

Université de Montréal

**Rôle de la sphingomyéline acide 3b soluble dans la pathogenèse de l'encéphalomyélite  
myalgique**

*Par*

Bitá Rostami-Afshari

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 génomique humaine

Novembre 2022

© Rostami, 2022



Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Rôle de la sphingomyéline acide 3b soluble dans la pathogenèse de l'encéphalomyélite myalgique**

*Présenté par*

**Bitá Rostami-Afshari**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Gerardo Ferbeyre**  
Président-rapporteur

**Dr Alain Moreau**  
Directeur de recherche

**Dr Marie-Yvonne Akoume-Ndong**  
Co-directrice de recherche

**Dr Stéphane Roy**  
Membre du jury



## Résumé

L'encéphalomyélite myalgique (EM) aussi connue sous le nom de syndrome de fatigue chronique est une maladie multi-systémique caractérisée par une fatigue extrême et un malaise post-effort, associés à d'autres symptômes débilitants comme l'intolérance orthostatique et des troubles du sommeil. L'EM se caractérise également par des altérations au niveau du système immunitaire et des perturbations du métabolisme énergétique affectant également le métabolisme des lipides. Dans ce contexte, nous avons exploré la contribution possible de la sphingomyéline phosphodiesterase acide 3b (SMPDL3B), produite par le gène *SMPDL3B*, dans la pathogénèse de l'EM. Celle-ci est une protéine multifonctionnelle ancrée par un groupement glycoposphatidylinositol (GPI) au niveau de la membrane des cellules. Cette enzyme a suscité notre intérêt compte tenu de son rôle dans la régulation de l'immunité innée et dans la conversion métabolique des sphingolipides en céramides. En effet, des études métabolomiques antérieures ont rapporté une réduction drastique des taux plasmatiques de céramides de 50% chez les hommes et de 86% chez les femmes souffrant d'EM.

Nous proposons que l'élévation des niveaux circulants en SMPDL3B contribue à la sévérité de plusieurs symptômes chez les personnes atteintes d'EM (PAEM) via différents mécanismes.

Les niveaux plasmatiques en SMPDL3B ont été mesurés par ELISA au niveau d'une cohorte prospective québécoise composée de PAEM (n=147) et de témoins sédentaires appariés pour le sexe et l'âge (n=62) n'ayant aucun antécédent familial d'EM. Nous avons également testé, par la même approche, des échantillons de plasma d'une cohorte norvégienne composée de PAEM (n=141). L'analyse de ces deux cohortes indépendantes a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre les taux circulants en SMPDL3B et la sévérité des symptômes des PAEM. Nous avons également observé des niveaux plasmatiques plus élevés chez les PAEM atteints d'intolérance orthostatique lorsque comparés aux PAEM ne présentant pas ce symptôme. Finalement, nous avons confirmé à l'aide de la spectrométrie cellulaire diélectrique que la forme soluble de la protéine SMPDL3B peut se lier avec une haute affinité au récepteur de chimiokines CCR3 présent chez les cellules Jurkat et mis en évidence que l'occupation de ce récepteur par la chimiokine CCL11 ou un antagoniste pharmacologique pouvait augmenter la liaison de la forme soluble de la protéine SMPDL3B vers un autre récepteur membranaire qui demeure pour l'instant

inconnu. Ce projet de maîtrise a permis une meilleure compréhension de la pathophysiologie de l'EM et de la contribution de la protéine SMPDL3B (forme ancrée et soluble) dans sa pathogénèse.

**Mots-clés :** Encéphalomyélite myalgique (EM), Sphingomyéline phosphodiesterase acide 3B (SMPDL3B), glycoposphatidylinositol (GPI), récepteur de chimiokine de type 3 (CCR3), la chimiokine 11 à motif C-C (CCL11) et syndrome de tachycardie orthostatique posturale (STOP).

## Abstract

Myalgic encephalomyelitis (ME) also known as chronic fatigue syndrome is a multi-systemic disease characterized by extreme fatigue, post-exercise malaise, orthostatic intolerance, and sleep disturbances. ME is also characterized by alterations in the immune system and disturbances in energy metabolism that also affect lipid metabolism. In this context, we explored the possible contribution of sphingomyelin acid phosphodiesterase 3b, produced by the *SMPDL3B* gene, in the pathogenesis of ME. This is a multifunctional protein anchored by a glycosphosphatidylinositol (GPI) group at the cell membrane. This enzyme has intrigued our interest given its role in the regulation of innate immunity and in the metabolic conversion of sphingolipids into ceramides. Indeed, previous metabolomics studies have reported a drastic reduction in plasma ceramide levels by 50% in men and 86% in women with ME.

We propose that elevation of circulating levels of SMPDL3B increases the severity of several symptoms in persons with ME (PwME) via different mechanisms.

Plasma levels of SMPDL3B were measured by ELISA in a Quebec cohort composed of PwME (n=147) and sedentary controls matched for sex and age (n=62) with no family history of ME. We also tested, by the same method, plasma samples from a Norwegian cohort composed of PwME (n=141). The analysis of these two independent cohorts revealed a positive correlation between SMPDL3B and the severity of PwME symptoms. We also observed higher plasma levels in PwMEs with orthostatic instability when compared to PwMEs without this symptom. Finally, we confirmed using dielectric cell spectrometry that the soluble form of the SMPDL3B protein can bind with high affinity to the CCR3 chemokine receptor present in Jurkat cells and demonstrated that the occupation of this receptor by the chemokine CCL11 or a pharmacological antagonist could increase the binding to another membrane receptor which remains unknown for the moment. This master's project allowed a better understanding of the pathophysiology of ME and the contribution of the SMPDL3B protein in its pathogenesis.

**Keywords:** Myalgic Encephalomyelitis (ME), sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL3b), Glycosphosphatidylinositol (GPI), C-C chemokine receptor type 3 (CCR3), C-C motif chemokine 11 (CCL11) and Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS)







# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>7</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>13</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>15</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>17</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction et revue de la littérature.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Encéphalomyélite myalgique.....</b>	<b>25</b>
1.1.1. L'étiologie.....	26
1.1.1.1. Infections.....	26
1.1.1.2. Génétique.....	26
1.1.2. Critères de diagnostic et symptômes de l'EM.....	27
1.1.3. Comorbidités.....	29
1.1.4. Perturbations de différents systèmes chez les patients EM.....	29
1.1.4.1. Système neurologique.....	29
<b>1.1.4.1.1. Présence de neuro-inflammation chez les PAEM.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.4.1.2. Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....</b>	<b>30</b>
1.1.4.2. Système immunitaire.....	30
<b>1.1.4.2.1. Cytokines.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.4.2.2. Cellules NK et lymphocytes T et B.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2. Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale.....</b>	<b>32</b>
<b>1.3. Rôles de la protéine SMPDL3B dans la pathogenèse de l'EM.....</b>	<b>33</b>
1.3.1. Implications dans le métabolisme des lipides.....	33
1.3.2. Rôle de la protéine SMPDL3B au niveau de l'immunité innée.....	35
1.3.3. Contribution au niveau du système rénal.....	37
1.3.4. Mécanisme d'ancrage via un lien GPI et son clivage protéolytique.....	38

1.3.5. Cible thérapeutique possible pour l'EM impliquant la protéine SMPDL3B .....	39
<b>1.4. Hypothèses et objectifs de recherche .....</b>	<b>40</b>
1.4.1. Problématique .....	40
1.4.2. Hypothèses et objectifs .....	41
<b>Chapitre 2 – Manuscrit.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapitre 3 – Discussion .....</b>	<b>76</b>
Pertinence de l'étude sur la protéine SMPDL3B et méthodologie.....	76
Pertinence clinique de la protéine SMPDL3B chez les PAEM.....	78
Perspectives .....	82
<b>Chapitre 4 – Conclusion.....</b>	<b>85</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>93</b>

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** – Critères du Consensus Canadien (CCC) tel que décrit par Carruthers *et al.*, 2003.  
28



## Liste des figures

- Figure 1. – Interaction indirecte de SMPDL3B et la sphingosine-1-phosphate et analyse des voies de molécules d'intérêt à l'aide de l'Ingenuity Pathway Analysis (IPA)..... 35
- Figure 2. – Schéma représentant les conséquences de la présence et de l'absence de SMPDL3B.  
36
- Figure 3. – Trois profils chez les PAEM..... 41
- Figure 4. – Interactions possibles entre CCR3, SMPDL3B et les marqueurs de POTS et analyse des voies des molécules d'intérêt à l'aide de l'Ingenuity Pathway Analysis (IPA)..... 78



## Liste des sigles et abréviations

3'UTR: 3' untranslated region

ANOVA: Analysis of Variance

AMSase: Acide Sphingomyelinase

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

C1P: Ceramide-1-phosphate

CCL11: Chimiokine 11 à motif C-C ou Eotaxin-1

CCR3: Récepteur de chimiokine C-C de type 3

CD8+: cluster de différenciation 8

CD11: cluster de différenciation 11

CD20: cluster de différenciation 20

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CERK: Ceramide Kinase

CERS2: Ceramide Synthase 2

CMV: cytomégalovirus

COVID-19: coronavirus disease 19

CXCR2: C-X-C Motif Chemokine Receptor 2

DKD: Diabetic Kidney Disease

DSP: dithiobis(succinimidyl propionate)

DSQ: DePaul Symptom Questionnaire

E2: estradiol

EBV: Epstein - Barr virus

EC50: Half maximal effective concentration

ESR2/ ER $\beta$ : Estrogen Receptor 2

EM/SFC: Encéphalomyélite Myalgique/Syndrome de Fatigue Chronique

EZH2: enhancer of zest homolog 2

FSGS: Focal segmental glomerulosclerosis

GDE2: glycérophosphodiester phosphodiesterase 2

GPCRs: G-protein-coupled receptors

GPI: glycosylphosphatidylinositol

GPLD1: Glycosylphosphatidylinositol Specific Phospholipase D1

HC: Healthy Controls

HEK 293T: Human embryonic Kidney

HHV: human herpesvirus

IBD: Inflammatory Bowel Disease

IFN $\gamma$ : Interféron- $\gamma$

IL-1 $\beta$ : Interleukine 1 bêta

IL-6: Interleukine 6

IOM: Institute of Medicine

IPA: Ingenuity Pathway Analysis

KLF2: Kruppel-like factor 2

LCR : liquide céphalo-rachidien

MAP kinases: Mitogen-activated protein kinase

miARN: microARN

miR: microARN

MFI-20: Multidimensional Fatigue Inventory-20

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NAFLD: Non-alcoholic fatty acid liver disease

NET: norepinephrine transporter

NK: natural killer

NF-κB: Nuclear Factor-Kappa B

OI: Orthostatic Intolerance

OMS: organisation mondiale de la santé

PAEM: Personnes atteintes d'encéphalomyélite myalgique

PC: Prostate Cancer

PEM: post-exertional malaise

PI-PLC: Phosphoinositide phospholipase C

POTS: postural orthostatic tachycardia syndrome

PwME: Persons with myalgic encephalomyelitis

S1P: Sphingosine-1-phosphate

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

SIRT1: Sirtuin 1

SF-36: 36-Item Short Form Survey

SLC6A2: solute carrier family 6 member 2

SMPDL3B: Sphingomyélinase phosphodiesterase acide like 3B

SNA: Système Nerveux Autonome

SNC: Système Nerveux Central

STOP: Syndrome de tachycardie orthostatique posturale

TLR4: Toll Like Receptor 4

TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha

TSP-1: thrombospondine-1

XMRV: Xenotropic murine leukemia virus-related virus

*À mes parents, Chababa et Mamanou!*

*Pour tous les sacrifices faits, les épreuves que vous m'avez aidé à surmonter et l'amour dont  
vous m'avez fait preuve.*



## Remerciements

Un gros merci à mon directeur de recherche, Docteur Alain Moreau, qui m'a inspiré et mis au défi tout au long de mon stage de recherche au baccalauréat, ce qui m'a motivé à entamer des études de cycle supérieur. Vous êtes tout simplement un directeur de recherche hors pair qui est passionné par son travail, ce que j'admire énormément. Merci pour l'aide, l'écoute et l'énergie positive que vous amenez dans notre équipe. Je tiens aussi à vous remercier pour vos encouragements même si les résultats obtenus n'étaient pas parfois ceux attendus (Votre Flemming). Un gros merci aussi à ma codirectrice de recherche, Docteure Marie-Yvonne Akoumé, dont j'admire sa passion pour les sciences. J'ai adoré travailler avec vous les derniers mois, j'ai énormément appris. Vous m'avez poussé à devenir meilleure. Merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire.

Je tiens à remercier certains collègues qui ont marqué ma maîtrise : Atefeh, Amélie, Corinne, Diana, Evguenia et Geneviève. Atefeh, tu as tellement bon cœur et c'est tellement facile de te parler de tout et de rien. J'apprécie nos conversations et j'adore nos pauses thé ! Merci Diana et Amélie d'avoir écouté mes histoires, mes états de panique et de stress durant la dernière année. J'ai adoré nos sorties, ça m'a toujours permis de me détendre. Merci Evguenia pour ton support, tu as toujours été d'une grande aide. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi, tu prends toujours le temps de bien expliquer les choses, ce qui est un grand atout. Corinne, tu es la grande sœur que je n'ai jamais eue. Merci d'avoir toujours été là pour m'aider quand j'en avait besoin, pour m'avoir appris à faire des sushis et pour m'avoir écouté chanter, même si des fois, tu étais à bout de nerfs à cause de mes chansons, je sais qu'au fond tu les aimes bien! Geneviève, tu es le soleil du laboratoire, car tu es toujours rayonnante, souriante et très positive. Tu m'as appris à « manifester », ce que je veux et à devenir une personne plus positive. Merci à ma bonne amie, Covida, tu as toujours été présente pour moi à m'écouter et à m'aider dans les moments difficiles.

Finalement, merci à mes parents à qui je dédie ce mémoire. Ils ont laissé leur vie d'avant, leur pays natal et leur famille pour venir dans un autre pays afin d'avoir et de m'offrir une meilleure vie. J'admire leur détermination, leur persévérance et leur force mentale pour aller de l'avant et à traverser d'innombrables obstacles. Ils m'ont appris à ne jamais baisser les bras et à foncer, peu importe ce que la vie nous réserve.



# Chapitre 1 – Introduction et revue de la littérature

## 1.1. Encéphalomyélite myalgique

L'encéphalomyélite myalgique (EM) est considérée comme l'une des dernières énigmes médicales du 21<sup>e</sup> siècle parmi les maladies chroniques complexes non-résolues. L'EM aussi connue sous le nom de syndrome de fatigue chronique est une maladie multi-systémique présentant une grande hétérogénéité clinique chez les personnes atteintes. Cette maladie affecte environ 0,2 % de la population canadienne ce qui représente environ 600,000 Canadiens (1). De plus, l'importance de cette maladie a été reconnue par le financement par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) d'un réseau de recherche en 2019 (1). Ce réseau national permet non seulement de mieux comprendre la maladie, mais aussi de trouver des cibles thérapeutiques prometteuses. Avec l'enquête menée par Statistique Canada sur la santé des communautés, l'EM semble être très répandue à l'instar de certaines maladies chroniques bien connues, comme l'asthme, le diabète, l'hypertension artérielle, etc. Cette maladie est aussi bien présente aux États-Unis, en affectant de 1 à 2,5 millions de personnes (2, 3). Cette pathologie a une prévalence globale de 0,4% à 2,5% et est en constante augmentation. De plus, certains facteurs comme l'âge et le sexe auraient une influence sur cette maladie (4). L'EM est plus fréquemment observée chez les gens entre 20 à 45 ans et cible trois fois plus les femmes que les hommes (4). Ces personnes atteintes de l'EM (PAEM) ne sont pas en mesure de mener une vie normale et par conséquent, perdent souvent leur emploi de manière permanente. D'autres aspects de leur vie sont également affectés, notamment leur vie amoureuse, familiale, leurs loisirs et leurs interactions sociales. En somme, la qualité de vie de l'individu se détériore suite à cette condition invalidante. Par ce fait même, il y a donc un impact économique majeur pour les individus atteints tout comme pour la société à cause de la grande perte de productivité ainsi qu'à la surutilisation des services de santé. L'étiologie inconnue de cette pathologie ainsi que le manque de biomarqueurs diagnostiques ont mis au défi le monde de la recherche. Normalement, le diagnostic de l'EM est posé après avoir exclu toutes les autres maladies présentant plus ou moins certains symptômes similaires, comme le lupus, la dépression, les problèmes liés à la glande thyroïde, etc. Diagnostiquer l'EM est difficile à cause de l'hétérogénéité des symptômes et prends en moyenne de cinq à huit années ce qui cause une grande errance médicale (5). Cette dernière découle du fait qu'il n'y ait pas de spécialités médicales qui prennent

en charge les PAEM nonobstant que l'EM fait partie des troubles neurologiques selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou des maladies physiques et non psychiatriques selon l'Institut de Médecine (IOM) aux États-Unis.

### **1.1.1. L'étiologie**

Bien que l'étiologie de l'EM soit inconnue, plusieurs études ont été faites sur le développement de cette maladie. En effet, certains facteurs environnementaux comme différents types d'infections virales (EBV, HHV-6, etc.), bactériennes (maladie de Lyme) ou l'exposition à des moisissures et des produits chimiques, comme le mercure peuvent mener au développement de l'EM (6). D'autres études démontrent qu'il existe une composante génétique et épigénétique associée au développement de la maladie (7). En effet, certains chercheurs pensent même que les événements stressants de la vie ou certains traits de personnalité pourraient déclencher les symptômes de l'EM (7).

#### **1.1.1.1. Infections**

Environ 75% des PAEM ont déclaré que le déclenchement de leur maladie découlerait d'une vilaine grippe ou d'une sévère mononucléose dont ils ne se sont jamais remis (8, 9). Plusieurs travaux ont été faits sur les infections de type viral, notamment le virus de l'hépatite C, les entérovirus Cocksackie 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 (9, 10). Avec la pandémie de COVID-19 qui a débuté en janvier 2020, plusieurs individus souffrent de symptômes persistants (COVID longue) qui ressemblent à ceux de l'EM (11). Les recherches suggèrent que les infections de type virale ou bactérienne peuvent déclencher une activation chronique du système immunitaire, ce qui peut mener à l'EM (12).

#### **1.1.1.2. Génétique**

Au niveau génétique, plusieurs travaux ont mis en évidence une prédisposition génétique dans le développement de l'EM (7, 13). En effet, pour mieux comprendre cet aspect, des recherches ont été faites sur des paires de jumeaux et des familles (14). Selon ces recherches, les membres d'une famille d'un patient EM seraient plus prédisposés à développer cette pathologie. En d'autres mots,

le risque de développer cette maladie est plus élevé dans les familles où l'un des membres est souffrant (7, 15). Une étude a été réalisée en utilisant des données sur des jumeaux australiens (15). L'étude explique que la fatigue étant le symptôme majeur de l'EM, celle-ci aurait une plus grande chance de se développer chez des vrais jumeaux identiques, monozygotes, que chez les jumeaux dizygotes, ce qui suggère une influence génétique (15). Il y a également des variations génétiques qui ont été identifiées dans des gènes impliqués dans l'inflammation, le fonctionnement mitochondrial ainsi qu'au niveau de la réponse immunitaire (16, 17).

Des travaux plus récents ont examiné la contribution de l'épigénétique dans la pathogenèse de l'EM, notamment via l'études d'ARN non-codants. Les ARN non-codants se divisent en deux groupes principaux : les longs (~ 200 nucléotides) et les microARN (~22 à 26 nucléotides) et sont impliqués dans plusieurs processus biologiques (18). La dérégulation de l'expression des microARN peut être associée au développement d'un cancer ou à des maladies neurodégénératives (19). De plus, les miARNs régulent l'expression des ARNm post transcriptionnellement en formant un complexe multi-protéique, le complexe RISC, qui est guidé par miARN au 3'UTR du ARNm et empêche la translation du ARNm par la machine ribosomale (20, 21).

### **1.1.2. Critères de diagnostic et symptômes de l'EM**

Cette maladie se caractérise par divers symptômes propres à chaque patient, comme la présence d'une fatigue extrême durant plus de six mois chez l'adulte, des problèmes musculaires, des douleurs aux articulations, des maux de tête, une sensibilisation accrue aux bruits ou à la lumière et d'autres problèmes qui peuvent toucher le système immunitaire ou neuroendocrinien (22). De plus, le malaise après-effort, appelé *post-exertional malaise* en anglais ou PEM, est le symptôme cardinal de l'EM (23). Celui-ci résulte à l'accentuation des symptômes après un effort physique ou mental même minimal qui vont perdurer quelques jours à plusieurs semaines. L'EM peut parfois être accompagnée de comorbidité telle que le syndrome de tachycardie orthostatique posturale (STOP ou *POTS en anglais*), la fibromyalgie et le syndrome d'Ehlers-Danlos (23).

Le CDC établit, en 1994, les critères de Fukuda qui représentent une définition révisée de l'EM (24). Elle est généralement utilisée dans un cadre de recherche clinique par les professionnels (25). Par contre, les critères visent principalement la fatigue prolongée et diminue l'emphase des autres

symptômes qui ont tout autant une importance clinique (26). De plus, la fatigue est auto-déclarée par les patients, ce qui peut être difficile à mesurer ou à évaluer, étant donné que ce symptôme est omniprésent autant dans la population que les patients EM (10). Dans le Journal of Chronic Fatigue Syndrome, le Dr Bruce Carruthers et ses collaborateurs ont publié un article proposant les Critères du Consensus Canadien (CCC) afin de permettre aux médecins de diagnostiquer l'EM (Voir Tableau 1) (27).

## SYMPTÔMES DE L'EM

FATIGUE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La personne est confuse</li> <li>- A de la difficulté à se rappeler de l'information</li> <li>- Fatigue persistance, récurrente et inexplicée</li> </ul>
MALAISE APRÈS EFFORT (POST EXERTIONAL MALAISE, PEM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Perte inappropriée d'endurance physique et mentale,</li> <li>- Période de récupération est pathologiquement lente, généralement de 24 heures ou plus</li> </ul>
PROBLÈMES DU SOMMEIL	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Absence de la phase profonde du sommeil</li> <li>- Insomnie</li> <li>- Variation des niveaux d'énergie</li> </ul>
LA DOULEUR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Douleur pouvant être ressentie dans muscles et/ou articulations</li> <li>- Maux de tête : migraine, pression/tension</li> </ul>
PROBLÈMES NEUROLOGIQUES ET COGNITIFS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficulté de langage</li> <li>- Difficulté à écrire, à lire et à compter</li> <li>- Problème de mémoire à court terme</li> <li>- Perturbations motrices : faiblesse musculaire, contraction involontaire des muscles, perte d'équilibre, perte de dextérité</li> <li>- Difficulté perceptuelle : au niveau du champ visuel, désorientation dans le temps et l'espace, démarche hésitante</li> <li>- Hypersensibilité à la lumière, aux sons, aux vibrations, à la vitesse et aux odeurs</li> </ul>
ANOMALIES DU SYSTÈME NERVEUX AUTONOME	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problèmes de respiration, gastro-intestinaux, urinaires</li> <li>- Palpitations avec/sans arythmie cardiaque</li> <li>- Intolérance orthostatique : STOP, hypotension neurologique, hypotension posturale à retardement</li> </ul>
ANOMALIES NEUROENDOCRINENNES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problème au niveau de la température corporelle : épisode de transpiration, sensation fiévreuse</li> <li>- Changement de poids important (anorexie ou poids anormal)</li> </ul>
ANOMALIES IMMUNITAIRES	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maux de gorge</li> <li>- Malaises semblables à ceux de la grippe</li> </ul>
DURÉE DE LA MALADIE	La maladie doit persister plus de six mois.

**Tableau 1.** – Critères du Consensus Canadien (CCC) tel que décrit par Carruthers *et al.*, 2003.

Bien entendu, il existe d'autres critères qui varient d'une région à l'autre, comme le critère d'Oxford, sorti en 1991, qui englobe deux syndromes, soit celui de la fatigue chronique et post-viral (25). Les critères d'inclusion peuvent donc être très différents d'un pays à l'autre et par conséquent, cela ne vient pas chercher les mêmes patients. En effet, seulement 15 % de 6175 patients étudiés répondant au critère d'Oxford peuvent être conformes aux critères de Fukuda, ce qui rend difficile d'établir la prévalence globale de cette maladie (8).

### **1.1.3. Comorbidités**

Il y a beaucoup de comorbidités chez les PAEM, principalement à cause de l'hétérogénéité de cette population vieillissante. La fibromyalgie (FM) est caractérisée par des symptômes qui chevauchent ceux de l'EM ainsi que d'autres troubles, comme le syndrome du côlon irritable, des allergies diverses, le syndrome de Raynaud, l'hypersensibilité chimique multiple et la dépression réactionnelle, etc. Ces multiples facteurs peuvent non seulement compliquer l'étude sur cette pathologie, mais ralentir le diagnostic de l'EM. De plus, à cause du manque de support de leur entourage, il y a une augmentation des idées suicidaires et des problèmes de dépression chez les PAEM (28). En outre, il y a environ 40% des PAEM qui souffrent également de l'intolérance orthostatique (IO) et du syndrome de tachycardie orthostatique posturale (STOP). Les symptômes connus de l'EM, comme la fatigue, les étourdissements ou la nausée vont s'intensifier lorsque le patient debout souffre d'IO ou de STOP (8, 29).

### **1.1.4. Perturbations de différents systèmes chez les patients EM**

L'EM est une maladie multi-systémique complexe, c'est-à-dire qu'elle peut provoquer de nombreux symptômes pouvant toucher une variété de systèmes pouvant différer d'un patient à l'autre mais aussi dans le temps. Les mécanismes expliquant de telles anomalies ne sont pas encore compris ou caractérisés. Au cours des 30 dernières années, plusieurs études suggèrent que cette pathologie implique des perturbations du système nerveux central (SNC) et du système nerveux autonome (SNA) ainsi que du système immunitaire (30).

#### **1.1.4.1. Système neurologique**

##### **1.1.4.1.1. Présence de neuro-inflammation chez les PAEM**

Quelques études ont été faites sur le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui est un liquide biologique baignant le cerveau. Ce fluide protège non seulement le cerveau de chocs possibles, mais il reflète

également l'état physiopathologique du cerveau, c'est-à-dire s'il y a présence d'inflammation, d'infection (30). Les études entreprises sur le LCR révèlent un niveau accru du nombre de globules blancs ainsi que de l'acide lactique, en comparaison avec des sujets sains et des patients atteints de troubles neurologiques. De plus, ce dernier contiendrait une différence au niveau des microARN et des cytokines, ce qui induirait une réponse neuro-inflammatoire (31, 32). Cette inflammation serait présente au niveau du thalamus et l'amygdale (31).

#### 1.1.4.1.2. **Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien**

Chez les PAEM, il existe plusieurs perturbations des fonctions neuroendocriniennes en lien avec l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) (33). Plusieurs études ont noté un faible niveau de cortisol chez les PAEM au niveau de la salive, du plasma ou de l'urine, ce qui peut amener des problèmes immunitaires, de l'hypotension, une grande fatigue, de l'hypoglycémie, etc., (34). Cette baisse du cortisol chez les PAEM serait associée à la sévérité de la fatigue ou de la douleur (35). Bien que la cause de cette baisse en cortisol demeure inconnue, certains chercheurs suggèrent un problème de signalisation entre le système nerveux central et les glandes surrénales après une période de stress, ce qui est très présent chez les PAEM et ce qui pourrait contribuer à l'exacerbation de leurs symptômes (8, 36).

#### 1.1.4.2. **Système immunitaire**

Plusieurs études faites dans le passé auprès des PAEM ont démontré une perte de fonction des cellules NK, une accentuation des cellules cytotoxiques actives, la présence de divers auto-anticorps et l'augmentation de la production de multiples cytokines pro-inflammatoires (32). À eux seuls, les cytokines pourraient causer des symptômes caractéristiques de l'EM, comme la fatigue, la fièvre, l'arthralgie, la myalgie, l'adénopathie, des troubles de sommeil, des troubles cognitifs et des troubles de l'humeur.

##### 1.1.4.2.1. **Cytokines**

La détection de niveaux anormaux de cytokines a suscité l'intérêt du monde la recherche. Ainsi, l'équipe du Dr Montoya a examiné si ces niveaux anormaux contribuent directement aux symptômes ou bien ceux-ci représentent plutôt un épiphénomène de la maladie (37). En mesurant

la concentration de 51 cytokines dans le plasma chez 192 PAEM et 392 sujets témoins sains appariés pour l'âge et le sexe, ils ont déterminé une corrélation linéaire ascendante statistiquement significative entre la sévérité de la maladie et quelques cytokines. Ceci suggère que les niveaux de cytokines sont, en effet, associés aux symptômes (37). De plus, cette étude a mis en évidence que la quantité de cytokines associés à la gravité de la maladie étaient plus faibles chez les patients moins gravement malades que ceux trouvés chez les sujets sains (37).

Une autre récente étude comprenant 298 PAEM et 348 témoins sains s'est concentré sur les changements associés à la durée de la maladie (38). En comparant les résultats de patients malades à court terme ( $\leq 3$  ans) versus ceux affectés depuis plus longtemps ( $> 3$  ans), la production de 28 cytokines était régulée à la hausse dans le premier groupe de patient ( $\leq 3$  ans) lorsque comparé au second (38). A titre d'exemple, chez les patients plus récemment atteints par l'EM, il y a la présence accrue d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), tandis que chez les patients EM ayant la maladie depuis plus de trois ans, cette cytokine est diminuée (38). Par contre, dans le groupe à long terme, les niveaux de ces 28 cytokines étaient soit normaux ou inférieurs aux valeurs normales mesurées chez les sujets sains (38). Les résultats découlant de cette étude ont conduit ces chercheurs à proposer qu'après plusieurs années d'une maladie inflammatoire, la capacité du système immunitaire à générer des niveaux élevés de certaines cytokines s'épuise. Il existe aussi d'autres cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  qui sont dérégulée chez les PAEM et qui seraient associées à la douleur, un des symptômes de l'EM selon le CCC (39). Bref, plusieurs études montrent une production élevée et dérégulée de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, car le système immunitaire serait constamment activé (40).

#### **1.1.4.2.2. Cellules NK et lymphocytes T et B**

Les globules blancs, notamment les cellules B et T sont essentielles au système immunitaire. Les cellules B contribuent à l'immunité humorale en produisant des anticorps qui permettent de combattre les infections ou autres attaques envers notre organisme, tandis que les cellules T contribuent à l'immunité dite cellulaire notamment les lymphocytes T4 et aident aussi les cellules B à démarrer le système de production d'anticorps (41). Chez les patients EM, les cellules B sont plus nombreuses qu'à la normale (41). De plus, les lymphocytes T8 qui commandent au système

immunitaire d'arrêter se retrouvent souvent déséquilibrées (41). Le débalancement de ces deux types de cellules indique qu'il y a un problème au niveau du bon fonctionnement du système immunitaire. On retrouve donc une diminution des cellules CD8+/CD11b + cellules T suppressives et une augmentation des cellules CD8+/CD11b + cellules T cytotoxiques (41).

Les cellules "*natural killer*" (NK) sont importantes pour la réponse immunitaire innée et adaptative. Elles sont donc la première ligne de défense. Malheureusement, chez les PAEM, on note un débalancement à la hausse ou à la baisse de cellules NK (23). Par conséquent, il est difficile de dire comment ces cellules vont se comporter d'un patient à l'autre.

## **1.2. Intolérance orthostatique et syndrome de tachycardie orthostatique posturale**

Le syndrome de tachycardie orthostatique posturale (STOP) ou *POTS* en anglais est caractérisé par un désordre du système nerveux autonome (42). Le STOP présente également une augmentation rapide et excessive du rythme cardiaque, supérieure à 100 battements par minute (bpm). De plus, l'IO représente un ensemble de troubles cardiovasculaires où il est difficile pour les personnes atteintes de supporter une position verticale (43). En effet, chez ces individus, il y a souvent une concentration sanguine anormalement élevée de norépinephrine, un neurotransmetteur des systèmes nerveux centraux et périphériques (44). Le gène *SLC6A2*, codant pour un transporteur de la norépinephrine appelé NET est déficient dans de rares formes familiales de STOP par des mutations entraînant l'inactivation de la protéine NET (45). En effet, la mutation est Ala457Pro dans l'exon 9 du gène *SLC6A2* induit un mauvais fonctionnement du transporteur NET (46). En temps normal, le transporteur permet d'amener la norépinephrine de la synapse au neurone présynaptique, mais cette mutation empêche la recapture de la norépinephrine, ce qui entraîne une augmentation des taux plasmatiques en norépinephrine (45). Toutefois, cette mutation ou tous autres variants au niveau du gène *SLC6A2* ne sont pas présents chez la grande majorité des individus atteints de STOP (47, 48). Conséquemment, d'autres investigations ont été entreprise notamment par Bayles et ses collègues sur différents polymorphismes et modifications épigénétiques modulant l'expression du transporteur de la norépinephrine. Cependant, ces travaux

n'ont pu mettre en évidence une association entre la diminution de l'expression du transporteur de la norépinephrine avec des polymorphismes ni au niveau de la méthylation du promoteur du gène *SLC6A2*. Ils en ont conclu que ça devait provenir de marques épigénétiques sur la chromatine (H3K27me). C'est pourquoi d'autres chercheurs se sont intéressés au gène *EZH2*, codant pour l'enhancer of zeste homolog 2, une méthyltransférase qui marque la modification de l'histone H3K27me, ce qui pourrait empêcher la mise sous silence de certains gènes régulés par EZH2 dont le gène *SLC6A2* (49).

### **1.3. Rôles de la protéine SMPDL3B dans la pathogenèse de l'EM**

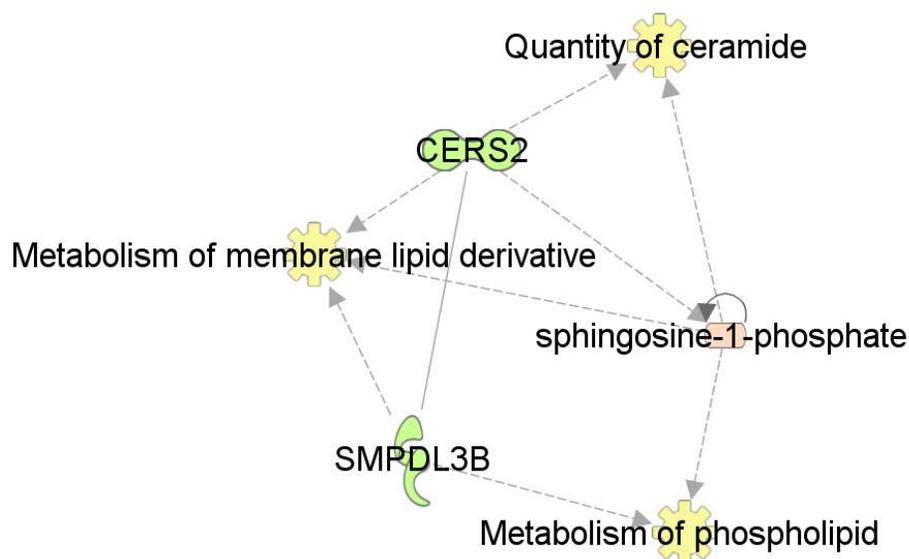
La sphingomyéline acide 3b (SMPDL3B) est impliquée dans plusieurs tissus, organes et systèmes qui sont perturbés chez les PAEM. Les différents rôles et fonctions de la protéine SMPDL3B seront donc résumés dans les sections suivantes.

#### **1.3.1. Implications dans le métabolisme des lipides**

Comme il a été mentionné précédemment, des études métabolomiques ont mis en évidence une diminution du taux de céramides chez les PAEM (50). La protéine SMPDL3B est impliquée dans le métabolisme des lipides notamment au niveau de la conversion des sphingomyélines en céramides. La protéine SMPDL3B possède un groupement GPI (phosphate) ancré à la surface cellulaire. Cet enzyme n'est pas sécrété et la plupart du temps, elle peut être clivée de manière non spécifique de la surface cellulaire à cause de différentes protéases. De ce fait même, un des rôles de la SMPDL3B serait de réguler l'activité de l'acide sphingomyélinase (ASMase) (51). L'ASMase est une hydrolase impliquée dans le métabolisme des sphingolipides. La sphingosine - 1- phosphate (S1P) qui est le produit du métabolisme des sphingolipides peut être dégradée en sphingosine (51). Ce dernier peut générer ensuite des céramides par acylation. Le S1P et les céramides ont des effets biologiques opposés. En effet, les céramides ont des effets pro-apoptotiques, tandis que le S1P stimule la survie cellulaire. De plus des études démontrent l'importance de ces lipides dans la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la migration cellulaire et le vieillissement cellulaire (52). En somme, la protéine SMPDL3B régule la formation de certains lipides métaboliques comme les sphingomyésines ou les céramides qui eux ont pour effet de diminuer le taux plasmatiques de phosphatidylcholine et de sphingomyélines (51). De plus,

les sphingolipides sont des composés structuraux importants des membranes cellulaires (53). Ils sont particulièrement abondants au niveau du cerveau (53). En effet, une réduction de la SMPDL3B ou un défaut quelconque dans la dégradation des sphingolipides augmente la fluidité membranaire et peut être associé à différentes maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer ou le Parkinson (53). Parmi les molécules régulant l'expression du gène SMPDL3B, la protéine SIRT1 semble jouer un rôle important, car celle-ci est responsable de la dégradation des sphingolipides en favorisant la production de la SMPDL3B (53). Ce gène code pour une protéine déacétylase qui est dépendante au NAD<sup>+</sup> et qui est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, dont l'inflammation, le stress, le métabolisme et les fonctions des cellules souches (53). Il est également très important dans le système nerveux central. SIRT1 promeut la transcription du gène *SMPDL3B* par le facteur de transcription c-Myc (53). En outre, dans un récent article sur la protéine SMPDL3B, on apprend que cette protéine peut se lier au céramide-1-phosphate et peut interférer avec le fonctionnement de l'enzyme CERK, une céramide kinase (52). Les céramides peuvent être phosphorylés en céramide-1-phosphate par un céramide kinase (CERK). Les chercheurs ont observé qu'une réduction de l'expression de CERK se produit seulement lorsque le niveau d'expression de la SMPDL3B est réduit aussi. De plus, sachant que la SMPDL3B peut se lier au céramide-1-phosphate, cela indique qu'elle peut déphosphoryler celui-ci en céramide (52). Malheureusement, il est difficile de détecter une élévation de céramides dans les cellules étant donné que ce dernier est toxique à haute concentration. Les cellules vont donc essayer de neutraliser les céramides en les transformant en d'autres produits, comme les sphingolipides (52, 54). Vu le rôle de la SMPDL3B dans la conversion du céramide-1-phosphate en céramide, il se peut qu'il soit impliqué également dans la conversion du sphingosine en sphingosine-1-phosphate. En effet, la diminution de la sphingolipide-1-phosphate dans l'hippocampe ainsi que le lobe temporal serait un biomarqueur de la maladie d'Alzheimer (55). L'hippocampe est la région du cerveau qui s'occupe de la mémorisation ainsi que de la navigation spatiale (55). Ce lipide permet la prolifération cellulaire donc sa diminution provoque un comportement opposé qu'on appelle pro-apoptotique (52). De plus, chez les PAEM, la diminution de cette connexion entre l'hippocampe et le néocortex est présente, car certains patients se plaignent de problèmes de mémorisation et de concentration (33). Si la diminution de la sphingosine-1-phosphate est reliée à la perte de mémoire, il est possible que cela implique un dysfonctionnement de la protéine SMPDL3B. En effet, une analyse d'interaction effectuée avec logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) démontre qu'il y a une

interaction protéine-protéine entre SMPDL3B et le facteur de transcription CERS2 qui régule les niveaux de sphingosine-1-phosphate (Figure 1).



© 2000-2022 QIAGEN. All rights reserved.

Figure 1. – **Interaction indirecte de SMPDL3B et la sphingosine-1-phosphate et analyse des voies de molécules d'intérêt à l'aide de l'Ingenuity Pathway Analysis (IPA).**

Les protéines d'intérêt sont identifiées en vert et les fonctions sont associées en jaune.

### 1.3.2. Rôle de la protéine SMPDL3B au niveau de l'immunité innée

La protéine SMPDL3B se retrouve à la surface de différentes cellules comme les macrophages ou les cellules dendritiques (56). Selon la littérature, cet enzyme régulerait de manière négative le récepteur de « Toll Like Receptor 4 ou TLR4 » (56). La stimulation de ces récepteurs, capteurs de pathogènes, conduit à une réponse inflammatoire menant à différentes fonctions cellulaires, comme la présentation de l'antigène, la sécrétion de cytokines ou la migration cellulaire (Fig. 2a). En absence de la protéine SMPDL3B, la stimulation des récepteurs TLR activerait différentes signalisations qui permettrait d'augmenter le niveau de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, TNF ou IL-12 qui participent à la réponse inflammatoire (Fig. 2b) (56).

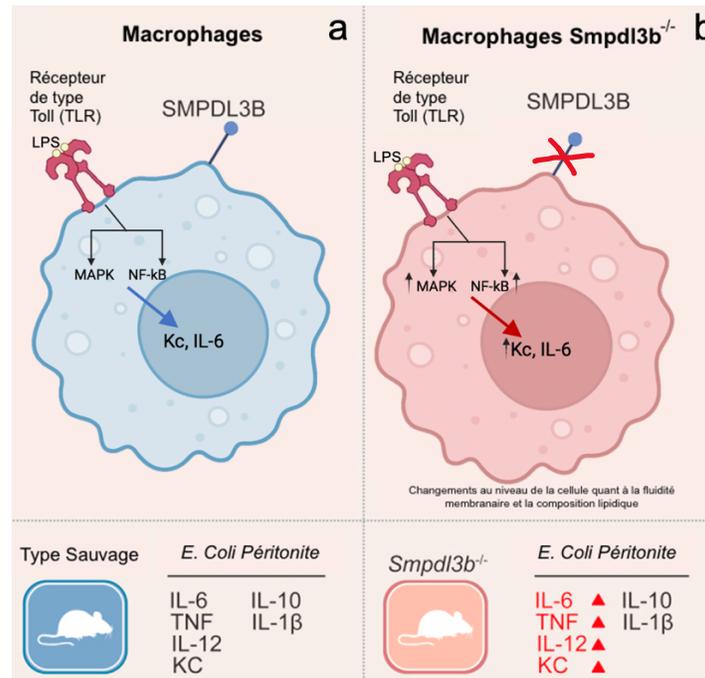


Figure 2. – Schéma représentant les conséquences de la présence et de l'absence de SMPDL3B.

La stimulation des récepteurs de TLR provoque la production de cytokines tels que IL-6, TNF, IL-12, etc. (a). Avec l'absence de SMPDL3B, la stimulation de ces mêmes récepteurs provoque l'augmentation de ces cytokines (b). Figure adaptée de Heinz *et al*(56).

De plus, un changement a lieu au niveau de la fluidité membranaire affectant la morphologie cellulaire et l'expression de certains gènes (56). Ceci a été démontré par le Dr Leonhard et son équipe sur des souris déficientes en SMPDL3B et sur les cellules HEK 293T (56). En outre, une autre découverte a été faite sur la protéine SMPDL3B en étudiant la thrombospondine-1 (TSP-1) dérivée des macrophages dans la maladie du foie gras non-alcoolique ou en anglais non-alcoholic fatty acid liver disease (NAFLD) (57). La NAFLD est une maladie progressive caractérisée par une mauvaise régulation du métabolisme des lipides et donc d'une inflammation accrue aboutissant souvent à une fibrose (57). De plus, l'expression accrue du gène *THBS1* codant pour la TPS-1 a été rapportée dans diverses maladies du foie (57). Cette glycoprotéine régule de nombreuses voies cellulaires, comme l'inflammation, l'adhésion cellulaire, etc. En analysant des séquences d'ARN dans le foie d'une souris dépourvu de TSP-1, les chercheurs ont observé une augmentation de l'expression d'environ 367 gènes, dont le gène *SMPDL3B* (58). Cette augmentation de l'expression

du gène *SMPDL3B* est associée à une diminution de la protéine TSP-1 et des cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ) (58). Cette dernière expérience confirme non seulement la théorie du Dr Leonhard et son équipe sur le lien entre la protéine SMPDL3B et l'immunité innée, mais démontre un lien possible entre les protéines TSP-1 et SMPDL3B. En somme, l'augmentation de la protéine TSP-1 chez les individus ayant la NAFLD provoque une diminution de la protéine SMPDL3B et donc une augmentation des cytokines pro-inflammatoires.

Comme cela a été mentionné ci-haut, le système immunitaire est perturbé dans la pathogenèse de l'EM. (40, 59). L'immunité innée a fortement suscité l'intérêt des chercheurs étant donné que ce système représente la première défense du corps humain contre diverses infections. De plus, dans une récente étude, il a été noté que chez les PAEM, il y a une augmentation de l'expression de TLR-4 (60). En effet, l'activation de ce dernier peut augmenter les niveaux de transcription du gène NF- $\kappa$ B, un régulateur clé de l'inflammation, ou la production de cytokines pro-inflammatoires (interleukin-1, TNF- $\alpha$ ) (60). Dans la plupart des cas, l'augmentation de cytokines est due à une pénétration ou une prolifération d'un corps étranger dans l'organisme (61, 62). Ces cytokines sont impliquées dans le processus de l'inflammation provoquant des symptômes pouvant être présents chez un patient EM, comme la fièvre, des douleurs musculaires et la fatigue (62). Bref, vu que la diminution de la protéine SMPDL3B provoque une augmentation de certaines cytokines, ce biomarqueur devrait être grandement diminué aux niveaux des surfaces cellulaires des PAEM.

### **1.3.3. Contribution au niveau du système rénal**

La protéine SMPDL3B se retrouve au niveau des reins notamment au niveau des podocytes où elle joue un rôle important pour le bon fonctionnement des reins. Les podocytes sont des cellules épithéliales composant la capsule de Bowman au niveau du glomérule rénal. La protéine SMPDL3B est diminuée chez les patients atteints par la Sclérose Glomérulaire Segmentaire Focale (FSGS) et augmentée chez les patients ayant la Néphropathie Diabétique (DKD) (63, 64). En utilisant également différentes approches thérapeutiques, les scientifiques ont vu une nette amélioration de l'état des patients atteints par l'une ou l'autre de ces maladies. En effet, le Rituximab, un anticorps monoclonal, peut reconnaître la protéine SMPDL3B et se lier à celle-ci en la gardant bien ancrée à la membrane. Par conséquent, le Rituximab utilisé dans le traitement de la

FSGS permet d'améliorer la fonction du glomérule (65). Tout comme la FSGS, la DKD affecte le fonctionnement des reins dû à l'élévation du taux de sucre dans le sang. En effet, il a été proposé que la protéine SMPDL3B participe dans la régulation de la signalisation du récepteur d'insuline dans les podocytes via le céramide-1-phosphate (66). Nous pouvons en conclure que la protéine SMPDL3B joue un rôle primordial dans la survie des podocytes et donc dans le bon fonctionnement des reins. En effet, un des symptômes du système autonome des gens souffrant de l'EM est un dysfonctionnement de la vessie. Sachant ce symptôme et le rôle de cette protéine dans les podocytes, l'investigation de la SMPDL3B devient d'autant plus intéressante.

#### **1.3.4. Mécanisme d'ancrage via un lien GPI et son clivage protéolytique**

La protéine SMPDL3B est ancrée à la surface de la membrane des cellules par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). La phospholipase D spécifique du phosphatidylinositol-glycane (GPLD1) est une enzyme connue pour cliver différents types de protéines membranaires au niveau de leur groupement GPI (67). Cette enzyme est abondante dans le sérum et possède deux domaines fonctionnels. La protéine GPLD1 clive le lien GPI dans plusieurs processus cellulaires, notamment lors de l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Il y a aussi le phosphoinositide phospholipase C (PI-PLC) qui est une enzyme intracellulaire pouvant également agir sur des groupements GPI. À ce jour, le ou les mécanismes impliqués dans le clivage de la protéine SMPDL3B liée à la membrane demeurent inconnus. Selon des études faites sur la biosynthèse du groupement GPI, on explique que lorsque la protéine est ancrée à la membrane avec le groupement GPI, l'inositol est déacétylé (68). Dans un autre article, on mentionne que le GPLD1 hydrolyse les GPI lorsque l'inositol est acétylé contrairement au PI-PLC (67). En examinant de plus près l'acétylation ou non du lien GPI ancrant la protéine SMPDL3B, il sera possible d'identifier avec plus de certitudes les GPIases impliquées dans ce processus.

Outre la protéine SMPDL3B, il est à noter qu'il existe d'autres protéines ancrées par un groupe GPI. Par exemple, la protéine RECK (Reversion Inducing Cysteine Rich Protein With Kazal Motifs) est une protéine extracellulaire ancrée par un lien GPI et qui agit comme inhibiteur de plusieurs métallo-protéases (67). La glycérophosphodiester phosphodiesterase 2 (GDE2) est une autre enzyme appartenant à la famille des GDPiase (67). Cette dernière induit la différenciation des motoneurones spinaux en inhibant la signalisation Notch (69). Cette famille d'enzyme métabolise

les glycérophosphodiester en glycérol-3-phosphate et en alcools (69). Selon la littérature, GDE2 inhibe la signalisation Notch par un mécanisme complètement différent que les GDPases classiques. Il clive les groupes glycosylphosphatidylinositol (GPI) (69). De plus, le gène *RECK* a été identifié par association pangénomique (association qui identifie les variations génétiques chez les sujets atteints de l'EM), comme présentant un variant le plus significativement associé avec l'EM (70).

### **1.3.5. Cible thérapeutique possible pour l'EM impliquant la protéine SMPDL3B**

Comme les symptômes associés à l'EM varient au cours du temps chez un individu mais aussi entre les individus, cela ajoute à la complexité de définir les meilleures stratégies thérapeutiques possibles. A titre d'exemple, quelques patients atteints d'EM ont vu une amélioration de leurs symptômes suite au traitement d'un lymphome hodgkinien qui a été traité par chimiothérapie et l'utilisation du Rituximab (71). Ce type de lymphome apparaît particulièrement dans un groupe de ganglions lymphatiques, le plus souvent au niveau du thorax, du cou et des aisselles. Ce cancer prend naissance dans les lymphocytes B immatures. Après la combinaison d'un traitement de chimiothérapie et de Rituximab pour traiter leur lymphome, les PAEM ont rapporté une diminution significative de leurs symptômes associés à l'EM (71). On s'est donc intéressé de plus en plus au Rituximab comme outil thérapeutique potentiel pour l'EM. Le Rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CD20 présent à la surface des lymphocytes B immatures et son action inhibe la production des lymphocytes B (72). Le récepteur CD20 est responsable de la différenciation et de la maturation des lymphocytes B (72). L'utilisation de ce médicament entraîne la déplétion de tous les lymphocytes B (sauf ceux qui sont déjà matures, car ils sont dépourvus de récepteurs CD20) (72). Le Rituximab est connu pour agir sur les podocytes (63). Les podocytes sont des cellules épithéliales composant la capsule de Bowman au niveau du glomérule rénal. Des études ont démontré que le Rituximab peut se lier à la protéine SMPDL3B (63). C'est pour cela qu'on cherche à la stabiliser dans certaines maladies rénales via un traitement avec le Rituximab, comme dans le cas de la FSGS (65).

Dans une récente étude faite par nos collaborateurs norvégiens, l'équipe du Dr Fluge a entrepris plusieurs essais cliniques de phase 2 qui ont indiqué une amélioration des symptômes chez les PAEM traités, possiblement en lien avec la déplétion des lymphocytes B (selon leur hypothèse)

(73). C'est pourquoi plusieurs chercheurs ont suggéré que l'EM serait peut-être une maladie auto-immune d'où l'intérêt d'éliminer les lymphocyte B afin de réduire ces auto-anticorps. Par contre, lors de l'essai de phase 3 (essai randomisé en double aveugle) ce dernier s'est soldé par un retentissant échec puisque le taux d'amélioration des symptômes était légèrement supérieur dans le groupe traité avec le placebo versus le groupe traité avec le Rituximab (73).

## **1.4. Hypothèses et objectifs de recherche**

### **1.4.1. Problématique**

L'EM est une maladie chronique complexe multi-systémique et hautement invalidante. Elle touche des individus de toutes races, de tous âges, et de tous les groupes socioéconomiques. Plusieurs organes et systèmes sont perturbés entraînant plusieurs conséquences physiopathologiques. Cette maladie affecte la vie de la personne atteinte sur le plan professionnel, social et familial. Encore à ce jour, il n'y a pas de traitement ou de cure pouvant guérir l'EM. Cependant, il existe des médicaments pour atténuer la sévérité de certains symptômes. Non seulement il n'y a pas de traitements curatifs, mais il n'y a pas de tests diagnostiques pour l'EM. Les cliniciens procèdent par exclusion en tentant d'éliminer les maladies pouvant expliquer certains symptômes. Ce processus crée souvent une errance médicale et des délais allant de cinq à huit années pour arriver possiblement à un diagnostic d'EM.

Tel que mentionné précédemment, il est très difficile de comprendre l'étiologie exacte de cette maladie à cause de l'hétérogénéité des symptômes. Cependant, chez certains PAEM, l'EM a débuté à la suite d'une maladie « de type infectieux ». Au cours du temps, les symptômes vont varier tant au niveau de leur fréquence qu'au niveau de leur intensité et chez 25% des PAEM la sévérité des symptômes les obligent à demeurer dans leur domicile voir même à être alité 24/7 dans un lit.

Il y a beaucoup de recherches qui ont été faites afin de trouver un ou plusieurs biomarqueurs spécifiques à cette maladie. Nous savons que certains composants sont surexprimés ou sous exprimés, mais le mécanisme derrière ces changements demeure inconnu. Nous nous sommes intéressés à la protéine SMPDL3B non seulement pour son implication dans le système immunitaire mais aussi pour son rôle dans le métabolisme des lipides.

### 1.4.2. Hypothèses et objectifs

Notre hypothèse centrale c'est que la protéine SMPDL3B joue un rôle important dans la physiopathologie de l'EM. Nous proposons qu'une diminution de l'activité de la sphingomyélinase acide 3B (SMPDL3B) à la surface des cellules de même que l'accumulation de sa forme clivée survenant chez certains PAEM pourraient affecter le bon fonctionnement du système immunitaire et du système cardiovasculaire via différents mécanismes. La Figure 3 illustre mon hypothèse.

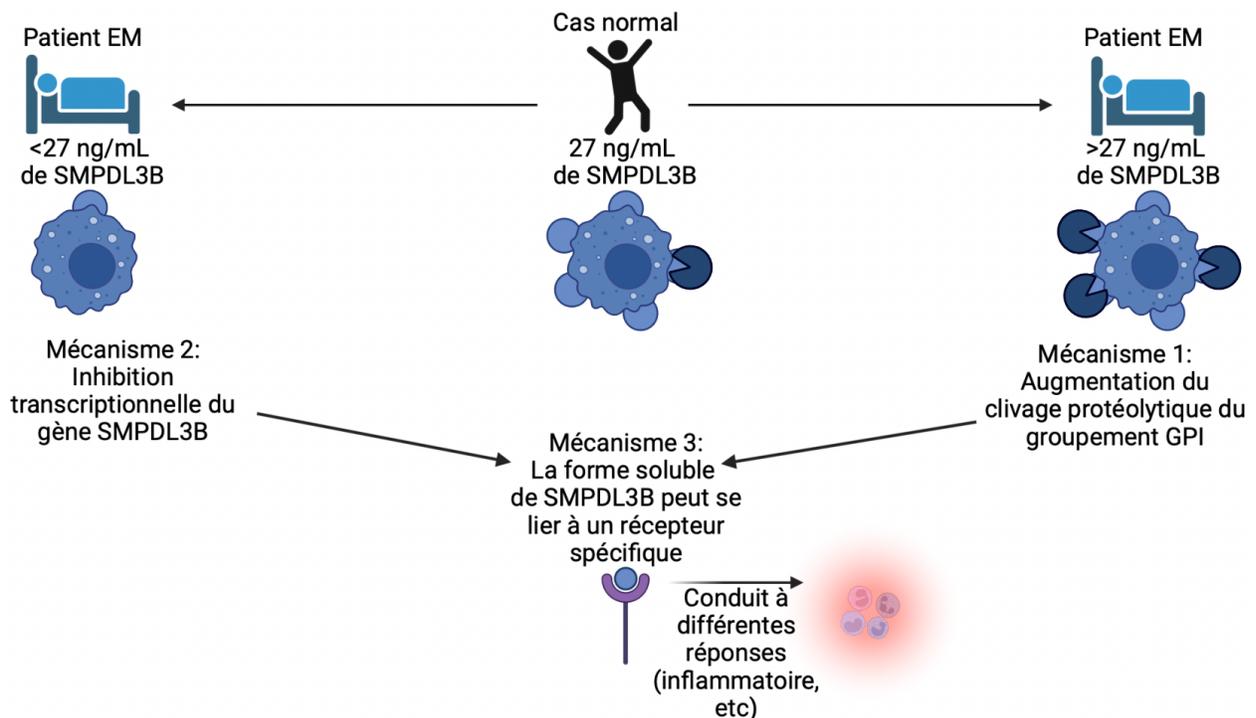


Figure 3. – **Trois profils chez les PAEM.**

Mécanisme 1: Certains PAEM ont des niveaux de SMPDL3B supérieur à 27ng/mL, ce qui peut être causé par un clivage accru de la protéine par divers GPIase, comme le PI-PLC. Mécanisme 2: Certains PAEM ont des niveaux inférieurs à 27ng/mL, ce qui peut être causé par une inhibition transcriptionnelle. Mécanisme 3: La forme relâchée de la protéine, c'est-à-dire la forme soluble peut interagir avec mes récepteurs, comme le CCR3, ce qui stimule la voie de l'inflammation.

## **OBJECTIFS ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES**

L'objectif principal de mon projet de maîtrise c'est de comprendre la contribution de la protéine SMPDL3B au niveau de sa forme membranaire et clivée dans la pathogenèse de l'EM. Pour ce faire, différentes approches complémentaires ont été mise en place.

**Objectif 1:** Détermination des niveaux plasmatiques de la protéine SMPDL3B clivée chez les PAEM, les sujets sains appariées en âge et en sexe. En outre, des analyses d'association entre les niveaux circulants de protéine SMPDL3B et certains symptômes et/ou leur sévérité ont été réalisées afin de déterminer de possibles cofacteurs comme le sexe biologique, la durée de la maladie et l'âge des participants, présence de comorbidités et certaines médications sur la variation des niveaux plasmatiques en protéines SMPDL3B et la sévérité des symptômes.

**Objectif 2:** Caractérisation fonctionnelle de la protéine SMPDL3B membranaire et sa forme soluble. On suppose que la forme active de cette protéine se retrouve à la surface cellulaire étant donné ses multiples rôles, comme la maintenance du cytosquelette des podocytes. Dans le cadre de cette maîtrise, je me suis particulièrement intéressée à comprendre le rôle de la forme soluble/clivée de la protéine SMPDL3B dans la pathogenèse de l'EM.





## Chapitre 2 – Manuscrit

### Role of soluble acid sphingomyelin phosphodiesterase 3B in the pathophysiology of myalgic encephalomyelitis

Les résultats obtenus dans le cadre de mon projet de maîtrise sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui sera soumis au journal Scientific Report.

#### Contribution des auteurs

**Bitá Rostami** a réalisé toutes les expériences biochimiques et la majorité des analyses statistiques et a rédigé et révisé le manuscrit

**Dre Marie-Yvonne Akoume** a contribué à la coordination finale du projet, à l'analyse des résultats et à la correction/rédaction du manuscrit

**Evguenia Nepotchatykh** a contribué aux analyses IPA et à la correction/rédaction du manuscrit.

**Anita Franco** a contribué à la coordination initiale du projet et partiellement à la correction/rédaction du manuscrit.

**Dr Iurie Caraus** a contribué partiellement aux analyses statistiques

**Dre Wesam Elremaly** a contribué partiellement aux analyses statistiques et partiellement à la correction/rédaction partielle du 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.

**Dr Olav Mella** a fourni les échantillons sanguins de la cohorte norvégienne.

**Dr Øystein Fluge** a fourni les échantillons et informations concernant la cohorte norvégienne.

**Dr Alain Moreau** chercheur principal de l'étude et responsable de son financement, a contribué à la coordination du projet, à l'analyses de l'ensemble des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Tous les coauteurs ont pris connaissance du manuscrit et ont contribué à sa révision.

# **Role of soluble acid sphingomyelin phosphodiesterase 3B in the pathophysiology of myalgic encephalomyelitis**

Bitá Rostami-Afshari<sup>1,2,6,7</sup>, Marie-Yvonne Akoume<sup>1,3,4,7</sup>, Evguenia Nepotchatykh<sup>1,3,6,7</sup>, Anita Franco<sup>1,6,7</sup>, Iurie Caraus<sup>1,6,7</sup>, Christian Godbout<sup>8</sup>, Wesam Elremaly<sup>1,6,7</sup>, Olav Mella<sup>10</sup>, Øystein Fluge<sup>10</sup> and Alain Moreau<sup>1,2,6,7,9,\*</sup>

<sup>1</sup>Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada;

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada;

<sup>3</sup>IRBK, Université Internationale de Libreville, Gabon;

<sup>4</sup>Department of Cellular and Molecular Biology and Genetics, Université des Sciences de la Santé de Libreville, Gabon;

<sup>5</sup>Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada;

<sup>6</sup>Open Medicine Foundation ME/CFS Collaborative Center at CHU Sainte-Justine/Université de Montréal, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada;

<sup>7</sup>ICanCME Research Network, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada;

<sup>8</sup>Patient-partner, ICanCME Research Network, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada;

<sup>9</sup>Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada;

<sup>10</sup>Department of Oncology and Medical Physics at the University of Bergen, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway.

\*Corresponding Author: Alain Moreau, Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Office 2.17.027, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Cote-Ste-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada. Tel.: 514-345-4931 ext 5722,

[alain.moreau.hsj@ssss.gouv.qc.ca](mailto:alain.moreau.hsj@ssss.gouv.qc.ca)

**Keywords:** Myalgic Encephalomyelitis (ME), sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL3b), Glycophosphatidylinositol (GPI), C-C chemokine receptor type 3 (CCR3), C-C motif chemokine 11 (CCL11) and Postural orthostatic tachycardia syndrome (POTS).

## ABSTRACT

Myalgic encephalomyelitis (ME), also known as chronic fatigue syndrome (CFS), is a complex disorder with symptoms including extreme fatigue, post-exertional malaise, orthostatic intolerance, and sleep disturbances. ME is also characterized by alterations in the immune system and disturbances in energy metabolism that affect lipid metabolism. Sphingomyelin acid phosphodiesterase 3B (SMPDL3B), is a multifunctional protein anchored by a glycophosphatidylinositol at the cell membrane, with a role in the regulation of innate immunity. We propose that the elevation of circulating cellular levels of SMPDL3B increases the severity of several symptoms related to ME via different mechanisms.

Two independent cohorts were studied: A Canadian cohort including 147 ME patients and 62 age- and sex-matched controls; and a replication Norwegian ME cohort (n=141). Plasma samples were collected and the circulatory levels of SMPDL3B were measured by ELISA method. The analysis of these two independent cohorts revealed a significant association between SMPDL3B and the severity of ME symptoms. Higher plasma levels of SMPDL3B were observed in ME patients with orthostatic intolerance (OI) compared to ME patients without vascular abnormalities. The potential action mechanism of SMPDL3B was examined by cellular dielectric spectroscopy (CDS), and results revealed that increased levels of SMPDL3B were associated with ME severity and certain comorbidities. As measured by impedance changes, Jurkat cells exhibited increased cellular response following treatment with recombinant SMDL3B. This effect was inhibited by a C-C chemokine receptor type 3 (CCR3) specific antagonist.

Immunoprecipitation analysis revealed a direct interaction between SMPDL3B and CCR3. Collectively, our findings led to the identification of SMPDL3B as a potential prognostic indicator and therapeutic target for ME.

## INTRODUCTION

Myalgic encephalomyelitis (ME), also known as chronic fatigue syndrome (CFS), is a complex multi-systemic disease whose etiology remains unknown. It has a global prevalence of 0,4% to 2,5%, which is constantly increasing <sup>1</sup>. According to Statistics Canada, this disease affects approximately 600,000 Canadians <sup>2</sup>. ME is characterized by unexplained severe fatigue lasting for more than six months that is not alleviated by rest, is associated with post-exertional malaise, sleep disturbances, perturbations of energy metabolism, immune system dysfunctions and other symptoms <sup>3</sup>. This disease is also very heterogeneous and presents itself with various comorbidities such as vascular instabilities which include postural orthostatic intolerance (POTS) or orthostatic intolerance (OI) <sup>4</sup>. To date, there is no official laboratory test for diagnosing ME or any known specific biomarkers due to the limited understanding of its pathophysiology. Indeed, several environmental factors such as viral infections (e.g., EBV, SARS-CoV-2), bacterial infections (e.g., Lyme disease) or chemical exposure (e.g., mercury and other heavy metal exposure) can lead to the onset of ME <sup>5</sup>. Previous studies reported immunologic abnormalities affecting ME patients, like an increase of cytotoxic T cells, an altered function of natural killer cells or an increase of various pro-inflammatory cytokines <sup>6</sup>.

One of the important proteins that is involved in the immune system and implicated in the up-regulation of several pro-inflammatory cytokines is sphingomyelin acid 3B (SMPDL3B) <sup>7</sup>. The SMPDL3B protein is found anchored on the surface of various cells, such as macrophages and dendritic cells <sup>8</sup>. This enzyme is not secreted but can be cleaved from the cell surface by different proteases in unspecific manners <sup>7</sup>.

SMPDL3B is also involved in lipid metabolism <sup>9</sup>. One of the roles of SMPDL3B is to regulate the activity of acid sphingomyelinase (ASMase) <sup>9</sup>. ASMase is a hydrolase that is involved in sphingolipid metabolism <sup>9</sup>. Sphingosine-1-phosphate (S1P), is the product of sphingolipid metabolism and can be degraded into sphingosine <sup>9</sup>, which can generate ceramides by acylation <sup>9</sup>. S1P and ceramides have opposite biological effects. Indeed, ceramides have pro-apoptotic effects, while S1P promotes cell survival <sup>9</sup>. In short, the SMPDL3B protein regulates the formation of specific metabolic lipids, such as sphingomyelin or ceramides, which reduce the level of phosphatidylcholine and sphingomyelin <sup>9</sup>. In the plasma samples obtained from ME patients, the level of ceramides was found to be reduced by 50% in men and 86% in women <sup>10</sup>.

It has been suggested that SMPDL3B negatively regulates the TLR4 receptor (Toll- Like Receptor 4)<sup>7</sup>. Stimulating these receptors triggers an inflammatory response leading to different cellular functions, such as antigen presentation, cytokine secretion or cell migration<sup>7</sup>. Studies have shown that with the absence of SMPDL3B, changes in membrane fluidity (cellular morphology) occur, and the stimulation of TLR receptors activate different signals that increase the level of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , or IL-12, which participate in the inflammatory response<sup>7</sup>.

SMPDL3B has been chosen in this study since it has a role in the immune system and the metabolism of lipids, which are both altered in ME patients. Here, we have measured plasma SMPDL3B levels in ME pathophysiology in two different populations and its association to symptom severity. Furthermore, we investigated the possible function of soluble SMPDL3B in regard to the inflammatory system.

Collectively, these findings establish the fundamental importance of SMPDL3B in the immune system and prompt us to explore its functional status and involvement in the comorbidities in ME patients to test the hypothesis that this protein may play a role in ME.

## **RESULTS**

### **Study populations**

The clinical and demographic characteristics of the Canadian and Norwegian cohorts studied are detailed in Table 1. The experimental study design is represented in Figure 1. One hundred forty-seven Canadian and one hundred forty-one Norwegian patients with ME were enrolled and matched by age and sex. From the one hundred forty-seven Canadian participants, nineteen presented with symptoms of OI in addition to ME. The Canadian cohort was used as a discovery cohort, while the Norwegian cohort was used as an independent replication cohort. A sedentary control group (n=62) was enrolled in the Canadian cohort. No significant difference in BMI between the three groups was observed or significant difference in illness duration between the two ME cohorts. More women than men were enrolled in both cohorts (83% in the Canadian cohort and 84% in the Norwegian cohort), concordant with the higher prevalence of ME in women.

However, a significant difference in age between both ME groups was observed, with the Canadian cohort being older ( $P < 0.0001$ , supplementary Figure S1).

## **ELEVATION OF CIRCULATING SMPDL3B PROTEIN LEVELS IS ASSOCIATED WITH SYMPTOMS SEVERITY**

### **Canadian cohort**

Knowing the heterogeneity of ME population and the observed variations in SMPDL3B levels, a threshold of 27ng/mL in SMPDL3B concentration was determined using the R programming language, and was used to separate the patients into two significantly different groups according to their plasma SMPDL3B levels. The impact of this stratification on the health-reported questionnaires SF-36, MFI-20 and DSQ scores was assessed. It was found that the ME group with higher levels of circulating SMPDL3B had higher physical disturbances (Fig. 2a), worse general fatigue (Fig. 2b), higher physical fatigue (Fig. 2c), decreased activity (Fig. 2d) and worse post-exertional malaise (Fig. 2e) ( $P < 0.05$ ) compared to the ME group having lower levels of circulating SMPDL3B. It should be noted that scores related to the questionnaires do not have the same values. Therefore, having a low score in SF-36 and high score in MFI-20 and DSQ are associated to a more pronounced disruption of ME symptoms in general. Those results indicate that plasma SMPDL3B is associated with more severe ME symptoms.

### **Independent replication Norwegian Cohort**

The disease severity for the Norwegian cohort was based on an overall clinical assessment by treating clinicians, which included many standardized and trial specific questionnaires. ME patients were classified into five groups having mild, mild/moderate, moderate, moderate/severe, and severe symptoms. The levels of plasma SMPDL3B were found to be higher in severe ME group compared to mild and mild/moderate groups (Fig. 2f) ( $P < 0.05$ ).

## **SMPDL3B LEVELS AND THE COMORBIDITY OF ME WITH OI**

Some of the participants in the Canadian cohort have reported having comorbid condition of OI in addition to ME ( $n=19$ ). When the plasma levels of SMPDL3B are compared between ME patients without OI and ME patients with OI (ME+OI) we observe a significantly higher level of SMPDL3B

in ME+OI compared to ME (Fig. 2g) ( $P<0.05$ ). In addition, ME+OI group reported having significantly more physical fatigue on MFI-20 standardized questionnaire compared to the ME group ( $P<0.05$ ).

### **INFLUENCE OF COVARIATES ON PLASMA SMPDL3B LEVELS**

Higher levels of circulating SMPDL3B protein were found in Canadian women compared to men (Fig. 3a) however, there was no significant differences in SMBDL3B levels between Norwegian women and men. In addition, in the Norwegian cohort, the concentration of SMPDL3B was higher in patients between 18 and 30 years old and decreases with age (Fig. 3b). This trend was partially observed in the Canadian cohort given that there are very few patients between the ages of 18 and 30 years old (Fig. 3c, and Supplementary Figure S1).

### **INFLUENCE OF ESTROGENS AND CONTRACEPTIVE PILLS MEDICATION ON CIRCULATING SMPDL3B LEVELS**

Among other compounds that can influence the level of SMPDL3B in the human body, estrogens (E2) were considered given the higher prevalence of ME in women. Higher soluble SMPDL3B levels were found in younger women (age 18 to 34 years) than older women (over 50 years) (Fig. 4a). Additionally, levels of circulating SMPDL3B were higher in ME women being treated with anovulants in both cohorts (Fig. 4b-c). In contrast, soluble SMPDL3B levels declined in menopausal women. To explore the impact of estrogens on the circulating SMPDL3B levels and confirm this observation, Jurkat cells were treated with estradiol, and western blots were performed with cell culture media. A greater amount of soluble SMPDL3B protein was observed in the cell culture media with estradiol-treated cells (Fig. 4d).

## **INVESTIGATION OF THE SOLUBLE FORM OF SMPDL3B THROUGH CCR3 AND CCL11 INTERACTIONS**

### **Physical interaction between CCR3 and SMPDL3B**

Since the SMPDL3B protein is considered active when anchored to the cell membrane, we further investigated the role of soluble SMPDL3B protein in ME pathogenesis, given its association with the symptom severity. To establish whether the soluble form interacts with a receptor, a search was performed using the BioGRID platform<sup>11</sup>. Of all the possible interactions identified with SMPDL3B, only one membrane receptor seemed to be involved in the immune system, namely the 3 C-C chemokine receptor (CCR3).

To first determine if this interaction is direct or indirect, we used Eotaxin-1, also called CCL11, which is a high-affinity agonist ligand of the CCR3 receptor. According to another study on cytokines in ME, CCL11 levels correlate positively with the severity of the disease<sup>12</sup>. In addition, CCL11 biological relevance in the context of ME is supported by the fact that this cytokine is involved in tissue inflammation and diseases like asthma and rhinitis<sup>13</sup>.

To confirm the interaction between SMPDL3B and CCR3, we used Jurkat cells, which express CCR3 at their surface<sup>14</sup>. These cells were either stimulated by CCL11 or recombinant SMPDL3B protein without GST tag. Jurkat cells are immortalized T lymphocyte cells that express SMPDL3B, and CCR3. Two conditions for SMPDL3B were tested with the addition of a cross-linker to consolidate the interaction. For the first condition T0, recombinant SMPDL3B protein was added simultaneously with a cross-linker. For the second condition T15, the cross-linker was added 15 minutes after the addition of recombinant SMPDL3B protein. Immunoprecipitation was then performed with CCR3 in each condition. Results illustrated in Figure 5, show the presence of CCL11 in the CCR3 precipitates with greater intensity at T0 compared to T15, while the intensity of CCR3 bands was similar between both time points. A similar profile was observed with SMPDL3B. These results are indicative of a direct interaction between SMDPL3B protein and CCR3.

## **Nature of the interaction between CCR3 and SMPDL3B**

The physical interaction between CCR3 and recombinant SMPDL3B protein is of interest to understand the molecular role of SMPDL3B, and the nature of this interaction to determine if it acts as an agonist or an antagonist with CCR3. To determine if SMPDL3 acts as an antagonist, Jurkat cells were treated with SMPDL3B prior to stimulation with CCL11. If SMPDL3B acts as an antagonist, we would expect to observe reduced impedance in response to CCL11 in presence of SMPDL3B. Results illustrated in Figure 6a show increased cellular response to CCL11 stimulation in presence of recombinant SMPDL3B treatment compared to vehicle, suggesting that SMPDL3B acts rather as an agonist and not as an antagonist. If SMPDL3B was an antagonist, the recombinant SMPDL3B protein would have blocked CCR3 receptor. Then, no cellular response would have been detected or measured by CDS. To confirm that SMPDL3B is an agonist of CCR3, we examined the effect of the CCR3 specific antagonist, SB-328437, on integrated response to SMPDL3B or CCL11. As expected, SB-328437 caused a decrease in integrated response to SMPDL3B, in a concentration-dependent manner. Similar responses were observed when CCL11 competed with SB-328437 (Fig. 6b). However, SMPDL3B exhibited a right-shift in its concentration-response curve, suggesting that SB-328437 is more effective in competing with SMPDL3B than CCL11 on CCR3.

To compare the affinity extent of these two agonists for CCR3, Jurkat cells were stimulated with SMPDL3 or CCL11 at various concentrations. Competitive curves illustrated in Figure 6c show that curves generated with purified recombinant human SMPDL3B-GST proteins or untagged purified recombinant human SMPDL3B proteins, exhibited a right-shift when compared with curves generated with CCL11. The EC<sub>50</sub> values were 1,37; 1,60 and 2,42 for CCL11, SMPDL3B and SMPDL3B-GST proteins, respectively. These results confirm that CCL11 has a higher affinity for CCR3 compared to SMPDL3B.

To test whether endogenous soluble SMPDL3B interacts with CCR3, Jurkat cells were treated with SB-328437 prior stimulation with plasma from EM patients and healthy controls containing high SMPDL3B levels. Unexpectedly, the blockage of CCR3 caused an increase in integrated response to plasma from both ME patient and healthy control. Compared to plasma from healthy control, the response extent was higher in cells stimulated with plasma from ME patients (Fig 6d). Jurkat cells stimulated with the SMPDL3B depleted plasma displayed lesser integrated response than

those stimulated with whole plasma at low concentrations. Moreover, the extent of their integrated response remained higher from submaximal concentrations. Our immunoprecipitation experiment confirmed the interaction of SMPDL3B with CCR3 as found on the BioGrid platform<sup>11</sup>. We do not foresee an alternative approach to study the functional nature of this interaction, as we have no doubt that the method used is appropriate for this study. Indeed, impedance measurement by dielectric spectroscopy is a widely used approach to characterize receptor activity<sup>37</sup>. We recently used this approach to demonstrate impaired signaling through G protein-coupled receptors in patients with scoliosis<sup>37</sup>. The unexpected high increase observed in response to plasma rich in SMPDL3B following inhibition of the CCR3 receptor, suggests that this protein may also act through another receptor. We believe that inhibition of the CCR3 receptor increases the availability of the soluble form of SMPDL3B protein for this potential receptor. To test this hypothesis, depletion of SMPDL3B proteins from plasma was performed and resulted in the loss of the increase observed with whole plasma. However, an increase in response was not observed with the recombinant protein following inhibition of the CCR3 receptor. This could be explained by the fact that the circulating SMPDL3B is a cleaved form while the recombinant protein used represents the complete form. Furthermore, we cannot exclude that this difference may also be caused by post-translational modifications (glycosylation, phosphorylation, etc.) with the circulating SMPDL3B or with the presence of a co-factor present in the plasma.

## **DISCUSSION**

ME is a debilitating disease with unknown pathophysiology. Not much is understood in terms of the deregulations of the physiological and immune processes which are responsible for the symptoms and symptom severity of ME. The present study results suggest that higher levels of circulating SMPDL3B in ME patients are associated with the severity of symptoms, as shown in the Canadian cohort, and confirmed in an independent Norwegian cohort. ME is a very complex disease with heterogeneous and varied symptoms ranging from mild to severe. Patients severely affected by ME are generally wheelchair-dependent and/or bed-ridden for months or even years. Therefore, the present results may open new research avenues for uncovering the biological processes underlining the severity of ME.

The elevation of circulating SMPDL3B levels suggests a possible decrease of SMPDL3B proteins anchored at the cellular membrane where they are normally active and play many roles in the immune response and in the lipid metabolism <sup>7</sup>. Release of soluble SMPDL3B proteins support previous results showing a reduction in the conversion of sphingomyelins into ceramides in ME patients <sup>10</sup>.

ME symptoms might worsen due to the decrease of the membrane bound form of SMPDL3B but could also potentially be affected by the soluble SMPDL3B protein. Not much is known regarding possible roles or interferences caused by the production/accumulation of soluble SMPDL3B proteins. Using the BioGrid platform <sup>11</sup>, we have identified a potential receptor for SMPDL3B, C-C chemokine receptor 3 (CCR3), and then confirmed a direct interaction between the two experimentally. SMPDL3B was shown to act as an agonist of CCR3 and to cause its internalisation. The functional importance of CCR3 internalization in ligand-induced signaling events is well established. For example, it has been demonstrated that internalization of CCR3 is critical for eosinophil shape change and actin polymerization after activation with eotaxin-1 (CCL11) <sup>15</sup>. Therefore, this receptor plays a vital role in accumulating eosinophils and T cells during chronic inflammatory immune responses like asthma <sup>16</sup>. In recent studies, CCR3 expression and eotaxin-1 levels, increase in patients with inflammatory bowel disease (IBD) <sup>16</sup>. IBD has not only similar symptoms to ME, like severe fatigue, but also is an often-present comorbidity to ME <sup>17</sup>. Interestingly, CCL11 levels have been previously reported to correlate with the severity of ME disease <sup>12</sup>

Unlike in ME patients, the circulating levels of CCL11 in the healthy controls was correlated negatively with SMPDL3B (Supplementary Figure S3). It seems that there is a certain regulation or indirect homeostasis between SMPDL3B and CCL11. Consequently, if ME patients present a defect in the regulation or balance between SMPDL3B and CCL11, SMPDL3B may continuously bind with CCR3, triggering the inflammation process.

Furthermore, we observed that the blockade of CCR3 by SB-328437, its specific antagonist, caused an increase in the cellular response induced by plasma containing high levels of SMPDL3. The possibility that this response was induced by another plasma component was ruled out by the lack of response to SMPDL3B-depleted plasma. This ambivalence suggests that CCR3 inhibition or competition for binding sites on this receptor favors the interaction of SMPDL3B with other

receptors or other factors to amplify symptoms in ME patients. In this regard, SMPDL3B has been reported to directly interfere with the beta-isoform of the insulin receptor, thereby altering its signaling <sup>18</sup>. SMPDL3B proteins can also interact directly with CIP or CERK, and affect the function of CERK and then influence the modulation of membrane lipids and membrane fluidity <sup>19,20</sup>.

Thus, based on the results reported by Montoya *et al.* on CCL11 and disease severity <sup>12</sup>, combined with those obtained in the present study, it is tempting to speculate that the severity of ME symptoms is at least, a consequence of the synergistic effects of CCL11 and SMPDL3B acting separately on different biological phenomena. Concretely, in severely affected ME patients with simultaneously high levels of CCL11 and SMPDL3B, it is possible that CCL11 which has more affinity for CCR3, reduces the possibility of SMPDL3B to interact with CCR3, thus favoring the action of SMPDL3B on other factors. This hypothesis can be supported by our results showing high levels of SMPDL3B mainly in ME patients with IO, which is a symptom associated with vascular disturbances. This could be a consequence of the effect of SMPDL3B on membrane structure while disorders associated with CCR3 stimulation such as inflammation and subsequent pain <sup>15</sup>, would result from the occupation of this receptor by CCL11. However, determination of CCL11 and SMPDL3B levels under the same conditions in the same patients with OI is required to confirm this hypothesis. Vascular abnormalities such as POTS or OI in response to standing are frequently found in 40% of ME patients and the causes remain poorly understood <sup>21</sup>. In the present study, we showed that the levels of soluble SMPDL3B were higher in ME with vascular instabilities such as OI or POTS. In addition, our results also showed that ME+OI group have more severe symptoms than the ME group, as shown by the MFI-20 questionnaire. This result once again confirms that SMPDL3B is associated to symptom severity but also gives us an indication that higher soluble SMPDL3B levels could be linked to the OI symptoms that are experienced by some ME patients. By doing an analysis using the Ingenuity pathway analysis software (IPA) (Fig. 7a), we did not identify a direct link between SMPDL3B protein and molecules known to be associated with POTS, although indirect associations of SMPDL3B with POTS are present. Based on IPA, Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), an enzyme that participates in histone methylation and is ultimately a transcription repressor, regulates the expression of Kruppel-like factor 2 (KLF2), which in turn regulates CCR3, which we have experimentally shown to interact with soluble SMPDL3B <sup>22</sup>. EZH2 has been associated to vascular instabilities by silencing *SLC6A2* gene that

encodes for the norepinephrine transporter, which is down-regulated in people suffering from POTS<sup>23,24</sup>.

ME disorder is characterized by various symptoms, different factors such as age and sex could influence the disease, and the immune function. The development of autoimmune diseases seems to be higher in women because of the possible mediation of sex steroids<sup>25</sup>. In recent studies, estrogens affect an inflammatory regulator that can possibly push the system toward the development of autoimmune disorders such as lupus or rheumatoid arthritis<sup>26</sup>. Since SMPDL3B protein participates in immune function, hormonal estrogen therapy may be one of the causes of the elevation of circulating SMPDL3B in women for both cohorts. Not only is the level of circulating SMPDL3B higher in younger women than in older in the cohorts of this study, but it is also higher in women using hormonal contraceptive medication. Aging is marked above all by endocrine changes, mainly sex hormones. Therefore, if estrogens affect the level of soluble SMPDL3B, its level will also fluctuate with age. Aging is also shown to be associated with an increased prevalence of chronic inflammatory diseases and immune dysregulation<sup>27,28</sup>. Indeed, our results support that estrogen seems to increase the release of SMPDL3B, and its level of expression. Moreover, in the Canadian cohort, the reason that the healthy controls (HC) had a higher level of soluble SMPDL3B compared to ME may be due to the use of the contraceptive pills, which may also explain higher fatigue rate which is common side-effect associated with these medications (supplementary Figure S2). A recent study confirmed that cortisol levels are altered by estrogens, which is a major mediator of the HPA axis and immune responses, in pre- and post-menopausal women<sup>29</sup>. Dr. Gordon Broderick presents a unique model to explain this notion, and that it is not simply whether the hormonal levels are low or high<sup>30</sup>. He explains that the issue is much more complex, and chronic fatigue requires both a malfunctioning of the HPA axis and elevated hormone levels (estradiol)<sup>30</sup>. If the patient has a normal level of estrogen production, the production of circulating SMPDL3B proteins will not be high since there are not many ESR2 receptors<sup>31</sup>. On the other hand, an increase in estrogen levels with hormonal methods of contraception will solicit the ESR2 receptors more often, despite their low quantity, hence the high production of SMPDL3B proteins<sup>31</sup>.

Further investigations are required to find the postulated unknown receptor interacting with soluble plasma SMPDL3B proteins and to characterize the interplay between SMPDL3B and CCL11 in

ME pathogenesis. Other approaches can be used such as the use of cell lines which do not express SMPDL3B protein or CCL11, but only CCR3 receptor, in order to better understand the role of soluble SMPDL3B or its anchored form. It would also be interesting to know the level of circulating SMPDL3B in patients with only POTS/OI and the level of circulating estrogens in all cohorts. Further works are also required in order to better understand the mechanism underlying the relation between levels of circulating estrogens and soluble SMPDL3B levels.

Currently, there is no way to diagnose or treat this disease whose progression is unpredictable. It is therefore essential to explore potential biomarkers and therapeutic targets that could essentially prevent, diagnose, treat, or improve the symptoms of people with ME. Here, we demonstrate for the first time, the prognostic potential of soluble SMPDL3B protein in ME symptom severity, the influence of estrogens and the interplay existing between SMPDL3B, CCL11 and CCR3 in ME pathogenesis.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Study populations.** For the Canadian cohort, 128 patients with ME, 19 patients with ME and a comorbid condition of OI (ME+OI) and 62 age and sex-matched sedentary healthy control subjects (HC) were recruited for this study (Table 1). ME patients were diagnosed according to the Canadian Consensus Criteria. HC subjects had no family history of ME or autoimmune disease disorders. 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. For the Norway cohort, plasma samples from Prof. Øystein Fluge, Oncology department, Haukeland University Hospital, Norway, were shipped on dry ice to the laboratory of Dr. Alain Moreau Sainte Justine research center. All patients fulfilled the Canadian consensus criteria for ME. The blood samples were collected at Haukeland University Hospital (ClinicalTrials.gov [NCT02229942](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02229942), 2014–2017; ref. 45).

**Blood collection.** Peripheral blood was collected from the median cubital vein in EDTA-treated tubes. Whole blood was centrifuged at 215 x g for 10 minutes, then plasma was retrieved, aliquoted, and stored at -80°C until further usage.

**Evaluation and quantification of ME symptoms, symptom severity and participant's health status.** To assess participant's health status and the severity of ME symptoms, individuals from both cohorts have filled out standardized questionnaires. The Canadian cohort have completed three questionnaires including 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36), Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20), and the DePaul Symptom Questionnaire (DSQ). The SF-36 questionnaire provides a general overview of the health status of the participant by reporting a physical score and mental score <sup>32</sup>. MFI-20 scores provide detailed information on fatigue by evaluating General Fatigue, Physical Fatigue, Reduced Activity, Reduced Motivation <sup>33</sup>. The summation of MFI-20 scores were used to calculate the patient's severity score. The DSQ questionnaire scores, which was developed to assess ME symptoms and their frequency are grouped into four factors, Neuroendocrine, Autonomic and Immune Dysfunction, Cognitive Dysfunction, Post-exertional Malaise and Sleep Disturbances <sup>34</sup>. The disease severity of the Norwegian cohort has been assessed by a combination of a range of questionnaires including, SF-36, the Fatigue Severity Scale, the DePaul Symptom Questionnaire and a trial-specific questionnaire <sup>35</sup>.

**Plasma SMPDL3B and CCL11 measurements.** Plasma SMPDL3B and CCL11 levels were determined using the sandwich enzyme immunoassay technique following the manufacturer's instructions (Human SMPDL3B ELISA kit, Abbexa, Cambridge, United-Kingdom; Human CCL11/Eotaxin ELISA kit, R&D systems, Minnesota, United-States). Every sample was analyzed in duplicate.

**Statistical analysis.** Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and were compared by unpaired T-test or one way 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).

**Threshold determination for soluble SMPDL3B levels.** To be able to correctly separate larger values from smaller ones, the threshold of 27ng/mL was determined by R program which is often use for statistics and data science. For this study, we used the function `auto_thresh`<sup>36</sup>. This function can only be use for any non-negative integer data.

**Construction of pathways and molecule interaction analysis.** The interactions of SMPDL3B and other molecules of interest have been identified using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (QIAGEN Inc. software version 81348237).

**Evaluation of cellular response.** Cellular dielectric spectroscopy makes it possible to measure the cellular response to different interactions or signaling activities in different cell types. The experimental procedures were described previously by Akoume *et al.*<sup>37</sup>. Jurkat cells were used because they express CCR3 receptor and SMPDL3B proteins. These cells are T lymphoblast coming from human cells. Jurkat cells are not only a significant cell line, but they are possibly the best known T-cell line where there is a wide range of chemokines receptors. It is a model often used in research, especially for everything related to the immune system. Jurkat cells reach a confluency that is equivalent to 60% and grows with RPMI buffer containing 10% FBS and 5% antibiotic in an incubator at 37 degrees. When the cells are treated, they are put in a 96 well plate with white RPMI (without phenol) at 37 degrees. There were two types of experiments, in the first type, Jurkat cells were treated, with the antagonist CCR3 SB-328437 (Biotechnology Tocris, Bristol, United-Kingdom). The following day, the cells were stimulated with either the human recombinant CCL11 agonist (Creative Biomart, Shirley, NY, USA), the recombinant SMPDL3B protein (Abnova, Neihu District. Taipei City, Taiwan), the recombinant SMPDL3B-GST protein (Abnova, Neihu District. Taipei City, Taiwan) and/or with patient (ME-98) and HC (HC-58) plasma. The second type of experiments, have been done without treatments by only stimulating Jurkat cells with the same stimulants mentioned above plus the plasma depleted of SMPDL3B of patient ME-98. The plasma was depleted of SMPDL3B by using anti-SMPDL3B antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) and sepharose beads (Immunoprecipitation kit, Abcam, Cambrigde, United-Kingdom).

**Immunoprecipitation assays with CCR3.** As previously described by Wang *et al.* study<sup>38</sup>. Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 media without phenol red (Gibco, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). Cells were counted and seeded into six-well culture plates, with 2 million cells/well. The following day, the cell suspension was collected, and centrifuged at 300 x g for 7 minutes. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended and treated with either human recombinant CCL11 agonist (Creative Biomart) or recombinant SMPDL3B protein (Abnova). The crosslinker dithiobis-succinimidyl propionate (Thermo Fisher Scientific) was added at the same time as the recombinants (T0) after 15 minutes (T15). The reaction mixture was incubated for 30 minutes at room temperature, followed by a 15 minutes incubation with Tris-H2O pH 7.4 at 1mM. The samples were then centrifuged at 900 x g at 4°C for 5 minutes and the supernatant was removed. Non-denaturing lysis buffer with protease inhibitor (Immunoprecipitation kit, Abcam, Cambridge, United-Kingdom) was added and samples were incubated for 30 minutes with agitation. Samples were centrifuged at 16 200 x g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was recuperated, and protein quantification was done using the Bradford assay (BioRad, Hercules, CA, USA). The CCR3 polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific) was added to the cell lysate and incubated overnight at 4°C. The following day, sepharose beads (protein A/G Sepharose) (Abcam) were added and incubated for 1 hour at 4°C, and then centrifuged at 16 200 x g for 1 minute at 4°C. The pellet contained the protein receptor complex and was stored at -20°C.

**Western Blot.** For experiments with estrogen, Jurkat cells were treated with DPN (Tocris, Bristol, United-Kingdom), a highly potent agonist of ER $\beta$  receptor. The next day the proteins were isolated from  $1.8 \times 10^6$  cells using the TRIzol Reagent (Thermo Fisher) following manufacturer's protocol. Protein concentration was determined using Bio-RAD Protein assay following manufacture's protocol (BIO-RAD, Hercules, California, USA) For the western blot, proteins were separated using 10% SDS-PAGE. Once separated the proteins were transferred onto a nitrocellulose membranes (BIO RAD). Then, the membrane was blocked with 10% skim milk prepared with PBS tween at 0.2% for one hour at room temperature. Then the membrane was incubated overnight at 4°C with different antibodies with dilution of 1:1000 in 1% of skim milk prepared with PBS Tween at 0.2%. The primary antibody for the detection of SMPDL3B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) and for the control, Beta-actin (Santa Cruz) was used. The same protocol was applied for the experiments involving CCR3 immunoprecipitation using following antibodies all at a dilution of 1:1000, anti-SMPDL3B (Santa Cruz), anti-CCL11 (Abnova) and anti-CCR3

(Thermo Fisher). After the incubation with an appropriate secondary antibody with HRP conjugate (Santa Cruz) at room temperature for 1 hour, the protein bands were viewed with ChemiDoc MP Imaging System (BIO RAD).

## DATA AVAILABILITY

The datasets that were generated and that were used for analysis for this study are available through the corresponding author.

## REFERENCES

- 1 Valdez, A. R. *et al.* Estimating Prevalence, Demographics, and Costs of ME/CFS Using Large Scale Medical Claims Data and Machine Learning. *Front Pediatr* **6**, 412 (2018). <https://doi.org:10.3389/fped.2018.00412>
- 2 Carol, E. M. How the IRSC-NP works. *Calif. Nurse* **82**, 6 (1986).
- 3 Fluge, O. *et al.* B-Lymphocyte Depletion in Myalgic Encephalopathy/ Chronic Fatigue Syndrome. An Open-Label Phase II Study with Rituximab Maintenance Treatment. *PLoS One* **10**, e0129898 (2015). <https://doi.org:10.1371/journal.pone.0129898>
- 4 Newton, J. L. *et al.* Symptoms of autonomic dysfunction in chronic fatigue syndrome. *QJM* **100**, 519-526 (2007). <https://doi.org:10.1093/qjmed/hcm057>
- 5 Canada, O. M. F. *Qu'est-ce que l'EM*, <<https://www.omfcanada.ngo/quest-ce-que-lem-sfc/?lang=fr>> (2022).
- 6 Yang, T. *et al.* The clinical value of cytokines in chronic fatigue syndrome. *J. Transl. Med.* **17**, 213 (2019). <https://doi.org:10.1186/s12967-019-1948-6>
- 7 Heinz, L. X. *et al.* The Lipid-Modifying Enzyme SMPDL3B Negatively Regulates Innate Immunity. *Cell Rep.* **11**, 1919-1928 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.celrep.2015.05.006>
- 8 Lorenzo, H. K. & Candelier, J. J. [Idiopathic nephrotic syndrome: une Arlesienne?]. *Med. Sci. (Paris)* **35**, 659-666 (2019). <https://doi.org:10.1051/medsci/2019128>
- 9 Bezombes, C. *et al.* Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood* **104**, 1166-1173 (2004). <https://doi.org:10.1182/blood-2004-01-0277>
- 10 Naviaux, R. K. *et al.* Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E5472-5480 (2016). <https://doi.org:10.1073/pnas.1607571113>
- 11 Oughtred, R. *et al.* The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci* **30**, 187-200 (2021). <https://doi.org:10.1002/pro.3978>
- 12 Montoya, J. G. *et al.* Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E7150-E7158 (2017). <https://doi.org:10.1073/pnas.1710519114>

- 13 Amerio, P. *et al.* Eotaxins and CCR3 receptor in inflammatory and allergic skin diseases: therapeutic implications. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2**, 81-94 (2003). <https://doi.org/10.2174/1568010033344480>
- 14 Willems, L. I. & Ijzerman, A. P. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. *Med. Res. Rev.* **30**, 778-817 (2010). <https://doi.org/10.1002/med.20181>
- 15 Zimmermann, N. & Rothenberg, M. E. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 97-105 (2003). <https://doi.org/10.1067/mai.2003.3>
- 16 Manousou, P. *et al.* Increased expression of chemokine receptor CCR3 and its ligands in ulcerative colitis: the role of colonic epithelial cells in in vitro studies. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 337-347 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04248.x>
- 17 Tsai, S. Y. *et al.* Increased risk of chronic fatigue syndrome in patients with inflammatory bowel disease: a population-based retrospective cohort study. *J. Transl. Med.* **17**, 55 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1797-3>
- 18 Mitrofanova, A. *et al.* SMPDL3b modulates insulin receptor signaling in diabetic kidney disease. *Nat Commun* **10**, 2692 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10584-4>
- 19 Mallela, S. K., Mitrofanova, A., Merscher, S. & Fornoni, A. Regulation of the amount of ceramide-1-phosphate synthesized in differentiated human podocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**, 158517 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158517>
- 20 Yoo, T. H. *et al.* Sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b expression levels determine podocyte injury phenotypes in glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 133-147 (2015). <https://doi.org/10.1681/ASN.2013111213>
- 21 Vernino, S. *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. *Auton. Neurosci.* **235**, 102828 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102828>
- 22 Yi, S. *et al.* Dual Role of EZH2 in Cutaneous Anaplastic Large Cell Lymphoma: Promoting Tumor Cell Survival and Regulating Tumor Microenvironment. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1126-1136 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.036>
- 23 Kaipananickal, H. *et al.* Targeting Treatment Refractory NET by EZH2 Inhibition in Postural Tachycardia Syndrome. *Circ. Res.* **126**, 1058-1060 (2020). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315654>
- 24 Lambert, E. *et al.* Altered sympathetic nervous reactivity and norepinephrine transporter expression in patients with postural tachycardia syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**, 103-109 (2008). <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.107.750471>
- 25 Gameiro, C. & Romao, F. Changes in the immune system during menopause and aging. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**, 1299-1303 (2010). <https://doi.org/10.2741/e190>
- 26 Fuite, J., Vernon, S. D. & Broderick, G. Neuroendocrine and immune network remodeling in chronic fatigue syndrome: an exploratory analysis. *Genomics* **92**, 393-399 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.08.008>
- 27 Vasto, S. *et al.* Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech. Ageing Dev.* **128**, 83-91 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.015>

- 28 Shaw, A. C., Goldstein, D. R. & Montgomery, R. R. Age-dependent dysregulation of innate  
immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 875-887 (2013). <https://doi.org:10.1038/nri3547>
- 29 Chrousos, G. P. Stress and sex versus immunity and inflammation. *Sci Signal* **3**, pe36  
(2010). <https://doi.org:10.1126/scisignal.3143pe36>
- 30 Russell, L. *et al.* Illness progression in chronic fatigue syndrome: a shifting immune  
baseline. *BMC Immunol.* **17**, 3 (2016). <https://doi.org:10.1186/s12865-016-0142-3>
- 31 Grans, H., Nilsson, M., Dahlman-Wright, K. & Evengard, B. Reduced levels of oestrogen  
receptor beta mRNA in Swedish patients with chronic fatigue syndrome. *J. Clin. Pathol.*  
**60**, 195-198 (2007). <https://doi.org:10.1136/jcp.2005.035956>
- 32 Ware, J. E., Jr. SF-36 health survey update. *Spine (Phila Pa 1976)* **25**, 3130-3139 (2000).  
<https://doi.org:10.1097/00007632-200012150-00008>
- 33 Smets, E. M., Garssen, B., Bonke, B. & De Haes, J. C. The Multidimensional Fatigue  
Inventory (MFI) psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. *J. Psychosom.*  
*Res.* **39**, 315-325 (1995). [https://doi.org:10.1016/0022-3999\(94\)00125-o](https://doi.org:10.1016/0022-3999(94)00125-o)
- 34 Jason, L. A. *et al.* Factor Analysis of the DePaul Symptom Questionnaire: Identifying Core  
Domains. *J Neurol Neurobiol* **1** (2015). <https://doi.org:10.16966/2379-7150.114>
- 35 Fluge, O. *et al.* B-Lymphocyte Depletion in Patients With Myalgic  
Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-  
Controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* **170**, 585-593 (2019). <https://doi.org:10.7326/M18-1451>
- 36 Network, T. C. R. A. *Finding Thresholds*, <[https://cran.r-  
project.org/web/packages/autothresholdr/vignettes/finding-thresholds.html](https://cran.r-project.org/web/packages/autothresholdr/vignettes/finding-thresholds.html)> (
- 37 Akoume, M. Y., Franco, A. & Moreau, A. Cell-based assay protocol for the prognostic  
prediction of idiopathic scoliosis using cellular dielectric spectroscopy. *J Vis Exp*, e50768  
(2013). <https://doi.org:10.3791/50768>
- 38 Wang, H., He, M., Willard, B. & Wu, Q. Cross-linking, Immunoprecipitation and  
Proteomic Analysis to Identify Interacting Proteins in Cultured Cells. *Bio Protoc* **9** (2019).  
<https://doi.org:10.21769/BioProtoc.3258>

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all participants, both with and without ME, 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 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.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.R., M-Y.A., A.F. and A.M. designed the research project; B.R. carried out the experiments; B.R., M-Y. A., E.N., W.E. performed the analyses; Ø. F. and O. M., provided Norwegian samples and data; I.C. contributed new analytic tools; B.R., M-Y.A. and A.M. analyzed data; B.R., M-Y. A., E.N., A.F., W.E. and A.M. wrote the paper. All co-authors 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 a Member of the Scientific Advisory Board of the Open Medicine Foundation. The authors declare no other competing interests.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Graphical representation of the experimental study design.** Abbreviations: ME/CFS (encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome), HC (healthy controls), OI (orthostatic intolerance), MFI-20 (Multidimensional Fatigue Inventory), SF-36 (36-Item Short-Form Health Survey), DSQ (DePaul Symptom Questionnaire).

**Figure 2. Plasma SMPDL3B levels and symptom severity of ME patients.** The graphs are displayed with the mean and  $\pm$  standard error of the mean. **(a)** Physical scores of the SF-36 questionnaire of two groups of ME patients from Canadian cohort stratified by the plasma levels of SMPDL3B. **(b)** General fatigue scores of MFI-20 questionnaire of two groups of ME patients from Canadian cohort stratified by the plasma levels of SMPDL3B. **(c)** Reduced activity scores of MFI-20 questionnaire of two groups of ME patients from Canadian cohort stratified by the plasma levels of SMPDL3B. **(d)** Physical fatigue scores of MFI-20 questionnaire of two groups of ME patients from Canadian cohort stratified by the plasma levels of SMPDL3B. **(e)** Post exertional malaise score (PEM) of DSQ questionnaire of two groups of ME patients from Canadian cohort stratified by the plasma levels of SMPDL3B. **(f)** Plasma levels of SMPDL3B in different groups of Norwegian ME cohort grouped by symptom severity. **(g)** Plasma SMPDL3B levels if ME

patients from Canadian cohort without symptoms of OI and ME patients with symptoms of OI (ME+OI). **(h)** Physical fatigue score of MFI-20 questionnaire of ME patients and ME+OI patients from Canadian cohort. Lower SF-36 questionnaires scores reflect more severe symptoms. Higher MFI-20 and DSQ scores reflect more severe symptoms. An unpaired T test was performed when comparing two groups to determine the significant difference. One-way ANOVA followed by Tuckey's test was performed when comparing more than two groups. Differences were found to be significant at \*P<0.05, \*\*P<0.01.

**Figure 3. Plasma SMPDL3B levels of different sex groups of and age groups of Canadian and Norwegian cohorts.** **(a)** Plasma SMPDL3B levels in Canadian and Norwegian men and women with ME. **(b)** Plasma concentration of SMPDL3B of Canadian ME participants of different age groups. **(c)** Plasma concentration of SMPDL3B of Norwegian ME participants. One-way ANOVA followed by Tuckey's test was performed when comparing more than two groups. Differences were found to be significant at \*P<0.05, \*\*P<0.01.

**Figure 4. Plasma SMPDL3B levels in female Norwegian patients are stratified by age and plasma SMPDL3B levels related to hormonal contraceptive methods for both cohorts.** **(a)** Significant differences were observed between three groups of age . The data was analysed using one-way ANOVA. **(b)** No significant differences were observed between female patients who take hormonal anovulants in the Canadian cohort. **(c)** Significant differences were observed between female patients who take hormonal anovulants in the Norwegian cohort. The data was analysed using T Test. The results were considered significant at \*P-value < 0.05, \*\*P-value < 0.01 and \*\*\* P-value <0.001. **(d)** The effect of estrogen on SMPDL3B expression and release into cell medium. The bands on the left represent SMPDL3B excreted by cells into the culture media. The bands on the right represent SMPDL3B protein obtained by the extraction of the organic phase of Jurkat cells.

**Figure 5. Interaction of SMPDL3B with CCR3 occurs in Jurkat cells.**

Jurkat cells were treated with recombinant SMPDL3B (1µM) or CCL11(1µM). In each case, DSP (5µg/mL), which is a chemical crosslinker that reacts with an amino group, was added either simultaneously with the product (T0)) or 15 min after the product (T15). Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation with antibody to CCR3. The precipitates were resolved by 10% SDS-PAGE and immunoblotted with SMPDL3B or CCL11 specific antibody. The precipitates

were also analyzed with antibody against CCR3. The expression of SMPDL3B, CCL11 and CCR3 in Jurkat cells was confirmed by western blot analysis of the total cell lysates (data not shown).

**Figure 6. Multifunctional nature of SMPDL3B is revealed by cellular dielectric spectroscopy.**

**(a)** Jurkat cells were challenged with purified recombinant CCL11 (1 $\mu$ M), a specific CCR3 agonist, in the absence (vehicle) and in the presence of purified recombinant SMPDL3B-GST (1 $\mu$ M). **(b)** The effect of CCR3 specific antagonist at various concentrations (10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M) on the impedance response to CCL11 (1 $\mu$ M) and SMPDL3B (1 $\mu$ M). **(c)** Measurement of Jurkat cells impedance after being stimulated with SMPDL3B-GST, CCL11 and SMPDL3B at different concentrations. **(d)** Measurement of Jurkat cells impedance to patient (6 ng/mL) and healthy (2ng/mL) control plasma stimulation pre-treated with SMPDL3B. The concentration-response curves were generated with GraphPad Prism software using data normalised to minimal inhibition. **(e)** Comparison of Jurkat cells impedance to different stimulations such as CCL11, whole patient plasma and the depleted plasma (without SMPDL3B). Jurkat cells were challenged with various concentrations of CCL11, SMPDL3B, whole patient plasma or SMPDL3B depleted patient plasma. The concentration-response curves were generated with GraphPad Prism software using data normalised to minimal stimulation.

**Figure 7. Interaction and pathway analysis of molecules of interest using Ingenuity Pathway Analysis (IPA).**

Protein coding genes in the presented graphs are identified in green, the associated functions in yellow and the related diseases in pink. **(a)** Interaction network of SMPDL3B, CCR3 and CCL11 and their association to ME disease and POTS. **(b)** Interaction between SMPDL3B and ESR2.

## TABLES

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of participants

	<b>Canadian Cohort</b>			<b>Norwegian cohort</b>
	ME Patients	ME+OI	HC	ME Patients
<b>N (women:men)</b>	128(104:24)	19(18:1)	62(36;26)	141(119:22)
<b>Age (years)</b>	51.0 ±1.0	44.3±2.2	49,0±1,4	36.8±1.0
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.6±0.5	25.0±1.7	25,3±0,7	25.0±0.4
<b>Disease duration</b>	14.4±1.0	10.8±3.1	NA	7.5±0.1

BMI: Body Mass Index. Data were expressed in mean ± standard error of the mean

## FIGURES

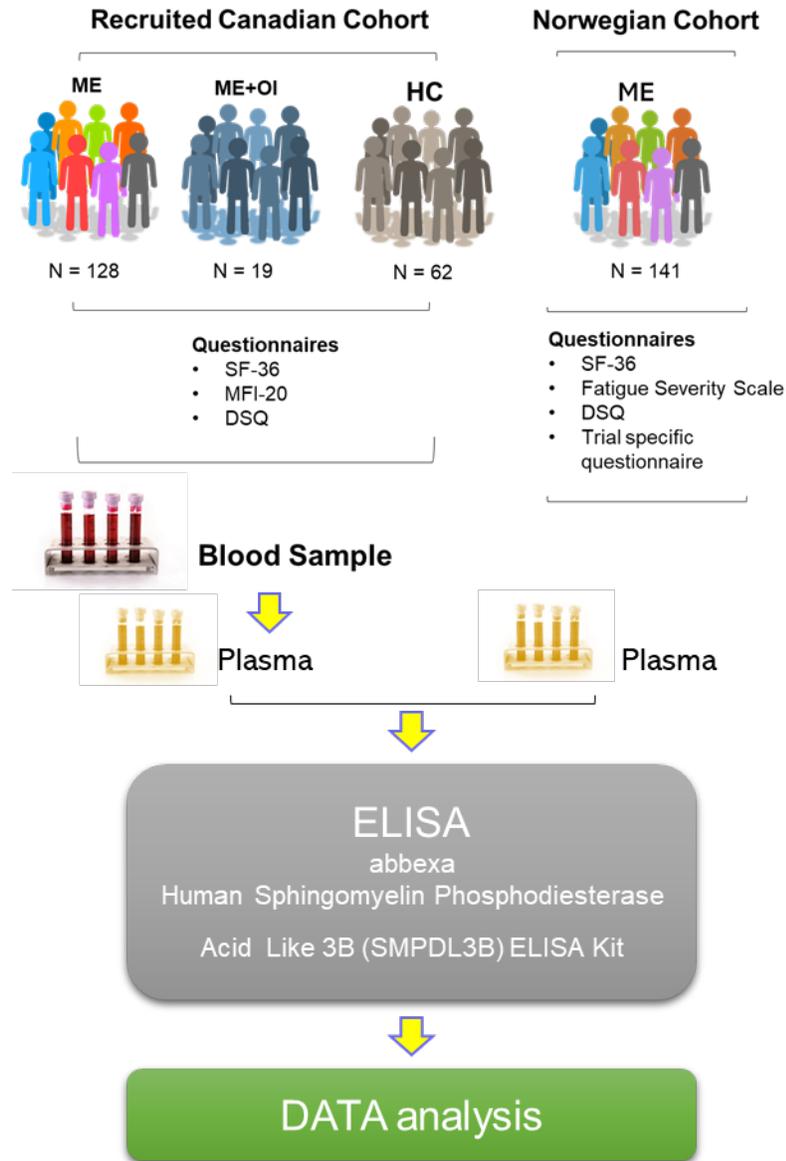
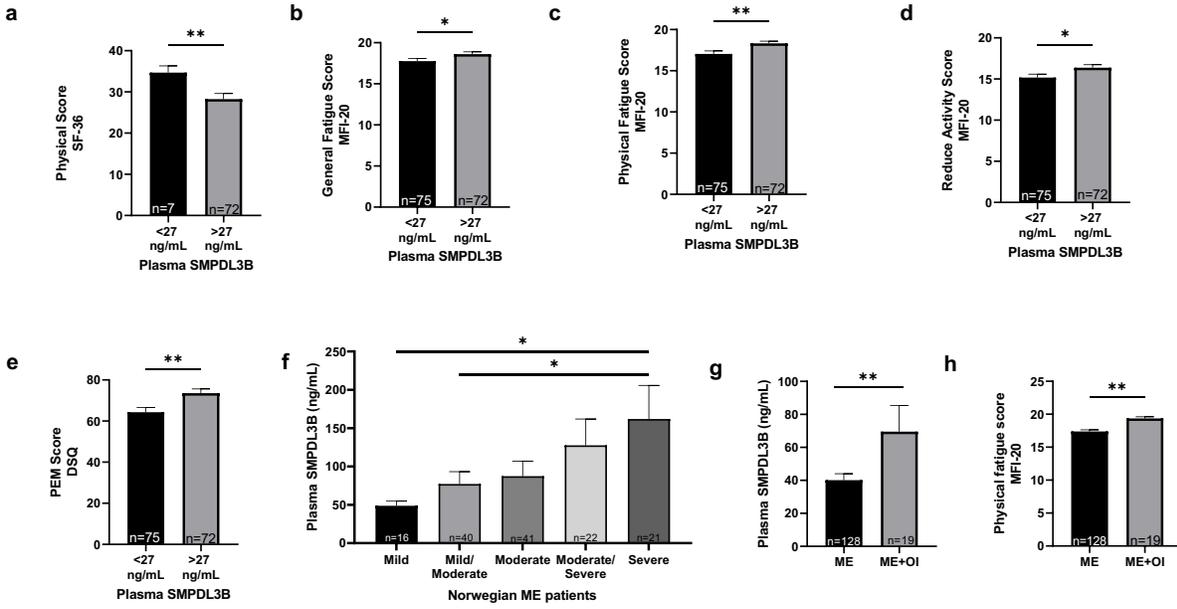
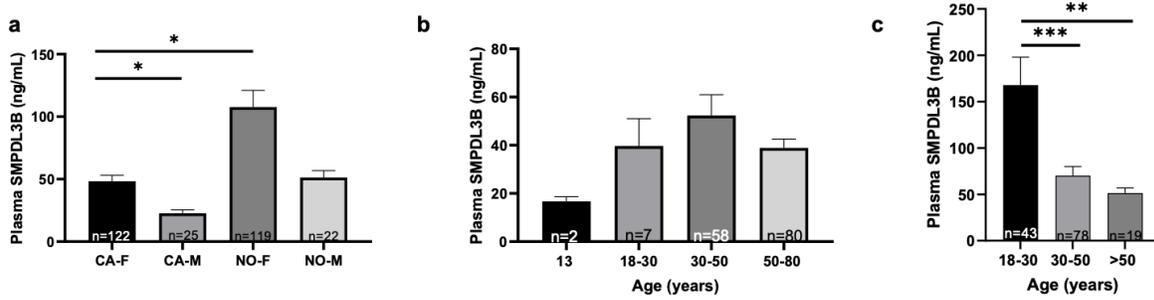


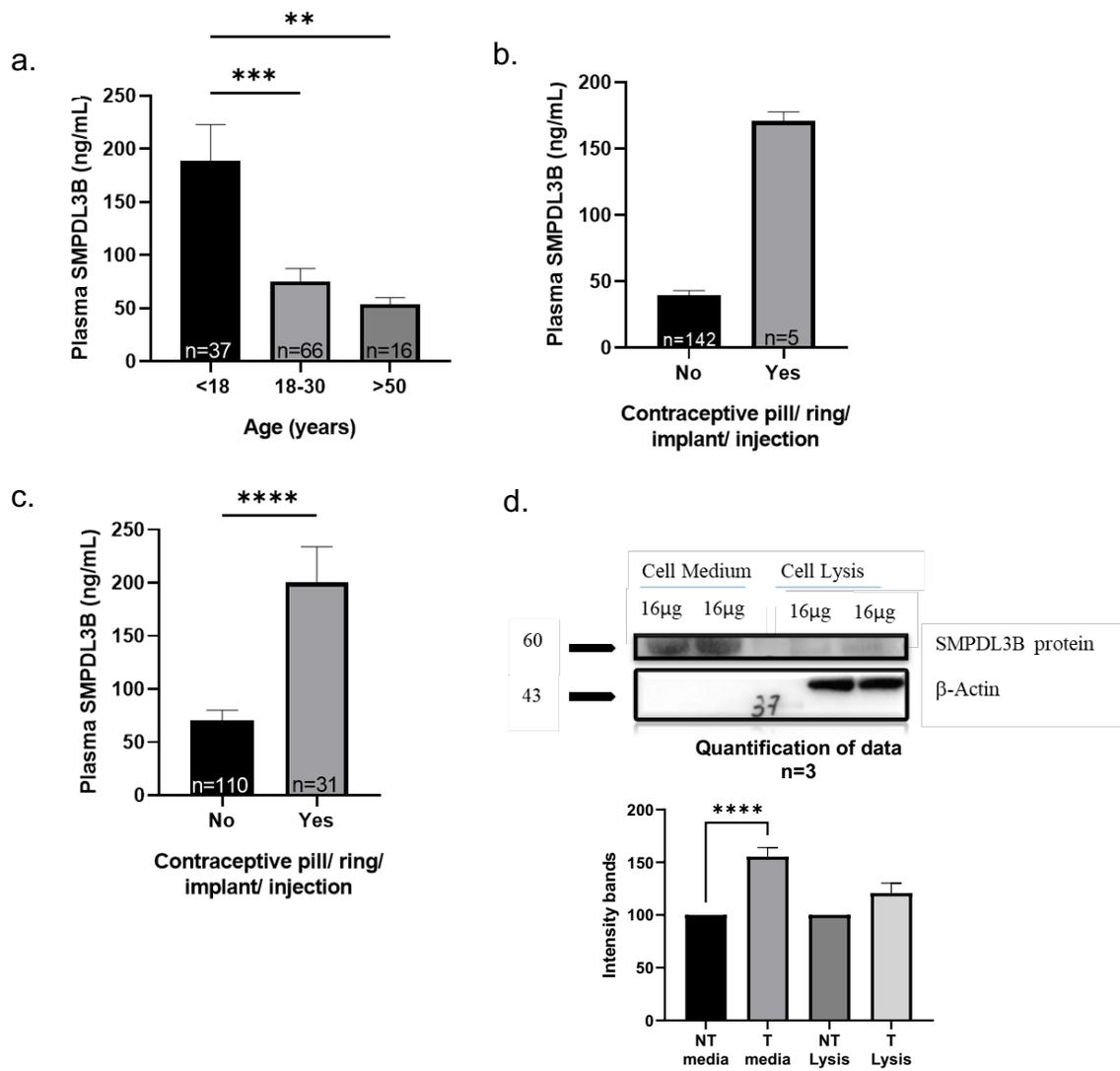
Figure 1. Graphical representation of the experimental study design.



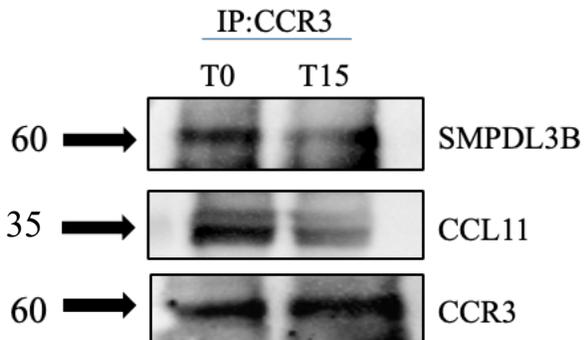
**Figure 2. Plasma SMPDL3B levels and symptom severity of ME patients.**



**Figure 3. Plasma SMPDL3B levels of different sex groups of and age groups of Canadian and Norwegian cohorts.**



**Figure 4. Plasma SMPDL3B levels in female Norwegian patients are stratified by age and plasma SMPDL3B level related to hormonal contraceptive methods for both cohorts.**



**Figure 5. Interaction of SMPDL3B with CCR3 occurs in Jurkat cells**

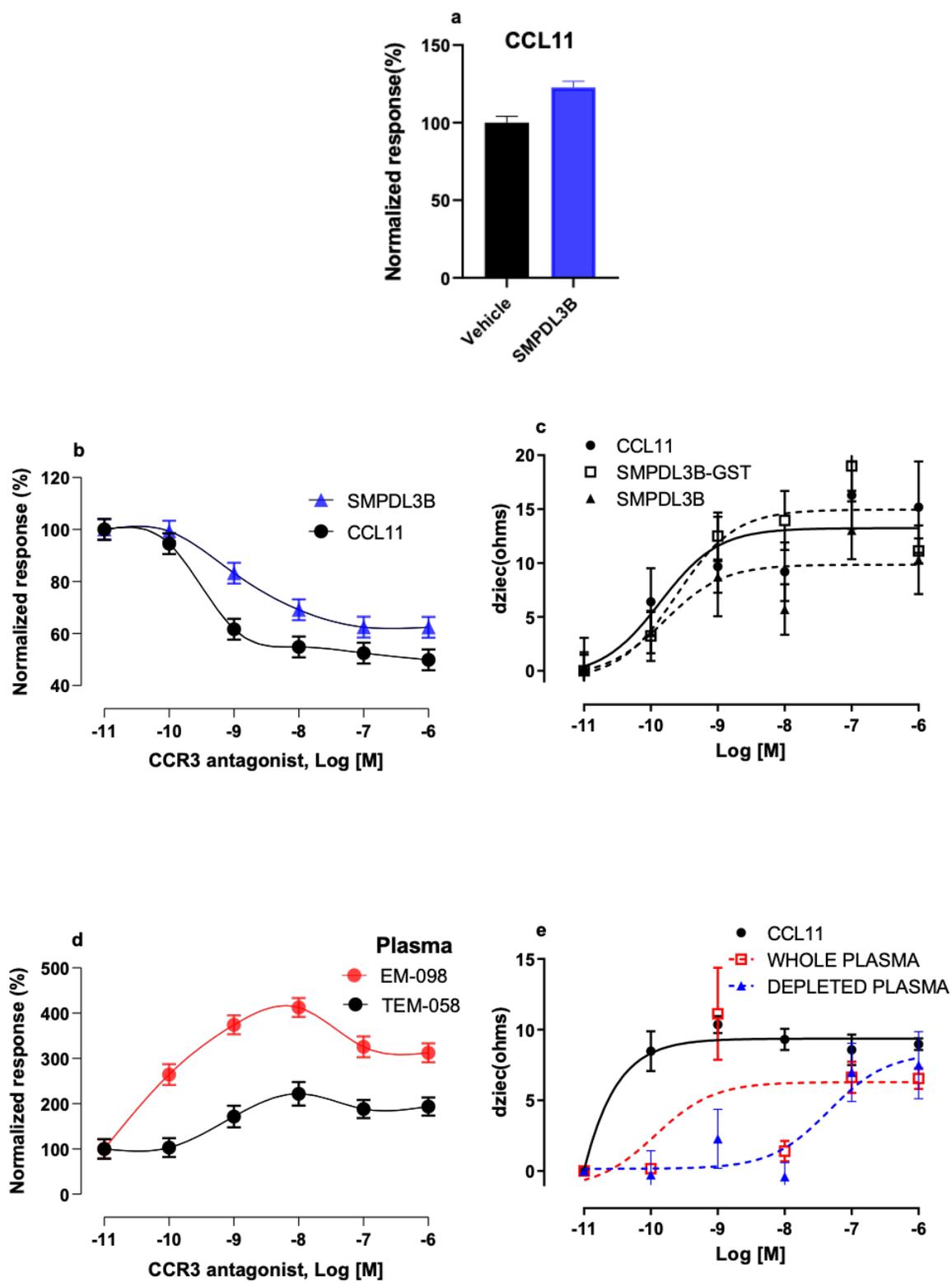
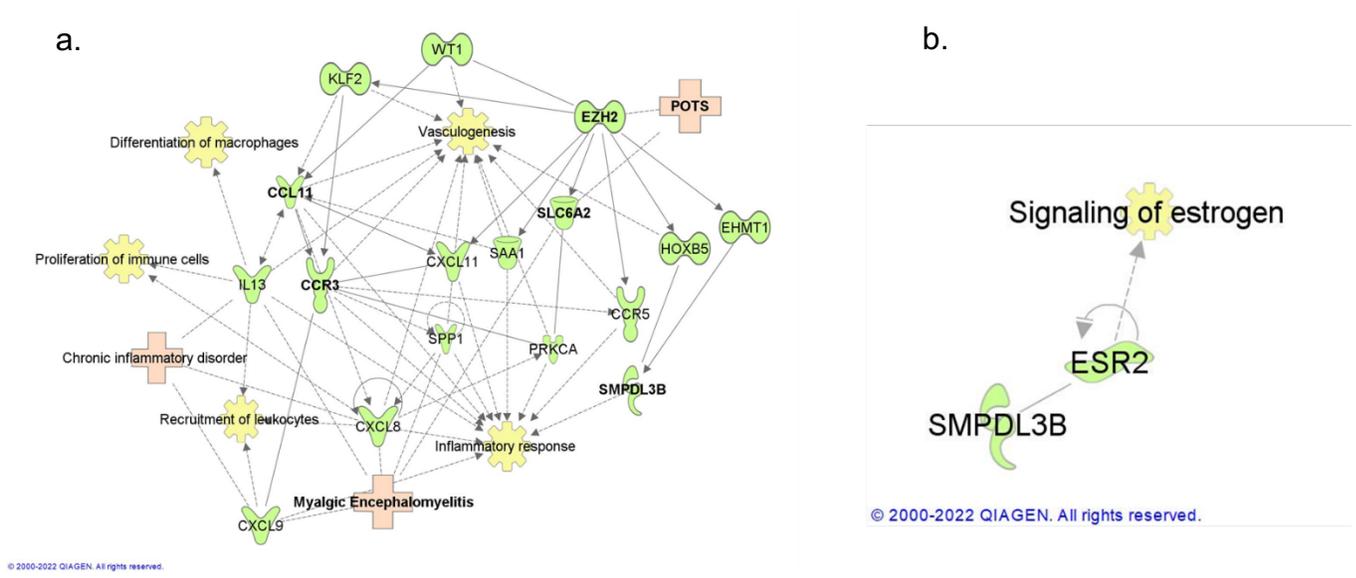
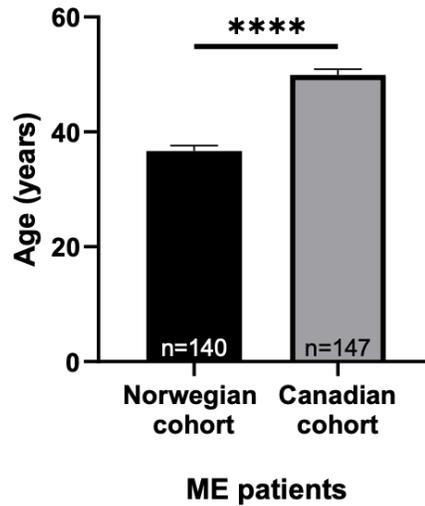


Figure 6. Multifunctional nature of SMDPL3B is revealed by cellular dielectric spectroscopy

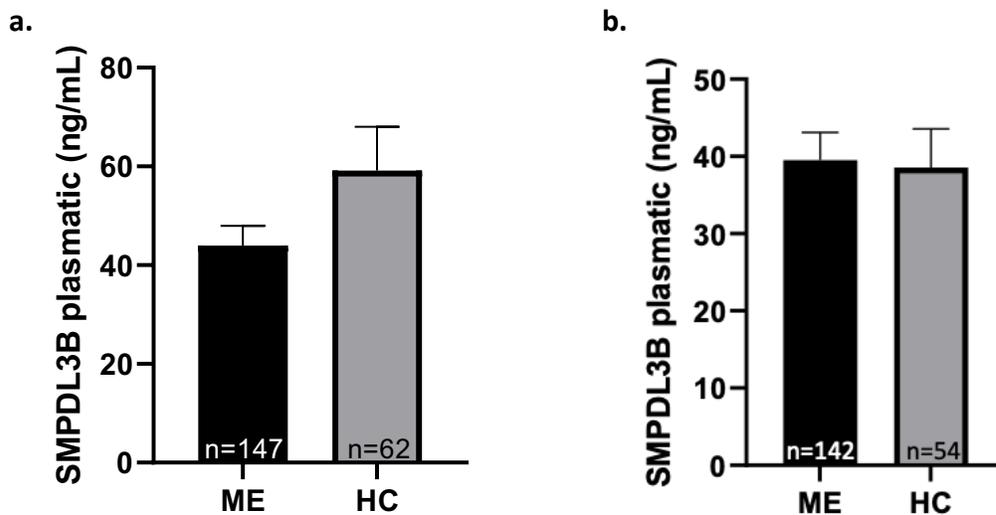


**Figure 7. Interaction and pathway analysis of molecules of interest using Ingenuity Pathway Analysis (IPA).**

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

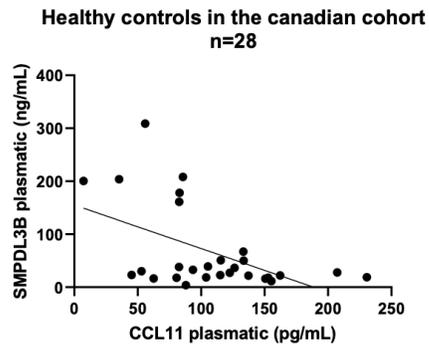


**Supplementary Figure S1. Average Age of ME participants in both cohorts.** Significant differences were observed between both groups. The data were analysed using one-way ANOVA. The results were significant at \*P-value < 0.05, \*\*P-value < 0.01 and \*\*\*P-value < 0.001.

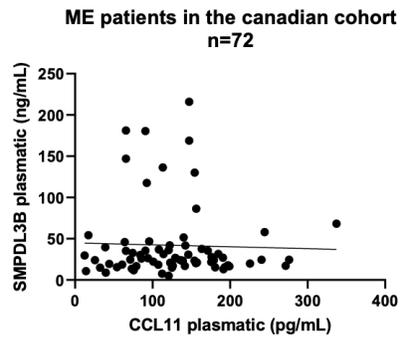


**Supplementary Figure S2. Plasma SMPDL3B concentration in ME and healthy controls in the Canadian cohort.** Circulatory SMPDL3B levels in ME patients and healthy controls (HC) with and without any hormonal contraceptive method (a, b respectively). No significant differences were observed between both groups in both figures. The data was analysed using a T Test.

a.



b.



**Supplementary Figure S3. Correlation between plasma SMPDL3B level and plasma CCL11 level.** Negative correlation for HC in the Canadian cohort (a) ( $P= 0,0053$ ;  $R= 0,2622$ ). No correlation for ME patients in the Canadian cohort (b).

## Chapitre 3 – Discussion

### Pertinence de l'étude sur la protéine SMPDL3B et méthodologie

Des essais cliniques sur des PAEM ont été effectués en utilisant le Rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur CD20 présent à la surface des lymphocytes B immatures. Son action inhibe la production des lymphocytes B (72). La pertinence de l'utilisation de ce médicament auprès des PAEM est due au fait qu'un patient ayant développé l'EM en 1997 et un lymphome en 2003, a reçu des séances de chimiothérapie avec le Rituximab qui aurait diminué ses symptômes (71). Le Rituximab est connu pour agir sur les podocytes également (63). Les podocytes sont des cellules épithéliales composant la capsule de Bowman au niveau du glomérule rénal. Certaines études ont démontré que le Rituximab peut lier la sphingomyélinase acide 3 b (SMPDL3B).

Dans la mesure où la protéine SMPDL3B est considérée comme active lorsqu'elle est ancrée à la membrane cellulaire, nous avons focalisé notre étude sur la forme soluble pour savoir si celle-ci contribue à la pathologie de l'EM. L'utilisation de la plateforme BioGrid créée par le département de biologie cellulaire de l'Université de Harvard (74) a permis d'identifier des protéines qui interagissent avec la protéine SMPDL3B. Cette base de données englobe les interactions entre les protéines humaines obtenues à l'aide de la spectrométrie de masse à purification par affinité et de l'algorithme CompPASS-Plus élaboré par Ed Huttlin, un chercheur du département. De tous les interacteurs identifiés, le récepteur de chimiokine de type 3 (CCR3) a retenu notre attention à cause de son rôle dans le système immunitaire et le fait qu'il était le seul récepteur membranaire de la liste. Ce système est l'un des systèmes biologiques grandement perturbés chez les PAEM. La chimiokine de type 3 est un récepteur se retrouvant à la surface cellulaire des éosinophiles principalement, mais il se retrouve également sur les basophiles et les mastocytes. Ces cellules sont connues pour participer aux réponses allergiques. Le récepteur CCR3 répond à plusieurs types de cytokines comprenant l'eotaxin (CCL11), eotaxin-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) et RANTES (CCL5). Une des conséquences de la liaison d'une chémokine à son récepteur est l'induction d'une réponse chimotactique, c'est-à-dire qu'il y a un signal qui est envoyé à toutes les cellules exprimant le récepteur d'intérêt afin qu'elles puissent se diriger vers une zone de haute concentration en chémokines. Suite à la liaison d'une cytokine à son récepteur, ce dernier est

internalisé et la cellule ne peut donc plus répondre à une cytokine par le même récepteur. Ce récepteur est de plus en plus étudié surtout quant à son implication dans l'entrée d'un nouveau rétrovirus dans les cellules humaines. Dans une récente étude, le virus apparenté au virus de la leucémie Murine Xénotrope (XMRV) a été associé avec le cancer de la prostate (PC) et le syndrome de la fatigue chronique (EM). De ce fait même, les récepteurs à chémokines sont généralement couplés au protéine G (GPCRs) et peuvent facilement être étudiés à l'aide de la spectrométrie cellulaire diélectrique (CDS) comme démontré dans le cadre des travaux de ce mémoire de maîtrise. Ce système permet de déterminer les profils d'impédance (la résistance électrique mesurée en Ohms), qui fournissent des informations sur les activités des voies signalétiques au niveau cellulaires. Il est donc idéal pour mesurer l'impédance des récepteurs couplés au protéine G (GPCR). L'utilisation de la méthode CDS nous a permis d'en apprendre davantage sur le profil de la forme soluble de SMPDL3B en tant qu'agoniste ainsi que de sa spécificité envers le récepteur CCR3.

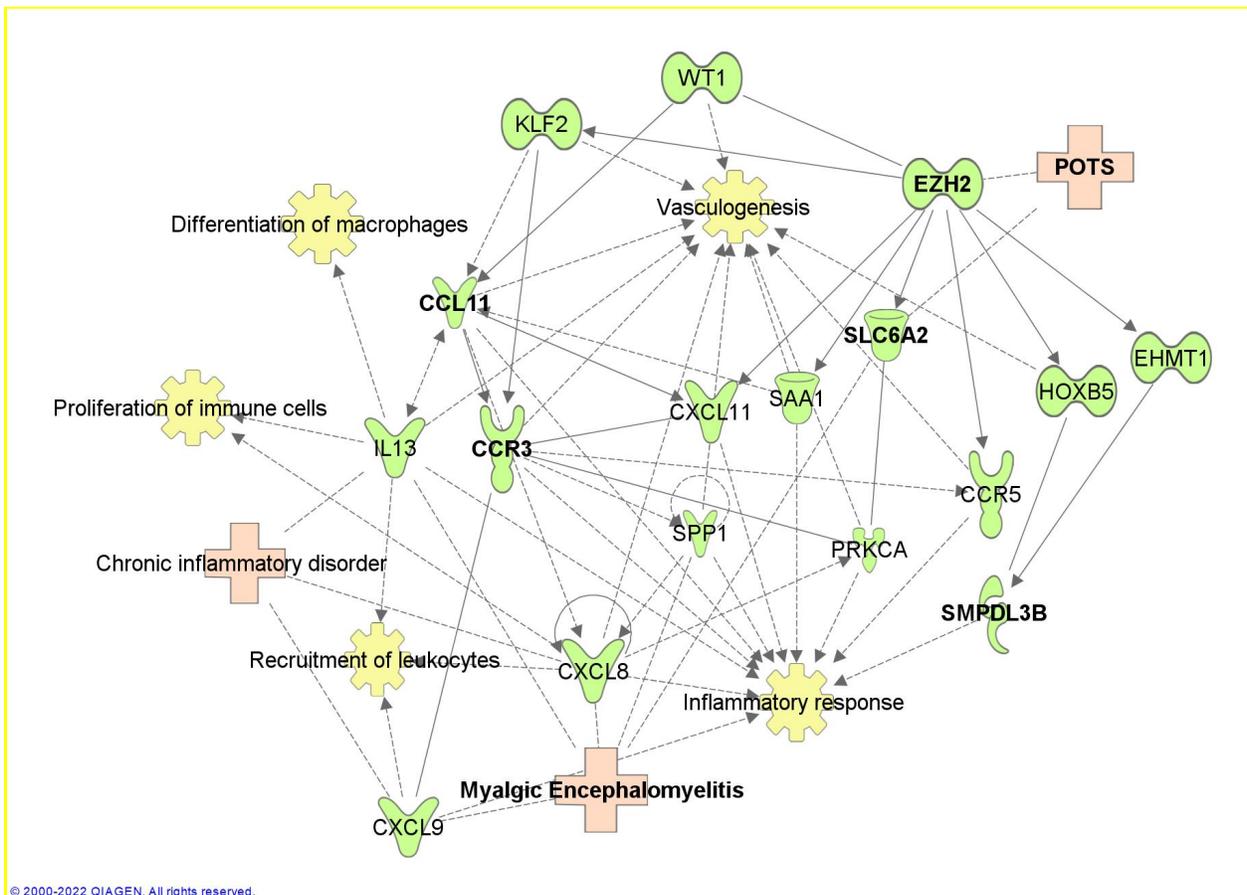


Figure 4. – **Interactions possibles entre CCR3, SMPDL3B et les marqueurs de POTS et analyse des voies des molécules d'intérêt à l'aide de l'Ingenuity Pathway Analysis (IPA).**

Les protéines dans le graphique présenté sont identifiées en vert, les fonctions qui y sont associées en jaune et les maladies qui y sont associées en rose.

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) est une application bio-informatique permettant aux chercheurs d'accéder à des données provenant d'expériences faites à haut débit telles que le séquençage nouvelle génération et impliquant aussi des analyses fonctionnelles. Cette figure créée à l'aide du logiciel IPA a donc permis de mettre en évidence les liens possibles du récepteur CCR3 et de l'agoniste CCL11 avec certaines protéines impliquées chez les personnes atteintes de POTS. La norépinéphrine est anormalement élevée chez les personnes atteintes de POTS, car sa recapture ne se fait pas correctement. La méthyle transférase EZH2 a été introduite plus haut, comme un régulateur transcriptionnel pouvant inhiber l'expression du gène *SLC6A2* codant pour le transporteur de la norépinéphrine (NET). En effet, EZH2 agit sur le facteur de transcription KLF2 en le mettant sous silence (75). KLF2 est un facteur de transcription qui repressé l'expression de plusieurs récepteurs de chimiokines dont le CCR3(76). Si KLF2 est mis à silence chez les patients POTS, cela aura une conséquence sur l'expression du récepteur CCR3 qui ne sera plus régulé et activerait davantage le processus d'inflammation.

## **Pertinence clinique de la protéine SMPDL3B chez les PAEM**

Caractérisée principalement par une extrême fatigue exacerbée après effort, l'EM est une maladie débilitante, invalidante et dévastatrice qui affecte près de 500 milles canadiens. Présentement, il n'existe aucun moyen pour diagnostiquer ou traiter cette maladie dont l'évolution est imprévisible. Il est donc primordial, d'explorer des biomarqueurs et les cibles thérapeutiques potentiels qui pourraient s'avérer essentiels dans des manœuvres visant à prévenir, diagnostiquer, traiter ou améliorer les conditions des personnes atteintes des EM. Ici, nous démontrons pour la première fois la valeur pronostique de SMPDL3B pour l'EM.

Le choix d'orienter notre étude sur la protéine SMPDL3B était guidé sur le fait que, d'une part celle-ci joue un important rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la production des

céramides, et d'autre part le système immunitaire est perturbé et les niveaux plasmatiques de céramides sont dramatiquement réduits chez les personnes atteintes de EM.

Nous avons amorcé notre étude par l'exploration d'un lien possible entre les niveaux plasmatiques en protéine SMPDL3B et les symptômes de l'EM dans deux cohortes indépendantes dont une cohorte canadienne et une cohorte norvégienne.

Dans la cohorte canadienne nous avons trouvé des hauts niveaux plasmatiques de SMPDL3B chez les patients présentant les symptômes sévères tels que, des troubles physiques, une fatigue générale, une fatigue physique, une diminution de l'activité, et le malaise après effort. Ces symptômes étaient plus présents chez les patients avec des niveaux plasmatiques de SMPDL3B excédant 27 ng/mL. Ces résultats étaient validés avec la cohorte norvégienne.

Il était particulièrement intéressant de noter que dans les deux cohortes, les patients EM avec POTS exhibaient des teneurs plasmatiques de SMPDL3B beaucoup plus élevées que celles retrouvées chez les patients présentant d'autres symptômes. Cet aspect est d'autant plus important que le POTS est un syndrome regroupant une combinaison de symptômes beaucoup plus sévères incluant une augmentation de la fréquence cardiaque, des étourdissements, la fatigue et surtout l'intolérance orthostatique. Donc, dans le contexte de l'EM, POTS représente un état avancé de la maladie. Donc, nos résultats suggèrent que SMPDL3B pourrait être un bon indicateur pronostique et cible thérapeutique dans l'EM.

## **Le potentiel mécanisme d'action de la SMPDL3B dans l'EM**

Une fois le récepteur identifié, il était devenu primordial de déterminer la nature de cette interaction, notamment d'examiner s'il s'agit d'une interaction directe ou indirecte. Dans notre approche méthodologique faisant recours à l'immunoprécipitation, nous avons jugé pertinent d'utiliser le DSP (dithiobis (succinimidyl propionate)). Cet agent permettrait de maintenir les deux composés ensemble dans le cas où il y'aurait faible interaction directe entre les deux acteurs et que cette interaction serait transitoire. Dans cette partie expérimentale, nous avons utilisé la forme non taguée de SMPDL3B recombinant et, comme contrôle positif, nous avons utilisé CCL11 qui est l'agoniste spécifique de CCR3. Dans la procédure expérimentale, les cellules Jurkat étaient traitées séparément avec SMPDL3B ou CCL11. Ces cellules expriment CCR3 sur leurs membranes

plasmiques (77). Dans les deux cas, DSP était ajouté dès le début ou 15 min après le début du traitement. L'immunoprécipitation était ensuite effectuée avec CCR3. Notre approche était validée par la présence de CCL11 dans les précipités de CCR3. En effet, l'immunoblot réalisé avec les précipités de CCR3 nous permis d'observer les bandes assignées à CCL11 sur les films résultants. Cependant, l'intensité était plus grande dans les bandes correspondant au début du traitement. Il était particulièrement intéressant d'observer le même profil avec SMPDL3B. Ces résultats étaient une indication claire d'une interaction directe entre SMPDL3B et CCR3. La diminution remarquable de l'intensité des bandes aussi bien pour CCL11 que pour SMPDL3B observée à 15 min après le début du traitement, suggère une internalisation du complexe.

Classiquement, après interaction à la surface membranaire, le complexe ligand-récepteur est internalisé dans les endosomes précoces. C'est dans ce compartiment subcellulaire que le récepteur se dissocie du ligand. Après cette dissociation, et dépendamment de la nature du récepteur, ce dernier peut soit se diriger vers la membrane pour le recyclage, soit être acheminés vers les endosomes tardifs et dans les lysosomes pour une dégradation subséquente (78).

Il était intéressant de voir que le niveau de CCR3 était identique à T0 et à T15 pour la protéine SMPDL3B. Ce qui laissait anticiper que le récepteur CCR3 n'était pas dans un processus de dégradation au bout de 15 min de stimulation. Par contre, la faible intensité de CCL11 ou SMPDL3B notée à ce temps précis relativement à T0, nous a amené à suggérer qu'à T15, le complexe ligand-CCR3 se trouve dans les endosomes de recyclage. Cette suggestion est en accord avec des études antérieures qui ont montré par microscopie confocale que le récepteur CCR3 subit une internalisation rapide et prolongée dans le compartiment de l'endosome précoce suite à sa liaison avec un ligand (79).

Il est bien connu que l'importance fonctionnelle de l'internalisation du complexe ligand-récepteur et la fonction spécifique de cette internalisation varient considérablement entre les récepteurs. Pour certains, ce phénomène est impliqué dans la désensibilisation pour d'autres, il est plutôt important pour la signalisation. Par exemple, l'internalisation a été impliquée pour la sensibilisation et l'activation de la voie des MAP kinases via le récepteur  $\beta$ 2-adrénérique, mais pas pour la désensibilisation de ce récepteur (80, 81). En revanche, l'internalisation de CXCR2 est nécessaire

pour certaines fonctions biologiques comme la chimiotaxie, mais pas pour l'activation des MAP kinases (82).

Dans le cas du récepteur CCR3, il a été démontré que l'internalisation de ce récepteur ne cause pas sa désensibilisation mais est plutôt critique pour la signalisation médiée à travers ce récepteur et certaines réponses fonctionnelles, dont la polymérisation de l'actine (83).

Conséquemment, la démonstration d'une interaction directe entre SMPDL3B avec CCR3 pouvant mener à l'internalisation de ce récepteur est d'une grande importance dans le contexte de l'EM. En effet, la présente étude a révélé des hauts niveaux plasmatiques de SMPDL3B chez les patients EM sévèrement affectés comparativement aux patients affectés de façon modérée, suggérant un rôle important de l'activation de CCR3 dans la progression et non dans la phase précoce de la maladie. Cette hypothèse est soutenue par la démonstration récente d'une corrélation positive entre les niveaux plasmatiques de CCL11 et la sévérité de EM (37).

Par ailleurs, nous avons observé que le blocage du récepteur CCR3 par la molécule SB-328437, son antagoniste spécifique, causait une augmentation de la réponse cellulaire induite par le plasma contenant les hauts niveaux de SMPDL3B. La possibilité que cette réponse soit induite par un autre composant plasmatique était exclue par l'absence de réponse au plasma dépourvu de SMPDL3B. Cette ambivalence laisse suggérer que l'inhibition de CCR3 ou la compétition des sites de liaison sur ce récepteur favorise l'interaction de SMPDL3B avec d'autres récepteurs ou d'autres facteurs pour amplifier les symptômes chez les patients EM. À cet égard, il a été rapporté que SMPDL3B interfère directement avec l'isoforme beta du récepteur de l'insuline, altérant ainsi sa signalisation (66). SMPDL3B peut aussi interagir directement avec CIP ou CERK et affecter la fonction de CERK puis influencer la modulation des lipides membranaires et la modification de la fluidité membranaire (52, 64). Ainsi, sur la base des résultats rapportés par Montoya et ses collègues (37), combinés avec les résultats obtenus dans la présente étude, il est tentant de spéculer que la sévérité des symptômes de l'EM est, en partie, une conséquence de la synergie des effets de CCL11 et SMPDL3B agissant séparément sur différents phénomènes biologiques. Concrètement, chez les patients EM sévèrement affectés et présentant simultanément des hauts niveaux de CCL11 et SMPDL3B, il est possible que CCL11 qui a plus d'affinité pour CCR3 réduise la possibilité de SMPDL3B d'interagir avec CCR3, favorisant ainsi l'action de SMPDL3B sur d'autres facteurs.

Cette hypothèse peut être soutenue par nos résultats montrant des hauts niveaux de SMPDL3B principalement chez des patients EM présentant l'intolérance orthostatique qui est un symptôme plus associé avec des perturbations vasculaires. Ce qui pourrait être une conséquence de l'effet de SMPDL3B sur la structure membranaire pendant que des troubles associés à la stimulation de CCR3 comme l'inflammation et la douleur subséquente (83), résulteraient de l'occupation de ce récepteur par CCL11. Toutefois, la détermination des niveaux de CCL11 et SMPDL3B dans les mêmes conditions chez les mêmes patients présentant ce symptôme, est requise pour confirmer cette hypothèse.

Un des aspects intéressants dans la présente étude était la démonstration que les œstrogènes induisent une augmentation des niveaux plasmatiques de SMPDL3B. En effet, bien que l'EM est observé dans toutes les tranches d'âge et dans les deux sexes, l'EM est plus prévalente chez les femmes jeunes et d'âge moyen. Dans le cadre de cette étude, tous les patients impliqués étaient âgés de 18 ans ou plus. Nous avons trouvé que les niveaux circulants de SMPDL3B étaient plus élevés chez les femmes comparativement aux hommes. De plus, parmi les femmes affectées, ces niveaux circulants de SMPDL3B étaient plus élevés chez les patientes plus jeunes puis déclinaient avec l'âge. Les femmes dans la tranche d'âge de 18 à 30 ans exhibaient des plus hauts niveaux de SMPDL3B dans leur plasma par rapport aux femmes dans la tranche d'âge de 50 ans et plus. Nous avons alors pensé que l'œstrogène pourrait contribuer à ce profil différentiel des niveaux circulants de SMPDL3B selon le sexe et selon l'âge. Le traitement des cellules Jurkat avec l'œstrogène, nous a permis de découvrir que l'œstrogène augmente la teneur membranaire de SMPDL3B et son relargage, suggérant un rôle de l'œstrogène dans la synthèse de SMPDL3B et son clivage. D'autres études sont requises pour examiner ces aspects. Néanmoins, la présente étude permet de lier les œstrogènes à la prévalence de l'EM parmi les femmes jeunes d'âge moyen.

## **Perspectives**

Dans le besoin urgent de trouver des traitements efficaces pour soulager des personnes atteintes de EM, Dr Fluge et son équipe ont récemment évalué le Rituximab dans un essai clinique de phase 3 sur une durée de 24 mois. Malheureusement, cet essai s'est soldé par un échec car le Rituximab n'a induit aucune amélioration chez les patients l'ayant reçu comparativement aux patients traités avec le placebo. Le groupe Rituximab et le groupe placebo ne différaient pas en termes de score de

fatigue ou d'aucun des critères d'évaluation. De plus, les deux groupes présentaient des effets secondaires graves avec un nombre de cas légèrement plus élevé dans le groupe Rituximab (69).

Le Rituximab est généralement utilisé pour traiter certains cancers et maladies auto-immunes, ainsi que des affections rénales. Cet anticorps monoclonal est bien connu pour son action immunorégulatrice consistant à causer la déplétion des lymphocytes B en ciblant l'antigène CD20 à la surface de ces cellules (84). Toutefois, il a été rapporté que Rituximab peut également agir par une action immuno-indépendante. En effet, Fornoli et ses collègues ont démontré que Rituximab peut empêcher le remodelage de l'actine des podocytes et altérer la fonction de ces cellules en stabilisant SMPDL3B (63). Cette action immuno-indépendante de Rituximab suscite un intérêt particulier eu égard aux résultats présentés dans ce mémoire. Il serait important de d'examiner si l'effet stabilisateur du Rituximab sur la protéine SMPDL3B augmente ou réduit son clivage et conséquemment les niveaux circulants de sa forme libre. Il serait également important d'examiner l'effet des composants du placebo utilisé dans l'étude de Dr Fluge, notamment l'albumine, le sodium caprylate ou le N-acétyl tryptophane, sur la production et le largage de SMPDL3B. Ces études permettraient de tester l'hypothèse que la forme clivée de la protéine SMPDL3B est peut-être le principal facteur impliqué dans la pathogenèse de l'EM. D'autres études sont également requises pour mieux comprendre le mode d'action de la forme soluble de la protéine SMPDL3B. En effet, il serait important non seulement de savoir si la protéine SMPDL3B peut interagir avec d'autres types de récepteurs de chimiokine ou d'autres classes de récepteurs couplé aux protéines G, mais aussi de caractériser la signalisation induite par SMPDL3B en identifiant les facteurs impliqués en aval.

Il serait également nécessaire d'évaluer la spécificité de la nature pronostique de SMPDL3B pour EM en étendant les investigations à d'autres affections, notamment les troubles neurologiques, les troubles endocriniens, les maladies auto-immunes et FM, dont bon nombre de symptômes sont communs à ceux de EM.



## **Chapitre 4 – Conclusion**

En conclusion, les résultats de ce projet de maîtrise offrent une nouvelle perspective d'investigation pour la compréhension du processus mécanistique associé à la sévérité de l'EM. Ces résultats révèlent que la protéine SMPDL3B et notamment sa forme clivée participent activement dans la pathophysiologie de l'EM. En effet, nous avons réussi à montrer une association entre la sévérité des symptômes de EM et les hauts niveaux plasmatiques de SMPDL3B avec un profil qui variait selon l'âge. Ce profil différentiel des niveaux circulants de SMPDL3B était causé par l'effet de l'œstrogène probablement sur la production de SMPDL3B et sur son clivage. Nous avons observé que les œstrogènes augmentent la teneur membranaire et plasmatique en protéine SMPDL3B contribuant ainsi aux effets néfastes associés à son accumulation. Toutefois, on ne peut exclure que les effets observés de la forme clivée de la protéine SMPDL3B sont potentialisés par les niveaux circulants en chimiokine CCL11 et la biodisponibilité du récepteur CCR3.















## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Carol EM. How the IRSC-NP works. *Calif Nurse*. 1986;82(10):6.
2. PHAo C. 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>].
3. CIHR-IRSC. Working with patients and their families to improve health outcomes for people living with ME/CFS 2019 [Available from: <https://cihr-irsc.gc.ca/e/51074.html>].
4. Fluge O, 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.
5. Canada Go. Chronic Fatigue Syndrome (Myalgic Encephalomyelitis) 2019 [updated 2019-02-14. Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/chronic-diseases/chronic-fatigue-syndrome-myalgic-encephalomyelitis.html>].
6. Canada OMF. Qu'est-ce que l'EM 2022 [Available from: <https://www.omfcanada.ngo/quest-ce-que-lem-sfc/?lang=fr>].
7. Walsh CM, Zainal NZ, Middleton SJ, Paykel ES. A family history study of chronic fatigue syndrome. *Psychiatr Genet*. 2001;11(3):123-8.
8. 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).
9. Rasa S, Nora-Krukke 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.
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. Hunt J, Blease C, Geraghty KJ. Long Covid at the crossroads: Comparisons and lessons from the treatment of patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS). *J Health Psychol*. 2022:13591053221084494.
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, Schmalting K, Sullivan P, et al. A twin study of chronic fatigue. *Psychosom Med*. 2001;63(6):936-43.
14. Crawley E, Davey Smith G. Is chronic fatigue syndrome (CFS/ME) heritable in children, and if so, why does it matter? *Arch Dis Child*. 2007;92(12):1058-61.
15. Corfield EC, Martin NG, Nyholt DR. Familiality and Heritability of Fatigue in an Australian Twin Sample. *Twin Res Hum Genet*. 2017;20(3):208-15.
16. Rajeevan MS, Dimulescu I, Murray J, Falkenberg VR, Unger ER. Pathway-focused genetic evaluation of immune and inflammation related genes with chronic fatigue syndrome. *Hum Immunol*. 2015;76(8):553-60.

17. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol*. 2005;58(8):826-32.
18. Yang CA, Bauer S, Ho YC, Sotzny F, Chang JG, Scheibenbogen C. The expression signature of very long non-coding RNA in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J Transl Med*. 2018;16(1):231.
19. Chang YS, Lee YT, Yen JC, Chang YC, Lin LL, Chan WL, et al. Long Noncoding RNA NTT Context-Dependently Regulates MYB by Interacting With Activated Complex in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Front Oncol*. 2021;11:592045.
20. Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Briere C. [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20(10):894-8.
21. Baulande S, Criqui A, Duthieuw M. [Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(3):289-96.
22. Moneghetti KJ, Skhiri M, Contrepolis K, Kobayashi Y, Maecker H, Davis M, et al. Value of Circulating Cytokine Profiling During Submaximal Exercise Testing in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Sci Rep*. 2018;8(1):2779.
23. Missailidis D, Annesley SJ, Fisher PR. Pathological Mechanisms Underlying Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3).
24. 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*. 2017;5(4):215-30.
25. 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.
26. 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.
27. Hu H, Baines C. Recent insights into 3 underrecognized conditions: Myalgic encephalomyelitis-chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and environmental sensitivities-multiple chemical sensitivity. *Can Fam Physician*. 2018;64(6):413-5.
28. 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.
29. Fedorowski A. Postural orthostatic tachycardia syndrome: clinical presentation, aetiology and management. *J Intern Med*. 2019;285(4):352-66.
30. Fuite J, Vernon SD, Broderick G. Neuroendocrine and immune network re-modeling in chronic fatigue syndrome: an exploratory analysis. *Genomics*. 2008;92(6):393-9.
31. 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.
32. VanElzakker MB, Brumfield SA, Lara Mejia PS. Neuroinflammation and Cytokines in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS): A Critical Review of Research Methods. *Front Neurol*. 2018;9:1033.
33. 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.

34. Tomas C, Newton J, Watson S. A review of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in chronic fatigue syndrome. *ISRN Neurosci*. 2013;2013:784520.
35. Torres-Harding S SM, 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.
36. Lopez C, Antoni M, Penedo F, Weiss D, Cruess S, Segotas MC, 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.
37. Montoya JG, Holmes TH, Anderson JN, Maecker HT, Rosenberg-Hasson Y, Valencia IJ, et al. Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(34):E7150-E8.
38. 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).
39. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
40. 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.
41. Filion Y. L'encéphalomyélite myalgique ou syndrome de la fatigue chronique. Du mythe à la réalité. . Multimondes, editor. Québec, Canada2005.
42. Amekran Y, Damoun N, Hangouche AJE. Postural orthostatic tachycardia syndrome and post-acute COVID-19. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2022;2022(1-2):e202213.
43. Stewart JM. Common syndromes of orthostatic intolerance. *Pediatrics*. 2013;131(5):968-80.
44. Sheffler ZM, Reddy V, Pillarisetty LS. Physiology, Neurotransmitters. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.
45. 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.
46. 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.
47. Arnold AC, Ng J, Raj SR. Postural tachycardia syndrome - Diagnosis, physiology, and prognosis. *Auton Neurosci*. 2018;215:3-11.
48. Ivancsits S, Heider A, Rudiger 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.
49. Kaipananickal H, Waheed Khan A, 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.

50. Nagy-Szakal D, Barupal DK, Lee B, Che X, Williams BL, Kahn EJR, et al. Insights into myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome phenotypes through comprehensive metabolomics. *Sci Rep.* 2018;8(1):10056.
51. Bezombes C, Grazide S, Garret C, Fabre C, Quillet-Mary A, Muller S, et al. Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains. *Blood.* 2004;104(4):1166-73.
52. Mallela SK, Mitrofanova A, Merscher S, Fornoni A. Regulation of the amount of ceramide-1-phosphate synthesized in differentiated human podocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2019;1864(12):158517.
53. Fan W, Tang S, Fan X, Fang Y, Xu X, Li L, et al. SIRT1 regulates sphingolipid metabolism and neural differentiation of mouse embryonic stem cells through c-Myc-SMPDL3B. *Elife.* 2021;10.
54. 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):E5472-80.
55. Couttas TA, Kain N, Daniels B, Lim XY, Shepherd C, Kril J, et al. Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:9.
56. Heinz LX, Baumann CL, Koberlin MS, Snijder B, Gawish R, Shui G, et al. The Lipid-Modifying Enzyme SMPDL3B Negatively Regulates Innate Immunity. *Cell Rep.* 2015;11(12):1919-28.
57. Min-DeBartolo J, Schlerman F, Akare S, Wang J, McMahon J, Zhan Y, et al. Thrombospondin-1 is a critical modulator in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *PLoS One.* 2019;14(12):e0226854.
58. 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.
59. Bansal AS, Bradley AS, Bishop KN, Kiani-Alikhan S, Ford B. Chronic fatigue syndrome, the immune system and viral infection. *Brain Behav Immun.* 2012;26(1):24-31.
60. Morris G, Maes M. Oxidative and Nitrosative Stress and Immune-Inflammatory Pathways in Patients with Myalgic Encephalomyelitis (ME)/Chronic Fatigue Syndrome (CFS). *Curr Neuropharmacol.* 2014;12(2):168-85.
61. Roerink ME, Knoop H, Bredie SJ, Heijnen M, Joosten LA, Netea MG, et al. Cytokine inhibition in chronic fatigue syndrome patients: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015;16:439.
62. ter Wolbeek M, van Doornen LJ, Kavelaars A, van de Putte EM, Schedlowski M, Heijnen CJ. Longitudinal analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine production in severely fatigued adolescents. *Brain Behav Immun.* 2007;21(8):1063-74.
63. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguilon-Prada R, Jauregui AN, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Transl Med.* 2011;3(85):85ra46.
64. Yoo TH, Pedigo CE, Guzman J, Correa-Medina M, Wei C, Villarreal R, et al. Sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b expression levels determine podocyte injury phenotypes in glomerular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(1):133-47.

65. Ochi A, Takei T, Nakayama K, Iwasaki C, Kamei D, Tsuruta Y, et al. Rituximab treatment for adult patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Intern Med.* 2012;51(7):759-62.
66. Mitrofanova A, Mallela SK, Ducasa GM, Yoo TH, Rosenfeld-Gur E, Zelnik ID, et al. SMPDL3b modulates insulin receptor signaling in diabetic kidney disease. *Nat Commun.* 2019;10(1):2692.
67. Fujihara Y, Ikawa M. GPI-AP release in cellular, developmental, and reproductive biology. *J Lipid Res.* 2016;57(4):538-45.
68. Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(4):409-17.
69. Park S, Lee C, Sabharwal P, Zhang M, Meyers CL, Sockanathan S. GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK. *Science.* 2013;339(6117):324-8.
70. Schlauch KA, Khaiboullina SF, De Meirleir KL, Rawat S, Petereit J, Rizvanov AA, et al. Genome-wide association analysis identifies genetic variations in subjects with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Transl Psychiatry.* 2016;6:e730.
71. 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.
72. Takahashi Y, Ikezumi Y, Saitoh A. Rituximab protects podocytes and exerts anti-proteinuric effects in rat adriamycin-induced nephropathy independent of B-lymphocytes. *Nephrology (Carlton).* 2017;22(1):49-57.
73. 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.
74. Oughtred R, Rust J, Chang C, Breitskreutz BJ, Stark C, Willems A, et al. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci.* 2021;30(1):187-200.
75. Taniguchi H, Jacinto FV, Villanueva A, Fernandez AF, Yamamoto H, Carmona FJ, et al. Silencing of Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. *Oncogene.* 2012;31(15):1988-94.
76. Sebzda E, Zou Z, Lee JS, Wang T, Kahn ML. Transcription factor KLF2 regulates the migration of naive T cells by restricting chemokine receptor expression patterns. *Nat Immunol.* 2008;9(3):292-300.
77. Willems LI, Ijzerman AP. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. *Med Res Rev.* 2010;30(5):778-817.
78. Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* 1997;322 ( Pt 1):1-18.
79. Zimmermann N, Conkright JJ, Rothenberg ME. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization. *J Biol Chem.* 1999;274(18):12611-8.
80. Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, et al. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1998;273(2):685-8.
81. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1993;268(1):337-41.

82. Yang W, Wang D, Richmond A. Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction. *J Biol Chem.* 1999;274(16):11328-33.
83. Zimmermann N, Rothenberg ME. Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1):97-105.
84. Dogra S, Kaskel F. Steroid-resistant nephrotic syndrome: a persistent challenge for pediatric nephrology. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(6):965-74.