malaise, PEM)	Perte inappropriée d'endurance physique et mentale, fatigabilité musculaire et cognitive rapide, malaise et/ou fatigue et/ou douleur après effort avec tendance à l'aggravation de l'ensemble des autres symptômes présents. La période de récupération est pathologiquement lente, généralement de 24 heures ou plus
3. Troubles du sommeil	Sommeil non réparateur ou perturbations de la quantité ou des rythmes du sommeil, telles que l'inversion du rythme ou la présence de rythmes diurnes chaotiques.
4. Douleurs	Degré significatif de myalgie. Douleur pouvant être ressentie dans muscles et/ou articulations, souvent éparses et migratrices, s'accompagnant souvent de maux de tête importants dont le type, la présentation et/ou la gravité sont nouveaux
5. Manifestations neurologiques ou cognitives (deux ou plus)	Confusion, troubles de concentration, déficience de mémoire à court terme, désorientation, difficulté à traiter et classer des informations et à trouver ses mots, troubles perceptuels et sensoriels, par ex. : instabilité spatiale ou désorientation ou incapacité de faire la mise au point visuelle. L'ataxie, la faiblesse musculaire et les fasciculations sont courantes. Peut y avoir des phénomènes de surcharge cognitive ou sensorielle, comme l'hypersensibilité au bruit ou à la lumière – et/ou surcharge émotionnelle pouvant mener à des épisodes asthéniques (crash) et/ou à de l'anxiété
6. Au moins un symptôme dans deux des trois catégories	<p><u>Système nerveux autonome</u> : intolérance orthostatique – hypotension à médiation neuronale, syndrome de tachycardie orthostatique posturale (POTS), hypotension posturale différée ; impression de léger étourdissement ; pâleur extrême ; nausées et syndrome de l'intestin ou du côlon irritable ; dysfonctionnement de la vessie ou de la fréquence mictionnelle ; palpitations avec ou sans arythmie cardiaque ; dyspnée à l'effort</p> <p><u>Système neuroendocrinien</u> : perte de stabilité thermostatique – température corporelle inférieure à la normale et fluctuations diurnes importantes, épisodes de transpiration, sensations fiévreuses répétées et extrémités froides ; intolérance aux températures extrêmes (chaudes comme froides) ; changement de poids important – anorexie ou appétit anormal ; perte de la faculté d'adaptation et aggravation des symptômes en période de stress</p> <p><u>Système immunitaire</u> : ganglions sensibles, maux de gorge à répétition, symptômes grippaux récidivants, malaise généralisé, apparition de nouvelles intolérances ou allergies à des aliments, médicaments et/ou produits chimiques</p>
7. Persistance de la maladie pour au moins six mois	

Tableau 1. – Critères requis pour un diagnostic clinique d'encéphalomyélite myalgique en fonction du CCC tel que décrit par Carruthers *et al.* (20) en 2003.

1.1.3 Comorbidités

Les comorbidités sont fréquentes chez les PAEM puisqu'on parle généralement d'une population vieillissante et sédentaire. On retrouve parmi celles-ci la fibromyalgie (FM), dont les symptômes chevauchent ceux de l'EM, le syndrome du côlon irritable, des allergies diverses, le syndrome de Raynaud, l'hypersensibilité chimique multiple et la dépression réactionnelle, pour n'en nommer que quelques-unes (22). Il est évident que la présence de comorbidités chez les PAEM complique l'étude de sa pathophysiologie puisqu'il subsiste une confusion quant à l'analyse de facteurs étudiés, mais peut aussi ralentir et compliquer le diagnostic (25).

Comme mentionné précédemment, il n'existe à ce jour aucun traitement contre l'EM. Alors qu'une très petite minorité de patients vont obtenir une rémission partielle ou complète de la maladie, la majorité des PAEM devra vivre avec la maladie tout au long de leur vie (6). Pour ces derniers, la mort risquera cependant d'être causée par d'autres comorbidités. Dans un échantillon de 56 patients, MacManimen *et al.* ont identifié que l'âge de la mort était inférieur à la moyenne nationale américaine et qu'une proportion importante sont décédés suite à des problèmes cardiovasculaires (26). Il faut aussi mentionner qu'un grand nombre de PAEM vont avoir des idées suicidaires et des problèmes de dépression dû à la stigmatisation de leur condition ou au manque de support de leur entourage entraînant une augmentation du risque de suicide chez ces derniers (27).

1.1.3.1 Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale

Parmi les comorbidités connues coexistant avec l'EM, l'intolérance orthostatique et le syndrome de tachycardie orthostatique posturale se retrouve chez près de 40% des PAEM. Chez ceux-ci, les symptômes comme la fatigue, les étourdissements ou la nausée vont apparaître et/ou s'intensifier lors du maintien d'une position debout ce qui est caractéristique des intolérances orthostatiques (28, 29).

1.1.4 Pathophysiologie

L'EM est une maladie multi-systémique et on peut le voir dans sa pathophysiologie puisqu'on recense des dysfonctions dans une variété de systèmes. Cela étant dit, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore bien compris et caractérisés (24).

1.1.4.1 Système immunitaire et inflammation

Plusieurs patients ont rapporté que leur maladie a commencé avec des symptômes similaires à ceux de la grippe ou à la suite d'une infection bactérienne. C'est grâce à cette information que plusieurs groupes de chercheurs ont émis l'hypothèse de l'implication d'un dérèglement du système immunitaire dans la pathologie (30). Une variété de composantes du système immunitaire sont sujettes à des dérégulations ou des déséquilibres dans la pathophysiologie de l'EM. Ces composantes seront brièvement décrites dans les prochains paragraphes dans le contexte de l'EM.

1.1.4.1.1 Cellules NK

Les cellules NK, *natural killer cells*, sont des cellules immunitaires impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (24, 30). Au sein de la population NK, il en existe plusieurs types ayant différentes fonctions comme la production de cytokines ou des fonctions cytotoxiques (31). Chez les patients EM, on note un déséquilibre des cellules NK (30). Toutefois, plusieurs études sont contradictoires: augmentation et diminution du nombre de cellules NK, cytotoxicité accrue ou diminuée (24). Il est difficile de prédire comment les cellules NK agissent d'un patient à l'autre. Il pourrait s'agir d'une régulation par les cytokines qui modifie et diminue leur activité, une diminution du nombre de cellules NK donc une baisse de cytotoxicité, ou encore une augmentation du nombre de cellules, mais avec une activité moindre (4). Le métabolisme des cellules NK est différent selon qu'elles soient activées ou au repos (31) ce qui suggère que la dérégulation des comportements des cellules NK chez les PAEM est variable selon le stade de la maladie et en fonction des sous-types cellulaires.

1.1.4.1.2 Lymphocytes B et T

Les lymphocytes sont aussi dérégulés chez un sous-ensemble de patients EM. Notamment, certains lymphocytes T subissent une activation anormale et une augmentation de leur cytotoxicité (30). Une équipe a démontré qu'il existe un lien entre le phénotype des lymphocytes NKT et des cellules NK CD56⁺⁺ et l'apparition des symptômes, soit à la suite d'une infection ou l'apparition spontanée de la maladie (28), ce qui permettrait d'établir une différence selon le développement de la maladie entre les patients.

Les lymphocytes B sont aussi d'intérêt pour l'EM. En effet, des études ont montré que les populations de lymphocytes B CD20⁺ CD5⁺ sont augmentées chez les patients par rapport aux sujets sains (3, 32). L'augmentation de ce type cellulaire est également liée à une augmentation du marqueur CD21, qui

sert de récepteur pour le virus d'Epstein-Barr et à la production d'auto-anticorps qui attaquent l'organisme (30). D'ailleurs, les lymphocytes B ont été ciblés lors d'essais cliniques pour l'EM. Les Drs Fluge et Mella ont découvert qu'une thérapie de déplétion en lymphocytes B par le Rituximab occasionne une amélioration des symptômes de l'EM (32). Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique qui cible le marqueur CD20 présent à la surface des lymphocytes B (32). Sa liaison au récepteur CD20 induit une apoptose, la lyse cellulaire ou la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (33). Cependant, après deux essais concluants en phase 2 impliquant 3 et 28 patients respectivement (32, 34), un troisième essai en phase 3 avec 151 patients n'a pas démontré les améliorations attendues chez les patients EM testés lorsque comparé aux patients traités avec le placebo (35).

1.1.4.1.3 Cytokines

Différentes études démontrent une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et une dérégulation des cytokines anti-inflammatoires (30). Selon les résultats de l'équipe de Hornig *et al.* (36), les profils plasmatiques des cytokines ne sont pas liés à la sévérité des symptômes, mais corrént plutôt avec la durée de la maladie. Pour ne donner qu'un exemple, la présence accrue d'interféron gamma (IFN- γ) est associée à l'EM de plus courte durée (moins de trois ans). Pour les patients qui ont la maladie depuis plus de trois ans (longue durée), il y aurait une diminution de cette cytokine (36). On sait également qu'une expression aberrante d'IFN- γ par les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est également associée aux maladies auto-immunes (37). Les auteurs ont émis comme hypothèse que les malades de longue durée, ont des cellules immunitaires « fatiguées », comme lorsqu'un individu combat une infection chronique (36).

On sait également que certaines cytokines pro-inflammatoires sont associées à la douleur, notamment IL-1 β , IL-6 et TNF- α (38). Comme de fait, la douleur chronique est un des symptômes clés de l'EM selon le critère du consensus canadien (20) et ces trois cytokines ont d'ailleurs été étudiées.

1.1.4.2 Mitochondries

Considérant que toutes les cellules du corps contiennent des mitochondries, les dysfonctions mitochondriales peuvent expliquer les perturbations observées au niveau du métabolisme énergétique des cellules immunitaires et autres types cellulaires reflétant ainsi la panoplie de complications affectant différents systèmes physiologiques (39, 40). Parmi les évidences de défauts mitochondriaux, on note une augmentation dans l'accumulation de lactate après une séance d'exercice, la présence de

dommages, et une production d'ATP débalancée (39). Chez une cohorte de 71 patients testés, une équipe a rapporté que l'intensité du dysfonctionnement mitochondrial dans les neutrophiles corrèle avec la sévérité de la maladie (40). Parallèlement, une autre étude a mis en évidence huit SNP au niveau de l'ADN mitochondrial qui seraient associés à certains symptômes, soit au niveau de leur susceptibilité ou de leur sévérité (41).

Lors d'un effort, la demande en ATP augmente et lorsque la demande excède la production, il en résulte une accumulation en lactate (42). Chez les patients EM qui présentent des défauts mitochondriaux, on retrouve une accumulation anormale de lactate suivant un exercice, même très léger (12, 39). On retrouve également une diminution des niveaux de coenzyme Q₁₀, qui agit comme cofacteur pour la production d'ATP (43). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré une production d'ATP réduite chez les patients EM (24), malgré qu'à l'inverse, une élévation d'ATP ait été mise en évidence dans une cohorte américaine (44). Ceci illustre encore une fois, que l'EM est une maladie complexe et que tous les patients qui en sont atteints ne présentent pas les mêmes défauts physiologiques.

Morris et Maes (39) avancent que l'activation du système immunitaire et de l'inflammation ainsi que la présence accrue d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote serait à l'origine des défauts mitochondriaux suite aux dommages induits au niveau de la chaîne de transport d'électrons.

1.1.4.2.1 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

On retrouve une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de l'azote (RNS). Cette augmentation crée un débalancement au niveau des mitochondries puisqu'une augmentation des ROS a un impact sur la chaîne de transport d'électron et éventuellement sur la production d'ATP et sur la phosphorylation oxydative. Inversement, un défaut de la phosphorylation oxydative augmente la quantité de ROS (39). Aussi, on note une élévation chronique des stress oxydatif et nitrosatif (O&NS) qui ont un impact sur la fatigue et la douleur musculaire dont les patients peuvent souffrir (12). On retrouve ces types de stress quand l'équilibre entre l'oxydation et les anti-oxydants penche en faveur l'oxydation, ce qui peut engendrer des dommages cellulaires (3). Comme de fait, on retrouve une formation excessive de radicaux libres qui vont attaquer les lipides, ce qui est démontré chez certains patients par une quantité surélevée de F2-isoprostanes qui sont des marqueurs de stress oxydatif *in vivo* (45, 46). Les O&NS engendrent également des dommages à l'ADN et aux protéines (47). Les lipides et les protéines endommagés deviennent donc des cibles pour le système

immunitaire, ce qui crée une boucle de rétroaction entre le système immunitaire et le stress oxydatif et les mitochondries (3).

1.1.4.3 Microbiote

Le microbiote intestinal peut être déséquilibré en cas d'infection, de maladie inflammatoire ou d'inflammation chronique, créant ainsi une dysbiose intestinale (48). Dans le cas de certaines pathologies, un tel déséquilibre peut aussi en exacerber les symptômes (49). Plusieurs patients atteints d'EM ont rapporté des symptômes gastro-intestinaux, bien que ceux-ci ne soient pas inclus dans la majorité des critères d'inclusion de la pathologie (15). Néanmoins, plusieurs équipes démontrent une association significative entre l'EM et un microbiote altéré dans leurs cohortes respectives (50). Deux équipes ont également identifié des différences dans le microbiote fécal entre les patients EM et des individus en santé (15). À l'inverse, Giloteaux *et al.* (15) n'ont pas constaté de transformation significative du microbiote intestinal de leur cohorte. Une autre étude d'un groupe associé (51) indique une baisse non-significative de la diversité microbienne. Malgré tout, ils sont d'avis que la dysbiose intestinale peut contribuer à l'intensité des symptômes et de leur sévérité. Une revue récente (49) a comparé les différentes études faites sur le microbiote et son implication potentielle avec l'EM. Les auteurs allèguent que les résultats sont contradictoires et qu'il est difficile d'établir une connexion directe entre une variation du microbiote intestinal et la pathophysiologie de l'EM; cette conclusion est d'ailleurs partagée par d'autres chercheurs (6). Cela dit, une dysbiose intestinale continue d'être considérée comme une hypothèse plausible et possiblement liée aux dysfonctions immunitaires et à l'inflammation (6, 50).

1.1.4.4 Neurologie, neuro-inflammation et système neuroendocrinien

Considérant que les individus atteints de l'EM présentent différents symptômes neurocognitifs dont des troubles du sommeil et affectant le système nerveux autonome, l'hypothèse de l'implication du système nerveux central a émergé en lien avec la présence d'une neuro-inflammation. Des différences ont été relevées dans le liquide céphalo-rachidien des patients EM par rapport à des individus en bonne santé, notamment avec des microARN qui induiraient une réponse neuro-inflammatoire ainsi que différentes cytokines pro-inflammatoires (52, 53). Nakatomi *et al.* (53) ont utilisé des techniques de neuroimagerie afin de visualiser la neuro-inflammation. Leurs résultats indiquent une inflammation accrue du thalamus, de l'amygdale entre autres, liée avec les troubles cognitifs décrits par les patients de l'étude. Mackay et Tate (52) avancent que le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est un

facteur clé dans la neuro-inflammation, notamment via l'activation des cellules gliales. L'hypothalamus régule aussi l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (52), vraisemblablement impliqué dans l'EM.

1.1.4.4.1 Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Les perturbations des fonctions neuroendocriniennes en lien avec l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA) ont été étudiées en profondeur chez les PAEM. Par exemple, on note fréquemment une baisse du niveau de cortisol chez les patients EM, que ce soit dans la salive, le plasma ou l'urine (3, 54). Les niveaux de cortisol salivaire semblent associés à la sévérité de la fatigue ou de la douleur (55). La cause de cet hypocortisolisme demeure inconnue. Des chercheurs suggèrent un problème de signalisation entre le système nerveux central et les glandes surrénales, ou encore un mécanisme compensatoire suite à une hyperactivation de l'axe HPA après un épisode de stress (3). Effectivement, une grande proportion des patients EM vivent de grands épisodes de stress, ce qui contribue à l'exacerbation de leurs symptômes (56).

Bien que l'hypo fonctionnalité de l'axe HPA ait été associée à l'EM, on ne sait si ce lien est causal ou simplement une conséquence (3, 54) compte tenu qu'elle soit présente que chez certains patients (47). L'implication de l'axe HPA est également rattachée au dysfonctionnement du système immunitaire et du système nerveux autonome (5). Spécifiquement l'axe HPA exerce une boucle de rétroaction sur le système immunitaire en excrétant des hormones qui diminuent la réponse immunitaire et la production de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent la production d'hormones HPA (47). L'axe peut aussi être dérégulé en raison du stress oxydatif et nitrosatif, particulièrement par le monoxyde d'azote (NO) (47, 54).

1.1.4.5 Métabolisme et métabolome

L'EM amène des perturbations dans les différents systèmes physiologiques, qui sont également reflétées dans les voies métaboliques. Le métabolisme pourrait possiblement contribuer à la pathophysiologie de la maladie via divers mécanismes. Naviaux *et al.* (57) ont analysé 612 métabolites et ont identifié que chez les patients EM, 20 voies métaboliques étaient touchées, et que dans 80% des cas il s'agissait d'une baisse du niveau des métabolites, suggérant ici un hypométabolisme. D'autres études tirent des conclusions similaires en ciblant des voies métaboliques directement, comme Germain *et al.* (58) avec le métabolisme des lipides et la biosynthèse des acides gras par exemple ou Armstrong *et al.* (59) avec la glycolyse. Fluge *et al.* (60) avancent que la présence d'un profil d'acides

aminés du sérum altéré causerait un défaut d'oxydation du pyruvate dans les mitochondries, ce qui aboutirait à un métabolisme énergétique endommagé chez les patients EM.

1.1.4.5 Malaise après-effort

Le malaise après-effort (*Post-exertional malaise* en anglais ou PEM) est un symptôme phare de l'EM et les patients ressentent souvent une détérioration de leur état à la suite d'un effort physique ou même cognitif minime. McGregor *et al.* (61) ont voulu déterminer la nature des changements biochimiques chez les patients qui en souffrent. Ils ont démontré une diminution significative de l'hypoxanthine suggérant ainsi un dérèglement dans le métabolisme des purines. Ils ont également identifié une augmentation de l'excrétion de glucose et un changement du ratio glucose/lactate, qui suggère une glycolyse altérée. Plus récemment, Nepotchatykh *et al.* (62) ont établi une classification basée sur l'expression différentielle de microARN circulants après l'induction du malaise après-effort. Cette classification inclut quatre différents groupes avec des symptômes de sévérité différente d'un groupe à l'autre. Les résultats de ces deux études sont une indication que considérer tous les patients EM dans leur ensemble n'est pas nécessairement profitable puisqu'il existe des différences au sein de cette population.

1.2 Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale

Les intolérances orthostatiques (IO) représentent un ensemble de troubles cardiovasculaires impliquant une difficulté à supporter une position debout et l'apparition de symptômes qui y sont liés, mais qui sont soulagés en regagnant une position couchée (63). Le syndrome de tachycardie orthostatique posturale, ou POTS en anglais, est défini comme un désordre du système nerveux autonome (64) qui est considéré comme une version chronique, possiblement quotidienne des IO (63). En plus des symptômes de l'IO, le POTS occasionne une augmentation rapide et excessive du rythme cardiaque, sans hypotension orthostatique (63, 65). La tachycardie quant à elle, est décrite comme un rythme cardiaque supérieur à 100 bpm (66).

1.2.1 Définition et critère de diagnostic

Une définition clinique récente du POTS a été décrite par Vernino et collègues et validé par diverses sociétés et associations médicales reconnues (64, 67). L'étiologie du POTS demeure inconnue. La condition peut être déclenchée par plusieurs facteurs incluant un traumatisme, un événement immunologique, ou encore une chirurgie (67). Les individus de tous sexes et âges peuvent en être atteints, bien qu'il soit estimé que 75 à 80% des personnes atteintes sont des femmes (68). La prévalence du POTS n'a cependant pas été déterminée avec précision dans la population mais il est estimé que près de 40% des PAEM en sont atteints (64).

1. Une augmentation soudaine du rythme cardiaque d'au moins 30 bpm dans les 10 minutes suivant un passage à la position debout. Une augmentation de 40 bpm est nécessaire chez les jeunes de 12-19 ans
2. Absence d'hypotension orthostatique (baisse d'au moins 20 mm Hg de la pression systolique ou 10 mm Hg de la pression diastolique)
3. Symptômes fréquents d'intolérance orthostatique qui sont soulagés au retour à la position couchée (étourdissements, palpitations, tremblements, faiblesse généralisée, vision embrouillée et fatigue)
4. Symptômes d'une durée d'au moins 3 mois
5. Absence d'autres symptômes pouvant expliquer la tachycardie sinusale comme l'anxiété, l'anémie, l'hyperventilation, l'anorexie, la fièvre, la déshydratation, l'hyperthyroïdie, l'usage de médicaments ou drogues cardio-actives, la douleur, les infections, le déconditionnement physique sévère dû à un repos prolongé ou un phéochromocytome

Tableau 2. – Définition clinique du syndrome de tachycardie orthostatique posturale telle que présenté dans le National Institutes of Health Expert Consensus Meeting. Tiré de Vernino *et al.* (64).

Avant d'être diagnostiqué comme atteint de POTS, un individu doit rencontrer les critères présentés au Tableau 2. Le cas échéant, une batterie de tests peut être entreprise pour confirmer, ou non le diagnostic (65). Un des tests fréquemment utilisé est le test d'inclinaison, *head-up tilt test*, avec un monitoring hémodynamique non-invasif (68). Lors d'un test d'inclinaison, le rythme cardiaque et

la pression artérielle sont mesurés en continu pendant que l'individu est en position verticale sur une table d'inclinaison, puis la table est inclinée à un angle supérieur à 60° (65).

De plus, le diagnostic peut être confirmé avec un monitoring du rythme cardiaque pendant 24 à 48h par électrocardiogramme (67). Cette confirmation permet notamment de faire la distinction entre une tachycardie sinusale inappropriée (IST) et le POTS (69). Bien qu'il y ait un chevauchement de symptômes entre le POTS et l'IST, la différence principale entre les deux est en lien avec la position du corps; dans l'IST, la position du corps n'a pas d'impact sur les symptômes ressentis (70).

1.2.2 Pathophysiologie

L'étiologie du POTS n'a pas été précisément identifiée et la pathophysiologie entourant la condition est mal comprise (71, 72). Cela dit, plusieurs avancent l'hypothèse que la tachycardie orthostatique et le POTS seraient le fruit d'une seule voie biologique contenant plusieurs branches pathophysiologiques tel que présenté à la figure 2 (65).

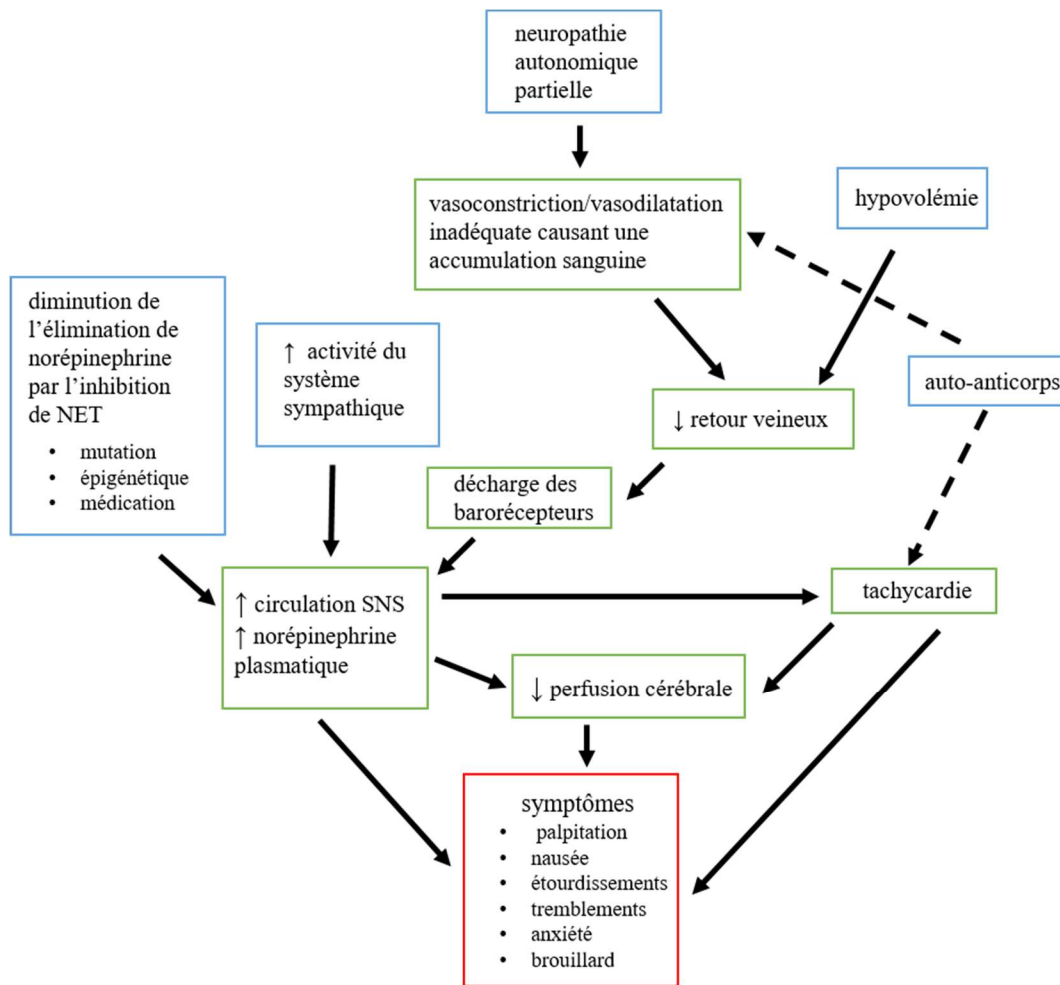


Figure 2. – Représentation schématique des pathophysiologies du POTS et de la tachycardie orthostatique. Adapté de Arnold *et al.* 2018 (65)

On identifie généralement trois sous-types de POTS (63, 68), qui ne sont cependant pas mutuellement exclusifs (65): neuropathique, hypovolémique et hyper-adrénergique. Le POTS neuropathique est associé à une neuropathie périphérique, plus spécifiquement une dénervation sympathique qui engendre une augmentation des niveaux circulants de norépinephrine et surtout une vasoconstriction plus importante dans le bas du corps (73, 74). Le POTS hypovolémique implique une quantité réduite du volume sanguin et un dérèglement du système rénine-angiotensine-aldostérone (73). Le POTS hyper-adrénergique quant à lui, inclut une hypertension orthostatique en plus des tachycardies (75) ainsi qu'une concentration plasmatique de norépinephrine anormalement élevée (>600pg/mL) (68, 76). Qui plus est, alors que la norépinephrine peut entraîner la vasoconstriction (77), un milieu biochimique contenant des agents

vasodilatateurs peut lui aussi causer une augmentation des tachycardies (64). Ainsi, une vasodilatation entraînera une diminution du flux sanguin cérébral qui sera compensé par une augmentation rapide du rythme cardiaque (78).

1.2.2.1 SLC6A2 — NET

La norépinephrine est un neurotransmetteur des systèmes nerveux centraux et périphériques (79). Tel que mentionné ci-haut, chez les individus atteints de POTS, il y a souvent une concentration anormalement élevée de norépinephrine dans le sang.

Une mutation dans le gène codant pour le transporteur de norépinephrine (SLC6A2 ou NET, ENSG00000103546) a été identifié chez une famille dont plusieurs membres sont atteints de tachycardies orthostatiques (80). La mutation Ala457Pro dans l'exon 9 du gène SLC6A2 implique une perte de fonction de près de 98% du transporteur NET (81). Le rôle du transporteur est d'amener la norépinephrine de la synapse vers le neurone présynaptique (82). La mutation identifiée a donc un impact sur la recapture de la norépinephrine ce qui engendre des niveaux plasmatiques élevés (80). En revanche, cette mutation n'explique pas tous les cas de tachycardies orthostatiques et ne sont pas communes (65, 80, 83). Afin d'approfondir la question, Bayles et collègues (81) ont investigué l'impact de différents polymorphismes et modifications épigénétiques sur l'expression de NET. Les niveaux d'expression de NET étaient diminués, mais sans que ce soit causé par des SNP ou la méthylation du promoteur du gène SLC6A2. Les auteurs en ont conclu que ça provenait de marques épigénétiques sur la chromatine, H3K27me. Kaipananickal *et al.* (84) ont à leur tour proposé que cibler le gène *EZH2*, *enhancer of zeste homolog 2*, une méthyltransférase responsable de la marque de modification d'histone H3K27me, permettrait d'empêcher la mise sous silence du gène SLC6A2. L'inhibition pharmacologique de *EZH2* pourrait donc être une piste thérapeutique pour diminuer les niveaux plasmatiques de norépinephrine.

Plusieurs composés pharmacologiques sont utilisés pour traiter des conditions neuropsychiatriques ciblent également la protéine NET (65). C'est le cas entre autres des inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la norépinephrine (SNRI) comme la duloxetine ou la venlafaxine (82, 85). À la lumière du rôle de NET et de la norépinephrine dans la pathophysiologie du POTS, l'utilisation de ces médicaments peut être problématique chez certains patients (86). Par exemple, la reboxetine et l'atomoxetine inhibent le transporteur NET. L'un reproduit des symptômes similaires à ceux d'une

tachycardie orthostatique chez des individus sains (87) et l'autre aggrave les symptômes d'individus atteints de POTS (86).

1.2.3 Intolérance orthostatique et encéphalomyélite myalgique

Tel que mentionné plus haut (tableau 1 et section 1.1.3.1), certains individus atteints d'EM peuvent également vivre des épisodes d'intolérances orthostatiques ou vivre avec le POTS. En effet, dans une étude menée sur un grand nombre d'individus atteints de POTS, 21% étaient également atteints par l'EM (64). Bien que les symptômes de l'EM et du POTS semblent souvent se chevaucher, ils sont considérés comme deux pathologies à part entière (88). Dans une étude, van Campen *et al.* (89) ont comparé les volumes sanguins de deux groupes de PAEM, un avec des symptômes d'IO et l'autre sans symptôme. Les PAEM avec IO avaient des volumes sanguins significativement inférieurs à l'autre groupe, ainsi qu'aux valeurs attendues. Conséquemment, les symptômes d'IO ont une importante répercussion sur les activités quotidiennes et la qualité de vie des PAEM (90). Dans le cas de l'EM comme du POTS, les individus atteints souffrent de perturbations cognitives, que ce soit des épisodes de brouillard mental ou des troubles de mémoire (91). Ceci étant dit, le stress orthostatique augmente d'avantage la dysfonction neurocognitive chez les sujets souffrant d'EM, bien que la pathophysiologie reliant les deux soit toujours incomprise et que dans ce cas-ci le flux sanguin cérébral ne semble pas en cause (92). Finalement, selon une méta-analyse effectuée en 2019 par Nelson *et al.* (93), les PAEM ont tendance à avoir des rythmes cardiaques plus élevés, mais également une régulation du rythme cardiaque altérée en comparaison aux sujets sains.

1.3 microARN

1.3.1 Généralités sur les microARN

Les microARN (miARN) sont de petites molécules d'ARN non codants découverts en 1993 par Lee *et al.* (94) dans l'organisme *Caenorhabditis elegans*. Ils ont une longueur entre 18 et 25 nucléotides et sont d'importants régulateurs de l'expression génique. Initialement considérés comme propre à *C. elegans*, plusieurs séquences de miARN ont été identifiées comme conservées à travers les espèces (95). Selon la base de données miRBase, à ce jour 38 589 miARN ont été prédits ou validés chez 271 espèces et 1 971 pour l'humain (96).

La biogénèse des miARN débute dans le noyau. Les séquences sont positionnées à divers endroits du génome, tant dans les régions intergéniques qu'intragéniques, dans les introns ou dans les exons (97). Les séquences sont transcrites par les ARN polymérase Pol II et Pol III (98) en microARN primaire, pri-miARN. Un complexe enzymatique va traiter le pri-miARN en pre-miARN, molécule d'environ 70 nucléotides avec une structure en tige-boucle, obtenue via l'action de l'enzyme Drosha (95, 98). Le pre-miARN est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 5 où la molécule sera clivée par le complexe Ago2/Dicer pour atteindre sa forme mature double brin (97). Le brin passager sera détruit, alors que le brin guide sera intégré au complexe RISC pour la régulation génique (98).

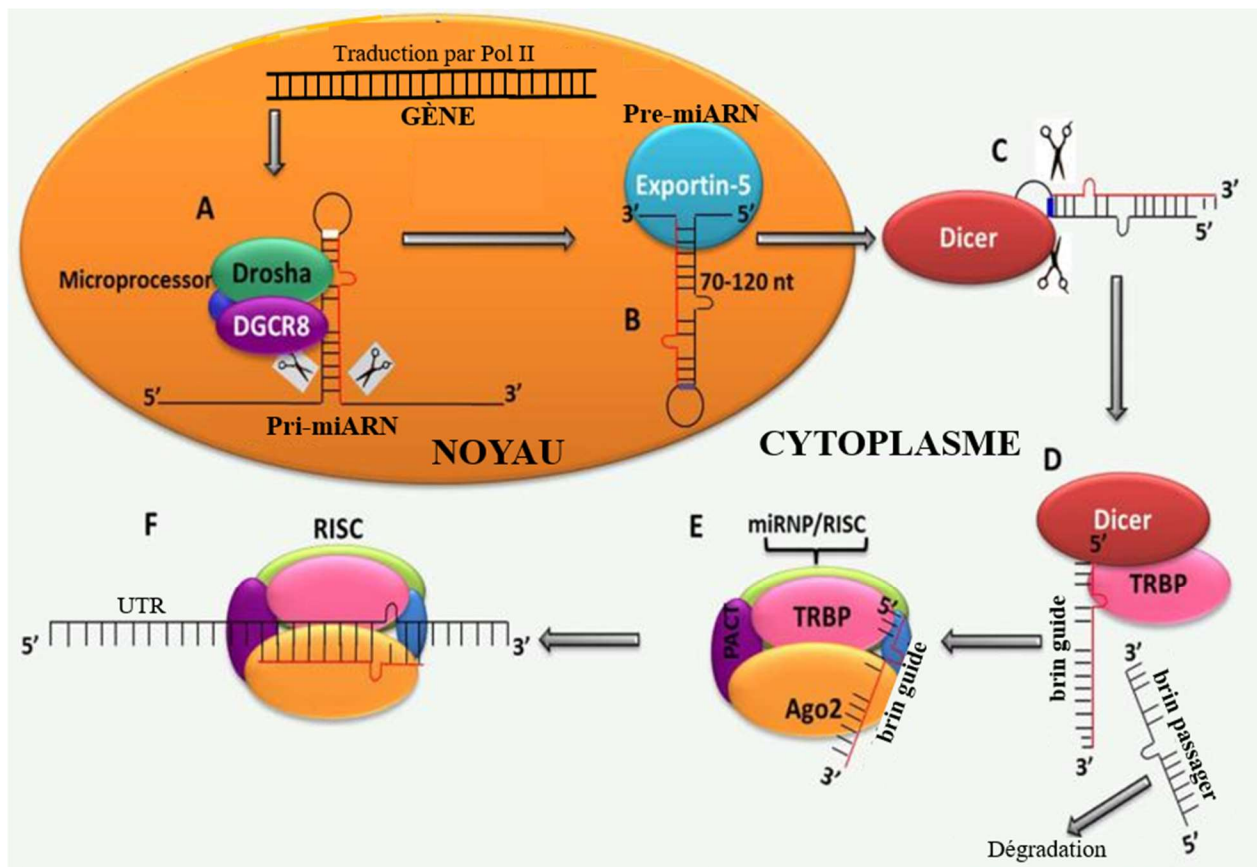


Figure 3. – Schéma de la biogénèse des microARN. La séquence d'ADN contenant le microARN est transcrite en pri-miARN dans le noyau. (A) Le complexe microprocesseur contenant l'enzyme Drosha et la protéine de liaison à l'ARN DGCR8 clivent le pri-miARN en pre-miARN, molécule de 70-120 nucléotides avec une structure tige-boucle. (B) L'Exportine 5 exporte le pre-miARN vers le cytoplasme. (C) Dicer clive le pre-miARN en microARN mature de 18-25

nucléotides. (D-E) Le complexe Dicer et TRBP permettent d'incorporer le brin guide dans le complexe RISC alors que le brin passager sera détruit. (F) Le miARN est guidé avec le complexe RISC vers sa cible, généralement la région 3'UTR pour réprimer ou inhiber la traduction de l'ARNm d'intérêt. Figure adaptée de Bhaskaran *et al.*, 2014 (95).

Le plus souvent, le miARN se lie à la région 3'UTR ou même au niveau de la région codante de l'ARNm cible pour aller réprimer l'expression en créant un blocage au niveau de la machinerie ribosomale. Bien que les miARN contribuent dans la grande majorité des cas à diminuer la production de protéine au niveau du gène ciblé, il arrive qu'ils activent l'expression génique en se liant au niveau du promoteur ou la région 5'UTR (99). Chaque miARN possède plus d'une cible (jusqu'à 200 gènes) et les ARNm peuvent être régulés par différents miARN (98).

Les miARN sont exprimés dans différents tissus et types cellulaires, mais existent aussi de manière circulante dans les fluides biologiques (99, 100). Les miARN ont été étudiés dans le contexte d'une panoplie de maladies pour leur potentiel comme biomarqueurs (95, 97-99). Ils sont généralement stables de manière circulante puisqu'ils sont contenus dans des exosomes ou des complexes lipido-protéiques qui peuvent résister aux nucléases et à divers stress comme des cycles de gel-dégel, une variation de pH ou de température (100).

1.3.2 hsa-miR-150-5p

Plusieurs miARN sont dérégulés chez certains PAEM tel que démontré par diverses équipes de recherche (62, 101, 102). Parmi les miARN identifiés, le hsa-miR-150 (103-105) et plus précisément hsa-miR-150-5p (62, 102) a été investigué dans le cadre de l'EM.

Ce miARN a été identifié comme un biomarqueur potentiel pour l'insuffisance cardiaque avancée, où il était sous-exprimé et associé à la sévérité de la maladie (106). Il a également été caractérisé comme biomarqueur potentiel de la myasthénie auto-immune où sa concentration était supérieure dans le sérum d'individus atteints, puis diminuait après une thymectomie corrélant avec une amélioration des symptômes, possiblement en lien avec les niveaux en lymphocytes CD4+ et CD8+ (107, 108). Le miR-150-5p a également été étudié dans le contexte de divers cancers (109-112) et beaucoup d'études ont été menées sans pouvoir clarifier s'il s'agissait de la version 3p ou 5p du miR-150.

Le hsa-miR-150-5p a plusieurs centaines de cibles prédites (113), parmi celles-ci se trouve le gène SLC6A2 (114). Selon l’outil de prédiction TargetScanHuman, hsa-miR-150-5p irait se positionner en position 1314 à 1320 de la région 3’UTR du gène SLC6A2 avec un appariement parfait avec la région *seed* (nucléotides 2-7) et le nucléotide en position 8 (114) ce qui contribue à la spécificité et à l’activité du miARN. Ceci suggère que le miR-150-5p puisse inhiber la traduction du gène SLC6A2 codant pour la protéine NET, et pourrait ainsi être impliqué dans le POTS (65, 80). Cette hypothèse n’a pas encore été explorée à ce jour par d’autres équipes de recherche.

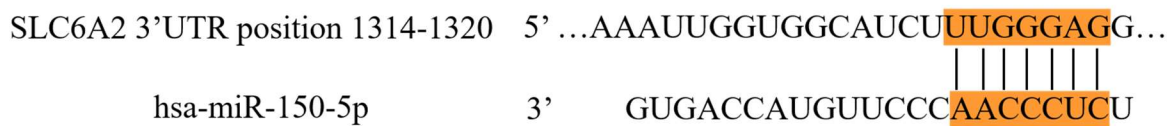


Figure 4. – **Prédiction de l’interaction entre hsa-miR-150-5p et SLC6A2 selon TargetScan (114).**

1.4 Thrombospondine-1

1.4.1 Généralités sur la thrombospondine-1

La thrombospondine-1 (TSP-1) est une protéine trimérique de 45kDa à sept domaines et qui est encodée par le gène THBS1. THBS1 (ENSG00000137801) se trouve sur le chromosome 15 et compte 22 exons (115). Le gène THBS1 est exprimé dans plus de 200 tissus chez l’humain (116). Majoritairement sécrétée, on détecte la TSP-1 dans divers fluides corporels comme le plasma (117-119), le sérum (120, 121), le liquide céphalo-rachidien (122) et la salive (123). Initialement identifiée en 1971 comme « thrombin-sensitive protein » (*TSP*) (124), la TSP-1 est maintenant une protéine étudiée tant dans un contexte fondamental que dans le contexte de plusieurs maladies humaines.

La TSP-1 est une glycoprotéine matricellulaire, présente dans la matrice extracellulaire et médiatrice des interactions cellule-cellule et cellule-protéine. Elle lie différents récepteurs notamment CD36, CD47, $\alpha 2\delta 1$, et plusieurs intégrines. C’est une protéine qui présente un large interactome, puisqu’en plus des récepteurs mentionnés, elle se lie également à des protéines de la matrice extracellulaire, à des protéases et à des facteurs de croissance (125). Bien que la TSP-1 soit présente dans la matrice extracellulaire, elle n’a pas une fonction structurale comme d’autres protéines qui s’y retrouvent (126).

En effet, plus de 80 protéines peuvent se lier à la TSP-1(125) illustrant la diversité de ses fonctions et des processus biologiques dans lesquels elle est impliquée. Parmi ceux-ci on retrouve l'angiogenèse, l'inflammation et l'apoptose notamment (127-131). La TSP-1 est également liée à de multiples catégories de maladies, que ce soit les cancers (132-134), les maladies métaboliques (135), les maladies cardiovasculaires (118, 134) ou encore les maladies hépatiques (136, 137).

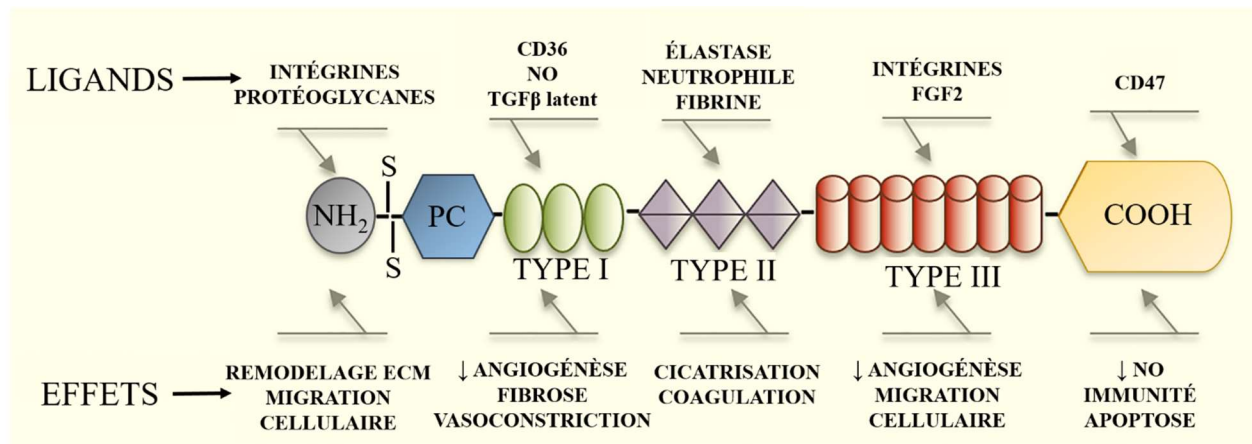


Figure 5. – **Schématisation des domaines de la thrombospondine-1, des ligands principaux et de leurs effets.** Les domaines N et C terminaux ainsi que les domaines type I (TSR1), type II (TSR2), type III (TT3R) ont été représentés. Le domaine PC (procollagène) n'a pas de ligand connu (138). Le domaine SS correspond à un pont disulfure, généralement associé à une superhélice. Figure adaptée de Gutierrez *et al.*, 2021 (135)

1.4.2 La thrombospondine-1 comme vasoconstricteur

La TSP-1 interagit avec le récepteur transmembranaire CD47 via son C-terminal initiant la signalisation TSP1-CD47 (139). CD47 est exprimé de manière ubiquitaire (140). Bauer *et al.* ont démontré que la TSP-1 circulante limite la production du vasodilatateur NO via son interaction avec le récepteur CD47 (141). L'oxyde nitrique (NO) bloque la contraction des cellules des muscles lisses vasculaires et l'agrégation plaquettaire, favorisant ainsi la vasodilatation. Il est considéré comme un vasodilatateur essentiel (142) et comme un régulateur de l'homéostasie et du tonus vasculaire (143). De plus, l'interaction TSP-1-CD47 inhibe la phosphorylation de VEGFR2, empêchant sa liaison avec VEGF et interrompant par le fait même le potentiel angiogénique de VEGF (144). On considère donc que la signalisation TSP1-CD47 accentue la vasoconstriction et entrave l'angiogenèse.

CD36 est un récepteur membranaire de type récepteur *scavenger* qui reconnaît le motif TSR1 (*thrombospondin structural repeats*) en plus d'autres protéines comportant ce domaine (145). La signalisation de NO peut aussi être régulée par la TSP-1 via son interaction avec le récepteur CD36 (140). Cela dit, alors que le récepteur CD47 est essentielle pour cette régulation, la TSP-1 demeure un inhibiteur de la signalisation NO même dans les cellules qui ne comportent pas de récepteur CD36 (140). Les propriétés anti-angiogéniques de la TSP-1 sont majoritairement attribuées à l'interaction TSP-1-CD36 (146), soit par l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales (147) ou par la réduction de la phosphorylation de VEGFR2 (148, 149).

Sachant que la TSP-1 est connu pour son caractère anti-angiogénique, Malek *et al.* ont mesuré la performance et l'endurance musculaire chez des souris TSP-1 *null* (150). Les souris génétiquement modifiées dépourvues de TSP-1 avaient une meilleure capacité physique que les souris de type sauvage, ainsi qu'une plus grande concentration de VEGF dans les muscles, suggérant que la TSP-1 est essentielle pour contrebalancer les propriétés pro-angiogénique de VEGF. Cela étant dit, la même équipe avait révélé que chez les rats, une seule séance d'exercice d'une heure augmentait de 3.5 fois la quantité d'ARNm de TSP-1 soulevant le questionnement sur le rôle de la TSP-1 dans un contexte de la réponse physiologique à l'exercice physique (151). D'autres études ont également identifié la TSP-1 comme étant une protéine mécanosensible (152, 153).

1.5 Hypothèses et objectifs de recherche

1.5.1 Problématique

L'encéphalomyélite myalgique (EM) est une maladie chronique complexe et multi-systémique dont l'étiologie demeure mal comprise. Les symptômes multiples et divers tel que décrits dans les critères du consensus canadien (20) varient en fréquence et en sévérité d'un individu à l'autre, rendant les populations de patients très hétérogènes cliniquement. Parmi les symptômes de l'EM, l'IO qui regroupe des manifestations des systèmes nerveux autonome, neuroendocrinien ou immunitaire, sont des plus débilantes et affectent grandement la qualité de vie. L'IO peut aussi être déclenchée et/ou exacerbée par le malaise après-effort, symptôme phare de l'EM (154).

L'IO se manifeste lors du maintien d'une position debout. Les symptômes sont allégés en regagnant une position couchée. Parmi ceux-ci on retrouve entre autres les étourdissements, la nausée, la vision embrouillée ou la syncope. Le syndrome de tachycardie orthostatique posturale, ou POTS, défini comme un désordre du système nerveux autonome (64), est la forme d'intolérance orthostatique la plus prévalente (154). Le POTS est caractérisé principalement par une augmentation rapide du rythme cardiaque d'au moins 30 battements par minute au passage de la position couchée à la position debout. La pathophysiologie des IO et du POTS est encore mal comprise, mais le rôle de la norépinephrine et de son transporteur NET ont été investigués (80, 86, 87). En effet, chez certains individus atteints, les niveaux plasmatiques de norépinephrine sont drastiquement élevés. Qui plus est, un milieu biochimique réduisant la vasoconstriction pourrait avoir un rôle potentiel dans le déclenchement des tachycardies liées au POTS (64).

Notre laboratoire a publié précédemment une étude sur les microARN circulants dans le plasma des PAEM et leur impact sur la sévérité des symptômes ressentis (62). Parmi les miARN identifiés, le hsa-miR-150-5p a été prédit comme pouvant cibler le gène SLC6A2 codant pour le transporteur de la norépinephrine ou NET (Ingenuity Pathway Analysis software, QIAGEN Inc.). De plus, sachant que la TSP-1 est connu pour son caractère vasoconstricteur et anti-angiogénique (125, 135), on soupçonne également sa participation dans le déclenchement des symptômes liés à l'IO dont le POTS.

1.5.2 Hypothèses et objectifs

Nos hypothèses sont les suivantes:

1. Un niveau d'expression élevé du hsa-miR-150-5p après un effort pourrait entraîner des symptômes d'intolérance orthostatique ou de tachycardie en inhibant la traduction du gène SLC6A2 créant ainsi une déficience en transporteur NET.
2. Une chute soudaine de thrombospondine-1 dans le plasma pourrait induire subitement une vasodilatation, contribuant à induire des symptômes liés à l'IO et/ou le POTS.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de mieux comprendre la pathophysiologie de l'EM en explorant les déterminants moléculaires et différents mécanismes liés aux intolérances orthostatiques et au POTS dans le contexte de la maladie. Pour atteindre cet objectif, les niveaux du hsa-miR-150-5p et de la thrombospondine-1 ont été mesurés dans le plasma, analysés et comparés avec les données cliniques.

Chapitre 2 – Manuscrit

Association of circulating miR-150-5p and thrombospondin-1 in myalgic encephalomyelitis and their relation to postural orthostatic tachycardia syndrome

En préparation

Contribution des auteurs

Corinne Leveau a réalisé la majorité des expériences biochimiques et partiellement celles des microARN, les analyses statistiques, a analysé les données Hexoskin et a rédigé et révisé le manuscrit.

Evguenia Nepotchatykh a réalisé la majorité des expériences de microARN et leur analyse et a rédigé et révisé le manuscrit.

Wesam Elremaly a contribué à la coordination du projet et aux analyses et a rédigé et révisé le manuscrit.

Christian Godbout est un patient partenaire du réseau de recherche ICanCME qui a participé au design expérimental et à la création du challenge post-exertion.

Anita Franco a partiellement réalisé les expériences biochimiques et a contribué à la coordination initiale du projet.

Alain Moreau chercheur principal de l'étude et responsable de son financement, a contribué au concept expérimental, à l'analyses de l'ensemble des résultats et à la rédaction du manuscrit

**Association of circulating miR-150-5p and thrombospondin-1 in myalgic
encephalomyelitis and their relation to postural orthostatic tachycardia
syndrome**

Corinne Leveau^{1,2,4,5}, Evguenia Nepotchatykh^{1,3,4,5}, Wesam Elremaly^{1,2,4,5}, Christian Godbout⁶, Anita Franco^{1,4,5}, Alain Moreau^{1,2,4,5,7,*}

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montreal, Qc, Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

³Program of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

⁴Open Medicine Foundation ME/CFS Collaborative Center at CHU Sainte-Justine/Université de Montréal

⁵ICanCME Research Network, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada

⁶Patient-partner, ICanCME Research Network, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada

⁷Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

*Corresponding Author: Alain Moreau, Email: alain.moreau.hsj@ssss.gouv.qc.ca

Keywords

Myalgic Encephalomyelitis | has-miR-150-5p | thrombospondin-1 | postural orthostatic
tachycardia syndrome | post-exertional malaise

Abstract

Myalgic encephalomyelitis (ME) is a complex chronic disease with a high clinical heterogeneity. In ME patients, vascular abnormalities such as postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS) or orthostatic intolerance (OI) response to standing are frequently found. The molecular mechanisms underlying OI symptoms or POTS remain poorly understood. Hsa-miR-150-5p is predicted to target SLC6A2 gene, which encodes for the norepinephrine transporter NET. NET is inactivated due to mutations in SLC6A2 in rare familial POTS cases. Besides NET, we searched for circulating factors that affect vascular tone and could induce tachycardia in OI. Among those molecules, thrombospondin-1 (TSP-1), a multifunctional protein, acts as a vasoconstrictor and plays a role in vessel stabilization and vascular structures. Our study aimed to investigate the role of miR-150-5p and TSP-1 in vascular instabilities (POTS or OI) of ME.

We enrolled prospectively 117 ME patients, 20 ME with POTS or OI and 48 sedentary age- and sex-matched healthy controls for this study. All participants were exposed to a mechanical stress challenge of 90-minutes to induce post-exertional malaise (PEM). Circulating miR-150-5p expression levels were measured by RT-qPCR at baseline (T_0) and after PEM induction (T_{90}). Similarly, plasma TSP-1 levels were measured at T_0 and T_{90} by ELISA, and Δ TSP-1 values were calculated ($T_{90}-T_0$). Of note, heart-rate variability was monitored by a connected smart vest on a subset of ME patients to follow the development of tachycardia events over five days following PEM induction. The expression levels of miR-150-5p were higher in ME with POTS or OI at baseline (T_0) and after the stress test (T_{90}) compared with ME patients without POTS/OI and matched healthy controls. Moreover, the elevation of miR-150-5p expression or the lower levels of TSP-1 after PEM

(T₉₀) induction was related to worse tachycardia events in a subset of ME patients that reported multiple tachycardias after small efforts. The present study uncovers the role of miR-150-5p and TSP-1 in ME and vascular instabilities in response to PEM induction.

Introduction

Myalgic encephalomyelitis (ME) is a complex, debilitating, multi-systemic disease of unclear etiology affecting over 500,000 Canadians¹⁻³. As described in the Canadian Consensus Criteria,⁴ ME symptoms vary in frequency and severity, making the patient population very heterogeneous.^{5,6} ME is characterized by a disabling fatigue, a post-exertional malaise (PEM), vascular instabilities and sleep disturbances. The vascular system abnormalities and its regulation by the autonomic nervous system, particularly in response to standing, are frequently found in patients with ME, resulting in a high association between ME and dysautonomia.⁷ Orthostatic intolerance (OI) and postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS) are forms of dysautonomia. OI symptoms include lightheadedness, palpitations, headache, fatigue, and cognitive difficulties, normally alleviated when returning to the supine position.⁸ OI significantly affects daily activity and quality of life and can be induced or exacerbated by PEM, a cardinal symptom of ME.^{9,10} POTS is the most prevalent form of OI,¹⁰ and it diagnosed when symptoms of OI are associated with an increase in heart rate of 30 bpm or more upon changing from supine to standing position.¹¹ It has been reported that POTS is often associated with OI observed in patients with ME.¹²

The causes of POTS remain uncertain. Its pathophysiology is heterogeneous and includes many mechanisms such as the impairment of sympathetically mediated vasoconstriction, the excessive sympathetic drive and blood volume dysregulation.^{13,14} The defective neuronal reuptake of the neurotransmitter norepinephrine (NE) has been implicated. The action of NE is terminated, in part, by its uptake into presynaptic noradrenergic neurons by the plasma-membrane NE transporter (NET), which is encoded by the SLC6A2 gene. Several studies have linked the decrease in expression of the norepinephrine transporter NET coded by SLC6A2 to POTS.^{15 16,17} In addition, pharmacological inhibition of NET appears to aggravate the symptoms of POTS, which supports the critical role of NET in POTS.¹⁸ In one family kindred, the cause is traced to a nonsynonymous mutation in the coding region of SLC6A2 gene¹⁹ resulting in a drastic elevation of plasmatic norepinephrine levels in family members affected with a POTS.^{20,21} However, the cause of impaired NET activity in a majority of persons suffering of POTS remains poorly understood despite its relative high prevalence in ME patients.²²

Hsa-miR-150-5p has been predicted to target the SLC6A2 gene, coding for the norepinephrine transporter NET by the online tool TargetScan.²³ A recent study by Nepotchatykh *et al.*²⁴ has identified miR-150-5p among a panel of 11 circulating microRNAs (miRNAs) dysregulated in ME upon PEM induction. Among other mechanisms, it has been proposed that circulating factors altering the regulation of the vascular tone could induce tachycardia in OI.¹¹ Thrombospondin-1 (TSP-1) is a glycoprotein with multiple roles such as regulation of vessel stabilization, vasoconstrictive and antiangiogenic functions.^{25,26} We hypothesized that OI symptoms induced by PEM

could be triggered by increased expression of circulating miR-150-5p or by an increased vasodilation caused by a sudden decrease in plasma TSP-1 levels in response to PEM. Therefore, this study aimed to investigate the contribution of miR-150-5p and TSP-1 in the mechanisms underlying POTS or OI in ME patients.

Results

Study populations

The study populations' characteristics are detailed in Table 1 ($n = 185$). ME patients were stratified into two subgroups according to the comorbidities of POTS or OI. ME without POTS or OI ($n=117$) and ME with POTS or OI ($n=20$) and 48 age- and sex-matched healthy controls. There was no significant difference in illness duration between both ME subgroups. Also, there was no significant difference in BMI between the three groups. As expected, we observed a higher prevalence of OI or POTS among women with ME in our cohorts, which is concordant with the literature,^{27,28} and the fact that ME is more prevalent in women.^{1,29}

Assessment of health status, OI and POTS

All participants filled three self-reported health questionnaires, Short Form 36-Item Health Survey (SF-36), Multidimensional Fatigue Inventory-20 (MFI-20) and DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) to assess their health status and symptom severity. Significant differences were observed in all questionnaire scores between healthy individuals, ME patients and patients with ME+POTS/OI (Supplementary Table S1). ME patients with POTS or OI have significantly worse scores in MFI-20 physical fatigue score (Fig. 1A) and reduced motivation score (Fig. 1B) when compared to ME patients ($p < 0.05$). Given that tachycardia represents a discriminant feature of OI and POTS, question 51 of the DSQ questionnaire was used to assess the frequency and severity of "irregular heart beat".³⁰ As shown in Figure 2, we observe a significant difference in irregular heart beat scores in ME with POTS or OI patients when compared to ME patients ($p < 0.05$). As expected, both

ME groups significantly differed from the sedentary healthy controls group ($p < 0.001$). Our analysis showed that ME patients without POTS or OI experience irregular heartbeats less severely and less often than ME patients with POTS or OI.

Contribution of circulating miR-150-5p to OI and POTS phenotypes in ME

pathogenesis Previous work by Nepotchatykh *et al.*²⁴ had identified a panel of 11 miRNAs differentially expressed after PEM induction in severely affected ME patients. Among these miRNAs, miR-150-5p has been predicted to target SLC6A2, a gene coding for the NET protein.²³ Relative expression of miR-150-5p was measured by RT-qPCR in plasma samples obtained at baseline (T_0) and after the induction of PEM (T_{90}) in both ME subgroups and controls (Fig. 3). Expression levels of miR-150-5p at T_0 were significantly higher in ME + POTS/OI than in ME group at T_0 ($p < 0.05$) (Fig. 3A). In addition, miR-150-5p expression at T_{90} was significantly higher in ME+POTS/OI group compared to ME group ($p < 0.01$) and to healthy controls ($p < 0.05$) (Fig. 3B). Given the role of NET in the re-uptake of norepinephrine in the synaptic cleft and in adrenergic neurotransmission, we investigated whether the elevation of miR-150-5p expression affects the mental functions of ME participants. ME patients were classified into four groups based on their relative expression levels of miR-150-5p after the stress test (T_{90}) as the following: the expression less than 0.50-fold was considered low. The normal range of expression (0.50-2.00-fold) was determined based on the variation of miR-150-5p expression in healthy controls. Of note, increased expression by 2.01 to 10.00-fold was determined as high, while an increase over 10-fold was considered as very high. ME patients with very high expression of miR-

150-5p have significantly better MFI-20 mental fatigue scores compared to ME patients that have a normal expression level of miR-150-5p ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Contribution of thrombospondin-1 in OI and POTS phenotypes in ME pathogenesis

Among other determinants of OI, we explored the role of TSP-1, a known vasoconstrictor. We initially measured changes in plasmatic TSP-1 concentration before and immediately after the induction of PEM. The Δ TSP-1 ($T_{90}-T_0$) values were calculated to better estimate whether PEM induction following the application of a post-exertional challenge induced alterations in circulating TSP-1 levels. There was no significant difference in delta TSP-1 levels between the three groups (Supplementary Figure S1). However, given that PEM-induced symptoms varies between individuals and overtime, plasma TSP-1 levels were measured at three-time points T_0 , T_{90} and at day 8 (D8) in a subset of ME patients ($n=10$). Furthermore, heart-rate variations of these patients were monitored for 8 days using a connected smart vest (Table 2). The results from the ten patients who were followed for eight days demonstrated a significant negative correlation ($r^2 = 0.41$, $P < 0.04$, Fig. 5) between plasma TSP-1 levels after PEM induction and the tachycardia events for the days following the induction of PEM.

Discussion

Vascular instabilities such as OI or POTS represent debilitating symptoms for a majority of ME patients and their causes remains poorly understood. This study led us to identify two novel mechanisms underlying vascular instabilities in ME patients. Our results showed

a higher expression of circulating miR-150-5p in plasma samples collected at baseline and after the induction of PEM in ME patients exhibiting POTS or OI as co-morbidities compared to ME patients without POTS/OI and sedentary healthy controls. Indeed, higher expression of circulating miR-150-5p in ME+POTS/OI group might drastically decrease the expression of the SLC6A2 gene, resulting in a severe reduction of NET protein, which could explain their symptoms (Supplementary Fig. S2). Bayles and colleagues³¹ suggested that low SLC6A2 expression could be caused by epigenetic modification. Kaipananickal et al.³² supported this hypothesis and showed that H3K27me methylation by EZH2, a histone methyltransferase part of the Polycomb Repressive Complex 2, was responsible for silencing NET in individuals affected by a refractory POTS. Interestingly, EZH2 was also identified as a putative target of miR-150-5p (Supplementary Fig. S2).³³ Therefore, one could speculate that miR-150-5p triggers POTS/OI through two distinct mechanisms. While high expression of miR-150-5p expression could directly prevent the translation of SLC6A2 by the ribosomal machinery through its physical interaction with its mRNA, resulting in a NET deficiency. Conversely, a severe reduction of miR-150-5p expression could lead to a similar effect by increasing the EZH2 expression, which leads to a transcriptional repression of SLC6A2 gene, resulting in lower NET levels (Supplementary Fig. S3). Interestingly, despite that miR-150-5p overexpression is predicted to inhibit also EZH2 expression, increased expression of SLC6A2 resulting of EZH2 inhibition does not prevent the direct inhibitory effect of miR-150-5p on the translation of SLC6A2 mRNA and NET deficiency (Fig. 6). Our results showed that the ME patients with POTS or OI had more severe symptoms in MFI-20's physical fatigue and reduced motivation scores than those without POTS and OI and healthy control. However, we observed that patients

with higher expression levels of miR-150-5p had lower MFI-20 mental fatigue scores. Interestingly, our results are concordant with the previous study of Arnold *et al.*³⁴, who showed that pharmacological inhibition of NET proteins by duloxetine improved mental fatigue in ME patients using the same questionnaire.

Among other possible mechanisms underlying POTS or OI in the context of ME pathogenesis, we explored the possible contribution of circulating TSP-1, a known mechanosensitive glycoprotein^{35,36} and a powerful vasoconstrictor. We measured changes in plasmatic concentrations before and after the post-exertional stress challenge. Although there was no significant difference in TSP-1 between the three groups, monitoring of heart rate variability with a connected smart vest revealed in a subset of ME patients that the frequency of the tachycardia events following the induction of PEM was negatively correlated with the plasma TSP-1 levels. These results may be explained by the interaction of TSP-1 and the receptor CD47, which is known to limit NO production, a vasodilator.³⁷ Therefore, a sudden decrease in circulating TSP-1 levels in response to PEM induction could stimulate NO production and triggers a rapid vasodilation, which would be compensated by an increased heart rate. Interestingly, CD47 expression is significantly upregulated in ME patients' vascular tissue.³⁸

Considering the clinical heterogeneity occurring in ME, our study design involving the induction of PEM through a post-exertional stress challenge revealed two novel mechanisms underlying POTS and OI in the context of ME pathogenesis. Further works are required to confirm whether these mechanisms are specific to a subset of ME patients

or if they are shared with individuals suffering of POTS/OI without ME. In addition, the dual mechanism whereby high or low miR-150-5p expression induces a NET deficiency remain to be further characterized at the tissue or cellular levels. While the longitudinal monitoring of tachycardia events prior, during and 5-days after the induction of PEM with a connected smart vest represents an innovative approach, the limited number of ME patients tested constitutes a potential limitation and should be repeated on a larger cohort.

In conclusion, this study identified that changes in circulating miR-150-5p expression are associated with vascular instability symptoms in a subset of ME patients. Additionally, it shed light on the potential role of miR-150-5p as a therapeutic target for ME patients with orthostatic intolerance. It also highlights that sudden decrease in plasma TSP-1 levels in response to PEM induction can also trigger compensatory tachycardia events in a subset of ME patients and could represent another actionable therapeutic target.

Materials and Methods

Study populations. One hundred seventeen patients with ME, twenty patients with ME and comorbidity of POTS or OI, and forty-eight age- and sex-matched sedentary control subjects were recruited prospectively for this study (Table 1). ME patients were diagnosed according to the Canadian Consensus Criteria. Healthy control subjects had no family history of ME symptoms. All participants were over 18 years of age. The protocol of this study was approved by the Institutional Review Board of Sainte-Justine University

Hospital (protocol #4047). All participants signed written informed consent. All experiments were performed following relevant guidelines and human ethic regulations.

Study design. Two blood samples were obtained from each participant, one at baseline (T₀) and a second after 90 minutes of mechanical stress stimulation (T₉₀). This mechanical stress test induces a PEM in a standardized manner (Supplementary Fig. S4) as previously described.²⁴ In addition, a subset of ME patients (n=10) was followed longitudinally over eight days using a connected smart vest to monitor PEM development following the stress test and the tachycardia events before the stress test and five days following PEM induction. For this subset, additional blood samples were withdrawn on day 8. Peripheral blood was collected from the median cubital vein in EDTA-treated tubes. Whole blood was centrifuged at 11,000 x g for 10 minutes, then plasma was retrieved, aliquoted, and stored at -80°C until further usage.

Evaluation of ME symptoms and participant health status. All participants completed standard questionnaires, including 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36), Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20), and the DePaul Symptom Questionnaire (DSQ), to assess their health status and symptoms of ME/CFS. The SF-36 scaled scores provide a physical health score and a mental health score,³⁹ while the MFI-20 scores are stratified into General Fatigue, Physical Fatigue, Reduced Activity, Reduced Motivation, and Mental Fatigue.⁴⁰ The DSQ questionnaire, which provides 54 summed values to assess the health status, were grouped into four factors: Neuroendocrine, Autonomic and Immune Dysfunction; Cognitive Dysfunction; Post-exertional Malaise; and Sleep Disturbances⁴¹. Question 51 of DSQ questionnaire was used to assess the frequency and severity of

“irregular heart beat.” Frequency and severity were graded on a 0-4 scale, 4 being the more severe score. The total score was calculated using the severity and frequency scores. The values were multiplied by 25, then averaged to generate a mean score value.

Post-exertional stress challenge. Participants were subjected to a stress-test to induce PEM using an ABR therapeutic massager device developed by Panacis Medical Ltd. (Ottawa, Ontario, Canada) as described by Nepotchatykh *et al*²⁴. The ABR method includes an inflatable cuff applied to each participant's arm. The cuff dynamically exerts pulsatile compressions, producing variable amplitude pressure from 0-4 psi at 0.006 Hz. All participants were mechanically stimulated for 90 minutes (T₉₀) to induce PEM in a standardized manner, which was used to evaluate changes in the expression profile of miR-150-5p and TSP-1 protein in response to this mechanical stimulation.

Circulating microRNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis, qPCR miRNA detection and quantification. Circulating miRNAs were extracted from participants' plasma samples by organic extraction with mirVana PARIS RNA and Native Protein Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. After the denaturation step of the RNA extraction protocol, 10 fmol of *C. elegans* miRNA cel-miR-39-3p was added to each sample and served as an exogenous control for normalization. Extracted miRNA samples were stored at -80°C until further usage. cDNA was synthesized from the extracted miRNA samples using a PCR thermocycler (T3000 Thermocycler, Biometra, Montreal Biotech Inc, Montreal, QC, Canada) and the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher

Scientific) by following the manufacturer's instructions. The resulting cDNA samples were stored at -20°C. The synthesized cDNA was used to quantify miRNAs by qPCR using the TaqMan Advanced miRNA Assays and probes (probe ID: 477918_mir, Thermo Fisher Scientific). qPCR reaction was performed using the QuantStudio 3 instrument (Thermo Fisher Scientific). qPCR reactions were performed in duplicate for each sample and target, the mean of the obtained cycle thresholds (C_T) was used for calculations.

qPCR data analysis. The fold difference between the expression of hsa-miR-150-5p in each sample compared to the mean expression of the controls was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method at two time points, T_0 and T_{90} . First, the results of miRNA 150-5p for each sample were normalized with the results of the exogenous control, cel-mir-39a-3p, where $\Delta C_{T\text{sample}} = C_{T\text{miR}} - C_{T\text{cel-mir-39a-3p}}$. Then, the $\Delta\Delta C_T$ was calculated for each sample as follows, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{sample}} - \text{mean } \Delta C_{T\text{CTRLs}}$. Finally, the fold difference in miRNA-150-5p expression between each participant and the mean of controls was calculated as $2^{-\Delta\Delta C_T}$. The miRNA expression of each sample is relative to the mean expression of the controls.

Plasma thrombospondin-1 measurements. Plasma thrombospondin-1 (TSP-1) levels were determined using the sandwich enzyme immunoassay technique following the manufacturer's instructions (Quantikine ELISA human thrombospondin-1 immunoassay kit, R & D systems, Minneapolis, MN, USA). Every sample was analyzed in duplicate.

Heart rate variability monitoring. Heart rates (HR) were monitored for eight days for a subset of participants ($n = 10$) with a connected smart vest (Hexoskin vest, Carré

Technologies Inc., Montreal, Que., Canada). Participants were asked to wear the smart vest for a minimum of 20 hours per day, during which heart rate was measured continuously. Hexoskin monitors data every 256Hz (s/256). Every heart rate entry averages the 16 last heartbeats in beats per minute. A tachycardia event corresponds to either a 30bpm jump compared to the resting heart rate, as in POTS,⁴² or the a heart rate >100bpm, which is the usual definition for tachycardia.⁴³.

Statistical analysis. Results were expressed as mean \pm SEM and were compared by ANOVA after verification of the homogeneity of the variances by Bartlett's test. P-values were considered significant at $p \leq 0.05$. Graphs and statistics were performed in GraphPad Prism (version 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, United States), R, and Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, United States).

Data availability. The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Chu, L., Valencia, I.J., Garvert, D.W. & Montoya, J.G.J.F.i.p. Onset patterns and course of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *7, 12* (2019).
2. Bateman, L., *et al.* Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: Essentials of diagnosis and management. in *Mayo Clinic Proceedings*, Vol. 96 2861-2878 (Elsevier, 2021).

3. Hardt, J., *et al.* Health-related quality of life in patients with chronic fatigue syndrome: an international study. **51**, 431-434 (2001).
4. Carruthers, B.M., *et al.* Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: clinical working case definition, diagnostic and treatment protocols. **11**, 7-115 (2003).
5. Missailidis, D., Annesley, S.J. & Fisher, P.R.J.D. Pathological mechanisms underlying myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. **9**, 80 (2019).
6. Murga, I., Aranburu, L., Gargiulo, P.A., Gómez Esteban, J.C. & Lafuente, J.-V.J.F.i.P. Clinical Heterogeneity in ME/CFS. A Way to Understand Long-COVID19 Fatigue. 1734 (2021).
7. Newton, J.L., *et al.* Symptoms of autonomic dysfunction in chronic fatigue syndrome. **100**, 519-526 (2007).
8. Stewart, J.M.J.P. Common syndromes of orthostatic intolerance. **131**, 968-980 (2013).
9. Miwa, K. & Inoue, Y.J.J.o.c. The etiologic relation between disequilibrium and orthostatic intolerance in patients with myalgic encephalomyelitis (chronic fatigue syndrome). **72**, 261-264 (2018).
10. Garner, R. & Baraniuk, J.N.J.J.o.t.m. Orthostatic intolerance in chronic fatigue syndrome. **17**, 1-10 (2019).
11. Vernino, S., *et al.* Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS): State of the science and clinical care from a 2019 National Institute of Health Expert Consensus Meeting. 102828 (2021).

12. Stewart, J.M.J.P.R. Autonomic nervous system dysfunction in adolescents with postural orthostatic tachycardia syndrome and chronic fatigue syndrome is characterized by attenuated vagal baroreflex and potentiated sympathetic vasomotion. **48**, 218-226 (2000).
13. Low, P.A., Sandroni, P., Joyner, M. & SHEN, W.K.J.J.o.c.e. Postural tachycardia syndrome (POTS). **20**, 352-358 (2009).
14. Parsaik, A., *et al.* Deconditioning in patients with orthostatic intolerance. **79**, 1435-1439 (2012).
15. Bayles, R., *et al.* Epigenetic modification of the norepinephrine transporter gene in postural tachycardia syndrome. **32**, 1910-1916 (2012).
16. Lambert, E., *et al.* Altered sympathetic nervous reactivity and norepinephrine transporter expression in patients with postural tachycardia syndrome. **1**, 103-109 (2008).
17. Khan, A.W., Corcoran, S.J., Esler, M., El-Osta, A.J.N. & Reviews, B. Epigenomic changes associated with impaired norepinephrine transporter function in postural tachycardia syndrome. **74**, 342-355 (2017).
18. Green, E.A., *et al.* Effects of norepinephrine reuptake inhibition on postural tachycardia syndrome. **2**, e000395 (2013).
19. Robertson, D., *et al.* Familial orthostatic tachycardia due to norepinephrine transporter deficiency. **940**, 527-544 (2001).
20. Arnold, A.C., Ng, J. & Raj, S.R.J.A.N. Postural tachycardia syndrome—diagnosis, physiology, and prognosis. **215**, 3-11 (2018).

21. Sheldon, R.S., *et al.* 2015 heart rhythm society expert consensus statement on the diagnosis and treatment of postural tachycardia syndrome, inappropriate sinus tachycardia, and vasovagal syncope. **12**, e41-e63 (2015).
22. Encephalomyelitis, B.M. Redefining an Illness. Committee on the Diagnostic Criteria for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome; Board on the Health of Select Populations; Institute of Medicine. (Washington (DC): National Academies Press (US), 2015).
23. McGeary, S.E., *et al.* The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. **366**(2019).
24. Nepotchatykh, E., *et al.* Profile of circulating microRNAs in myalgic encephalomyelitis and their relation to symptom severity, and disease pathophysiology. **10**, 1-13 (2020).
25. Gutierrez, L.S. & Gutierrez, J.J.F.i.E. Thrombospondin 1 in Metabolic Diseases. **12**, 248 (2021).
26. Resovi, A., Pinessi, D., Chiorino, G. & Taraboletti, G.J.M.B. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. **37**, 83-91 (2014).
27. Carew, S., *et al.* A review of postural orthostatic tachycardia syndrome. **11**, 18-25 (2009).
28. Fedorowski, A.J.J.o.i.m. Postural orthostatic tachycardia syndrome: clinical presentation, aetiology and management. **285**, 352-366 (2019).
29. Cortes Rivera, M., Mastronardi, C., Silva-Aldana, C.T., Arcos-Burgos, M. & Lidbury, B.A.J.D. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a comprehensive review. **9**, 91 (2019).

30. Jason, L.A., *et al.* The development of a revised Canadian myalgic encephalomyelitis chronic fatigue syndrome case definition. (2010).
31. Bayles, R., *et al.* Epigenetic modification of the norepinephrine transporter gene in postural tachycardia syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1910-1916 (2012).
32. Kaipananickal, H., *et al.* Targeting treatment refractory NET by EZH2 inhibition in postural tachycardia syndrome. **126**, 1058-1060 (2020).
33. Hapugaswatta, H., Amarasena, P., Premaratna, R., Seneviratne, K.N. & Jayathilaka, N.J.J.o.b.s. Differential expression of microRNA, miR-150 and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in peripheral blood cells as early prognostic markers of severe forms of dengue. **27**, 1-9 (2020).
34. Arnold, L.M., Blom, T.J., Welge, J.A., Mariutto, E. & Heller, A.J.P. A randomized, placebo-controlled, double-blinded trial of duloxetine in the treatment of general fatigue in patients with chronic fatigue syndrome. **56**, 242-253 (2015).
35. Yamashiro, Y., *et al.* Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling. **117**, 9896-9905 (2020).
36. Yamashiro, Y., *et al.* Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. **123**, 660-672 (2018).
37. Bauer, E.M., *et al.* Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. *Cardiovasc. Res.* **88**, 471-481 (2010).

38. Kerr, J.R., *et al.* Gene Expression Subtypes in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 1171-1184 (2008).
39. Ware Jr, J.E.J.S. SF-36 health survey update. **25**, 3130-3139 (2000).
40. Smets, E., Garssen, B., Bonke, B.d. & De Haes, J.J.J.o.p.r. The Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. **39**, 315-325 (1995).
41. Jason, L., *et al.* & Strand, EB (2015). Factor analysis of the DePaul Symptom Questionnaire: Identifying core domains. **1**.
42. Arnold, A.C., Ng, J. & Raj, S.R. Postural tachycardia syndrome - Diagnosis, physiology, and prognosis. *Auton. Neurosci.* **215**, 3-11 (2018).
43. Gopinathannair, R. & Olshansky, B. Management of tachycardia. *F1000Prime Rep* **7**, 60 (2015).

Acknowledgments

We thank all participants, both with and without ME/CFS, who took part in this study as well as l'Association Québécoise de l'Encéphalomyélite Myalgique (AQEM), which greatly aided in the enrollment process. We also thank Ms. Valérie Tremblay R.N., Sophie Perreault R.N. and Hélène Gagnon R.N. for their nursing assistance. This work was supported by grants to A.M. from the Sibylla-Hesse Foundation and The Open Medicine Foundation Canada. W.E. is the recipient of a TransMedTech Institute postdoctoral scholarship.

Author Contributions

C.L., E.N., W.E., C.G., and A.M. designed research study; C.L., E.N., W.E., and A.F. performed the analyses; C.L., E.N., W.E., C.G., and A.M. analyzed data; C.L., E.N., W.E., C.G., and A.M. wrote the paper; and A.F. helped run experiments. All coauthors reviewed and approved the manuscript.

Conflict of Interest Statement

A.M. is Director of Interdisciplinary Canadian Collaborative Myalgic Encephalomyelitis (ICanCME) Research Network, a national research network funded by The Canadian Institutes of Health Research (grant MNC – 166142 to A.M.) and Member of the Scientific Advisory Board of the Open Medicine Foundation.

Figure Legends

Figure 1. Physical and reduced motivation scores from MFI-20 self-reported questionnaires in ME, ME+POTS/OI and matched healthy controls. (A) Physical fatigue and (B) reduced motivation were higher in ME+POTS/OI compared to both the ME group and the healthy controls. A higher score corresponds to a more severe symptom.

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. The results were considered significant at *P-value < 0.05 , and **P-value < 0.01 .

Figure 2. Irregular heart beat score. ME: Myalgic Encephalomyelitis, ME+POTS/OI: Myalgic Encephalomyelitis with Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome or orthostatic intolerance and HC: healthy controls. Patients ME with POTS or OI had higher irregular heartbeat compared to ME and healthy controls. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. The results were considered significant at *P-value < 0.05 , and **P-value < 0.01 .

Figure 3. Expression analysis of hsa-miR-150-5p relative expression in ME, ME+POTS/OI and healthy controls. Relative expression levels of miR-150-5p - at T₀ (A) and T₉₀ (B). The expression levels of miRNA were higher in ME+POTS/OI at both time points. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. The results were considered significant at *P-value < 0.05 , and **P-value < 0.01 .

Figure 4. Mental fatigue scores from MFI-20 self-reported questionnaires in function of miRNA-150-5p relative expression at T₉₀. ME participants were classified based on the circulatory levels of miR-150-5p at T₉₀. A relative expression of less than 0.50 fold was considered low, -0.50 and 2.00 fold identified as normal, -2.01 -10.00 fold considered high and more than 10.00 fold considered very high. Data is presented as the mean \pm standard error of the mean. The data was analysed using one-way ANOVA, and the results were marked as significant at $p < 0.05$ (*) $p < 0.0001$ (****).

Figure 5. Tachycardia events after the induction of PEM as a function of TSP-1 levels at T₉₀. Significant linear correlation ($r^2 = 0.41$, $p < 0.04$) between the frequency of the tachycardia events and TSP-1 levels after PEM induction in a subset of patients ($n = 10$).

Tables

Table 1. Demographic and clinical characteristics of participants

	ME	ME + OI/POTS	HC
N (women;men)	20 (18;2)	117 (96;21)	48 (25;23)
Age (years)	44.3 ± 2.1	50.5 ± 1.1	48.7 ± 1.5
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 1.6	25.7 ± 0.5	25.6 ± 0.7
Disease duration (years)	9.9 ± 3.0	13.3 ± 1.1	NA

BMI body mass index. Data were expressed in mean ± standard error of the mean

Table 2. Heart-rate monitoring of ME patients

ID	Sex	No of tachycardia for 8 days	No of tachycardia after PEM	TSP-1 T₀ (ng/ml)	TSP-1 T₉₀ (ng/ml)	TSP-1 D8 (ng/ml)	Rel Exp T₀	Rel Exp T₉₀
ME-016	F	18	11	24,290	22,835	24,365	1.14	0.46
ME-144	F	48	39	25,294	10,819	22,624	3.04	1.13
ME-169	F	107	60	25,843	16,956	13,992	0.58	1.45
ME-170	F	22	20	18,927	18,602	10,039	5.37	0.45
ME-171	M	44	34	8,054	17,325	7,718	9.00	10.40
ME-172	M	37	27	19,565	22,709	13,541	0.65	3.12
ME-173	F	40	23	15,036	20,794	7,713	0.45	0.95
ME-175	F	36	17	12,506	22,387	33,200	0.30	0.22
ME-177	M	148	114	15,245	11,983	10,316	0.93	2.69
ME-179	F	100	86	16,911	18,165	16,828	2.44	0.19

Figures

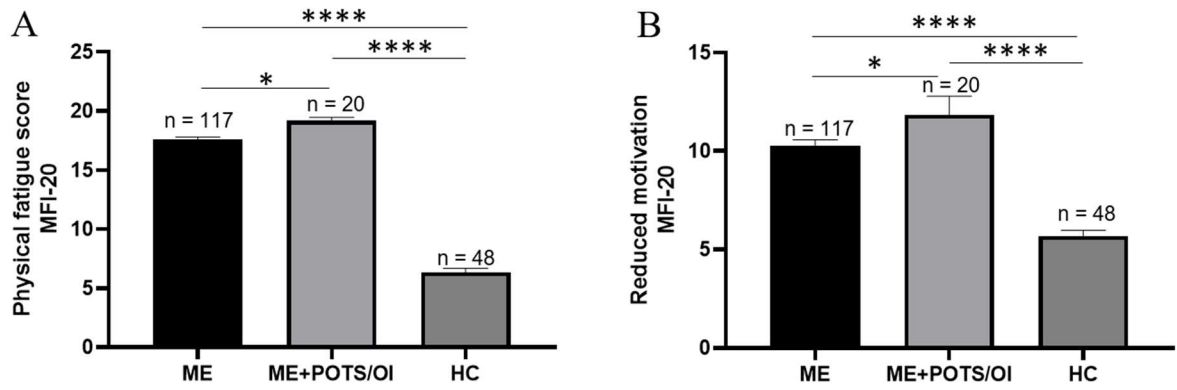


Figure 1

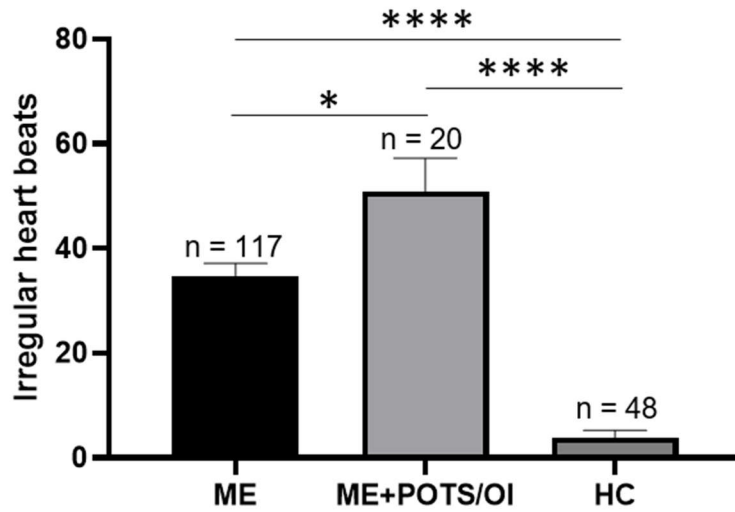


Figure 2

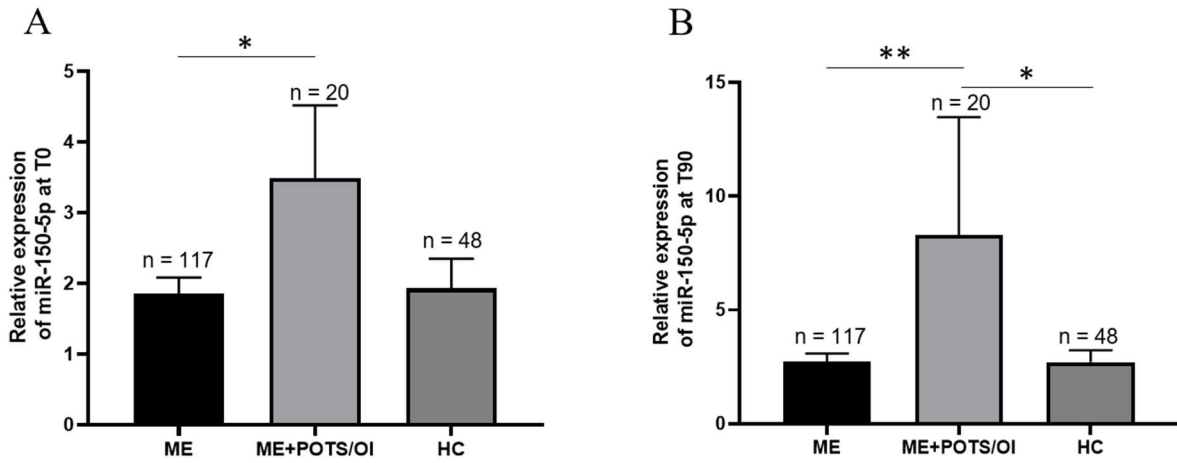


Figure 3

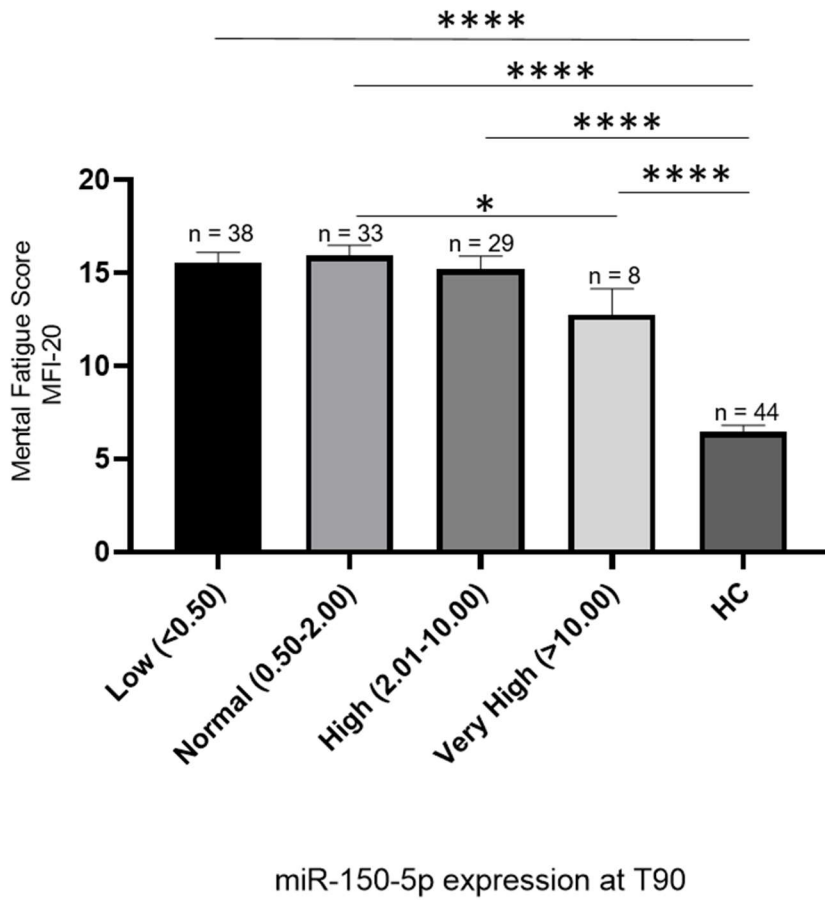


Figure 4

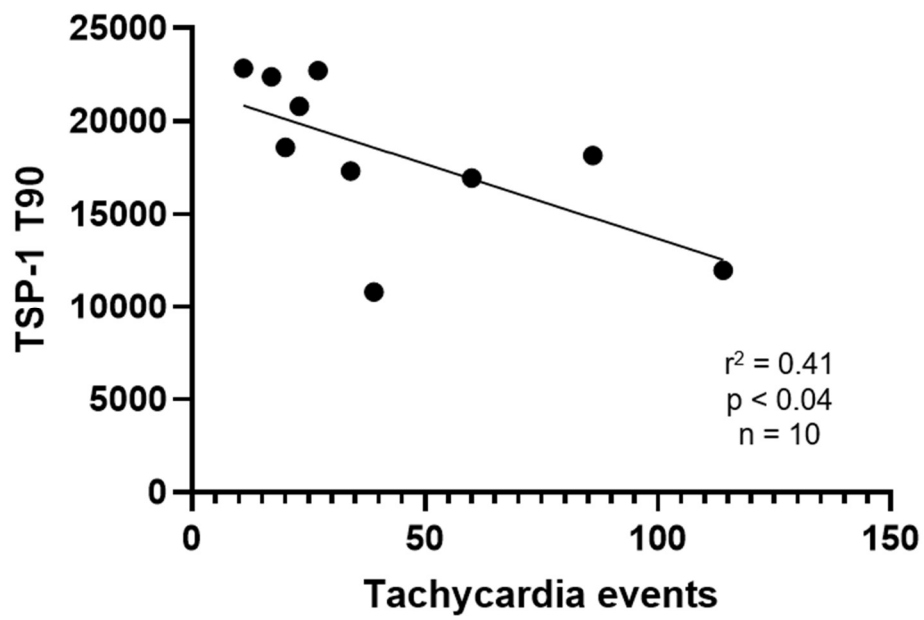


Figure 5

Supplemental Information

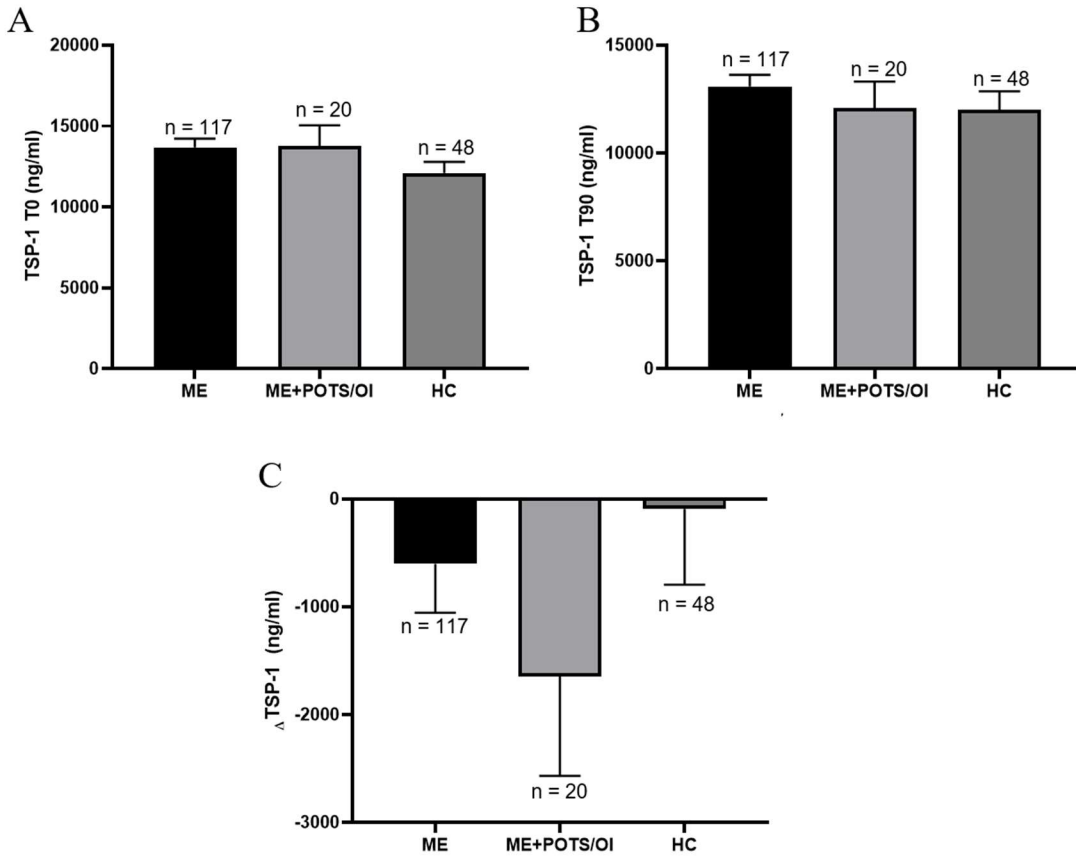
Supplementary Table S1. Clinical characteristics of participants

	ME	ME + POTS/OI	HC
36-Item Short Forme Health Survey (SF-36) Scores			
Physical score	28.0 ± 2.5****	31.3 ± 1.1****	88.8 ± 1.5
Mental score	41.6 ± 3.5****	45.9 ± 1.7****	88.9 ± 1.1
Multidimensional Fatigue-Iventory-20 (MFI-20) Scores			
General fatigue	19.2 ± 0.4****	18.1 ± 0.2****	6.6 ± 0.4
Physical fatigue	19.2 ± 0.3****	17.6 ± 0.2****	6.3 ± 0.4
Reduced activity	16.7 ± 0.7****	15.9 ± 0.3****	5.6 ± 0.3
Reduced motivation	11.9 ± 0.9****	10.3 ± 0.3****	5.7 ± 0.3
Mental fatigue	15.2 ± 0.8****	15.0 ± 0.3****	6.5 ± 0.4
DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) scores			
Autonomic, Neuroendocrine, Immune Dysfunction	41.7 ± 3.5****	40.5 ± 1.5****	5.8 ± 0.6
Cognitive dysfunction	54.4 ± 4.6****	58.4 ± 1.6****	8.5 ± 1.3
Post-exertional malaise	69.0 ± 4.3****	69.8 ± 1.7****	6.5 ± 0.8
Sleep disturbance	53.8 ± 3.7****	50.8 ± 1.5****	13.1 ± 1.2

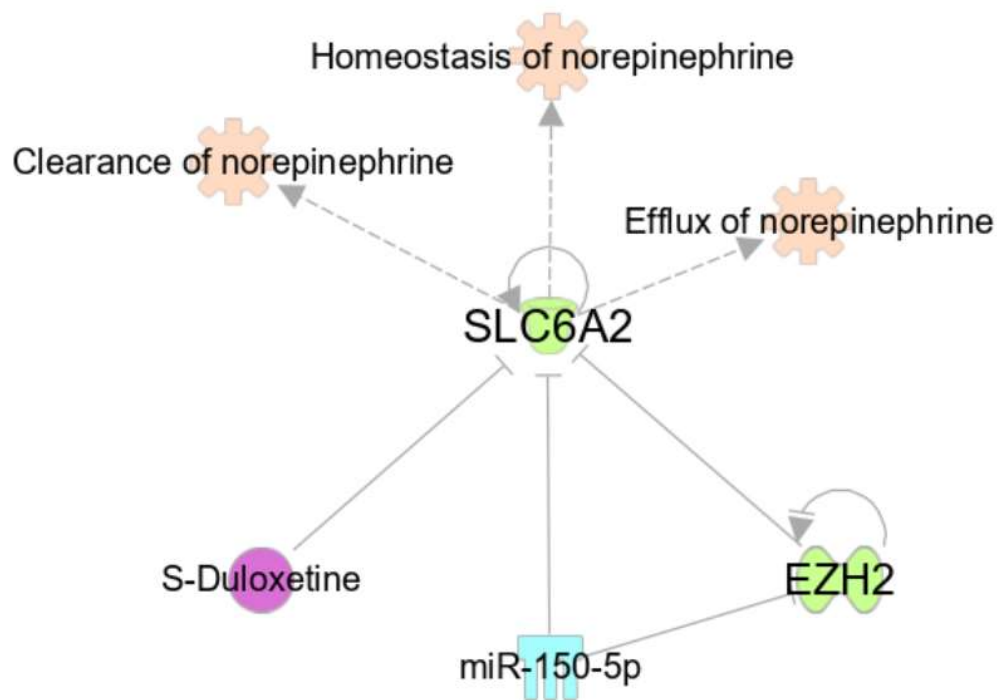
ME and ME + POTS/OI questionnaire scores were compared with HC. Data were expressed in mean ± standard error of the mean. The results were considered significant at *P-value < 0.05, and ****P-value < 0.0001.

Supplementary Table S2. Heart rate variabilities, miR-150-5p relative expression and thrombospondin-1 (TSP-1) concentration at different time points over a 8 day period

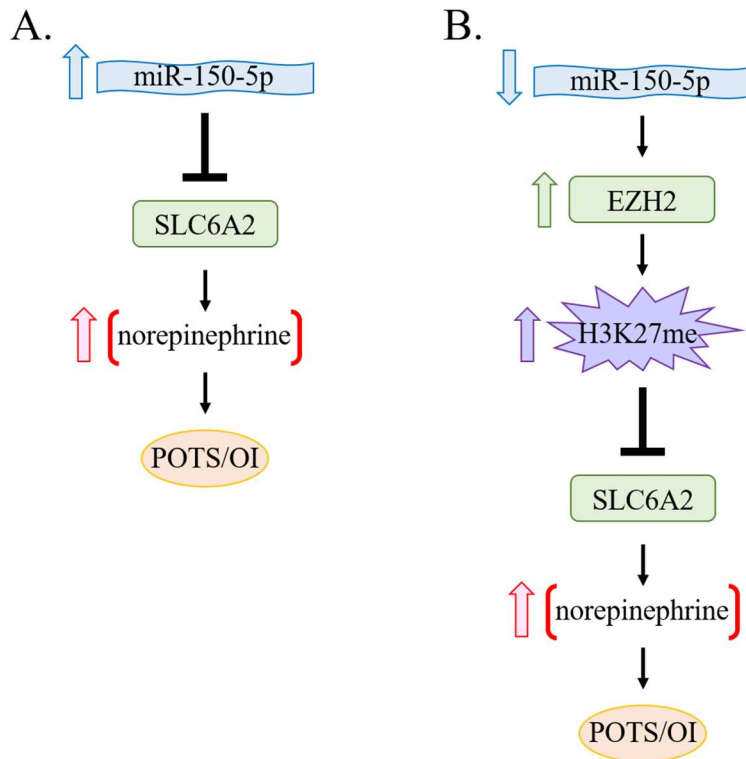
ID	Resting HR (BPM)	Number of tachycardia events	Mean HR during tachycardia (BPM)	Lowest HR (BPM)	Highest HR (BPM)	Average event duration (hh:mm:ss)	Longest event duration (hh:mm:ss)	hsa-miR-150-5p Relative expression (2 ^{-ΔΔCT})	TSP-1 (ng/mL)
ME-016-2 T ₀	70	7	108	63	117	00:07:08	00:14:00	1.14	24,290
ME-016-2 T ₉₀		0	-	67	95	-	-	0.46	22,835
ME-016-2 D8		11	103	67	112	00:03:22	00:10:00	-	24,365
ME-144-2 T ₀	55	9	131	31	154	00:03:33	0:08:00	3.04	25,294
ME-144-2 T ₉₀		3	86	47	88	00:01:20	0:02:00	1.13	10,819
ME-144-2 D8		36	122	31	179	00:01:35	0:03:00	-	22,624
ME-169 T ₀	83	47	107	68	144	00:04:00	01:14:00	0.58	25,843
ME-169 T ₉₀		19	115	71	144	00:09:28	01:20:00	1.45	16,956
ME-169 D8		41	115	52	162	00:13:22	02:35:00	-	13,992
ME-170 T ₀	66	2	101	52	101	00:01:00	00:01:00	5.37	18,927
ME-170 T ₉₀		2	102	57	103	00:01:00	00:01:00	0.45	18,602
ME-170 D8		18	107	60	118	00:02:28	0:08:00	-	10,039
ME-171 T ₀	67	10	106	63	116	00:01:06	00:01:00	9.00	8,054
ME-171 T ₉₀		2	100	58	103	00:01:00	00:01:00	10.40	17,325
ME-171 D8		32	109	61	129	00:03:21	00:25:00	-	7,718
ME-172 T ₀	66	10	103	61	108	00:01:00	00:01:00	0.65	19,565
ME-172 T ₉₀		2	102	59	106	00:01:00	00:01:00	3.12	22,709
ME-172 D8		25	104	59	122	00:02:08	00:12:00	-	13,541
ME-173 T ₀	78	17	113	61	140	00:06:27	00:35:00	0.45	15,036
ME-173 T ₉₀		6	110	61	118	00:05:31	00:28:00	0.95	20,794
ME-173 D8		17	111	68	133	00:09:31	01:19:00	-	7 713
ME-175 T ₀	83	19	115	32	201	00:02:22	00:05:00	0.30	12,506
ME-175 T ₉₀		7	102	72	108	00:02:17	00:04:00	0.22	22,387
ME-175 D8		10	104	82	116	00:12:00	0:34:00	-	33 200
ME-177 T ₀	61	34	114	54	135	00:04:33	00:49:00	0.93	15,245
ME-177 T ₉₀		76	106	63	120	00:03:14	00:25:00	2.69	18,165
ME-177 D8		38	109	69	129	00:03:52	00:53:00	-	10 316
ME-179 T ₀	78	14	103	66	115	00:01:08	00:02:00	2.44	16 911
ME-179 T ₉₀		13	106	63	120	00:03:14	00:25:00	0.19	18 165
ME-179 D8		73	108	30	171	00:01:52	00:07:00	-	16 828



Supplementary Figure S1. Plasma Thrombospondin-1 concentration in ME, ME+POTS/OI and healthy controls at different time points. Circulatory TSP-1 levels in - at T₀ (A) T₉₀ (B) and ΔTSP-1 T₉₀-T₀ (C). No significant differences were observed between the three groups. The data was analysed using one-way ANOVA. The results were considered significant at *P-value < 0.05, and **P-value < 0.01.

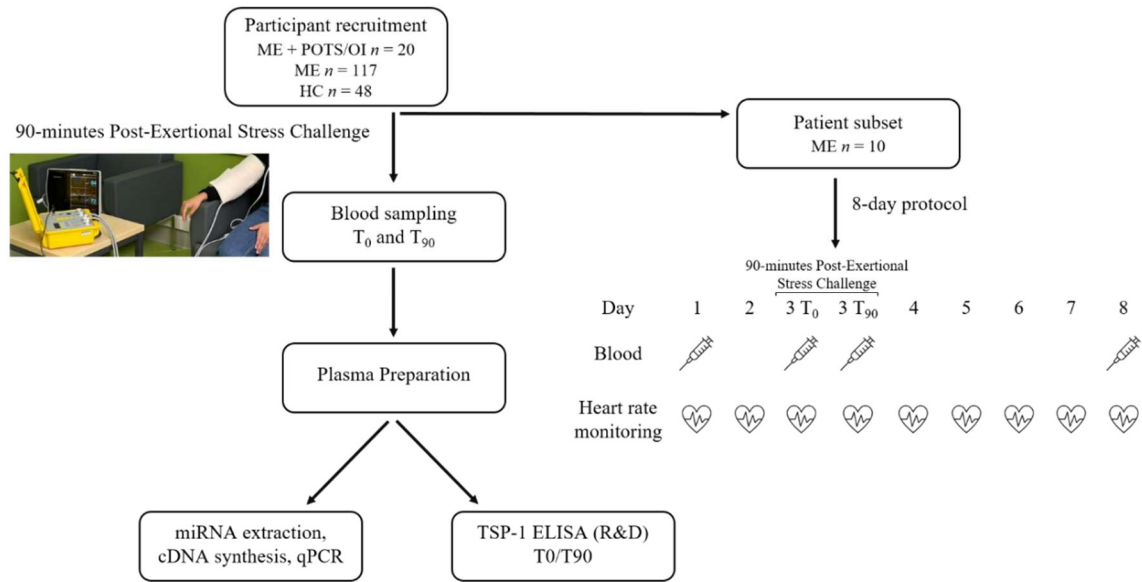


Supplementary Figure S2. Predicted interactions between miR-150-5p, SLC6A2, EZH2 and duloxetine. The potential targets of miR-150-5p, were primarily identified through comprehensive literature reviews and manual curations. The connections (interactions) of miR-150-5p and its targets were constructed based on the Ingenuity Knowledge Base using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (QIAGEN Inc. software version 51963813). The microRNA is represented in blue, gene targeted by miR-150-5p are represented in green, pharmacological drug (S-Duloxetine) is represented in purple and the physiological functions of the molecules are represented in orange.



Supplementary Figure S3. Potential mechanisms relating miR-150-5p to POTS/OI.

Suggested mechanisms relating miR-150-5p to POTS/OI based on its elevation (A) or reduction (B). Potential targets were identified using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (QIAGEN Inc. software version 51963813). The microRNA is represented in blue, genes targeted by miR-150-5p are represented in green, plasmatic norepinephrine concentration is represented in red, histone methylation is represented in purple, and the disease is represented in orange.



Supplementary Figure S4. The experimental study design and workflow. Abbreviations: ME: Myalgic Encephalomyelitis, ME+POTS/OI: Myalgic Encephalomyelitis with Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome or orthostatic intolerance, HC: healthy controls.

Chapitre 3 – Discussion

3.1 Groupes à l'étude

Pour notre étude, nous avons formé trois groupes : EM, EM avec IO et POTS et les témoins. Les patients EM avec POTS/IO représentent une sous-population peu étudiée avec des symptômes très débilitants, souvent plus sévères (Fig. 1). Le classement dans un groupe ou l'autre a été fait sur la base d'informations cliniques transmises par les participants aux infirmières de recherche clinique rattachées à ce projet quant à un diagnostic de POTS ou à la présence de symptômes laissant présumer cette condition en fonction du dossier médical de chaque participant. Afin de s'assurer que cette classification était pertinente, nous avons utilisé la question 51 du questionnaire DSQ portant sur la fréquence et la sévérité du symptôme suivant « battements de cœur irréguliers » (Fig. 2). Ce symptôme est parmi les seuls permettant de possiblement distinguer un symptôme d'IO contrairement à un symptôme d'EM. En effet, les IO et le POTS comprennent des symptômes comme les étourdissements, la fatigue, les troubles de vision ou les maux de tête, mais ce sont des symptômes plus communs et moins spécifiques (5, 20). Ceci dit, les définitions et les critères d'inclusion s'entremêlent puisque le POTS est décrit comme une augmentation soudaine du rythme cardiaque de 30bpm ou supérieur à 110-120 bpm (64) alors que la tachycardie sinusale est décrite comme un rythme cardiaque supérieur à 100 bpm (69).

C'est dans ce contexte que nous avons utilisé la veste intelligente Hexoskin (Carré Technologies Inc., Montréal, Que., Canada) permettant de mesurer en continue la variation du rythme cardiaque, de la respiration et du niveau d'activité physique afin de différencier certains symptômes. Ainsi pour un sous-groupe de patients (n = 10) nous avons monitoré le rythme cardiaque en continu avec la veste intelligente pendant huit jours (tableau supplémentaire S3). Nous avons demandé aux patients de porter la veste pendant un minimum de 20 heures par jour ce qui nous a permis de suivre de manière longitudinale le rythme cardiaque des patients avant et après l'induction du malaise après-effort.

Ce sous-groupe de participants a également rempli le DPSEQ, *DePaul Post-Exertional Malaise Questionnaire* (données non présentées). Ce questionnaire porte spécifiquement sur le malaise après-effort, mais il ne donne pas d'information quant à la présence ou l'absence de symptômes

d'intolérance orthostatique ou de tachycardie. En effet, dans le DPEMQ la question n'est pas directement posée. Étonnamment, pour chaque individu du sous-groupe a présenté des épisodes de tachycardie à un moment ou un autre durant cette période de huit jours, parfois même sur de très longues périodes (tableau supplémentaire S2). Cette information oblige donc une réflexion quant à l'utilisation de questionnaires pour établir des diagnostics des corrélations avec des données biochimiques et supporte plutôt bien notre stratégie expérimentale d'utilisée une veste connectée pour obtenir des données physiologiques objectives et quantifiables.

En effet, les différents questionnaires, bien qu'utilisés dans presque toutes les études sur l'EM, ont souvent été critiqué parce que jugés subjectifs ou qu'il ou qu'ils ne permettaient pas de distinguer adéquatement un patient extrêmement malade dû à un effet plafond (155). Par ailleurs, les PAEM sévèrement atteintes participent que très rarement aux études (156). Puisqu'ils sont alités ou qu'ils ne peuvent quitter leur domicile, il est d'autant plus difficile de leur demander de se déplacer pour participer aux études puisque ça risquerait d'aggraver leur condition. C'est d'ailleurs un des avantages principaux de la présente étude. Le dispositif pour le *post-exertional stress challenge* est transporté par les infirmières de recherche qui se déplacent jusqu'au domicile des participants. Ainsi, nous avons accès à une patientèle sous-étudiée, mais aussi plus vulnérable. Qui plus est, l'utilisation de marqueur digitaux comme la veste Hexoskin (Carré Technologies Inc., Montréal, Que., Canada) devient d'autant plus pertinente chez ce groupe puisqu'ils sont moins connus et que ces marqueurs permettent d'obtenir beaucoup plus d'information au niveau physiologique. Ceci dit, une des limitations de notre étude est la fenêtre de minimum 20 heures par jour. En effet, nous n'avons pas spécifié d'heures créant ainsi involontairement une variation entre les individus.

3.1 hsa-miR-150-5p

Nous avons observé que les PAEM avec POTS/IO avaient des niveaux d'expression relative du miR-150-5p plus élevé que les deux autres groupes (Fig. 3). Nous suspectons que ce lien provient de l'interaction du miARN avec la région 3'UTR du gène SLC6A2 (figure supplémentaire S2). Il serait donc d'autant plus intéressant d'investiguer la relation entre la variation du niveau d'expression et l'importance des symptômes de POTS/IO.

Dans une publication, Cheema *et al.* (102) indiquaient que les niveaux d'expression du hsa-miR-150-5p étaient statistiquement différents entre les hommes et les femmes. Par contre, l'étude de Nepotchatykh *et al.* (62) indiquent un résultat contraire. Nous n'avons pas tenu compte du sexe des

individus pour l'étude de ce miARN la première raison étant que le groupe ME/CFS + OI/POTS était composé presque exclusivement de femmes, reflétant par le fait même que la prévalence de POTS est plus importante chez les femmes (64). Cela dit, Nepotchatykh *et al.* ont utilisé du plasma alors que Cheema *et al.* ont utilisé des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC). Puisque nous avons également utilisé du plasma, on s'attendait à ce que nos résultats aillent dans la même direction. La particularité des miARN circulant dans le plasma est qu'ils sont sécrétés en étant encapsulé dans des exosomes ou des microvésicules. Ces transporteurs de miARN peuvent ensuite être intégrés par d'autres cellules, permettant aux miARN d'aller réguler l'expression génique en ciblant des gènes spécifiques (157). De plus, des cellules peuvent être ciblées par les exosomes en présentant des héparanes sulfates à leur surface. La fibronectine a notamment été identifiée comme ligand des héparanes sulfates pouvant médier des interactions entre les exosomes et les cellules (158).

En outre, ce miARN a été identifié comme régulé par divers types de statines (159, 160). Les statines sont une classe de molécules utilisées majoritairement pour diminuer le cholestérol sanguin. Étant donné que l'EM touche une population vieillissante, il n'est pas étonnant que plusieurs individus aient ce type de médication. Nonobstant cette limitation, notre approche expérimentale mesurant la variation de l'expression du miR-150-5p au repos (T_0) et après l'induction du PEM (T_{90}) neutralise l'effet de la médication puisque chaque individu devient son propre contrôle.

On sait également que le miR-150-5p a plusieurs cibles connues qui ont fait l'objet de publications (113). Dans le cas de l'interaction entre le miARN et le gène SLC6A2, elle n'est pour l'instant que prédite (114), on ne connaît donc pas le type de cellule où cette interaction aurait lieu. Pour valider l'interaction, l'idéal serait un *reporter gene assay* (161) en testant différents types cellulaires, sachant que SLC6A2 est exprimé dans plusieurs tissus et types cellulaires (162), notamment les tissus cardiaques (163) et les leukocytes (164). Aussi, un dosage plasmatique de norépinephrine permettrait d'établir si l'élévation du niveau d'expression du miARN corrèle avec une augmentation des niveaux de norépinephrine dans le sang suite à une diminution de la protéine NET codée par le gène SLC6A2. En outre, tel que mentionné dans le manuscrit, la méthyltransférase EZH2 pose une marque de méthylation sur H3K27me, causant l'atténuation de l'expression du gène SLC6A2 (*gene silencing*) (84). Ce gène étant cependant également une cible

suspectée du miR-150-5p, on se retrouve dans un triangle où plusieurs mécanismes s'entrecroisent (165). On pourrait évaluer le changement de méthylation avec du séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-chip ou ChIP-seq) (166).

3.1 Thrombospondine-1

Nous avons aussi dosé la TSP-1 dans notre cohorte chez les participants au repos (T_0) et après l'induction du PEM suite à l'application d'un stress mécanique pendant 90 minutes (T_{90}). Cette approche a permis de déterminer la variation des niveaux circulants en TSP-1 ($\Delta TSP-1$) à la suite du *post-exertional stress challenge* (Supplementary Figure. S1). Toutefois, la variation différentielle des niveaux plasmatiques en TSP-1 n'était pas significatives entre les PAEM, les PAEM avec POTS/OI et les sujets témoins testés dans les mêmes conditions. Ceci n'est pas vraiment surprenant considérant que la protéine TSP-1 est impliquée dans un grand nombre de processus biologiques et que celle-ci est aussi associée à différentes maladies.

Cela dit, lors de ces analyses, nous avons identifié une corrélation entre les niveaux de TSP-1 à T_0 et la sévérité de certains symptômes chez les PAEM. En effet, l'élévation des niveaux circulants en TSP-1 corrélait avec la sévérité des symptômes (annexe I). En outre, les PAEM présentant des niveaux de TSP-1 plasmatiques élevés à T_0 étaient plus souvent à risque d'une diminution soudaine en TSP-1 suite à l'induction du PEM (T_{90}). Nos résultats montrent cependant, que malgré qu'il semble y avoir un lien entre une diminution important des niveaux plasmatiques en TSP-1 et l'IO chez certains patients, ce processus n'est pas linéaire. Effectivement, les niveaux sanguins de base en TSP-1 varient beaucoup d'un individu à l'autre de même qu'en réponse au PEM induit.

Afin d'élucider les mécanismes modulant les niveaux de TSP-1 chez les PAEM, nous avons génotypé plusieurs SNP au niveau du gène THSB1 codant pour la TSP-1 de même qu'au niveau de deux autres gènes pouvant moduler l'expression de THSB1 ou la production de TSP-1. Ces deux gènes sont IDO1 et IDO2 (annexe II). Nous avons émis l'hypothèse que des mutations sur les gènes IDO1 et IDO2 auraient un impact sur la production de TSP-1. IDO1/IDO2, codant pour l'indoléamine-2,3-oxygénase 1/2, sont impliqués dans la voie de la kynurénine et ce sont ces enzymes qui transforment le tryptophane en N-formylkynurénine (167). Une mutation dans IDO1/IDO2 aurait pu mener à une accumulation de tryptophane, qui aurait été recyclée dans la production de TSP-1, une protéine riche en tryptophane (132). Cela dit, les différents génotypes

mesurés n'ont pu mettre en évidence des différences significatives entre les PAEM et les sujets témoins et les niveaux circulants en TSP-1.

La TSP-1 étant membre de la famille des thrombospondines, nous avons aussi investigué chez un nombre limité d'individus, les autres membres de la famille (TSP-2, TSP-3, TSP-4 et TSP-5). Alors que les protéines TSP-3 et TSP-4 étaient quasi indétectable dans le plasma, les protéines TSP-2 et TSP-5 ne semblaient présenter aucun lien avec les concentrations de TSP-1.

Une des limitations du dosage de la TSP-1 dans le plasma est l'absence de valeur de référence. En effet, d'une étude à l'autre, les valeurs moyennes varient énormément, rendant l'interprétation des données difficiles. Ceci est toutefois probablement dû au caractère polyvalent de la TSP-1 et au fait que sa concentration est facilement influencée par différents facteurs (134).

3.1 Perspectives

La suite de cette étude consistera d'abord à recruter un groupe d'individu atteint de POTS uniquement afin d'explorer si l'élévation des niveaux d'expression du hsa-miR-150-5p et les changements observés au niveau de la TSP-1 sont spécifiques aux PAEM avec POTS ou puissent aussi se retrouver chez les personnes présentant un POTS ou une IO sans être atteintes de l'EM.

Au niveau de la voie du hsa-miR-150-5p, nous souhaitons valider son effet sur le transporteur NET et les niveaux circulants de norépinephrine. Ensuite, il serait intéressant de chercher plus loin quant à l'effet de la duloxetine chez les PAEM et PAEM+POTS. Bien que reliée à des effets secondaires de tachycardies, la duloxetine est largement prescrite pour traiter les troubles du sommeil chez les PAEM. Le développement d'un modèle animal pourrait conduire à de nouvelles perspectives permettant la validation de meilleures thérapies et une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents l'IO et le POTS. Récemment Li *et al.* (168) ont induit le POTS chez des lapins en les traitant avec des peptides de récepteurs adrénergiques, c'est donc un modèle qu'il serait possible d'utiliser. Les auteurs soutiennent d'ailleurs que ça démontre le potentiel auto-immun du POTS. D'un autre côté, Goebel *et al.* (169) ont induit de la fibromyalgie chez des souris en injectant des IgG provenant de patients atteints. Considérant que l'EM et la fibromyalgie sont des maladies qui se ressemblent et qui sont souvent associées ensemble, ce serait plausible d'essayer ce modèle. Idéalement, combiner les deux modèles permettrait d'atteindre une autre dimension quant au type d'étude envisageable.

Par la suite, étant donné qu'une mutation a déjà été associée au POTS (80), bien que rare, un séquençage des exons et de la région promotrice du gène SLC6A2 permettant l'identification de mutations *de novo* ou de variants rares pourrait être envisageable chez les PAEM présentant un POTS. Au niveau épigénétique, la recherche d'autres microARN pouvant cibler le gène SLC6A2 et/ou le gène EZH2 de même que l'identification d'altérations au niveau de la méthylation de l'ADN au niveau de sites CpG régulant l'expression de ces deux gènes pourraient aussi être d'intérêt. Il serait également d'investiguer les dysfonctions cognitives présentes dans le POTS comme dans l'EM (92). En effet, beaucoup de PAEM avec ou sans POTS sont sujets à des épisodes de brouillard cognitifs, particulièrement lors du malaise après-effort, possiblement associé à la baisse du flux sanguin cérébral (92). Une partie de notre étude de Phase II incluait d'ailleurs une mesure des fonctions neurocognitives avec le test BrainCheck (BrainCheck, Inc., Houston, TX, États-Unis), un test accessible par tablette électronique. L'intégration de cet autre marqueur digital pourrait aussi contribuer à mieux évaluer l'état de chaque patient suite au *post-exertional stress challenge*.

Côté thrombospondine-1, il serait intéressant de voir la conséquence du blocage des récepteurs CD47, à savoir s'il médie la vasoconstriction tel que supposé. Ce genre de d'expérience pourrait être fait avec des cellules de PAEM qu'on stimulerait à la TSP-1 et où on bloquerait les récepteurs CD47 avec des anticorps. Ensuite, il serait possible de faire de même avec différents récepteurs de TSP-1, notamment au niveau du cerveau avec le récepteur $\alpha 2\delta 1$ puisqu'il est ciblé par des médicaments souvent prescrits aux PAEM comme la gabapentine et la prégabaline (28). On sait également que la TSP-1 est augmenté entre autres par le glucose et l'angiotensine II (126). Sachant que l'angiotensine II est également impliquée dans le POTS (65), on pourrait investiguer pour voir si le mécanisme de la TSP-1 dans le POTS passe par la voie de l'angiotensine II.

Chapitre 4 – Conclusion

En conclusion, ce projet de maîtrise a permis d’approfondir les connaissances entourant l’encéphalomyélite myalgique. Nous avons concentré nos efforts autour de l’intolérance orthostatique, un symptôme touchant un sous-groupe de PAEM et qui se manifeste parfois sous la forme de POTS. Nous avons émis l’hypothèse que les symptômes d’IO induites ou exacerbées par le malaise après-effort pouvait être causés par une inhibition du transporteur NET codé par le gène SLC6A2 suite à une élévation des niveaux d’expression du hsa-miR-150-5p, ou via une variation de la concentration de la protéine TSP-1 circulante. Nos résultats indiquent que cette hypothèse semble vraie chez certains individus, suggérant l’apport possible d’autres mécanismes. En effet, les PAEM avec POTS/IO ont une expression du miR-150-5p plus importante que les PAEM sans POTS/IO et que les témoins sains. Qui plus est, nous avons testé une veste intelligente permettant de monitorer au quotidien les symptômes des PAEM.

Pour la suite de ce projet, il serait intéressant de comparer les différents groupes avec un groupe supplémentaire de patients atteint uniquement de POTS. On pourrait également confirmer les cibles du miR-150-5p, qui ne sont que prédites pour le moment. Pour se faire, il serait possible d’utiliser des méthodes de *microRNA pulldown* ou de *reporter gene assay* avec différentes lignées cellulaires. En outre, il faudrait investiguer la potentielle contribution de EZH2 via la méthylation de H3K27me, avec par exemple du séquençage d’immunoprécipitation de la chromatine ChIP-seq ou ChIP-chip (169). Pour compléter le tout, on pourrait approfondir nos connaissances quant à l’impact de la duloxetine et d’autres inhibiteurs de la recapture de la norépinephrine sur la santé de PAEM avec et sans POTS/OI.

D’un point de vue clinique, il serait possible d’utiliser la veste intelligente Hexoskin (Carré Technologies Inc., Montreal, Qué., Canada) pour établir un pré-diagnostic de tachycardie posturale. Autrement, elle pourrait être utilisée pour améliorer le suivi clinique des PAEM notamment suite à l’induction du malaise après-effort.

Finalement, il reste beaucoup de travaux à entreprendre pour élucider les mécanismes des intolérances orthostatiques chez les PAEM, mais ce projet a permis une première percée dans cette voie.

Références bibliographiques

1. Canada PHAo. Unpublished analysis using 2015 data from the Canadian Community Health Survey (Statistics Canada) 2017 [Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/chronic-fatigue-syndrome-myalgic-encephalomyelitis.html>].
2. CIHR-IRSC. Working with patients and their families to improve health outcomes for people living with ME/CFS 2019 [Available from: <http://www.cihr-irsc.gc.ca/e/51074.html>].
3. Cortes Rivera M, Mastronardi C, Silva-Aldana CT, Arcos-Burgos M, Lidbury BA. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3).
4. Devanur LD, Kerr JR. Chronic fatigue syndrome. *J Clin Virol*. 2006;37(3):139-50.
5. Bested AC, Marshall LM. Review of Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: an evidence-based approach to diagnosis and management by clinicians. *Rev Environ Health*. 2015;30(4):223-49.
6. Sweetman E, Noble A, Edgar C, Mackay A, Helliwell A, Vallings R, et al. Current Research Provides Insight into the Biological Basis and Diagnostic Potential for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3).
7. Davenport TE, Stevens SR, VanNess JM, Stevens J, Snell CR. Checking our blind spots: current status of research evidence summaries in ME/CFS. *Br J Sports Med*. 2019;53(19):1198.
8. Rasa S, Nora-Krukle Z, Henning N, Eliassen E, Shikova E, Harrer T, et al. Chronic viral infections in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *J Transl Med*. 2018;16(1):268-.
9. White PD. A perspective on causation of the chronic fatigue syndrome by considering its nosology. *J Eval Clin Pract*.0(0).
10. Esfandyarpour R, Kashi A, Nemat-Gorgani M, Wilhelmy J, Davis RW. A nanoelectronics-blood-based diagnostic biomarker for myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(21):10250-7.

11. Wong TL, Weitzer DJ. Long COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS)-A Systemic Review and Comparison of Clinical Presentation and Symptomatology. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(5).
12. Gerwyn M, Maes M. Mechanisms Explaining Muscle Fatigue and Muscle Pain in Patients with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): a Review of Recent Findings. *Curr Rheumatol Rep*. 2017;19(1):1.
13. Buchwald D, Herrell R, Ashton S, Belcourt M, Schmaling K, Sullivan P, et al. A twin study of chronic fatigue. *Psychosom Med*. 2001;63(6):936-43.
14. Ciregia F, Giusti L, Da Valle Y, Donadio E, Consensi A, Giacomelli C, et al. A multidisciplinary approach to study a couple of monozygotic twins discordant for the chronic fatigue syndrome: a focus on potential salivary biomarkers. *J Transl Med*. 2013;11:243.
15. Giloteaux L, Goodrich JK, Walters WA, Levine SM, Ley RE, Hanson MR. Reduced diversity and altered composition of the gut microbiome in individuals with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Microbiome*. 2016;4(1):30-.
16. Sullivan PF, Evengard B, Jacks A, Pedersen NL. Twin analyses of chronic fatigue in a Swedish national sample. *Psychol Med*. 2005;35(9):1327-36.
17. Perez M, Jaundoo R, Hilton K, Del Alamo A, Gemayel K, Klimas NG, et al. Genetic Predisposition for Immune System, Hormone, and Metabolic Dysfunction in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Pilot Study. *Frontiers in Pediatrics*. 2019;7(206).
18. Shimosako N, Kerr JR. Use of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) to distinguish gene expression subtypes of chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME). *J Clin Pathol*. 2014;67(12):1078-83.
19. Smith AK, Fang H, Whistler T, Unger ER, Rajeevan MS. Convergent genomic studies identify association of GRIK2 and NPAS2 with chronic fatigue syndrome. *Neuropsychobiology*. 2011;64(4):183-94.
20. Carruthers BM, Jain AK, De Meirleir KL, Peterson DL, Klimas NG, Lerner AM, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*. 2003;11(1):7-115.

21. Sharpe MC, Archard LC, Banatvala JE, Borysiewicz LK, Clare AW, David A, et al. A report--chronic fatigue syndrome: guidelines for research. *J R Soc Med.* 1991;84(2):118-21.
22. Carruthers BM, van de Sande MI, De Meirleir KL, Klimas NG, Broderick G, Mitchell T, et al. Myalgic encephalomyelitis: International Consensus Criteria. *J Intern Med.* 2011;270(4):327-38.
23. Baraniuk JN. Chronic fatigue syndrome prevalence is grossly overestimated using Oxford criteria compared to Centers for Disease Control (Fukuda) criteria in a U.S. population study. *Fatigue: Biomedicine, Health & Behavior.* 2017;5(4):215-30.
24. Missailidis D, Annesley SJ, Fisher PR. Pathological Mechanisms Underlying Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Diagnostics (Basel).* 2019;9(3).
25. Castro-Marrero J, Faro M, Aliste L, Saez-Francas N, Calvo N, Martinez-Martinez A, et al. Comorbidity in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: A Nationwide Population-Based Cohort Study. *Psychosomatics.* 2017;58(5):533-43.
26. McManimen SL, Devendorf AR, Brown AA, Moore BC, Moore JH, Jason LA. Mortality in Patients with Myalgic Encephalomyelitis and Chronic Fatigue Syndrome. *Fatigue.* 2016;4(4):195-207.
27. McManimen SL, McClellan D, Stoothoff J, Jason LA. Effects of unsupportive social interactions, stigma, and symptoms on patients with myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome. *J Community Psychol.* 2018;46(8):959-71.
28. Bateman L, Basted AC, Bonilla HF, Chheda BV, Chu L, Curtin JM, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Essentials of Diagnosis and Management. *Mayo Clin Proc.* 2021;96(11):2861-78.
29. van Campen C, Rowe PC, Visser FC. Deconditioning does not explain orthostatic intolerance in ME/CFS (myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome). *J Transl Med.* 2021;19(1):193.
30. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G. Immunological aspects of chronic fatigue syndrome. *Autoimmun Rev.* 2009;8(4):287-91.

31. Nguyen T, Staines D, Johnston S, Marshall-Gradisnik S. Reduced glycolytic reserve in isolated natural killer cells from Myalgic encephalomyelitis/ chronic fatigue syndrome patients: A preliminary investigation. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2019;37(2):102-8.
32. Fluge O, Mella O. Clinical impact of B-cell depletion with the anti-CD20 antibody rituximab in chronic fatigue syndrome: a preliminary case series. *BMC Neurol.* 2009;9:28.
33. Bosly A. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation.* 2006;15.
34. Fluge Ø, Risa K, Lunde S, Alme K, Rekeland IG, Sapkota D, et al. B-Lymphocyte Depletion in Myalgic Encephalopathy/ Chronic Fatigue Syndrome. An Open-Label Phase II Study with Rituximab Maintenance Treatment. *PLoS One.* 2015;10(7):e0129898-e.
35. Fluge O, Rekeland IG, Lien K, Thurmer H, Borchgrevink PC, Schafer C, et al. B-Lymphocyte Depletion in Patients With Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med.* 2019;170(9):585-93.
36. Hornig M, Montoya JG, Klimas NG, Levine S, Felsenstein D, Bateman L, et al. Distinct plasma immune signatures in ME/CFS are present early in the course of illness. *Sci Adv.* 2015;1(1):e1400121.
37. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101.
38. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
39. Morris G, Maes M. Mitochondrial dysfunctions in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome explained by activated immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways. *Metab Brain Dis.* 2014;29(1):19-36.
40. Myhill S, Booth NE, McLaren-Howard J. Chronic fatigue syndrome and mitochondrial dysfunction. *Int J Clin Exp Med.* 2009;2(1):1-16.

41. Billing-Ross P, Germain A, Ye K, Keinan A, Gu Z, Hanson MR. Mitochondrial DNA variants correlate with symptoms in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J Transl Med.* 2016;14:19-.
42. Wan J-J, Qin Z, Wang P-Y, Sun Y, Liu X. Muscle fatigue: general understanding and treatment. *Exp Mol Med.* 2017;49(10):e384-e.
43. Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Coenzyme Q10 deficiency in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) is related to fatigue, autonomic and neurocognitive symptoms and is another risk factor explaining the early mortality in ME/CFS due to cardiovascular disorder. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(4):470-6.
44. Lawson N, Hsieh C-H, March D, Wang X. Elevated Energy Production in Chronic Fatigue Syndrome Patients. *J Nat Sci.* 2016;2(10):e221.
45. Kennedy G, Spence VA, McLaren M, Hill A, Underwood C, Belch JJ. Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(5):584-9.
46. Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers.* 2005;10 Suppl 1:S10-23.
47. Morris G, Anderson G, Maes M. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Hypofunction in Myalgic Encephalomyelitis (ME)/Chronic Fatigue Syndrome (CFS) as a Consequence of Activated Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Pathways. *Mol Neurobiol.* 2017;54(9):6806-19.
48. Proal A, Marshall T. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome in the Era of the Human Microbiome: Persistent Pathogens Drive Chronic Symptoms by Interfering With Host Metabolism, Gene Expression, and Immunity. *Frontiers in pediatrics.* 2018;6:373-.
49. Du Preez S, Corbitt M, Cabanas H, Eaton N, Staines D, Marshall-Gradisnik S. A systematic review of enteric dysbiosis in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Syst Rev.* 2018;7(1):241-.

50. Newberry F, Hsieh S-Y, Wileman T, Carding SR. Does the microbiome and virome contribute to myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome? *Clinical science (London, England : 1979)*. 2018;132(5):523-42.
51. Mandarano AH, Giloteaux L, Keller BA, Levine SM, Hanson MR. Eukaryotes in the gut microbiota in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *PeerJ*. 2018;6:e4282-e.
52. Mackay A, Tate WP. A compromised paraventricular nucleus within a dysfunctional hypothalamus: A novel neuroinflammatory paradigm for ME/CFS. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2018;32:2058738418812342.
53. Nakatomi Y, Mizuno K, Ishii A, Wada Y, Tanaka M, Tazawa S, et al. Neuroinflammation in Patients with Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis: An (1)(1)C-(R)-PK11195 PET Study. *J Nucl Med*. 2014;55(6):945-50.
54. Tomas C, Newton J, Watson S. A review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in chronic fatigue syndrome. *ISRN Neurosci*. 2013;2013:784520-.
55. Torres-Harding S, Sorenson M, Jason L, Maher K, Fletcher MA, Reynolds N, et al. The associations between basal salivary cortisol and illness symptomatology in chronic fatigue syndrome. *J Appl Biobehav Res*. 2008;13:157-80.
56. Lopez C, Antoni M, Penedo F, Weiss D, Cruess S, Segotas M-C, et al. A pilot study of cognitive behavioral stress management effects on stress, quality of life, and symptoms in persons with chronic fatigue syndrome. *J Psychosom Res*. 2011;70(4):328-34.
57. Naviaux RK, Naviaux JC, Li K, Bright AT, Alaynick WA, Wang L, et al. Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(37):E5472-E80.
58. Germain A, Ruppert D, Levine SM, Hanson MR. Metabolic profiling of a myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome discovery cohort reveals disturbances in fatty acid and lipid metabolism. *Mol Biosyst*. 2017;13(2):371-9.
59. Armstrong CW, McGregor NR, Lewis DP, Butt HL, Gooley PR. Metabolic profiling reveals anomalous energy metabolism and oxidative stress pathways in chronic fatigue syndrome patients. *Metabolomics*. 2015;11(6):1626-39.

60. Fluge Ø, Mella O, Bruland O, Risa K, Dyrstad SE, Alme K, et al. Metabolic profiling indicates impaired pyruvate dehydrogenase function in myalgic encephalopathy/chronic fatigue syndrome. *JCI Insight*. 2016;1(21):e89376-e.
61. McGregor NR, Armstrong CW, Lewis DP, Gooley PR. Post-Exertional Malaise Is Associated with Hypermetabolism, Hypoacetylation and Purine Metabolism Deregulation in ME/CFS Cases. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3).
62. Nepotchatykh E, Elremaly W, Caraus I, Godbout C, Leveau C, Chalder L, et al. Profile of circulating microRNAs in myalgic encephalomyelitis and their relation to symptom severity, and disease pathophysiology. *Sci Rep*. 2020;10(1):19620.
63. Stewart JM. Common syndromes of orthostatic intolerance. *Pediatrics*. 2013;131(5):968-80.
64. Vernino S, Bourne KM, Stiles LE, Grubb BP, Fedorowski A, Stewart JM, et al. Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS): State of the science and clinical care from a 2019 National Institutes of Health Expert Consensus Meeting - Part 1. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2021;235:102828-.
65. Arnold AC, Ng J, Raj SR. Postural tachycardia syndrome - Diagnosis, physiology, and prognosis. *Auton Neurosci*. 2018;215:3-11.
66. Gopinathannair R, Olshansky B. Management of tachycardia. *F1000Prime Rep*. 2015;7:60.
67. Fedorowski A. Postural orthostatic tachycardia syndrome: clinical presentation, aetiology and management. *J Intern Med*. 2019;285(4):352-66.
68. Safavi-Naeini P, Razavi M. Postural Orthostatic Tachycardia Syndrome. *Tex Heart Inst J*. 2020;47(1):57-9.
69. Sheldon RS, Grubb BP, 2nd, Olshansky B, Shen WK, Calkins H, Brignole M, et al. 2015 heart rhythm society expert consensus statement on the diagnosis and treatment of postural tachycardia syndrome, inappropriate sinus tachycardia, and vasovagal syncope. *Heart Rhythm*. 2015;12(6):e41-63.

70. Nwazue VC, Paranjape SY, Black BK, Biaggioni I, Diedrich A, Dupont WD, et al. Postural Tachycardia Syndrome and Inappropriate Sinus Tachycardia: Role of Autonomic Modulation and Sinus Node Automaticity. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(2):e000700.
71. Freeman R, Wieling W, Axelrod FB, Benditt DG, Benarroch E, Biaggioni I, et al. Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, neurally mediated syncope and the postural tachycardia syndrome. *Clin Auton Res*. 2011;21(2):69-72.
72. Kavi L, Gammage MD, Grubb BP, Karabin BL. Postural tachycardia syndrome: multiple symptoms, but easily missed. *Br J Gen Pract*. 2012;62(599):286-7.
73. Carew S, Connor MO, Cooke J, Conway R, Sheehy C, Costelloe A, et al. A review of postural orthostatic tachycardia syndrome. *Europace*. 2009;11(1):18-25.
74. Gibbons CH, Bonyhay I, Benson A, Wang N, Freeman R. Structural and functional small fiber abnormalities in the neuropathic postural tachycardia syndrome. *PLoS One*. 2013;8(12):e84716.
75. Vykoupil K. Current look on postural tachycardia syndrome. *Cor Vasa*. 2016;58(4):e426-e30.
76. Grubb BP. Postural Tachycardia Syndrome. *Circulation*. 2008;117(21):2814-7.
77. Fijal BA, Kohler J, Ostbye K, Ahl J, Houston JP. Association of candidate gene polymorphisms with diastolic blood pressure change in patients treated with duloxetine. *Psychiatry Res*. 2013;206(2):313-4.
78. van Campen CMC, Verheugt FWA, Rowe PC, Visser FC. Cerebral blood flow is reduced in ME/CFS during head-up tilt testing even in the absence of hypotension or tachycardia: A quantitative, controlled study using Doppler echography. *Clinical Neurophysiology Practice*. 2020;5:50-8.
79. Bylund DB, Bylund KC. Norepinephrine. In: Aminoff MJ, Daroff RB, editors. *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 614-6.

80. Shannon JR, Flattem NL, Jordan J, Jacob G, Black BK, Biaggioni I, et al. Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *N Engl J Med.* 2000;342(8):541-9.
81. Robertson D, Flattem N, Tellioglu T, Carson R, Garland E, Shannon JR, et al. Familial orthostatic tachycardia due to norepinephrine transporter deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;940:527-43.
82. Schlessinger A, Geier E, Fan H, Irwin JJ, Shoichet BK, Giacomini KM, et al. Structure-based discovery of prescription drugs that interact with the norepinephrine transporter, NET. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2011;108(38):15810-5.
83. Ivancsits S, Heider A, Rüdiger HW, Winker R. Orthostatic intolerance is not necessarily related to a specific mutation (Ala457Pro) in the human norepinephrine transporter gene. *Am J Med Sci.* 2003;325(2):63-5.
84. Kaipananickal H, Khan AW, Okabe J, Corcoran SJ, Esler MD, El-Osta A. Targeting Treatment Refractory *NET* by EZH2 Inhibition in Postural Tachycardia Syndrome. *Circ Res.* 2020;126(8):1058-60.
85. Gould GG, Javors MA, Frazer A. Effect of Chronic Administration of Duloxetine on Serotonin and Norepinephrine Transporter Binding Sites in Rat Brain. *Biol Psychiatry.* 2007;61(2):210-5.
86. Green EA, Raj V, Shibao CA, Biaggioni I, Black BK, Dupont WD, et al. Effects of norepinephrine reuptake inhibition on postural tachycardia syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(5):e000395.
87. Schroeder C, Tank J, Boschmann M, Diedrich A, Sharma AM, Biaggioni I, et al. Selective norepinephrine reuptake inhibition as a human model of orthostatic intolerance. *Circulation.* 2002;105(3):347-53.
88. Reynolds GK, Lewis DP, Richardson AM, Lidbury BA. Comorbidity of postural orthostatic tachycardia syndrome and chronic fatigue syndrome in an Australian cohort. *J Intern Med.* 2014;275(4):409-17.

89. van Campen CMC, Rowe PC, Visser FC. Blood Volume Status in ME/CFS Correlates With the Presence or Absence of Orthostatic Symptoms: Preliminary Results. *Frontiers in Pediatrics*. 2018;6(352).
90. Miwa K, Inoue Y. The etiologic relation between disequilibrium and orthostatic intolerance in patients with myalgic encephalomyelitis (chronic fatigue syndrome). *J Cardiol*. 2018;72(3):261-4.
91. Shanks L, Jason LA, Evans M, Brown A. Cognitive impairments associated with CFS and POTS. *Front Physiol*. 2013;4:113.
92. Stewart JM, Medow MS, Messer ZR, Baugham IL, Terilli C, Ocon AJ. Postural neurocognitive and neuronal activated cerebral blood flow deficits in young chronic fatigue syndrome patients with postural tachycardia syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(5):H1185-94.
93. Nelson MJ, Bahl JS, Buckley JD, Thomson RL, Davison K. Evidence of altered cardiac autonomic regulation in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(43):e17600.
94. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
95. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. 2014;51(4):759-74.
96. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2018;47(D1):D155-D62.
97. Kreth S, Hübner M, Hinske LC. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesth Analg*. 2018;126(2):670-81.
98. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*. 2020;9(2).

99. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):25-30.
100. Nik Mohamed Kamal NNSB, Shahidan WNS. Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Front Pharmacol.* 2020;10(1500).
101. Almenar-Pérez E, Sarría L, Nathanson L, Oltra E. Assessing diagnostic value of microRNAs from peripheral blood mononuclear cells and extracellular vesicles in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Sci Rep.* 2020;10(1):2064.
102. Cheema AK, Sarria L, Bekheit M, Collado F, Almenar-Pérez E, Martín-Martínez E, et al. Unravelling myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS): Gender-specific changes in the microRNA expression profiling in ME/CFS. *J Cell Mol Med.* 2020;24(10):5865-77.
103. Al-Rawaf HA, Alghadir AH, Gabr SA. MicroRNAs as Biomarkers of Pain Intensity in Patients With Chronic Fatigue Syndrome. *Pain Practice.* 2019;19(8):848-60.
104. Brenu EW, Ashton KJ, Batovska J, Staines DR, Marshall-Gradisnik SM. High-Throughput Sequencing of Plasma MicroRNA in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *PLoS One.* 2014;9(9):e102783.
105. Brenu EW, Ashton KJ, van Driel M, Staines DR, Peterson D, Atkinson GM, et al. Cytotoxic lymphocyte microRNAs as prospective biomarkers for Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *J Affect Disord.* 2012;141(2-3):261-9.
106. Scrutinio D, Conserva F, Passantino A, Iacoviello M, Lagioia R, Gesualdo L. Circulating microRNA-150-5p as a novel biomarker for advanced heart failure: A genome-wide prospective study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2017;36(6):616-24.
107. Punga T, Le Panse R, Andersson M, Truffault F, Berrih-Aknin S, Punga AR. Circulating miRNAs in myasthenia gravis: miR-150-5p as a new potential biomarker. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1(1):49-58.
108. Cron MA, Maillard S, Truffault F, Gualeni AV, Gloghini A, Fadel E, et al. Causes and Consequences of miR-150-5p Dysregulation in Myasthenia Gravis. *Front Immunol.* 2019;10(539).

109. Zou SL, Chen YL, Ge ZZ, Qu YY, Cao Y, Kang ZX. Downregulation of serum exosomal miR-150-5p is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2019;26(1):69-77.
110. Zhu J, Han S. miR-150-5p promotes the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells via targeting SRCIN1. *Pathol Res Pract.* 2019;215(4):738-47.
111. Qin Y, Zhang B, Ge BJ. MicroRNA-150-5p inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells by down-regulating VEGFA. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(18):9265-73.
112. Wu Z, Li W, Li J, Zhang Y, Zhang X, Xu Y, et al. Higher expression of miR-150-5p promotes tumorigenesis by suppressing LKB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Res Pract.* 2020;216(11):153145.
113. Huang HY, Lin YC, Li J, Huang KY, Shrestha S, Hong HC, et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D148-d54.
114. McGeary SE, Lin KS, Shi CY, Pham TM, Bisaria N, Kelley GM, et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science.* 2019;366(6472).
115. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, et al. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* 2020;49(D1):D884-D91.
116. Bastian FB, Roux J, Niknejad A, Comte A, Fonseca Costa Sara S, de Farias TM, et al. The Bgee suite: integrated curated expression atlas and comparative transcriptomics in animals. *Nucleic Acids Res.* 2020;49(D1):D831-D47.
117. Amarasekera AT, Assadi-Khansari B, Liu S, Black M, Dymmott G, Rogers NM, et al. Vitamin D supplementation lowers thrombospondin-1 levels and blood pressure in healthy adults. *PLoS One.* 2017;12(5):e0174435-e.
118. Choi K-Y, Kim D-B, Kim M-J, Kwon B-J, Chang S-Y, Jang S-W, et al. Higher plasma thrombospondin-1 levels in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. *Korean Circ J.* 2012;42(2):100-6.

119. Kaiser R, Frantz C, Bals R, Wilkens H. The role of circulating thrombospondin-1 in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Respir Res.* 2016;17(1):96.
120. Okada-Tsuchioka M, Omori W, Kajitani N, Shibasaki C, Itagaki K, Takebayashi M. Decreased serum levels of thrombospondin-1 in female depressed patients. *Neuropsychopharmacol Rep.* 2020;40(1):39-45.
121. Xie Y, Zhang J, Jin W, Tian R, Wang R. Role of Thrombospondin-1 in sepsis-induced myocardial injury. *Mol Med Rep.* 2021;24(6).
122. Chen Q, Ye ZN, Liu JP, Zhang ZH, Zhou CH, Wang Y, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of thrombospondin-1 correlate with adverse clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Sci.* 2016;369:126-30.
123. Crombie R, Silverstein RL, MacLow C, Pearce SF, Nachman RL, Laurence J. Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120: relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J Exp Med.* 1998;187(1):25-35.
124. Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(1):240-3.
125. Resovi A, Pinessi D, Chiorino G, Taraboletti G. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biol.* 2014;37:83-91.
126. Stenina-Adognravi O. Invoking the power of thrombospondins: regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biol.* 2014;37:69-82.
127. Bradshaw AD. Chapter 15 - Regulation of Cell Behavior by Extracellular Proteins. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press; 2014. p. 279-90.
128. P07996 (TSP1_HUMAN) [Internet]. 2019 Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P07996>.
129. Isenberg JS, Frazier WA, Roberts DD. Chapter 12 - Nitric Oxide Signaling in Vascular Cells is Regulated through CD47 by Thrombospondin-1. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 415-40.

130. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, et al. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell*. 2009;139(2):380-92.
131. Risher WC, Eroglu C. Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2012;31(3):170-7.
132. Lopes-Bastos B, Jin L, Ruge F, Owen S, Sanders A, Cogle C, et al. Association of breast carcinoma growth with a non-canonical axis of IFN γ /IDO1/TSP1. *Oncotarget*. 2017;8(49):85024-39.
133. Hale JS, Li M, Sinyuk M, Jahnen-Dechent W, Lathia JD, Silverstein RL. Context dependent role of the CD36--thrombospondin--histidine-rich glycoprotein axis in tumor angiogenesis and growth. *PLoS One*. 2012;7(7):e40033-e.
134. Zhao C, Isenberg JS, Popel AS. Human expression patterns: qualitative and quantitative analysis of thrombospondin-1 under physiological and pathological conditions. *J Cell Mol Med*. 2018;22(4):2086-97.
135. Gutierrez LS, Gutierrez J. Thrombospondin 1 in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(248).
136. Li Y, Turpin CP, Wang S. Role of thrombospondin 1 in liver diseases. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2017;47(2):186-93.
137. Gwag T, Reddy Mooli RG, Li D, Lee S, Lee EY, Wang S. Macrophage-derived thrombospondin 1 promotes obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep*. 2021;3(1):100193.
138. Nakamura T, Bornstein P. Matricellular Proteins*. In: Janes SM, editor. *Encyclopedia of Respiratory Medicine (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2022. p. 137-51.
139. Kale A, Rogers NM, Ghimire K. Thrombospondin-1 CD47 Signalling: From Mechanisms to Medicine. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).

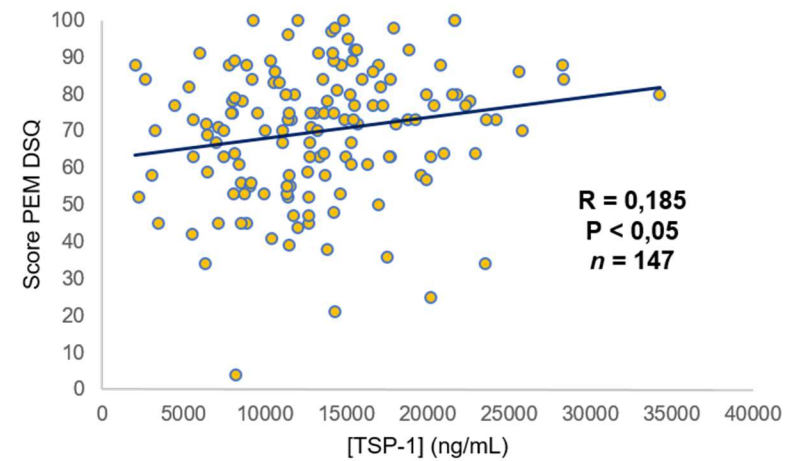
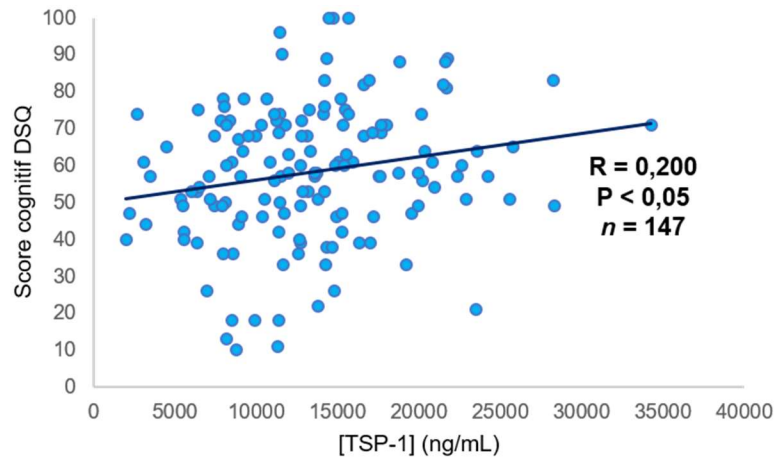
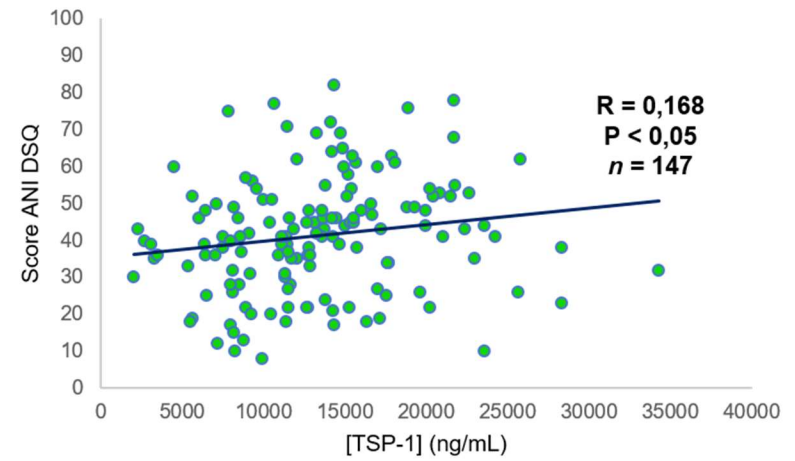
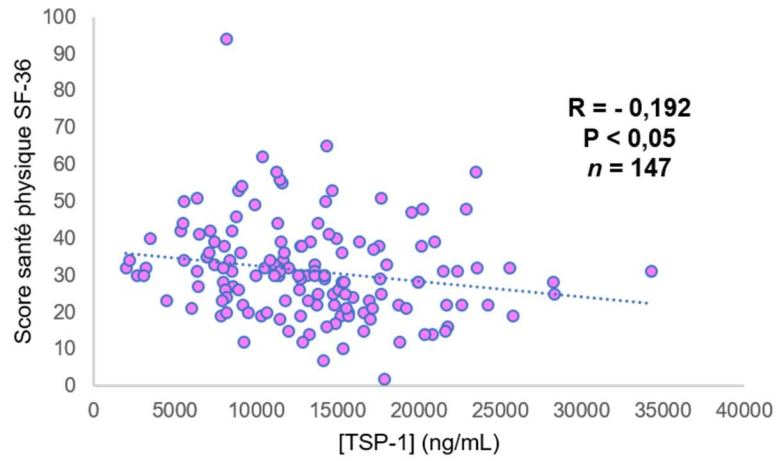
140. Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):182-94.
141. Bauer EM, Qin Y, Miller TW, Bandle RW, Csanyi G, Pagano PJ, et al. Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation. *Cardiovasc Res*. 2010;88(3):471-81.
142. Elmarakby AA, Pollock DM, Imig JD. 6.25 - Renal Dysfunction in Hypertension and Obesity. In: Taylor JB, Triggle DJ, editors. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier; 2007. p. 575-95.
143. Rassaf T, Kelm M. CHAPTER 13 - Nitrite and nitrosospecies in blood and tissue: approaching the gap between bench and bedside. In: Van Faassen E, Fyodorovich Vanin A, editors. *Radicals for Life*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 269-88.
144. Kaur S, Chang T, Singh SP, Lim L, Mannan P, Garfield SH, et al. CD47 signaling regulates the immunosuppressive activity of VEGF in T cells. *J Immunol*. 2014;193(8):3914-24.
145. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2009;2(72):re3.
146. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:296069.
147. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*. 1997;138(3):707-17.
148. Osz K, Ross M, Petrik J. The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:21.
149. Chu LY, Ramakrishnan DP, Silverstein RL. Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood*. 2013;122(10):1822-32.

150. Malek MH, Olfert IM. Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice. *Exp Physiol*. 2009;94(6):749-60.
151. Olfert IM, Breen EC, Gavin TP, Wagner PD. Temporal thrombospondin-1 mRNA response in skeletal muscle exposed to acute and chronic exercise. *Growth Factors*. 2006;24(4):253-9.
152. Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, Nakamura T, Kim J, et al. Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm in Mouse and Humans. *Circ Res*. 2018;123(6):660-72.
153. Yamashiro Y, Thang BQ, Ramirez K, Shin SJ, Kohata T, Ohata S, et al. Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(18):9896-905.
154. Garner R, Baraniuk JN. Orthostatic intolerance in chronic fatigue syndrome. *J Transl Med*. 2019;17(1):185.
155. Murdock KW, Wang XS, Shi Q, Cleeland CS, Fagundes CP, Vernon SD. The utility of patient-reported outcome measures among patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*. 2017;26(4):913-21.
156. Pendergrast T, Brown A, Sunnquist M, Jantke R, Newton JL, Strand EB, et al. Housebound versus nonhousebound patients with myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome. *Chronic Illn*. 2016;12(4):292-307.
157. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*. 2016;10(2):175-86.
158. Purushothaman A, Bandari SK, Liu J, Mobley JA, Brown EE, Sanderson RD. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem*. janv 2016;291(4):1652-63.
159. Li J, Chen H, Ren J, Song J, Zhang F, Zhang J, et al. Effects of statin on circulating microRNAome and predicted function regulatory network in patients with unstable angina. *BMC Med Genomics*. 2015;8:12.

160. Cosar E, Mamillapalli R, Moridi I, Duleba A, Taylor HS. Serum MicroRNA Biomarkers Regulated by Simvastatin in a Primate Model of Endometriosis. *Reprod Sci.* 2019;26(10):1343-50.
161. Riolo G, Cantara S, Marzocchi C, Ricci C. miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation. *Methods Protoc.* 2020;4(1).
162. Papatheodorou I, Fonseca NA, Keays M, Tang YA, Barrera E, Bazant W, et al. Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. *Nucleic Acids Res.* 4 janv 2018;46(D1):D246 51.
163. Doll S, Dreßen M, Geyer PE, Itzhak DN, Braun C, Doppler SA, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. *Nat Commun.* déc 2017;8(1):1469.
164. Khan AW, Ziemann M, Corcoran SJ, K N H, Okabe J, Rafehi H, et al. NET silencing by let-7i in postural tachycardia syndrome. *JCI Insight.* 2017 03 23;2(6):e90183.
165. Hapugaswatta H, Amarasena P, Premaratna R, Seneviratne KN, Jayathilaka N. Differential expression of microRNA, miR-150 and enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in peripheral blood cells as early prognostic markers of severe forms of dengue. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):25.
166. O'Geen H, Echipare L, Farnham PJ. Using ChIP-seq technology to generate high-resolution profiles of histone modifications. *Methods Mol Biol.* 2011;791:265-86.
167. Kashi AA, Davis RW, Phair RD. The IDO Metabolic Trap Hypothesis for the Etiology of ME/CFS. *Diagnostics (Basel, Switzerland).* 2019;9(3):82.
168. Li H, Zhang G, Zhou L, Nuss Z, Beel M, Hines B, et al. Adrenergic Autoantibody-Induced Postural Tachycardia Syndrome in Rabbits. *Journal of the American Heart Association.* 2019;8(19):e013006.
169. Goebel A, Krock E, Gentry C, Israel MR, Jurczak A, Urbina CM, et al. Passive transfer of fibromyalgia symptoms from patients to mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 2021;131(13).

Annexes

Annexe I



Annexe II

Gène	SNP	Fréquence allélique	Résultat
IDO1	rs75136015	C > A,G,T	ns
IDO1	rs10108663	T > C	ns
IDO1	rs3808606	A > G,T	ns
IDO1	rs35059413	G > A,T	ns
IDO1	rs35099072	G > A	ns
IDO1	rs7820268	C > T	ns
IDO1	rs10108662	C > A,T	ns
IDO1	rs9298586	T > G	ns
IDO1	rs3739319	G > A	ns
IDO1	rs73619577	A > C	ns
IDO2	rs7846217	C > G,T	ns
IDO2	rs10109853	C > T	ns
IDO2	rs4503083	T > A,C	ns
IDO2	rs4736794	A > G	ns
IDO2	rs35212142	T > A	ns
IDO2	rs7846217	C > G,T	ns
THBS1	rs1478604	T > C	ns
THBS1	rs2228262	A > G	ns

Annexe III

Bourses obtenues :

- Bourse de recherche Lucie Besner, Fonds de recherche Lucie Besner en fatigue chronique (ou encéphalomyélite myalgique), département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, juillet 2021
- Bourse d'excellence des ESP - département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, décembre 2020
- Bourse d'excellence des ESP «J.A.DeSève», Université de Montréal, octobre 2020

Publications :

- Leveau C. Avancée dans le diagnostic de la fatigue chronique. *Dire.* 2021; 30(1) : 18-22 (vulgarisation)
- Nepotchatykh E, Elremaly W, Caraus I, Godbout C, Leveau C, Chalder L, et al. Profile of circulating microRNAs in myalgic encephalomyelitis and their relation to symptom severity, and disease pathophysiology. *Sci Rep.* 2020;10(1):19620.