



HAL
open science

Physiopathologie d'un modèle murin knock-in d'une mutation du gène BAG3 responsable d'insuffisance cardiaque humaine

Océane Piedallu

► **To cite this version:**

Océane Piedallu. Physiopathologie d'un modèle murin knock-in d'une mutation du gène BAG3 responsable d'insuffisance cardiaque humaine. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUL079 . tel-04713645

HAL Id: tel-04713645

<https://theses.hal.science/tel-04713645v1>

Submitted on 29 Sep 2024

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

École doctorale Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique - ED 394

Réalisée au sein de l'unité de recherche INSERM UMR_S 1166

Dans l'Équipe 1 « Génomique et physiopathologie des maladies du myocarde »

Physiopathologie d'un modèle murin knock-in d'une mutation du gène BAG3 responsable d'insuffisance cardiaque humaine

Par Océane PIEDALLU

Sous la direction du Dr. Éric VILLARD

Présentée et soutenue publiquement le 27 mars 2024

Devant le jury composé de :

Sonia-Athina KARABINA

Présidente du jury

Florence PINET

Rapportrice

Franck LEZOUALC'H

Rapporteur

Gisèle BONNE

Examinatrice

Mathias MERICKSKAY

Examineur

Éric VILLARD

Directeur de thèse

« Chaque difficulté rencontrée doit être l'occasion d'un nouveau progrès. »

Pierre de Coubertin

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse. Je remercie le Pr. Sonia-Athina KARABINA pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de ma soutenance de thèse. Je remercie également mes deux rapporteurs, le Dr. Florence PINET et le Dr. Frank LEZOUALC'H, d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit de thèse. Merci également à mes deux examinateurs, le Dr. Gisèle BONNE et le Dr. Mathias MERICKSKAY, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer mon travail.

Je remercie le Pr. Stéphane HATEM de m'avoir accueillie dans son unité de recherche.

Je remercie également le Pr. Philippe CHARRON de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 1 et d'avoir apporté son expertise et ses conseils tout au long de ce projet, notamment sur les caractéristiques des CMD humaines qui impliquent des mutations du gène *BAG3*.

Merci au Dr. Éric VILLARD d'avoir dirigé ce travail, de m'avoir fait confiance et donner l'opportunité de faire une thèse.

Je souhaite également remercier toutes les personnes ayant participé à ce projet de thèse. Je remercie particulièrement le Dr. Nathalie MOUGENOT pour avoir réalisé l'ensemble des échocardiographies relatives à ce projet de thèse et pour m'avoir formé à cette technique. Je remercie également l'ensemble du personnel des animaleries, en particulier Maria MIHOC, sans lesquels ce projet n'aurait pas pu aboutir.

Je remercie également le Dr. Lieng TAING pour avoir effectué l'ensemble des analyses de nos RNA-seq, pour ses conseils et surtout son aide précieuse dans l'utilisation de divers outils informatiques nécessaires à l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie le Dr. Perrine DEVOS pour avoir initié le travail sur le projet de la thérapie génique impliquant le gène *BAG3* lors de son stage de M2 au sein de notre équipe.

Je tiens à remercier l'équipe de la plateforme P3S, notamment le Dr. Solenne CHARDONNET, Cédric PIONNEAU et David GINGUENE, pour avoir réalisé notre analyse de protéomique ainsi que pour leur expertise et conseils lorsque l'interprétation de nos résultats s'est avérée plus complexe que nous le pensions initialement.

Merci aux membres de la plateforme de iGenSeq pour avoir généré nos datas de RNA-Seq et à Morgane LE GALL de la plateforme PROTEOM'IC pour son expertise avec le logiciel IPA ainsi que pour sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie le Dr. Marie Lhomme et le Dr. Maharajah PONNAIAH de la plateforme de lipidomique de l'ICAN pour avoir réalisé notre analyse de lipidomique.

Je tiens maintenant à remercier toutes les personnes de mon équipe, Laëtitia, Claire, Flavie, Nathalie N., Sophie G., Arnaud et Pascale, pour leur aide, leurs conseils et leur soutien durant mes années de thèse.

Merci à Émeline et Amandine, pour m'avoir secondée dans mon travail lors de leur stage respectif au sein de notre unité de recherche.

Je remercie également tous les membres des autres équipes qui sont intervenus d'une manière ou d'une autre dans mon projet de thèse, que ce soit pour apporter leur expertise ou pour me former à une technique particulière. Je remercie particulièrement Fabrice, Gilles, Canelle, Veronica, Sophie B., Élise, Sophie N., Nadine, Élodie, Camille, Eva et Angèle.

Je remercie également le secrétariat de l'U1166, notamment Angélique, Nathalie A. et Estelle, pour leur aide et leurs conseils.

Un grand merci à toutes les personnes ayant contribué à l'ambiance conviviale de notre unité et aux discussions animées dans la salle de repos du 3^{ème} étage, que ce soit lors du repas du midi ou autour d'un apéro en début de soirée !

Je tiens maintenant à remercier les membres de la TEAM M'BOP, Brice, Marie et Pierre, sans lesquels cette thèse aurait été très différente. Merci pour votre amitié, pour tous les moments que l'on a pu partager et surtout votre soutien sans faille. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. Marie, merci pour ta joie de vivre et ton sourire au quotidien, pour avoir été mon binôme de zumba/yoga pendant presque 2 ans et également pour toutes nos poses thé et nos discussions. En tant que doctorante, merci de m'avoir montré la marche à suivre, tu as plus d'une fois été une source d'inspiration pour moi. Pierre, merci pour ta gentillesse, tes conseils et ton optimisme à toute épreuve. Tu as bien souvent réussi à trouver les bons mots afin d'apporter de la lumière au bout du tunnel. Nos discussions dans ton box EHT avec Marie font partie de mes meilleurs souvenirs ! Brice, ton sens de l'humour restera à jamais culte au sein de l'U1166 ! La vie au laboratoire n'était plus la même après vos départs respectifs.

J'ai une pensée particulière pour tous les futurs docteurs de l'U1166 avec lesquels j'ai pu interagir, Chloé, Marine, Laëtitia, Dounia, Pauline, Canelle, Margaux, Caroline, Raoul et Dominique, bon courage pour la fin de votre thèse !

Merci à Julie, je suis tellement contente de t'avoir comme amie, je ne pense pas rencontrer un jour quelqu'un qui me comprenne aussi bien que toi ! Ta franchise et nos moments passés ensemble sont toujours pour moi une bouffée d'air frais. Tu ne t'en rends peut-être pas compte mais ton dévouement, ta force et ta persévérance ont toujours été pour moi une source d'inspiration.

Finalement, je tiens à remercier ma famille. Merci à mon petit frère, Quentin, pour tous nos moments de partage, qui compte pour moi plus que tu ne le crois. Ces dernières années ont été difficiles pour nous deux mais j'espère que tu es aussi fier de moi que je suis fière de toi.

Mamie, merci pour ton amour et surtout pour tous nos fous rires avec Maman lorsque nous sommes toutes réunies. Merci pour ton soutien, je sais que tu penseras fort à moi le jour J.

Merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont permis de faire des études supérieures. Vous avez toujours fait en sorte que je ne manque de rien et que je puisse poursuivre les études de mon choix dans les meilleures conditions possibles et cela, peu importe le coût que cela vous imposait. J'ai peut-être gravi toute seule les échelons de l'enseignement supérieur, mais si j'en suis arrivée jusqu'ici aujourd'hui c'est grâce à vous.

Papa, merci pour ton amour et ton soutien, même s'il est parfois maladroit. Merci d'avoir pris soin de moi à ta façon, comme par exemple me faire plaisir en faisant en sorte d'avoir mes aliments favoris lorsque je rentre à la maison.

Maman, merci d'avoir veiller sur moi. Tu as fait beaucoup de concessions durant ces années de thèse alors que tes journées sont déjà bien remplies, comme les innombrables aller-retours entre la maison et Paris, la relecture de mon manuscrit ou encore la préparation de la fin de ma thèse. Tu es pour moi un soutien au quotidien et mon pilier émotionnel, ma réussite c'est aussi la tienne.

Je voudrais finir ces remerciements avec une pensée pour ceux qui n'ont pas pu voir l'aboutissement de toutes ces années d'études. Pépé, granny, j'espère cependant que cela vous aurait rendu fier de votre petite-fille.

INTRODUCTION.....	18
CHAPITRE 1 – L’INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	19
I. LE MUSCLE CARDIAQUE.....	19
a. Anatomie du cœur.....	19
b. Le cycle cardiaque	20
II. L’INSUFFISANCE CARDIAQUE.....	22
a. Définition.....	22
b. Étiologie.....	23
c. Modèles d’études.....	25
CHAPITRE 2 – LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE.....	28
I. CLASSIFICATION DES CARDIOMYOPATHIES.....	28
a. La cardiomyopathie hypertrophique.....	29
b. La cardiomyopathie restrictive.....	30
c. La cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit	30
d. La non-compaction du ventricule gauche	31
e. La cardiomyopathie dilatée.....	31
II. CARATÉRISTIQUES DE LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE.....	31
a. Manifestations cliniques	32
b. Évolution et traitement	34
c. Outils de diagnostic	34
d. Etiologie.....	36
III. GÉNÉTIQUE DE LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE	37
a. Formes familiales et sporadiques.....	37
b. Gènes associés aux CMD	38
c. Mécanismes physiopathologiques associés.....	40
IV. RECHERCHE DE LOCI CONTRIBUANT AUX FORMES SPORADIQUES DE CMD.....	50
a. GWAS.....	50
b. Locus ZBTB17/HSPB7/CLCNKA	50
c. Locus BAG3.....	51
d. Mutations de <i>BAG3</i> associées à des formes familiales de CMD	53
CHAPITRE 3 – BAG3, UNE PROTÉINE MULTIFONCTIONNELLE	55
I. MUTATIONS ASSOCIÉES.....	55
a. Haploinsuffisance	55
b. Perte de fonction.....	56
c. Gain de fonction	58
II. STRUCTURE ET FONCTIONS DE BAG3.....	62
a. Généralités sur les membres de la famille BAG	62
b. Généralités sur la structure de BAG3	64
c. BAG3 dans le maintien de la structure du sarcomère.....	67
d. BAG3 dans le métabolisme.....	70
e. BAG3 dans l’adhésion et la migration cellulaire.....	72

f.	BAG3 et stress cellulaire.....	73
g.	BAG3 et apoptose.....	74
h.	L'interaction BAG3/HSP70.....	76
III.	BAG3 ET AUTOPHAGIE.....	79
a.	L'homéostasie protéique.....	81
b.	La machinerie autophagique.....	86
c.	Fonctions de l'autophagie.....	90
d.	L'autophagie sélective : implication de BAG3.....	95
e.	Dialogue entre les systèmes du PQC.....	97
f.	La protéotoxicité et les pathologies cardiaques.....	100
g.	La protéostasie dans les cellules post-mitotiques : implication de BAG3.....	103
h.	BAG3 et pathologies associées.....	105
IV.	CONCLUSION.....	109
	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	110
	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	112
	PROJET I : Etude des conséquences phénotypiques et moléculaires de la mutation	
	<i>Bag3</i>^{V473M} dans un modèle murin.....	113
I.	Modèle d'étude.....	113
a.	Génération de la lignée BAG3 ^{V473M}	113
b.	Génotypage de la lignée BAG3 ^{V473M}	114
II.	Analyses <i>in vivo</i>	114
a.	Echocardiographies.....	114
b.	Modulation de l'autophagie.....	115
c.	Tests de tolérance.....	116
d.	Résonance Magnétique Nucléaire.....	116
III.	Analyses histologiques.....	117
a.	Immunomarquages.....	117
b.	Colorations.....	117
IV.	Analyses biochimiques et biomoléculaire.....	119
a.	Biochimie.....	119
b.	Biologie moléculaire.....	120
V.	Analyses omiques.....	122
a.	Protéomique.....	122
b.	Transcriptomique.....	123
c.	Lipidomique.....	124
d.	Analyses d'enrichissements.....	124
e.	Visualisation des données.....	125
VI.	Analyses statistiques.....	126
	PROJET II : Evaluation de l'effet thérapeutique de la surexpression de <i>Bag3</i> dans un	
	modèle murin de CMD d'origine génétique.....	127

I. Modèle d'étude	127
II. Surexpression de <i>BAG3</i>	127
III. Etude du phénotype cardiaque	128
RÉSULTATS.....	130
PROJET I : Etude des conséquences phénotypiques et moléculaires de la mutation	
<i>Bag3</i>^{V473M} dans un modèle murin.....	131
I. Introduction	131
II. Article : La mutation <i>Bag3</i> ^{V473M} entraîne des altérations de la protéostasie et du métabolisme conduisant à une CMD dans un modèle knock-in murin	132
III. Résultats hors-article	170
a. Réplication du transcriptome cardiaque <i>Bag3</i> ^{V473M/wt} vs. WT	170
b. Evaluation de la tolérance au glucose et à l'insuline chez les souris <i>Bag3</i> ^{V473M/V473M}	171
c. Etude de la signature lipidique chez les souris <i>Bag3</i> ^{V473M/V473M}	171
d. Analyse de trajectoires : <i>Bag3</i> ^{V473M/wt} vs. <i>Bag3</i> ^{V473M/V473M}	172
PROJET II : Evaluation de l'effet thérapeutique de la surexpression de <i>Bag3</i> dans un modèle murin de CMD d'origine génétique.....	183
I. Introduction	183
II. Résultats	184
DISCUSSION	187
CONCLUSION & PERSPECTIVES	195
BIBLIOGRAPHIE	201

Liste des figures

Figure 1. Anatomie du cœur	19
Figure 2. Le cycle cardiaque	21
Figure 3. Schéma global des étiologies relatives à l'HF _r EF et l'HF _p EF.....	24
Figure 4 Les différents types de cardiomyopathie	28
Figure 5. Comparaison histologique de tissus cardiaques de patient sain et atteint de CMD.....	33
Figure 6. Architecture génétique des gènes associés à la CMD.....	38
Figure 7. Causes génétiques de CMD.....	41
Figure 8. Le mécanisme de la contraction musculaire.....	43
Figure 9. Gènes codant les protéines sarcomériques associées à la CMD.....	43
Figure 10. Gènes codant les protéines associées aux échanges ioniques et impliqués dans la CMD	46
Figure 11. Gènes codant les protéines associées à la structure du cardiomyocyte et impliqués dans la CMD.....	48
Figure 12. Manhattan plot centré sur le locus rs10927875.....	51
Figure 13. Manhattan plot centré sur le locus rs2234962.....	52
Figure 14. Variants de BAG3 retrouvés dans des formes familiales de CMD	54
Figure 15. Les conséquences de la mutation BAG3-E455K sur l'interaction avec différents partenaires protéiques	58
Figure 16. Illustration de la répartition des variants identifiés sur la séquence protéique de BAG3.	59
Figure 17. Mécanisme proposé illustrant la séquestration du complexe BAG3-HSP70 au sein d'agrégats en présence de la mutation BAG3-P209L.....	60
Figure 18 : Structure des membres de la famille des protéines BAG humaines	63
Figure 19. Structure et domaines protéiques de BAG3.....	64
Figure 20. Les effets pléiotropes de BAG3	65
Figure 21. Expression tissulaire de chaque exon de Bag3	67
Figure 22. Dégénérescence myofibrillaire chez les souris KO homozygotes Bag3	68
Figure 23. Rôle de BAG3 dans l'exocytose des granules d'insuline	71
Figure 24. Illustration du cycle chaperonne d'HSP70	77
Figure 25. Mécanismes impliquant le complexe BAG3-HSP70.....	79
Figure 26. Vue d'ensemble du réseau participant à l'homéostasie protéique	80

<i>Figure 27. Les différents types d'autophagie.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 28. Les différentes étapes de la macroautophagie.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 29. Vue d'ensemble de la machinerie de l'autophagie.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 30. Le recyclage de composants intracellulaires et leur utilisation dans le maintien de la balance énergétique</i>	<i>90</i>
<i>Figure 31. Production de NADH et FADH2 par le cycle de Krebs</i>	<i>92</i>
<i>Figure 32. Le transport d'électrons et la production d'ATP au sein des mitochondries</i>	<i>92</i>
<i>Figure 33. La machinerie CASA</i>	<i>96</i>
<i>Figure 34. Schéma proposé illustrant le « switch BAG1/BAG3 » dans un modèle d'ischémie cérébrale</i>	<i>99</i>
<i>Figure 35. Mutations de BAG3 identifiées par séquençage chez des cas familiaux de CMD.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 36. Structure des AAV utilisés</i>	<i>127</i>
<i>Figure 37. Projet II – Déroulement expérimental.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 38. Le transcriptome cardiaque de souris Bag3^{V473M/wt} réalisé à un stade précoce de la CMD met en évidence une dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 39. La mutation Bag3-V473M engendre une hypoglycémie, une meilleure sensibilité à l'insuline et une signature lipidique cardiaque enrichie chez les souris mutées.....</i>	<i>177</i>
<i>Figure 40. Analyse de trajectoires basées sur l'expression différentielle des gènes ..</i>	<i>179</i>
<i>Figure 41. Analyse de trajectoire basée sur les voies identifiées par IPA</i>	<i>181</i>
<i>Figure 42. L'expression cardio-spécifique de BAG3 exacerbe l'insuffisance cardiaque dans le modèle de CMD murin LmnaH222P/H222P.....</i>	<i>185</i>
<i>Figure 43. Schéma bilan : les rôles de Bag3 dans l'homéostasie cardiaque en conditions physiologiques</i>	<i>198</i>
<i>Figure 44. Schéma bilan : impact de la mutation Bag3-V473M sur les rôles de Bag3 dans l'homéostasie cardiaque</i>	<i>199</i>

Liste des tables

Table 1. Causes non-génétiques de CMD	36
Table 2. Gènes majeurs impliqués dans la CMD	40
Table 3. Liste des variants tronquants et faux-sens (domaine BAG) de BAG3.....	61
Table 4. Liste des protéines connues pour interagir directement avec	66
Table 5. Modèle murin déficient pour BAG3 et/ou exprimant la mutation Bag3 ^{E455K}	108
Table 7. Préparation de la gamme d'étalonnage	119
Table 8. Projet II – Liste des anticorps utilisés	120
Table 6. Projet II – Liste des amorces d'oligonucléotides	122
Table 9. Projet II – Liste des amorces d'oligonucléotides utilisées en qPCR	128
Table 10. Projet II – Liste des anticorps utilisés	129

Abréviations

A

ADN acide désoxyribonucléique

ADP adenosine diphosphate

ARN acide ribonucléique

AlbZIP androgen-induced bZIP

ARN acide ribonucléique

ATP adenosine triphosphate

B

BAG BCL-2-associated athanogene

BNP brain natriuretic peptide

bZIP basic leucine zipper

C

CAIR calcium influx inhibitor stress

CASA chaperone-associated selective autophagy

CAVD cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit

CM cardiomyopathie

CMA chaperone-mediated autophagy

CMD cardiomyopathie dilatée

CMH cardiomyopathie hypertrophique

CMR cardiomyopathie restrictive

CMs cardiomyocytes

D

DCM dilated cardiomyopathy

E

EGR early growth response

ERK extracellular signal-regulated kinase

F

FBXO f-box protein

FR fraction de raccourcissement

FE fraction d'éjection

G

GWAS genome-wide association studies

H

HFmrEF heart failure with mid-range ejection fraction

HFrEF heart failure with reduced ejection fraction

HFpEF heart failure with preserved ejection fraction

HSC heat shock cognate

HSE heat shock element

HSF heat shock transcription factor

HSP heat shock protein

I

IC insuffisance cardiaque

iPSC induced pluripotent stem cell

IPV isoleucine-proline-valine motif

K

KI knock-in

KO knock-out

N

NIK NFκB-inducing kinase

NFκB nuclear factor-kappa B

NLS nuclear localisation sequence

NCVG non-compaction du ventricule gauche

NMD nonsense-mediated decay

NBD nucleotide-binding domain

P

PLC phospholipase C

PXXP prolin-rich region

R

RE Réticulum endoplasmique

S

SH3 sarcoma homology 3

shARN short hairpin ARN

SNP single nucleotide polymorphism

SBD substrate-binding domain

T

TAC transverse aortic constriction

TAZ transcription regulator protein

TSC tuberous sclerosis protein

U

UBL ubiquitin-like domain

UTR untranslated region

UPS ubiquitin-proteasome system

V

VG ventricule gauche

VTS volume télésystolique

VTD volume télédiastolique

W

WT wilm's tumor

WT wild type

WW tryptophan-tryptophan domain

Y

YAP yes-associated protein

Avant-propos

Les maladies cardiovasculaires englobent l'ensemble des pathologies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles représentent aujourd'hui la première cause de mortalité au niveau mondial et la deuxième en France après les cancers. Grâce à la mise en place de plans de prévention et des avancées thérapeutiques, on observe depuis quatre décennies une baisse de la mortalité et de la morbidité associées aux maladies cardiovasculaires. Cependant, elles restent à l'origine d'environ 140 000 morts par an et l'une des principales causes de morbidité et de consommation de soins, avec plus de 15 millions de personnes traitées pour maladie, risque cardiovasculaire ou diabète selon le Ministère de la Santé et de la Prévention.

Après les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque représente la plus forte prévalence au sein des maladies cardiovasculaires. Elle concernerait environ 1,5 millions de personnes en France, avec une majorité des personnes atteintes âgées de plus de 60 ans. Avec le vieillissement de la population et une exposition croissante aux facteurs de risque cardiovasculaires (tabagisme, consommation d'alcool, sédentarité...) on estime que la fréquence de cette maladie pourrait augmenter de 25% tous les 4 ans. En absence de traitement curatif, plusieurs axes de recherche sont en place afin de permettre une meilleure prise en charge de la maladie.

Notre équipe s'intéresse notamment à l'identification des causes génétiques et des mécanismes associés à la mise en place de la cardiomyopathie dilatée, l'une des principales causes d'insuffisance cardiaque et la première indication de transplantation cardiaque en France. Notre équipe a notamment permis l'identification d'un nouveau gène associé à la cardiomyopathie dilatée : le gène *BAG3*. Maintenant, il nous faut comprendre les conséquences au niveau cellulaire des mutations de ce gène qui sont à l'origine du développement d'une cardiomyopathie dilatée et d'une l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Ce travail de thèse porte donc sur la compréhension et la mise en évidence des mécanismes physiopathologiques impliqués, essentielles au développement de nouvelles cibles thérapeutique et à une meilleure prise en charge de la maladie.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 – L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

I. LE MUSCLE CARDIAQUE

a. Anatomie du cœur

Le cœur est l'un des organes vitaux de l'organisme. Logé dans le médiastin au sein de la cage thoracique, il fonctionne comme une pompe afin d'assurer la circulation sanguine et l'apport en oxygène du corps entier. Il est composé de deux parties séparées, communément appelées « cœur droit » et « cœur gauche ». Chaque partie est composée de deux cavités, une oreillette et un ventricule, séparés par une valve. Les parties droite et gauche du cœur sont séparées par le septum cardiaque, une épaisse cloison musculaire, isolant ainsi la circulation systémique de la circulation pulmonaire (Figure 1). La circulation pulmonaire, également appelée petite circulation, assure l'acheminement du sang entre le cœur et les poumons permettant le renouvellement des gaz du sang. Ainsi, elle transporte le sang désoxygéné vers les poumons au contact des alvéoles pulmonaires afin d'y éliminer le dioxyde de carbone (CO₂) et d'y absorber du dioxygène (O₂).

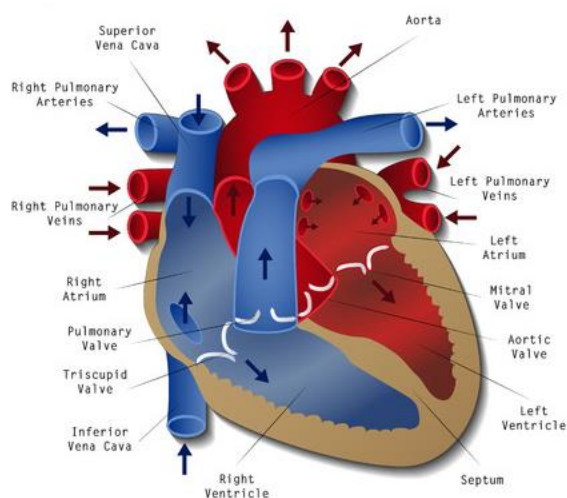


Figure 1. Anatomie du cœur

La paroi cardiaque est composée de trois couches, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épicarde, le myocarde et l'endocarde. Le myocarde, qui constitue l'essentiel de la masse du cœur, est un muscle composé de fibres musculaires striées, les myofibrilles, qui se contractent de manière spontanée et rythmique assurant ainsi la circulation sanguine.

b. Le cycle cardiaque

Le système de conduction électrique du cœur va permettre de coordonner le cycle cardiaque en générant des pulsions électriques afin de réguler les phases de contraction (systole) et relaxation (diastole) du myocarde. Ce système permet d'assurer une synchronisation des différents compartiments cardiaque afin d'assurer une bonne circulation sanguine à travers le corps.

Ainsi le cycle cardiaque peut être divisé en plusieurs phases (Figure 2).

Tout d'abord la diastole ventriculaire correspond au remplissage passif des ventricules, au départ rapide puis lent. Durant cette phase la pression au niveau des oreillettes est plus importante que dans les ventricules, ce qui a pour conséquence l'ouverture des valves auriculo-ventriculaires et l'écoulement du sang des oreillettes vers les ventricules.

Par la suite, les oreillettes vont se contracter (systole auriculaire) et ainsi augmenter la pression intra-auriculaire ce qui va avoir pour conséquence l'éjection complète du sang restant dans les oreillettes vers les ventricules. Le volume de sang contenus dans les ventricules à la fin de la phase de diastole ventriculaire est appelé volume télédiastolique.

Une fois les ventricules remplis, les parois ventriculaires vont se contractées (systole ventriculaire isovolumique), les valves auriculo-ventriculaires vont se refermées suite à l'augmentation de la pression au sein des ventricules.

Une fois que la pression intra-ventriculaire devient supérieure à celles des artères, les valves sigmoïdes vont s'ouvrir afin de laisser passer le sang des ventricules vers les vaisseaux, il s'agit de la phase d'éjection. Le volume de sang contenus dans les ventricules à la fin de la phase de systole ventriculaire est appelé volume télésystolique.

Suite à l'éjection, les parois ventriculaires vont commencer à se relaxer. Il s'agit de la protodiastole, la pression intra-ventriculaire commencer à diminuée mais reste supérieure à celles des artères permettant ainsi aux valves sigmoïdes de restées ouvertes.

Finalement, les valves sigmoïdes vont finir par se refermées, il s'agit de la diastole ventriculaire isovolumique. Par la suite la pression au sein des oreillettes devient supérieure à celles des ventricules ce qui permet de renouveler le cycle.

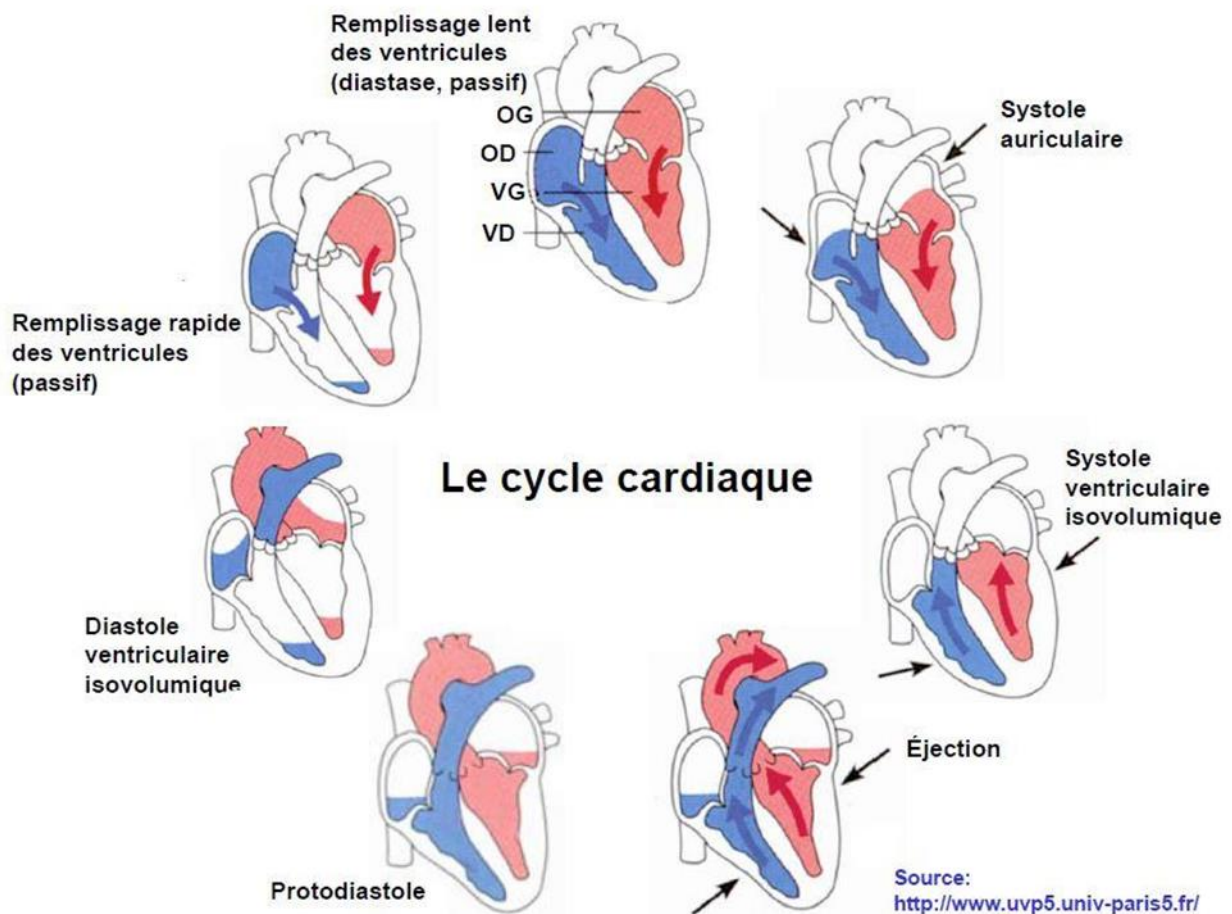


Figure 2. Le cycle cardiaque

OG, oreillette gauche ; OD, oreillette droite ; VG, ventricule gauche ; VD, ventricule droit

A partir des volumes télédiastoliques et télésystoliques, il est possible d'estimer par échocardiographie la fraction d'éjection (FE) qui correspond au pourcentage de volume sanguin éjecté à partir d'une cavité cardiaque lors d'un battement. Chez l'homme, la FE est un paramètre couramment utilisé afin d'évaluer la capacité de contraction du myocarde. En ce qui concerne le ventricule gauche, une FE normale est généralement comprise entre 50 et 70%. Une FE inférieure à 40% est considérée comme réduite et peut descendre jusqu'à 10 - 15% dans le cas d'une dysfonction contractile majeure.

Dans le cas où la FE est diminuée, l'organisme va alors s'adapter afin de maintenir le débit cardiaque : augmenter la fréquence cardiaque ou bien augmenter le volume télédiastolique du ventricule après un remodelage cardiaque. L'augmentation du volume télédiastolique va avoir pour conséquence la dilation du ventricule ce qui va permettre transitoirement

d'améliorer la capacité de contraction cardiaque grâce aux propriétés élastiques des fibres musculaires. Cependant il s'agit de mécanismes d'adaptation délétères au long terme et lorsque ceux-ci s'épuisent, le débit cardiaque diminue et devient insuffisant pour maintenir les besoins de l'organisme, c'est alors que l'insuffisance cardiaque (IC) se met en place.

II. L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

a. Définition

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique, initialement définie par une réduction de la capacité de contraction cardiaque ou bien par une anomalie de la structure/fonction cardiaque aboutissant à un débit cardiaque ou une pression intra-ventriculaire anormale. Le cœur est ainsi incapable d'assurer le débit sanguin nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme en termes d'oxygénation et d'apports énergétiques au niveau des organes.

Depuis 2021, un consensus mondial a été proposé pour définir et classifier l'insuffisance cardiaque ([Bozkurt et al. 2021](#)). L'insuffisance cardiaque est maintenant définie comme un syndrome clinique avec des symptômes et/ou signes issus d'un problème structural et/ou fonctionnel cardiaque associé à une élévation des niveaux d'expression des peptides natriurétiques et/ou à la présence d'œdème au niveau pulmonaire ou systémique.

En se basant sur la fraction d'éjection (FE) du ventricule gauche, l'insuffisance cardiaque peut être classifiée selon trois catégories :

- IC avec réduction de la FE (HFrEF), $FE \leq 40\%$
- IC avec une réduction moyenne de la FE (HFmrEF), $41\% \leq FE \leq 49\%$
- IC avec une FE préservée (HFpEF), $FE \geq 50\%$

L'insuffisance cardiaque a été définie comme une pandémie au niveau mondiale avec près de 64,3 millions de personnes atteintes dans le monde en 2017 ([Global Burden of Disease Study 2017](#)). De nos jours, la prévalence de l'IC est particulièrement élevée chez les personnes de plus de 65 ans car son incidence augmente avec l'âge. Les projections estiment une augmentation de sa prévalence, notamment de la HFpEF, dû à l'amélioration de la prise en charge des personnes atteintes et de l'espérance de vie globalement plus longue de la population générale ([Savarese et al. 2023](#)).

b. Étiologie

L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe et multifactoriel affectant défavorablement la structure et la fonction myocardique, et peut être de causes variables, allant de l'hypertension artérielle à des considérations génétiques, des valvulopathies et des cardiopathies congénitales, des arythmies, des causes toxiques en passant par l'ischémie myocardique et l'infarctus du myocarde ([González-Pacheco et al. 2021](#)). Dans le cas de l'HFpEF, la relaxation du myocarde entre deux cycles cardiaques est réduite ce qui conduit à l'augmentation de la rigidité du ventricule gauche. Cette rigidité, pouvant être attribuée à un surmenage du cœur, va avoir pour conséquence un remplissage anormal de la cavité cardiaque. L'hypertension est le facteur de risque majeur associé à l'HFpEF. D'autres facteurs de risques ont également été attribués à l'HFpEF tels que l'âge, le sexe féminin ainsi que diverses comorbidités comme le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, l'obésité ou le diabète. Les causes plus rares d'HFpEF incluent la cardiomyopathie hypertrophique ainsi que les cardiomyopathies infiltratives comme l'amyloïdose et les maladies causant l'accumulation toxique de fer dans l'organisme telle que l'hémochromatose ([Ziaieian et al. 2016](#)).

Dans le cas de l'HFfrEF, la contraction du ventricule gauche est insuffisante pour maintenir un débit cardiaque normal. Les pathologies chroniques affaiblissant le cœur sont les premières causes d'HFfrEF, telles que les maladies coronariennes, un défaut de structure au niveau des valves cardiaques, les arythmies ou encore les cardiomyopathies (Figure 3). La cardiomyopathie dilatée (CMD) représente l'une des causes d'insuffisance cardiaque, il s'agit d'une pathologie dont l'étiologie est complexe avec une prévalence estimée à 1/2500 dans la population générale. ([Ababio et al. 2023](#)).

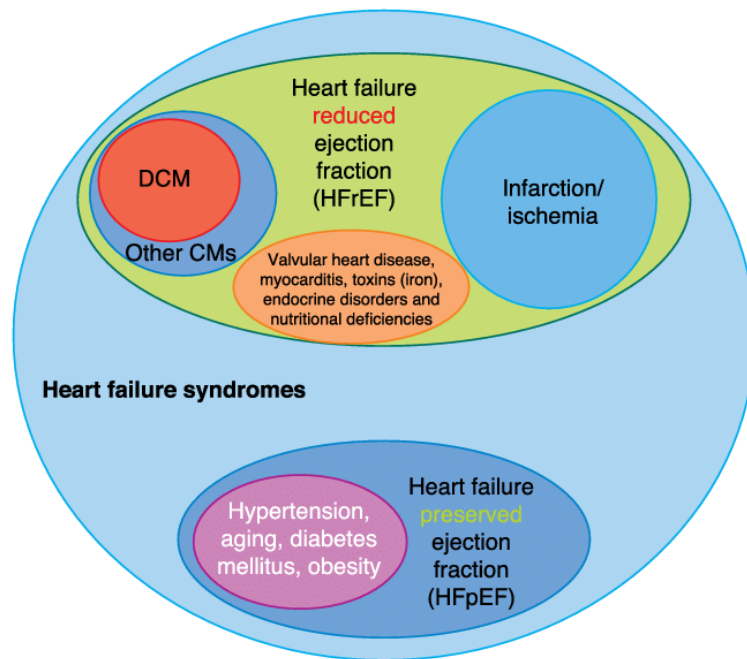


Figure 3. Schéma global des étiologies relatives à l'HFrEF et l'HFpEF (Tiré de [Tayal et al. 2017](#))

Les syndromes d'insuffisance cardiaque englobent les symptômes cliniques et/ou signes d'insuffisance cardiaque et de dysfonctionnement myocardique. Cela peut se produire dans le cas d'une fraction d'éjection ventriculaire gauche réduite (HFrEF) ou préservée (HFpEF). La cause la plus fréquente d'HFrEF est l'ischémie myocardique. La cardiomyopathie dilatée (DCM) représente un sous-ensemble de l'HFrEF et constitue la cardiomyopathie (CM) la plus courante provoquant des syndromes d'IC.

La première ligne de traitement comporte l'association d'un modulateur du système rénine angiotensine aldostérone et d'un bêta-bloquant. Cependant il s'agit avant tout d'un traitement symptomatique et non curatif. La transplantation cardiaque est le traitement de référence d'une IC avancée, voire terminale, lorsque le pronostic est défavorable et quand il n'y a pas d'alternative thérapeutique probante.

Ainsi, afin de réduire l'apparition de la maladie et/ou améliorer la prise en charge rapide des patients insuffisants cardiaques, plusieurs campagnes ont été mises en place afin de reconnaître et gérer les risques environnementaux potentiels de l'insuffisance cardiaque. Cependant l'IC est une maladie multifactorielle avec de plus en plus de preuves indiquant que la prédisposition génétique influence la probabilité, la progression de la maladie ou encore la réponse au traitement pharmacologique ([Skrzynia et al. 2015](#)). Ainsi, l'identification de facteurs génétiques et la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents

semblent critiques pour la prise en charge et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients qui finissent par développer une insuffisance cardiaque.

c. Modèles d'études

Des modèles d'IC ont été utilisés pour améliorer notre compréhension des divers aspects et étiologies de l'IC, dans le but ultime de développer de nouvelles stratégies de traitement. Les souris sont les modèles animaux les plus couramment utilisés dans la recherche sur l'IC. En effet 99% des gènes humains possèdent un orthologue murin et environ 85 % des régions codantes pour les protéines sont identiques au génome humain (Uhl *et al.* 2015). Cependant leur fréquence cardiaque est cinq fois plus élevée que celle des humains avec une relation inverse entre force et fréquence.

D'un point de vue expérimental, les souris offrent des avantages uniques, tels que la possibilité de modifications génétiques, des cycles de reproduction courts et des coûts de logement relativement faibles. De nombreux modèles murins d'IC ont été développés grâce à une combinaison de modifications génétiques, d'administration de composés pharmacologiques et/ou d'approches chirurgicales pour récapituler la maladie humaine. Les modèles murins permettent l'étude de facteurs de risque spécifiques et de stratégies de traitement pour l'IC sans certains des effets confondants des comorbidités observées dans d'autres modèles animaux (Noll *et al.* 2020).

Les modèles de souris transgéniques sont devenus la norme lorsqu'il s'agit d'étudier l'impact de gènes spécifiques sur les voies cellulaires et moléculaires au cours de l'IC. Ces modèles ont été utiles pour étudier les diverses causes sous-jacentes de la cardiomyopathie dilatée ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies (Marcello *et al.* 2022, Nishiyama *et al.* 2022).

Bien que les modèles murins aient permis de progresser dans l'étude de l'IC, ils présentent des limites. Les lignées murines sont consanguines ce qui d'une part facilite l'exploitation des résultats obtenus grâce au fond génétique homogène, et d'autre part entraîne peu d'hétérogénéité inter-individuelle, ce qui ne reflète pas la vaste diversité génétique observée chez l'homme. De plus, la plupart des études chez la souris, en ce qui concerne les pathologies cardiaques, sont réalisées chez des souris mâles assez jeunes. Étant donné que l'IC affecte de manière disproportionnée les personnes âgées, les modifications du système cardiovasculaire dues au vieillissement ne sont pas récapitulées dans ces modèles. Dans le cas spécifique des

modèles génétiques murins, cela s'explique également par le retard ou l'absence de phénotype pathologique chez les femelles et/ou les hétérozygotes dans la plupart des lignées transgéniques générées (Patten RD. 2007, Du XJ. 2004, Camacho *et al.* 2016).

CHAPITRE 2 – LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE

I. CLASSIFICATION DES CARDIOMYOPATHIES

Les cardiomyopathies sont un groupe de pathologies hétérogènes caractérisées par des altérations structurelles et fonctionnelles du muscle myocardique non expliquées par l'hypertension, une maladie coronarienne, valvulaire ou congénitale (Elliott *et al.* 2008). Il existe différentes formes de cardiomyopathies, illustrées dans la figure 4, présentant des étiologies et des signes cliniques diverses. Cependant l'ensemble des morphotypes conduisent à la réduction de la capacité de cœur à pomper efficacement le sang riche en oxygène vers le reste du corps, faisant de l'insuffisance cardiaque l'évolution terminale des cardiomyopathies.

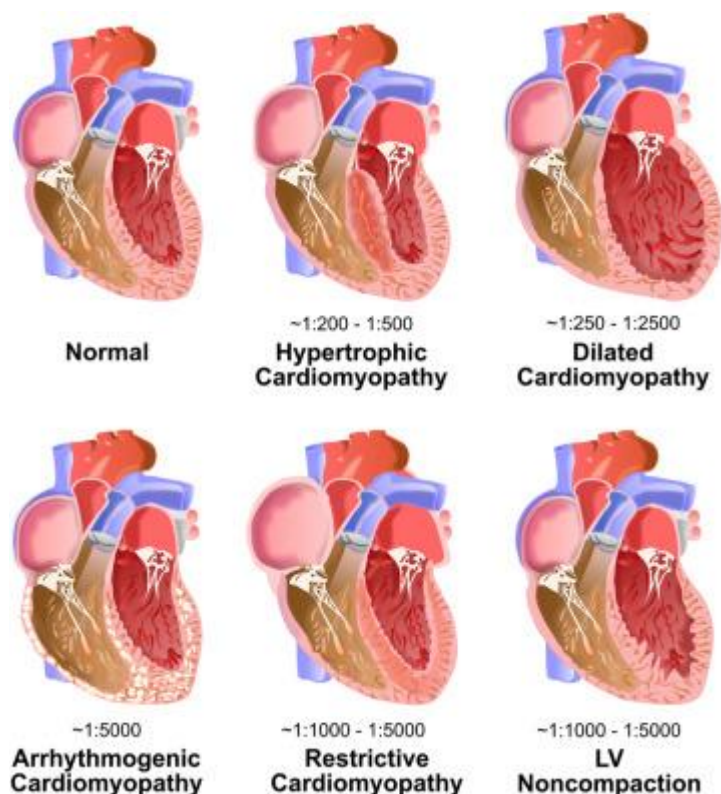


Figure 4 Les différents types de cardiomyopathie (Tiré de Yogasundaram *et al.* 2021) Images illustrant un cœur normal, une cardiomyopathie hypertrophique (CMH), une cardiomyopathie dilatée (CMD), une cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (CAVD), une cardiomyopathie restrictive (CMR) et une non-compaction du ventricule gauche (NCVG). Pour chaque morphotype, la prévalence estimée est indiquée.

La classification des cardiomyopathies est en constante évolution depuis sa première apparition en 1980 par l'Organisation Mondiale de la Santé faisant alors apparaître les premiers sous-types de cardiomyopathies, dilatée, hypertrophique et restrictive. Il faudra attendre 1996 pour voir la cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit ajoutée à cette

classification. En 2008, la société européenne de cardiologie a établi une classification basée sur la morphologie et la fonction cardiaque, ainsi 5 sous-types de cardiomyopathie ont été décrits ; la cardiomyopathie hypertrophique (CMH), la cardiomyopathie dilatée (CMD), la cardiomyopathie restrictive (CMR), la cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (CAVD) et la non compaction du ventricule gauche (NCVG) (Elliott *et al.* 2008). Bien qu'une grande hétérogénéité soit présente au sein même de ces sous-types de cardiomyopathie, cette classification va notamment permettre d'orienter le traitement ainsi que d'anticiper les complications majeures associées à chaque type de cardiomyopathie. Chaque sous-type est ensuite divisé en formes familiale (d'origine génétique le plus souvent) ou acquise.

Pour les formes d'origine génétique, une classification plus fine peut être faite à l'aide des études génétiques, cependant celles-ci restent limitées du fait du chevauchement des spectres génétiques des différentes catégories de cardiomyopathies. En effet, différentes mutations dans un même gène peuvent causer différents types de cardiomyopathies. On retrouve par exemple des mutations du gène codant pour la chaîne lourde beta de la myosine (*MYH7*) à la fois dans la CMH et la CMD, selon si l'effet de la mutation entraîne respectivement une augmentation ou une réduction de la force contractile. Les cardiomyopathies héréditaires présentent toutes un spectre génétique hétérogène avec de multiples gènes impliqués, cependant le degré d'hétérogénéité reste variable et est notamment très élevé en ce qui concerne la CMD.

Compte tenu de l'existence d'un chevauchement clinique et génétique entre les différents morphotypes de cardiomyopathies, il me semble nécessaire de décrire brièvement chaque sous type avant de s'intéresser plus particulièrement à la cardiomyopathie dilatée, sujet centrale de mon travail de thèse.

a. La cardiomyopathie hypertrophique

Les cardiomyopathies hypertrophiques ou CMH sont caractérisées par l'augmentation de l'épaisseur des parois ventriculaires pouvant entraîner une obstruction lors de l'éjection du sang à la sortie du ventricule gauche en absence de conditions de charges anormales. Il s'agit de la forme la plus commune de cardiomyopathie primaire recensée avec une prévalence d'environ 1/500 dans la population générale (Elliott *et al.* 2004).

L'hypertrophie observée est habituellement asymétrique, touchant principalement le septum interventriculaire avec des épaisseurs supérieures à 15mm chez l'adulte. Le traitement actuel de la CMH consiste à soulager les symptômes secondaires à l'obstruction (dyspnée, angine de poitrine, œdèmes) dans un premier temps par un traitement médicamenteux, qui lorsqu'il n'est plus assez efficace est remplacé par des méthodes de traitement invasives telles que l'implantation d'un pacemaker (Arbela *et al.* 2023).

Les formes génétiques de CMH constituent plus de la moitié des cas avec un mode de transmission presque toujours autosomique dominant. De nombreux gènes ont été identifiés comme associés à la CMH avec, pour l'immense majorité, des fonctions impliquées dans la structure et/ou le fonctionnement du sarcomère. Ainsi on retrouve principalement des gènes codant pour des protéines sarcomériques incluant les composants du filament épais (*MYH7*, *MYL2*, *MYL3*) ou associés (*MYBPC3*), les composants du filament fin (*ACTN*, *TPM1*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TNNC1*), ou encore les gènes de la strie Z (*ACTN2*, *MYOZ2*, *NEXN*) (Veselka *et al.* 2017).

L'identification des mécanismes des mutations conduit actuellement à plusieurs programmes prometteurs de l'industrie pharmaceutique, avec notamment le développement chez l'homme d'une molécule visant à diminuer l'activité ATPasique de la myosine dans l'hypothèse d'un gain de fonction des mutants du gène *MYH7* (Scellini *et al.* 2021).

b. La cardiomyopathie restrictive

La cardiomyopathie restrictive (CMR) se caractérise par un myocarde rigide avec des parois ventriculaires non compliantes impactant le remplissage diastolique d'au moins l'un des deux ventricules. La prévalence, moins connue que pour les formes de cardiomyopathies majeures, est estimée entre 1/1000 et 1/5000 (Yogasundaram *et al.* 2021), en faisant le sous-type le moins répandu de cardiomyopathie. Il s'agit d'un groupe de cardiomyopathie très hétérogène pouvant être idiopathique, d'origine génétique ou bien résultant d'une altération systémique telles que l'amylose, la sclérodermie, la sarcoïdose ou encore l'hémochromatose (Elliott *et al.* 2008).

c. La cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit

La cardiomyopathie arythmogène (ARVC) est une cardiomyopathie du ventricule droit caractérisée histologiquement par le remplacement progressif du tissu contractile cardiaque

par du tissu adipo-fibreux. Les modifications histologiques sont la résultante d'une altération d'origine génétique responsables de mort subite chez le sujet jeune et/ou athlétique. L'ARVC présente principalement un mode de transmission autosomique dominant avec 40 à 50% des sujets atteints qui présentent une mutation dans les gènes codant pour les protéines participant à la formation des desmosomes, l'un des types de jonction intercellulaire retrouvés dans les cardiomyocytes. L'ARVC est une pathologie progressive, menant dans le temps à une insuffisance cardiaque droite pouvant s'accompagner de modifications histologiques au niveau du ventricule gauche. Eventuellement, une insuffisance cardiaque globale se développe avec une fibrillation atriale et l'apparition d'évènements thromboemboliques (Shah SN. 2023).

d. La non-compaction du ventricule gauche

La non-compaction du ventricule gauche est un sous-type rare de cardiomyopathie lié à un développement anormal du ventricule gauche lors de l'embryogénèse. Le muscle cardiaque, normalement compact, présente un aspect spongieux suite à un défaut de compaction des fibres musculaires cardiaques avec l'augmentation en nombre, de trabéculations. Bien que les causes précises soient encore mal connues, différentes études ont proposé une cause d'origine génétique liée à des mutations retrouvées au niveau du gène *ZASP*, ou encore des gènes codant la dystrobrevin et la tafazzin. Les complications de ce type de cardiomyopathie concernent l'apparition d'une insuffisance cardiaque, d'une arythmie ventriculaire et d'évènements emboliques au niveau systémique (Singh et Patel 2022).

e. La cardiomyopathie dilatée

Il s'agit, après la CMH, de la forme la plus courante de maladie du muscle cardiaque, représentant près de 50% des cardiomyopathies, primaires et secondaires confondues. Les caractéristiques de la CMD sont détaillées dans la suite de cette introduction.

II. CARATÉRISTIQUES DE LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est l'une des causes principales d'insuffisance cardiaque. Elle est également associée à un risque élevé de mort subite, imposant un coût économique important pour la société en termes de dépenses de santé avec près de 15000€ par patient

par an selon une étude récente (Wiethoff *et al.* 2023). Son incidence est d'environ 5 à 7 cas pour 100 000 personnes par an (Reichardt *et al.* 2019) et sa prévalence est estimée à 1/2500 dans la population générale, cependant ces chiffres restent difficiles à estimer (Ababio *et al.* 2023). Au niveau mondial, la prévalence de la CMD, et des cardiomyopathies en général, est plus élevée chez les hommes et augmente avec l'âge (Roth *et al.* 2020). Cependant cet écart est à la baisse ces dernières années avec l'évolution des comportements sociaux et l'augmentation des facteurs de risques (notamment la consommation d'alcool et le tabagisme) chez les femmes. Malgré une meilleure prise en charge des patients et l'avancée des traitements pour l'insuffisance cardiaque ces dernières années, la mortalité associée à la CMD reste élevée et elle représente aujourd'hui la première indication de transplantation cardiaque au niveau mondial (Weintraub *et al.* 2017). Plus de 40% des patients atteints de CMD présentent une qualité de vie altérée avec notamment des problèmes liés à la mobilité, à l'exécution de tâches de la vie courante ou encore liée à la présence de douleurs ou d'inconfort qui augmente avec la sévérité des symptômes associés à la CMD (Wiethoff *et al.* 2023). Les CMD représentent 60% des cardiomyopathies identifiées chez l'enfant, ayant une incidence maximale chez les enfants de moins de 12 mois (Weintraub *et al.* 2017).

a. Manifestations cliniques

La pathologie est définie par l'existence d'une dilation uni ou bi-ventriculaire associée à une dysfonction systolique en l'absence de conditions de charge anormales (hypertension, valvulopathie) ou de coronaropathie suffisante pour induire une dysfonction systolique au niveau systémique (Elliott *et al.* 2008). Près de 80% des patients atteints de CMD présentent les premiers symptômes d'une insuffisance cardiaque. Parmi ces symptômes on retrouve notamment une fatigue accrue après un effort modéré, des œdèmes au niveau des chevilles ou encore une difficulté respiratoire en position allongée. L'effondrement du débit cardiaque est la résultante la plus sévère de l'insuffisance cardiaque. Certains patients peuvent alors présenter des palpitations cardiaques ou encore perdre connaissance (Weintraub *et al.* 2017).

A l'échelle tissulaire, la CMD est associée à un remodelage d'au moins un des deux ventricules. On observe alors une altération de l'architecture des fibres musculaires avec l'apparition progressive d'une fibrose interstitielle et périvasculaire associée à une dégénérescence myofibrillaire (Figure 5). Cette perte de tissu contractile en faveur de tissu fibrotique est

responsable de la dysfonction systolique et de la dilatation des cavités cardiaque observable à l'échelle de l'organe.

A l'échelle microscopique on retrouve notamment une combinaison de cellules myocardiques normales, hypertrophiées ou atrophiées ou bien associées à la présence d'œdème intracellulaire. Les changements histopathologiques associés à la CMD sont multiples et non spécifiques, similaires à ceux observables dans les tissus cardiaques à un stade terminale d'autres maladies cardiovasculaires (Mitrut *et al.* 2018).

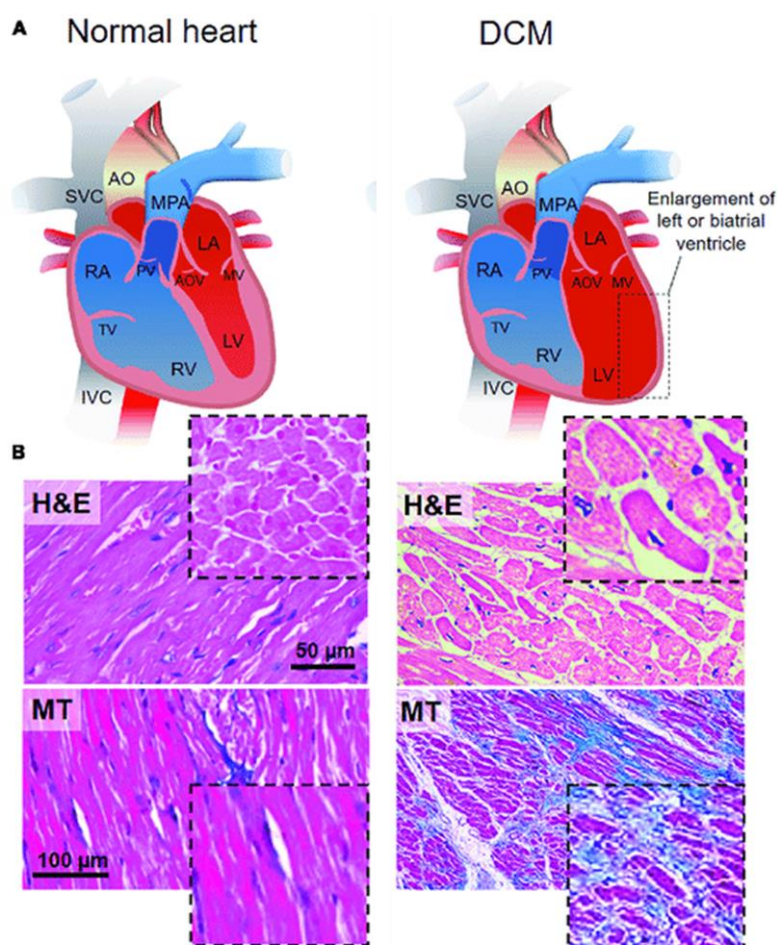


Figure 5. Comparaison histologique de tissus cardiaques de patient sain et atteint de CMD (Adapté de Cassani *et al.* 2020).

Représenté schématiquement à gauche, la structure d'un cœur sain avec une analyse histologique du tissu cardiaque associée à la fois en hématoxyline éosine (H&E) et en trichrome de Masson (MT) montrant une organisation normale avec un agencement parallèle des cardiomyocytes. A l'inverse, représenté schématiquement à droite, l'analyse d'un tissu myocardique issu d'un patient atteint de CMD révèle une désorganisation structurelle avec l'accumulation de tissu fibrotique non contractile (en bleu).

b. Évolution et traitement

L'évolution et les complications (en dehors de la mort subite) de la CMD sont principalement la progression vers l'insuffisance cardiaque et l'apparition d'une fibrillation auriculaire. Ainsi, les recommandations sont généralement indépendantes de l'étiologie de la maladie et les traitements sont avant tout symptomatiques, ils visent à réduire les symptômes et les signes de l'insuffisance cardiaque ainsi qu'à limiter le risque de mort subite. Les traitements médicamenteux correspondent à l'instauration d'un traitement par l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine associé à un bêta bloquant, afin de réduire la pression artérielle et la postcharge et de venir renforcer le travail du cœur respectivement, et dans la plupart des cas à un diurétique pour prévenir la rétention d'eau. Lorsque le traitement médicamenteux n'est pas ou plus efficace, un système de soutien à l'éjection du VG peut être implanté, et dans les cas les plus grave, la transplantation cardiaque peut être envisagée.

c. Outils de diagnostic

La CMD a souvent une évolution progressive, surtout pour les formes génétiques de la maladie. Le plus souvent les personnes atteintes de CMD sont asymptomatiques pendant les quatre premières décennies de leur vie, elles sont diagnostiquées lorsque les premiers symptômes de l'IC s'expriment. De ce fait le diagnostic est souvent tardif avec une dysfonction cardiaque et un remodelage ventriculaire déjà avancés.

Dans le cadre d'une suspicion de cardiomyopathie, les professionnels de santé vont d'abord chercher à établir et caractériser la présence d'un phénotype de cardiomyopathie puis chercher à identifier l'étiologie sous-jacente associée. Pour cela, la réalisation d'un ECG et l'imagerie médicale, notamment l'échocardiographie, sont de première intention dans l'évaluation des patients atteints de CMD.

Bien que l'ECG puisse être normal chez certains, les anomalies standard de l'ECG restent courantes dans tous les sous-types de cardiomyopathie et peuvent précéder de plusieurs années le développement d'un phénotype morphologique ou fonctionnel. Bien que l'ECG soit souvent non spécifique, la présence d'éléments particuliers peut aiguiller le diagnostic ou encore suggérer une certaine étiologie. Dans le cadre de la CMD, on peut notamment retrouver un défaut de transmission de l'influx électrique ou encore une faible amplitude de l'onde P ou du complexe QRS ([Arbelo et al. 2023](#)).

Afin d'apporter un diagnostic formel, l'échocardiographie va permettre, de manière non-invasive, de caractériser le phénotype et d'identifier d'éventuelles anomalies morphologiques (hypertrophie ou dilatation) et/ou fonctionnelles (dysfonction systolique/diastolique). Au besoin, une IMR cardiaque peut venir confirmer et/ou compléter les résultats de l'échocardiographie en révélant d'éventuelles anomalies tissulaires comme la présence de tissus cicatriciel et/ou fibro-adipeux. Lors de l'évaluation de la fonction systolique du VG, de nombreux paramètres quantitatifs et qualitatifs peuvent être déterminés lors d'une échocardiographie. Dans le cadre d'une suspicion de CMD, les volumes télésystolique (VTS) et diastolique (VTD) ainsi que les mesures du diamètre ventriculaire gauche en systole (VGs) et en diastole (VGd) vont être notamment utilisés pour déterminer le pourcentage de fraction de raccourcissement (%FR) et la fraction d'éjection (FE) :

$$\%FR = \frac{VGd - VGs}{VGd} \qquad FE = \frac{VTD - VTS}{VTD}$$

Ainsi, les critères associés à un diagnostic de CMD sont l'augmentation du diamètre interne du ventricule gauche ainsi qu'une fraction de raccourcissement (<25%) et une fraction d'éjection (<45%) abaissées ([Mathew et al. 2017](#)).

Il est également possible d'utiliser certains biomarqueurs dans le cadre du diagnostic mais également dans l'établissement d'un pronostic. En effet, ceux-ci sont principalement des marqueurs de l'insuffisance cardiaque qui vont être informatifs en ce qui concerne le stade de l'évolution de la pathologie et ainsi aider à définir la meilleure prise en charge des patients. Par exemple des taux sanguins élevés de BNP « brain natriuretic peptide », de son précurseur (NT-proBNP) ou de troponine T cardiaque sont notamment associés à des événements cardiovasculaires et à l'insuffisance cardiaque. Les panels d'analyses sanguines effectués en routine sont souvent utilisés dans la détection d'autres conditions qui peuvent aggraver une dysfonction systolique déjà présente, comme par exemple une maladie thyroïdienne, un dysfonctionnement rénal ou encore le diabète.

Ainsi une approche systématique dans l'identification et l'évaluation des patients avec une suspicion de CMD permet de fournir des informations essentielles non seulement pour le diagnostic, la stratification des risques et l'orientation du traitement, mais joue également un rôle clé dans le dépistage des membres de la famille et l'identification des causes sous-jacentes, notamment d'origine génétique. ([Mathew et al. 2017](#)).

d. Etiologie

Les cardiomyopathies dilatées sont un groupe de maladie avec une étiologie très hétérogène. Parmi les causes sous-jacentes de CMD on retrouve notamment une origine génétique ou bien dite « acquise » suite à l'exposition à certains facteurs. Lorsque la cause de la maladie reste inconnue, on parle alors de CMD idiopathique.

Parmi les causes non-génétiques de la maladie, récapitulées dans la Table 1, on retrouve notamment des causes infectieuses, auto-immunes, liées à l'exposition d'éléments cardio-toxiques, à une déficience nutritionnelle ou encore à une altération endocrinienne (Bondue et al. 2018).

Causes non-génétiques de CMD

Infectieuses	Myocardite virale, différentes virus (entérovirus, parvovirus B19, adénovirus, échovirus, virus de l'hépatite C et de l'herpès), le VIH ou encore la maladie de Chagas ou de Lyme
Auto-immunes	Arthrite rhumatoïde, maladie de cœliaque (intolérance au gluten), vascularite, myocardite à cellules géantes, lupus érythémateux, dermatomyosite, polymyosite, sclérodermie systémique, cirrhose biliaire primitive, myasthénie et pemphigus
Auto-inflammatoires	Maladie de Crohn, colite ulcéreuse, la goutte ou encore l'arthrite réactionnelle
Toxiques	Alcool, drogues (cocaïne, amphétamines, ecstasy, certaines drogues psychiatriques et antinéoplasiques), l'hémochromatose (surcharge en fer), l'amyloïdose ou encore le plomb
Déficience nutritionnelle	Déficience en sélénium, en thiamine (vitamine B1), zinc, cuivre ou encore carnitine
Endocrinienne	L'acromégalie, les phéochromocytomes (tumeurs des glandes surrénales), une dysfonction thyroïdienne ou encore le diabète sucré
Perturbation d'électrolytes	Hypocalcémie et hypophosphatémie
Péripartum	Développement d'une CMD à la suite d'une grossesse

Table 1. Causes non-génétiques de CMD (Adapté de Bondue et al. 2018)

De plus en plus d'études s'intéressent à l'interaction entre la composante génétique et environnementale, suggérant que les facteurs environnementaux influent sur le terrain génétique participant ainsi au développement de la maladie (Jain et al. 2021).

Dans environ 30 à 50% des cas de CMD, il s'agit de cas familiaux où l'identification d'une cause génétique est faite dans environ 40% des cas (Bondue et al. 2018). On parle alors de CMD

familiale lorsqu'au moins deux personnes apparentées au premier degré sont atteintes de CMD (Huggins *et al.* 2022). Dans le cas d'une origine génétique, la CMD familiale est considérée comme une maladie monogénique de pénétrance incomplète (~70%), cependant cela n'explique pas l'hétérogénéité des phénotypes observés au sein d'une même famille. Des facteurs modificateurs doivent alors être pris en compte afin d'expliquer le développement et la progression de la maladie, comme certains facteurs génétiques (gènes modificateurs), épigénétiques ou environnementaux (mode de vie, âge, sexe) (Watkins *et al.* 2011).

III. GÉNÉTIQUE DE LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE

a. Formes familiales et sporadiques

L'étude et l'identification des causes génétiques responsables de CMD ont beaucoup évolué ces 30 dernières années. Cela a notamment permis de mettre en évidence une origine génétique dans de nombreux cas de CMD idiopathique. Dans une étude récente de la population américaine, composée de 1220 patients atteints de CMD, le screening génétique de 1693 apparentés au premier degré a révélé une prévalence d'une CMD familiale estimée à 29,7% (Huggins *et al.* 2022).

L'évolution positive de la prévalence des formes familiales de CMD est notamment dû à l'évolution des moyens et des techniques d'identification de cause génétique. Initialement, il s'agissait d'études rétrospectives basées sur l'historique familial du patient alors qu'aujourd'hui une étude de l'historique familiale est systématiquement réalisée peu importe l'origine de la CMD. Lorsqu'une origine génétique a été mise en évidence dans la famille ou si elle est suspectée, un test génétique est réalisé chez les apparentés avec un suivi recommandé notamment par la réalisation d'examen échocardiographiques. Ainsi, les cas sporadiques représentent les individus atteints d'une CMD pour lesquels il n'y a pas d'élément indiquant une possible cause monogénique, ou bien portant des mutations de forte pénétrance *de novo* ou héritées mais l'enquête familiale n'a pas été conduite ou n'a pas révélée d'apparenté au premier degré atteint de CMD.

Les facteurs génétiques contribuant à la pathologie peuvent être une mutation unique causale de forte pénétrance (maladie monogénique), ou bien la combinaison d'effets faibles associés à un ou plusieurs polymorphismes de gènes associés à la pathologie (formes multifactorielles). En effet, des facteurs modificateurs d'origine génétique sont capables d'altérer le bon

fonctionnement du myocarde jusqu'à atteindre la limite du seuil de déclenchement de la maladie. Ces polymorphismes, plus fréquents dans la population que les mutations généralement rares et responsables de formes monogéniques, seraient donc en combinaison avec d'autres facteurs, notamment environnementaux, responsables de cas sporadiques de la maladie.

Le principal mode de transmission au sein des CMD familiales est autosomique dominant, avec une pénétrance réduite et une expression phénotypique variable. Les mutations mitochondriales contribuent également à la maladie via une hérédité maternelle. Les mutations associées au chromosome X sont moins fréquentes et associées à plusieurs gènes tels que la dystrophine, la tafazzine et l'émerine (McNally *et al.* 2013).

b. Gènes associés aux CMD

L'architecture génétique de la CMD touche une grande variété de compartiments cellulaires (Hershberger *et al.* 2021). Comme mentionné précédemment le spectre génétique des sous types de cardiomyopathies se chevauche pour certains gènes. Dans le cas de la CMD, le chevauchement avec la CMH concerne principalement des gènes codant pour des protéines du sarcomère (*MYH7*, *TNNC1*, *TNNT2*) et du réticulum sarcoplasmique (*PLN*). On retrouve également un chevauchement avec la CAVD concernant notamment les protéines desmosomales (Figure 6).

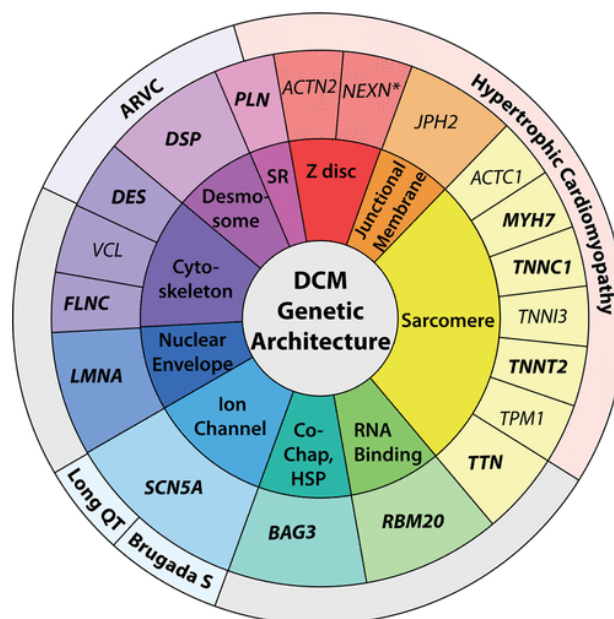


Figure 6. Architecture génétique des gènes associés à la CMD (Tiré de Jordan *et al.* 2021)

Chaque gène associé à la CMD (gènes majeurs en gras) est regroupé selon sa fonction et selon les autres pathologies dans lesquelles il a été retrouvé impliqué.

L'explication à l'origine de cette diversité d'architecture génétique dans la CMD reste floue à ce jour. La CMD peut être considérée comme le phénotype final lorsque les voies cellulaires maintenant la force de contraction ou l'intégrité structurelle ventriculaire sont perturbées par des variations pathologiques de gènes codant pour des protéines clés (Jordan *et al.* 2021).

Le nombre de gènes suggérés comme étant pertinents dans l'origine génétique de la CMD est devenu très important, en partie à cause de cette architecture diversifiée. Plus largement, les efforts visant à établir une relation causale entre les variants d'un gène et une maladie constituent une étape cruciale non seulement pour la recherche cardiovasculaire, mais également pour l'application de la génétique clinique aux soins des patients et à leur famille.

Ainsi, afin de déterminer la validité clinique des gènes jusque-là ayant été associés à la CMD, le National Institute of Health Clinical Genome Resource (ClinGen) a proposé une méthode semi-quantitative pour évaluer la validité clinique des relations entre les gènes candidats et la maladie (Strande *et al.* 2017).

Un ensemble initial de 267 gènes a été identifié à partir d'une recherche documentaire structurée et de ressources référencées sur les maladies génétiques. Cette liste initiale a été réduite à 51 gènes suite à l'élimination de gènes associés à des syndromes ou à d'autres maladies cardiovasculaires, ou bien n'étant pas pertinents dans ce contexte ou représentant des gènes candidats.

L'évaluation des apports des études génétiques et expérimentales a abouti à la conservation de 19 gènes avec des preuves substantielles soutenant un rôle dans les CMD monogéniques, dont 11 (21 %) avec une classification « définitive », 1 (2 %) avec une classification « forte » et 7 (14 %) avec une classification « modérée ». Au total, 12 gènes ont été classés comme ayant une relation définitive ou forte (Table 2).

Gène	Protéine	Fréquence CMD (%)	Transmission	Classification
BAG3	BCL-2-associated athanogene 3	2-4	AD	Définitif
DES	Desmin	<1	AD	Définitif
FLNC	Filamin C	1-8	AD	Définitif

LMNA	Lamin A/C	4	AD	Définitif
MYH7	Myosin heavy chain 7	5	AD	Définitif
PLN	Phospholamban	1	AD	Définitif
RBM20	RNA-binding motif protein 20	2	AD	Définitif
SCN5A	Sodium voltage-gated channel, α subunit 5	2	AD	Définitif
TNNC1	Troponin C	Rare	AD	Définitif
TNNT2	Troponin T2	3	AD	Définitif
TTN	Titin	20-25	AD	Définitif
DSP	Desmoplakin	2-4	AD	Fort

Table 2. Gènes majeurs impliqués dans la CMD

(Adapté de [Jordan et al. 2021](#) et [Richard et al. 2018](#)) AD, autosomique dominant

Ainsi, on retrouve une fois de plus une grande diversité parmi les gènes classés comme « définitif » et « fort » avec notamment des gènes codant pour des protéines du sarcomère impliquées dans sa structure (*TTN*), son maintien (*BAG3*) et la génération de la force contractile (*MYH7*, *TNNC1*, *TNNT2*) des protéines de la strie Z ou du cytosquelette participant à la bonne transmission de cette force contractile (*DES*, *FLNC*), impliquée dans l'homéostasie calcique (*PLN*), la structure nucléaire (*LMNA*), les jonctions intercellulaires (*DSP*), les mécanismes d'épissage (*RBM20*) ou encore la régulation des flux sodiques (*SCN5A*).

Pour la plupart de ces gènes, notamment ceux codant pour des protéines du sarcomère, il s'agit de variants à effet fort initialement identifiés par étude de liaison génétique dans des grandes familles de CMD. Cependant les limites associées à ce type d'étude, la taille restreinte des familles étudiées et la faible pénétrance des mutations, ont ouvert un nouveau champ d'étude visant cette fois-ci les polymorphismes de faible pénétrance. C'est dans ce contexte que mon équipe a notamment identifié une association génétique du gène *BAG3* avec la CMD ([Villard et al. 2011](#)). Mon sujet de thèse s'intéressant aux mécanismes physiopathologiques associés à la CMD dépendante de *BAG3*, il me semble nécessaire de passer en revue les mécanismes physiopathologiques associés aux gènes majeurs associés à la CMD, présentés dans la Table 2.

c. Mécanismes physiopathologiques associés

Du fait de l'hétérogénéité des gènes impliqués dans les CMD d'origines génétiques, de nombreux mécanismes pathologiques ont alors été décrits comme responsable du

développement de la CMD (Figure 7). La suite de ce paragraphe concerne la revue des gènes notables identifiés, organisée selon le compartiment cellulaire auquel ils appartiennent, en s'intéressant particulièrement au mécanisme physiopathologique proposé conduisant à terme, au développement d'une CMD.

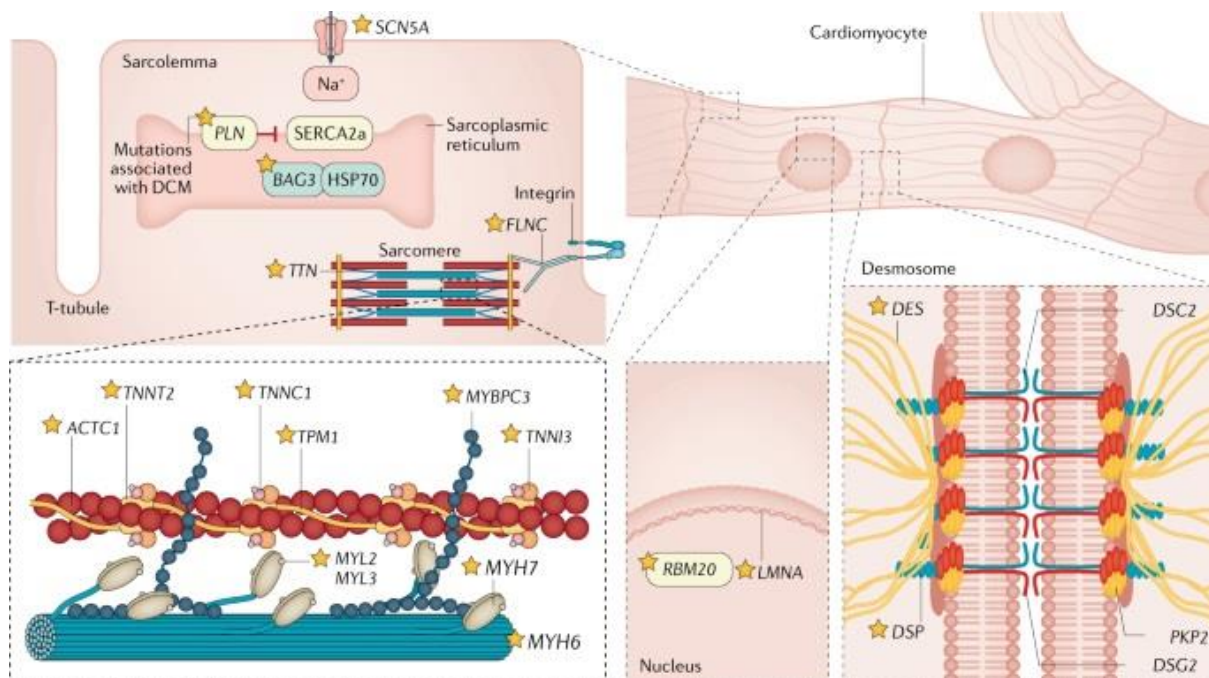


Figure 7. Causes génétiques de CMD (Tiré de Schultheiss et al. 2019)

À ce jour, plus de 30 gènes ont été associés à la CMD et codent des protéines participant à diverses fonctions cellulaires et voies biochimiques, dont la majorité peuvent être directement associées à la contraction et à la régulation du muscle cardiaque. Certaines des protéines codées par ces gènes sont illustrées dans leur contexte cellulaire et moléculaire, et celles dans lesquelles une mutation associée à la CMD a été identifiée dans leur séquence codante sont indiquées par une étoile jaune.

Les protéines du sarcomère

Le myocarde est un tissu hautement organisé et composé de plusieurs types cellulaires, les cardiomyocytes, l'unité contractile cardiaque, représente 30% de la composition du myocarde mais près de 70 % du volume cardiaque. L'architecture du cardiomyocyte est assurée par le cytosquelette dit « non contractile » comprenant l'actine cytoplasmique, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces structures, en plus de former un support structurel entre l'environnement extracellulaire et l'appareil contractile, participent à la transduction du signal et fournissent un réseau pour le transport des protéines et des organites intracellulaires (Grimes et al. 2019). Le sarcomère est l'unité contractile du cardiomyocyte, il est composé de l'alternance de bandes apparaissant claires et sombres en microscopie électronique correspondant en réalité aux filaments épais et fins qui composent le sarcomère.

Le filament épais est formé par les chaînes lourdes (l'isoforme beta est codé par le gène *MYH7* et l'isoforme alpha par *MYH6*) et légères de la myosine (*MYL2/3*) ainsi que de la protéine C de liaison à la myosine (*MYBPC3*). Les filaments fins sont principalement composés d'actine (*ACTC1*) associée à la tropomyosine (*TPM1*) et à la troponine. Le complexe de troponine, composé de trois chaînes appelées troponine-T (*TNNT2*), troponine-I (*TNNI3*) et troponine-C (*TNNC1*), ont chacune leur fonction respective. La troponine T est responsable de la liaison troponine-tropomyosine, la troponine-I possède une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de la myosine et la troponine-C possède plusieurs sites de fixation pour le calcium, qui lorsqu'ils sont occupés lèvent l'action inhibitrice de la troponine-I (Tobasman LS. 2021).

Au repos, la tropomyosine et la troponine-I masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. La contraction se produit lorsque la troponine-C, après avoir fixé du calcium, change de conformation et déplace la troponine-I et la tropomyosine. Les têtes de myosine ont alors accès à leurs sites de fixation sur l'actine. Elles hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie, comme illustré sur la figure 8. Le relargage de l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères, qui de manière synchrone avec les cardiomyocytes adjacents, vont permettre la contraction cardiaque à l'échelle de l'organe. Le décrochage des têtes de myosine est induit par la fixation d'un nouvel ATP et par la libération du calcium de la troponine-C. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.

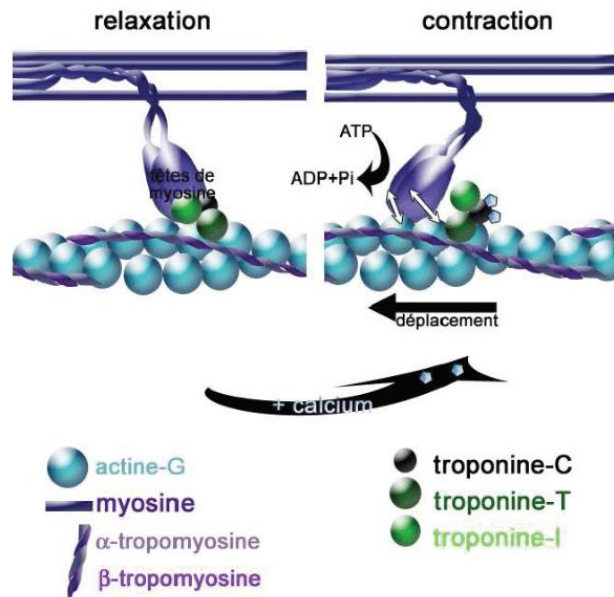


Figure 8. Le mécanisme de la contraction musculaire
(Tiré de la Thèse de Julien Pottecher 2012)

En plus des filaments d'actine et de myosine on retrouve notamment la titine (*TTN*), qui confère des propriétés élastiques au sarcomère. Ce filament gigantesque reliant la ligne Z à la ligne M joue un rôle structural majeur en maintenant notamment en place le filament épais (Wang *et al.* 2021).

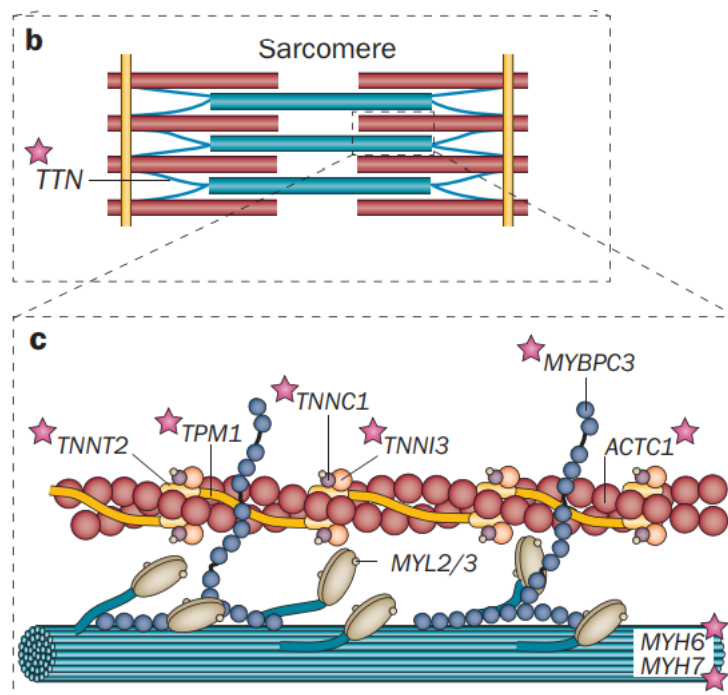


Figure 9. Gènes codant les protéines sarcomériques associées à la CMD
(Adapté d'Hershberger *et al.* 2013)

Les protéines dont une mutation associée à la CMD a été identifiée dans leur séquence codante sont indiquées par une étoile rouge.

Les mutations retrouvées pour les gènes codant les protéines sarcomériques sont des variants faux-sens, de petites insertions/délétions ou bien des mutations conduisant à l'expression de protéines tronquées. On estime qu'environ 35 à 40% des formes monogéniques seraient causées par ce type de mutation, avec une majorité d'entre elles (20 à 25%) attribuées à des mutations tronquantes dans le gène *TTN* (McNally *et al.* 2013).

Dans la CMD, l'hypothèse avancée est que les mutations touchant les protéines sarcomériques réduisent la fonction contractile, tandis que dans la cardiomyopathie hypertrophique, différentes mutations sarcomériques ont été rapportées comme augmentant la génération de la force de contraction via un mécanisme de gain de fonction (Mestroni *et al.* 2014). En effet il a montré que dans un système *in vitro* permettant la reconstitution de filament fin, les filaments reconstitués à l'aide d'une tropomyosine portant la mutant D230N montrent une réduction du turnover ATPasique de la tête de myosine ainsi qu'une sensibilité réduite pour le calcium. De façon intéressante, les résultats inverses sont observés lorsque le modèle généré porte la mutation D175N du gène *TPM1*, associée cette fois ci à la CMH (Lakdawala *et al.* 2010).

L'observation d'une diminution de la sensibilité au calcium semble être un mécanisme central, puisque l'étude des fibres musculaires de souris délétée pour la lysine en position 210 (del210K) dans le gène *TNNT2* présente une diminution de la sensibilité au calcium dans la génération dans la force de contraction. Ces souris mutées finissent par développer une dilation cardiaque marquée, associée au développement d'une insuffisance cardiaque et à l'augmentation de mort subite, récapitulant le phénotype de patient atteint de CMD. Ces résultats suggèrent que la délétion del210K du gène *TNNT2* perturbe les interactions intermoléculaires au sein du sarcomère, très probablement avec la tropomyosine (Du *et al.* 2007).

En ce qui concerne le filament épais, deux mutations du gène *MYH7*, S532P et F764L, chacune liée à contexte de CMD familial, ont été modélisées de façon indépendante chez la souris en modifiant le gène codant pour la chaîne lourde de la myosine retrouvée de façon majoritaire chez la souris, *Myh6*. Les mutations S532P et F764L sont localisées dans la partie codant pour la partie de la tête de la myosine responsable de la production de la force associée à la contraction, les sites de liaisons à l'actine et ceux responsables de l'activité ATPasique respectivement. L'activité ATPasique, dépendante de l'activation par l'actine est réduite, tout

comme la capacité de glissement *in vitro* de l'actine. La production de force n'est pas diminuée, mais une réduction de la taille du pas de la myosine est observée. Étant donné que l'hydrolyse de l'ATP produit moins de déplacement de myosine, il s'agit d'un sarcomère moins efficace sur le plan énergétique.

Comme mentionné précédemment, les mutations tronquantes de la titine représentent une grande partie des mutations estimées responsables de CMD. Les études génétiques et moléculaires de cette protéine ont pendant longtemps été complexes du fait de sa taille gigantesque. Un modèle de souris KO présentant une délétion en phase avec le cadre de lecture dans la région PEVK du gène *TTN* développe un dysfonctionnement diastolique, cohérent avec le rôle de la titine dans l'entretien de la tension passive (Granzier *et al.* 2009). Chez les rats et les souris présentant des mutations hétérozygotes tronquantes de la titine, des facteurs de stress supplémentaires, tels que la constriction aortique transverse (TAC), sont utilisés expérimentalement pour favoriser le développement d'une CMD. En effet, bien que des mutations tronquantes de la titine soient fréquemment observées au sein de cohortes de patients atteints de CMD, il a été démontré que celles-ci sont également observées dans la population générale, avec une fréquence allant de 1 à 3 % (McNally *et al.* 2017). Ainsi la réelle proportion de variants pénétrants et tronquants du gène *TTN* pathologiques reste difficile à estimer.

Au niveau cardiaque *RBM20* régule l'épissage de plusieurs gènes, y compris l'épissage du gène *TTN*. Ainsi, les conséquences moléculaires des mutations *RBM20* peuvent partager des similitudes avec celles des variants tronquants de la titine. Des cardiomyocytes dérivés d'iPSC (CMs-iPSC) portant la mutation R636S de *RBM20* développent des sarcomères moins épais, similaires à ceux décrits pour les CMs-iPSC mutés pour le gène *TTN*, ainsi qu'un profil d'expression génique et d'épissage cohérent avec une cardiomyopathie affectant non seulement le gène *TTN* mais également les gènes *CAMK2D* et *CACNA1C*. Une étude récente a notamment proposé l'association d'un variant faux sens *de novo* du gène *CAMK2D* au développement d'une CMD (Tolmacheva *et al.* 2023).

Ainsi, les mutations affectant les gènes codant pour les protéines sarcomériques provoquent une altération des composants du sarcomère, modifiant ainsi la génération d'une force contractile adéquate. Bien que la protéine codée par *RBM20* ne soit pas considérée comme une protéine sarcomérique au sens strict, les mutations de ce gène ont pour conséquence

l'expression d'isoformes altérées de protéines impliquées dans la fonction cardiaque et notamment dans le maintien de la structure du sarcomère.

L'ensemble des protéines sarcomériques sont soumises à un turnover important permettant de maintenir une contraction optimale, par exemple la demi-vie de la titine en condition basale est estimée à 3-5 jours (Isaacs *et al.* 1989). Ainsi, les mutations de *RBM20* pourraient être à l'origine d'un déficit de protéine titine fonctionnelle mais également participer à l'accumulation délétère de protéines altérées issues d'ARNm mal épissés au sein de la cellule et engendrées un stress protéotoxique.

Les échanges ioniques

Parmi les protéines des canaux ioniques impliquées dans la CMD, des mutations des canaux sodium (*SCN5A*) et phospholamban (*PLN*) ont été décrites. *SCN5A* code pour le canal sodique majoritaire au niveau cardiaque (Nav1.5), dans la CMD les mutations faux sens de ce gène sont associées à un phénotype arythmogène avec un risque élevé d'arythmies. Des mutations hétérozygotes de *SCN5A* sont également liées à d'autres troubles du rythme tels que le syndrome du QT long et le syndrome de Brugada. Chez la souris, l'expression inductible de la mutation F1759A de *Scn5a* entraîne l'apparition d'une fibrillation auriculaire et des courants sodiques persistants au niveau des oreillettes et des ventricules (Wan *et al.* 2016). Ces souris présentent également une réduction progressive de la fraction d'éjection du ventricule gauche, similaire à un modèle de CMD, en combinant des altérations du rythme cardiaque et un dysfonctionnement systolique.

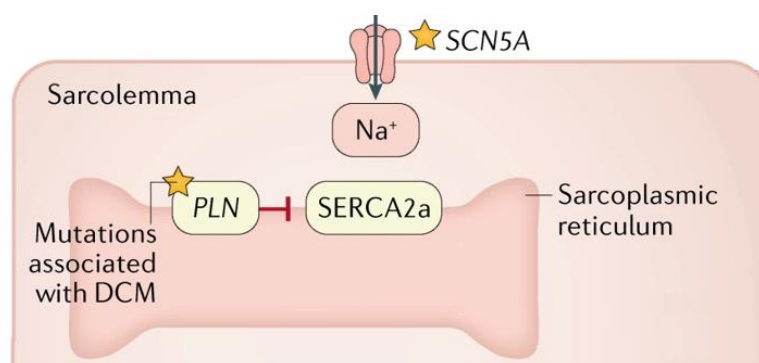


Figure 10. Gènes codant les protéines associées aux échanges ioniques et impliqués dans la CMD (Adapté d'Hershberger *et al.* 2013)

Les protéines dont une mutation associée à la CMD a été identifiée dans leur séquence codante sont indiquées par une étoile jaune.

En ce qui concerne le gène *PLN*, celui-ci code le phospholamban, qui dans son état non-phosphorylé, inhibe la pompe à calcium (SERCA). Les iPSC mutés (R14del) pour le gène *PLN* présentent, après traitement à la caféine, une utilisation aberrante du calcium et davantage de transitoires calciques irrégulières, qui sont révertées après édition génomique afin de corriger la mutation (Karakikes *et al.* 2015). Ces mêmes cellules ont été utilisées pour générer des tissus cardiaques humains en 3D qui, dans ce contexte, présentent des caractéristiques de cardiomyopathies plus claires telles qu'une force engagée réduite, améliorée après correction génétique (Stillitano *et al.* 2016). Dans les CMs-iPSC et dans les cœurs de porteurs de mutations *PLN*, des agrégats de phospholamban ont été observés au niveau périnucléaire et cytoplasmique suggérant que le phospholamban agrégé contribue à la pathologie, éventuellement par le biais d'une autophagie altérée (Te Rijdt *et al.* 2016).

Les protéines de structure

Comme mentionnée précédemment l'architecture du cardiomyocyte est assurée par le cytosquelette dit « non contractile ». La desmine (*DES*) et la filamine C (*FLNC*) font partie des protéines qui forment les filaments intermédiaires impliqués dans la transduction du signal en permettant le lien entre le cytosquelette et les différentes structures cellulaires (sarcomère, disque intercalaire, noyau, mitochondries et costamère) tout en participant au maintien de l'intégrité des structures cellulaires (Tsikitis *et al.* 2018). La lamine fait partie des filaments intermédiaires localisés au niveau nucléaire, la lamine A/C (*LMNA*) confère sa rigidité au noyau et est impliquée dans divers procédés cellulaires comme la régulation de l'expression génique, la réplication de l'ADN, le transport du noyau vers le cytoplasme ou encore peut agir comme mécano senseur (McNally *et al.* 2017).

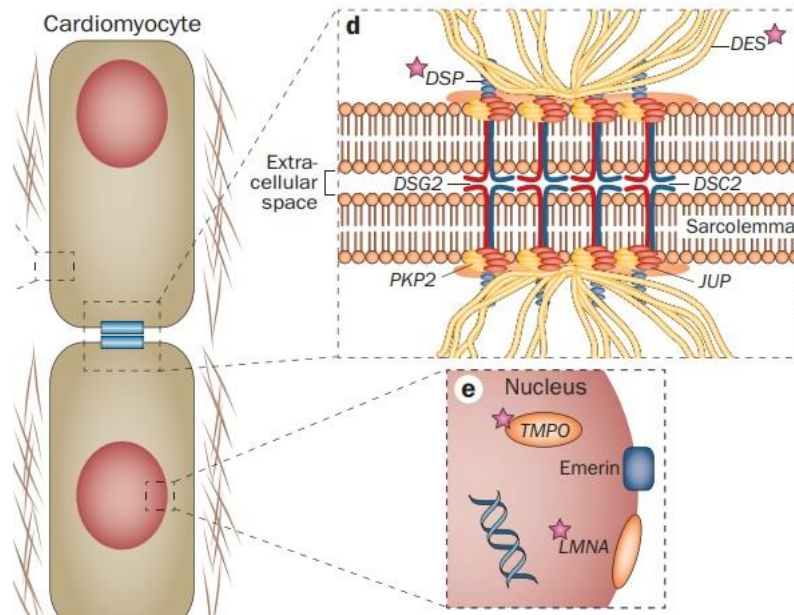


Figure 11. Gènes codant les protéines associées à la structure du cardiomyocyte et impliqués dans la CMD (Adapté d'Hershberger *et al.* 2013)

Les protéines dont une mutation associée à la CMD a été identifiée dans leur séquence codante sont indiquées par une étoile rouge.

Les desminopathies sont un groupe de myopathies myofibrillaires hétérogènes, aussi bien sur le plan clinique que génétique. C'est un ensemble de myopathies du muscle squelettique héréditaires ou sporadiques, présentant une cardiomyopathie dans leur tableau clinique. La pathologie est caractérisée par la présence d'agrégats protéiques protéotoxiques de desmine ainsi qu'à une dégénérescence des myofibrilles conduisant à l'affaiblissement des muscles squelettiques et cardiaques. En effet, les souris mutées portant la mutation R405W de la desmine développent à la fois une myopathie et une cardiomyopathie associée à la présence d'agrégats protéique contenant notamment la desmine mutée. Une désorganisation myofibrillaire est également observée chez ces souris avec des disques intercalaires anormaux reflétant une forte perturbation des jonctions desmosomales pouvant aller jusqu'à la perte du contact entre cardiomyocytes voisins (Herrmann *et al.* 2020).

Les mutations du gène *LMNA* provoquent un large spectre de maladies appelées laminopathies. La forme la plus répandue affecte les muscles striés sous forme de cardiomyopathie dilatée avec une atteinte variable des muscles squelettiques, incluant la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. Le modèle murin porteur d'une mutation ponctuelle du gène *Lmna* (*Lmna*^{H222P/H222P}) développe à la fois une CMD et une dystrophie musculaire (Arimura *et al.* 2005). Il a été constaté que la signalisation mTOR était suractivée et que la

réponse autophagique était de ce fait inhibée dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et que la réduction de l'activité de mTOR par une intervention pharmacologique (temsirolimus) était corrélée à une amélioration de l'autophagie et de la fonction cardiaque (Choi *et al.* 2012).

Plus récemment, des mutations *FLNC*, dans le gène codant pour la filamine C, ont été décrites dans la CMD. La filamine C interagit avec le complexe de la dystrophine et sa suppression chez la souris entraîne une myopathie squelettique. Chez l'homme, des mutations tronquantes conduisent à une cardiomyopathie associée à un taux élevé d'arythmies ventriculaires et de mort subite, ce qui suggère que la filamine C joue un rôle dans le système de conduction cardiaque en plus de son rôle au sein des cardiomyocytes (McNally *et al.* 2017).

La desmoplakine (*DSP*) est une protéine desmosomale qui joue un rôle essentiel dans l'adhésion cellule-cellule au sein des cardiomyocytes. Chez l'homme, les mutations de ce gène sont associées à des lésions myocardiques, une fibrose ventriculaire gauche qui précèdent un dysfonctionnement systolique et une incidence élevée d'arythmies ventriculaires (Brandão *et al.* 2023). Chez les souris mutées pour la desmoplakine (S311A), on retrouve des altérations des desmosomes associées à une distribution anormale de la connexine 43 au niveau cardiaque. Ces souris présentent une mort accrue des cardiomyocytes, une inflammation du myocarde et un remodelage ventriculaire fibro-adipeux. Ces altérations s'accompagnent d'un dysfonctionnement contractile, s'aggravant avec le temps, et d'une incidence accrue d'arythmies, avec une progression de la maladie et des évènements de mort subite potentialisés par l'exercice (Di Bona *et al.* 2021)

Comme nous avons pu le voir, les mécanismes de pathogénicités impliqués dans la CMD sont divers, et dans la plupart des cas associés à un gène unique. Cependant, l'ensemble de ces mutations entraînent le même phénotype pathologique, suggérant de possibles mécanismes communs. En effet, on constate que l'altération de la contraction associée à la réponse calcique (*MYH7*, *TNNC1*, *TNNC2*, *PLN*, *SCN5A*) et la protéotoxicité (*LMNA*, *DES*, *RMB20*, *TTN*) sont des phénomènes récurrents, qui soutiennent l'hypothèse d'un ou plusieurs mécanismes regroupant plusieurs gènes.

Cependant, malgré les progrès des techniques scientifiques en matière de génétique, près de la moitié des formes familiales de CMD, et des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, restent méconnus. L'une des explications concerne les variants de faible pénétrance, qui

malgré leur participation au développement d'un phénotype pathologique en présence d'autres facteurs, restent difficile à identifier du fait de leur effet modéré. Ainsi le phénotype de la maladie peut être relativement léger et la vraisemblance d'une CMD familiale, dans ce cas, est faible. Ainsi, la maladie va dépendre à la fois de variations dans plusieurs gènes simultanément et de facteurs pouvant être environnementaux. C'est l'étude de ces variants de faible pénétrance dans un contexte de CMD qui va notamment conduire à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la CMD, tels que *BAG3*.

IV. RECHERCHE DE LOCI CONTRIBUANT AUX FORMES SPORADIQUES DE CMD

a. GWAS

Les approches de génomique ont connu des progrès considérables depuis quelques années, avec notamment l'émergence des études d'association génome entier (Genome Wide Association Studies ou GWAS) afin d'étudier la composante héréditaire au sein de pathologies complexes. Ces approches consistent à cribler une large population et à mettre en évidence un déséquilibre allélique entre une population contrôle, constituée de personnes non atteintes par la maladie, et une population de malades.

C'est dans ce contexte que notre équipe a mené une GWAS en 2011 dans le but d'identifier de nouveaux loci impliqués dans la CMD (Villard *et al.* 2011). En regroupant 3 études européennes (CARDIGENE, EUROGENE-EHF et PHRC-DCM) le génome de 1179 individus atteints de CMD idiopathiques et de 1108 individus contrôles ont pu être analysés. L'équipe a testé l'association de plus de 600 000 SNP, et parmi eux, 3 étaient associés avec la pathologie de façon significative ($p < 5 \cdot 10^{-7}$). Ces résultats ont ensuite été répliqués dans une population indépendante, composée de plus de 1000 cas contrôles et atteints, et ont confirmé la significativité de 2 des 3 loci initialement identifiés, rs10927875 et rs2234962. Un criblage des mutations des meilleurs gènes candidats positionnels localisés à ces loci a ensuite été réalisé chez 168 cas indépendants atteints de CMD familiale.

b. Locus ZBTB17/HSPB7/CLCNKA

Le SNP rs10927875 est situé dans un intron du gène ZBTB17 pour « zinc finger and BTB domain containing-17 » localisé sur le chromosome 1. Ce locus couvre une région de plus de 200 kilobases enveloppant ainsi plusieurs gènes dont *SPEN* « spen homolog » codant un régulateur

transcriptionnel, *HSPB7* « heat shock protein family B member 7 » codant une protéine de choc thermique et *CLCNKA/B* « chloride channel K » codant les canaux chloriques de type A/B (Figure 12).

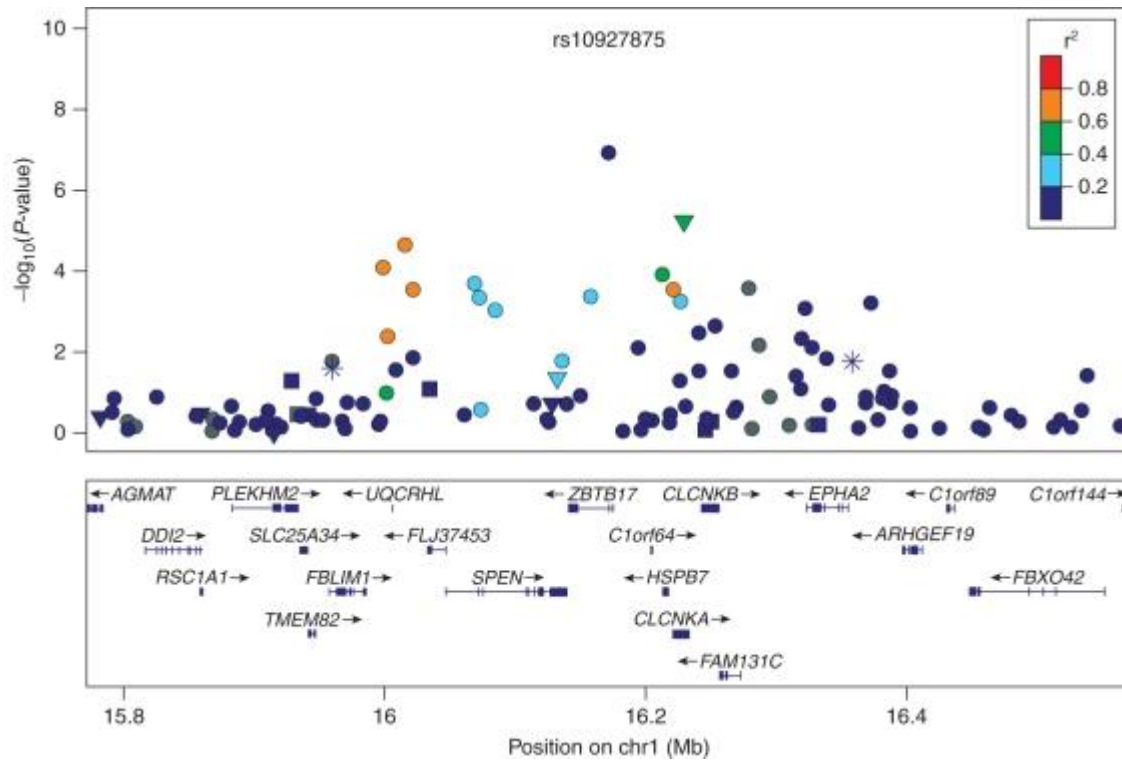


Figure 12. Manhattan plot centré sur le locus rs10927875 (Tiré de Villard *et al.* 2011)

Panel supérieur : le r^2 pairé entre le SNP principal et les SNP dans ses régions en déséquilibre de liaison sont affichés avec la p-value d'association avec la CMD de chaque SNP. Annotations des SNP : aucune (cercle), non synonyme (triangle), synonyme ou UTR (carré), site de liaison putatif de facteur de transcription (astérisque). Panel inférieur : gènes englobant le locus associé.

Parmi l'ensemble des gènes associés au SNP rs10927875, *HSPB7* présente un intérêt particulier puisqu'il code une protéine chaperonne très exprimée au niveau cardiaque (Vos *et al.* 2009) et que, peu avant, un autre SNP (rs1739843) de ce gène avait été associé à la CMD dans une autre étude (Stark *et al.* 2010). Cependant aucune mutation pénétrante de ce gène n'a pu être mise en évidence dans cette étude, ni dans d'autres études menées au même moment (Capolla *et al.* 2010, Matkovich *et al.* 2010).

Ainsi l'implication d'un des gènes appartenant au locus associé au SNP rs10927875 dans la CMD reste encore à démontrer, notamment par la réalisation d'analyses fonctionnelles et d'études de modélisation (Capolla *et al.* 2011).

c. Locus BAG3

Le second locus identifié (rs2234962) correspond à un SNP non-synonyme (c.T757C, p.C151R) situé dans la séquence codante du gène *BAG3* localisé sur le chromosome 10 (Figure 13).

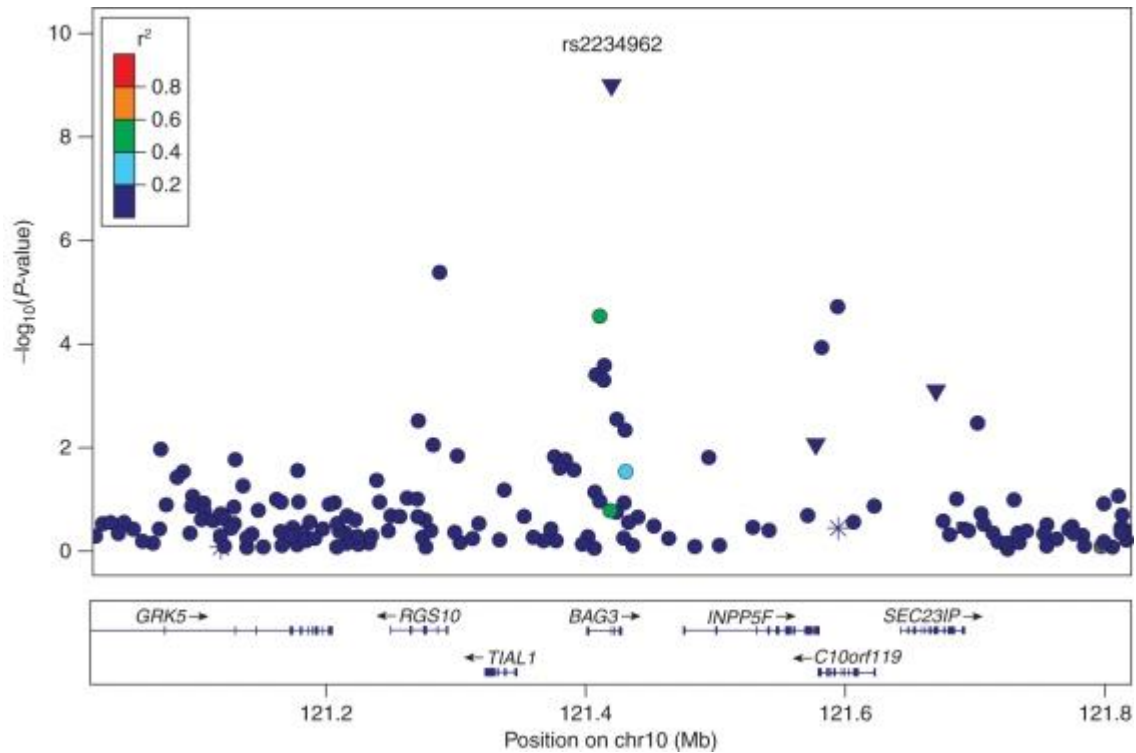


Figure 13. Manhattan plot centré sur le locus rs2234962 (Tiré de Villard *et al.* 2011)

Panel supérieur : le r^2 pairé entre le SNP principal et les SNP dans ses régions en déséquilibre de liaison sont affichés avec la p-value d'association avec la CMD de chaque SNP. Annotations des SNP : aucune (cercle), non synonyme (triangle), synonyme ou UTR (carré), site de liaison putatif de facteur de transcription (astérisque). Panel inférieur : gènes englobant le locus associé.

L'analyse de la fréquence allélique entre la population de patients atteints de CMD et la population contrôle a permis de révéler que l'allèle mineur (R) est associé avec un risque plus faible de développer une CMD alors que la substitution d'une cystéine par une arginine semble plus délétère à cette position. Une analyse poussée, notamment de la base de données HapMap, a révélé l'existence de plusieurs autres SNP non-synonymes du gène *BAG3*. Parmi eux, le locus rs3558340 (c.C1526T, p.P407L), s'est avéré significativement associé au développement d'une CMD, avec la substitution de la proline en position 407 par une leucine.

BAG3 semblait être un candidat idéal dans la recherche de variant rare à effet fort dans des formes familiales de CMD. En effet, il s'agit d'un gène avec l'implication de SNP non-synonyme chez les cas sporadiques de CMD, de plus il code une protéine exprimée de façon prédominante dans le muscle squelettique et cardiaque, co-localisant avec la bande Z des sarcomères, et la réalisation d'un modèle murin KO homozygote de ce gène entraîne le

développement d'une myopathie fulgurante associée à un grave retard de croissance lors de la période post-natale, ce qui a pour conséquence le décès des animaux vers l'âge de 4 semaines (Homma *et al.* 2006).

d. Mutations de *BAG3* associées à des formes familiales de CMD

Ainsi, le séquençage des 4 exons de *BAG3* réalisé chez les 168 cas indépendants atteints de CMD familiale a permis l'identification de 6 variants, 4 mutations non-sens et 2 mutations faux sens, illustrés dans la figure 14. Ces variants prédits comme délétères, ségrégent avec la maladie dans les familles de patients atteints de CMD et sont absents dans une population constituée de 347 individus sains. Touchant des acides aminés très conservés entre les espèces (pour les faux-sens), il en a été conclu que ces variants devaient être pathogènes et responsables de formes mendéliennes de CMD.

Ainsi la réalisation de cette première GWAS de la CMD, associée à un criblage de mutations dans les régions cibles identifiées chez des individus atteints de CMD familiale, a permis l'identification d'un nouveau gène (*BAG3*), associé aux formes familiales et sporadiques de CMD.

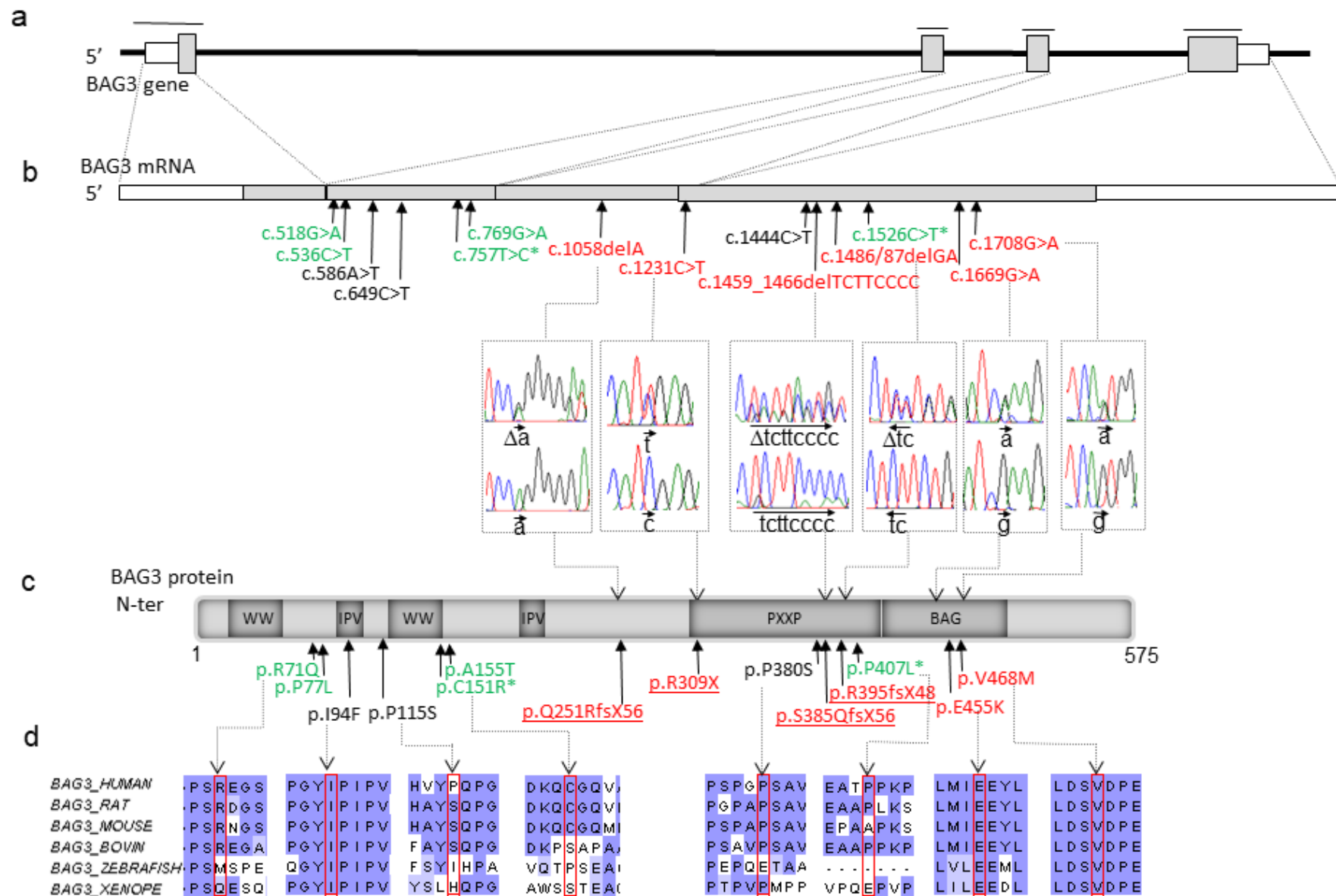


Figure 14. Variants de *BAG3* retrouvés dans des formes familiales de CMD (Tiré de Villard et al. 2011)

(A) Structure génomique du gène *BAG3*. Les quatre exons sont présentés sous forme de cases (blanches pour UTR, grises pour les régions codantes). Les lignes horizontales supérieures indiquent les régions séquencées. **(B)** Transcrit du gène *BAG3* annoté avec les positions des variants identifiés dans les cas familiaux de CMD (variants probablement à l'origine d'une maladie (rouge), éventuellement à l'origine d'une maladie (noir) ou probablement neutres (vert). *Indique les SNP associés à la CMD sporadique identifiés dans la GWAS. Les électrophérogrammes représentatifs des séquences mutées (supérieures) et non-mutées (inférieures) sont présentés pour chaque mutation. **(C)** Schéma de la structure de la protéine *BAG3* (domaines protéiques en gris foncé) annoté avec les changements d'acides aminés associés aux mutations identifiées. **(D)** Alignements des séquences orthologues de *BAG3* de différentes espèces. La conservation inter-espèces est indiquée par des cases bleues (bleu foncé : identique ; bleu clair : similaire ; blanc : acide aminé non conservé).

CHAPITRE 3 – BAG3, UNE PROTÉINE MULTIFONCTIONNELLE

I. MUTATIONS ASSOCIÉES

Selon une vaste étude menée par Mazzarotto *et al.* portant sur 2 538 patients atteints de CMD, des variants tronquants de *BAG3* ont été identifiés dans 0,3 % des cas (Mazzarotto *et al.* 2020). Cliniquement, les mutations du gène *BAG3* entraînent divers phénotypes avec un âge variable d'apparition des premiers symptômes allant de 18 à 64 ans (Knezevic *et al.* 2015). De plus, l'étude réalisée sur 129 échantillons issus d'individus porteurs de mutations *BAG3* a révélé qu'il s'agissait, dans près de 86% des cas, de variants tronquants (Domínguez *et al.* 2018).

a. Haploinsuffisance

Les mutations tronquantes ou entraînant la modification du cadre de lecture vont aboutir à la synthèse de transcrits porteurs d'un codon STOP prématuré. Ces transcrits sont reconnus par le mécanisme de dégradation de l'ARNm non-sens (NMD), un processus conservé au cours de l'évolution, qui va assurer leur dégradation afin de prévenir la synthèse de protéines tronquées potentiellement délétères pour la cellule. Ce mécanisme est à l'origine de l'haploinsuffisance observée dans de nombreux cas de mutations tronquantes, incluant celles identifiées pour *BAG3*.

En effet, plusieurs études ont rapporté une diminution de l'expression protéique de *BAG3* au sein des tissus cardiaques explantés de patients présentant une troncation de 135 acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine ou bien une mutation entraînant une modification du cadre de lecture (Feldman *et al.* 2014, Toro *et al.* 2016).

De façon intéressante, les niveaux de *BAG3* dans le cœur humain défaillant, provenant de patients atteints d'insuffisance cardiaque terminale sans mutations connues de *BAG3*, étaient significativement inférieurs à ceux trouvés dans les cœurs témoins non défaillants. Il semble donc que des niveaux réduits de protéine *BAG3* puissent être observés à la fois chez les individus porteurs d'une mutation *BAG3* ainsi que dans les cœurs humains défaillants en phase terminale (Feldman *et al.* 2014).

b. Perte de fonction

Dans le cas de variants non-tronquants, il s'agit principalement de mutations faux-sens qui peuvent alors s'exprimer selon un mécanisme de perte ou de gain de fonction. La pathogénicité de ces mutations est souvent incertaine, il s'agit notamment de différencier les variants communs identifiés dans la population (polymorphisme) des variants à effet fort qui vont conduire au développement de la maladie.

En ce qui concerne les mutations faux-sens identifiées pour *BAG3*, environ un tiers touche les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du domaine BAG de la protéine, essentielles à son interaction avec HSP70 (Lin *et al.* 2022). De plus, les mutations touchant la région comprise entre le glutamate en position 455 et l'arginine en position 477 sont particulièrement corrélées avec le développement d'une cardiomyopathie dilatée. Dans le cas de mutations faux sens impliquant le domaine BAG, l'hypothèse privilégiée serait l'altération des fonctions cellulaires associées au complexe BAG3/HSP70. En effet, il a été mis en évidence qu'en présence de la mutation E455K de *Bag3* au sein d'une lignée cellulaire HEK293T, il y a une perte importante d'interaction avec certains partenaires protéiques, notamment les membres appartenant à la famille d'HSP70. Des résultats similaires ont été obtenus par le même groupe de recherche cette fois-ci sur un modèle de cardiomyocyte dérivé d'iPSC *BAG3*-E455K (Perez-Bermejo *et al.* 2023). De façon intéressante lorsque l'on se place cette fois-ci en présence de la mutation *BAG3*-C151R, c'est un sous-ensemble différent de partenaires protéiques qui est retrouvé altéré. Les auteurs retrouvent notamment une augmentation de l'interaction avec la protéine filamine A (FLNA), la kinase de la voie Hippo STK38 et des ubiquitine-ligases E3 DDB1 et TRIM21, alors que les interactions avec la petite protéine de choc thermique HSPB7 et la co-chaperonne DNAJB1 sont retrouvées diminuées par rapport à *BAG3*-WT.

Bien que HSPB7, le meilleur candidat positionnel au locus GWAS du chromosome 1, ait été à plusieurs reprises décrite comme n'interagissant pas directement avec BAG3 (Fang *et al.* 2019), l'étude menée par Perez-Bermejo *et al.* a pour la première fois permis de mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une interaction indirecte via d'autres partenaires comme HSPB8 (Muranova *et al.* 2021) et que le variant *BAG3*-C151R pourrait altérer l'interactome entre BAG3 et les HSPB en faveur d'autres petites protéines de choc thermique, telle qu'HSPB1. Le résidu Cys¹⁵¹ est situé dans une région conservée de la protéine BAG3 sans domaine ni fonction connue. Cependant, en

raison de sa proximité avec les domaines IPV, qui interviennent dans l'interaction avec les HSPB (Rauch *et al.* 2014), la mutation BAG3-C151R pourrait affecter directement la liaison BAG3-HSPB. De plus, on peut aussi imaginer que selon l'impact de la mutation dans la structure tridimensionnelle de BAG3, elle puisse également impacter des régions distantes comme le domaine BAG, responsable de la fonction de la protéine dans la qualité contrôle des protéines.

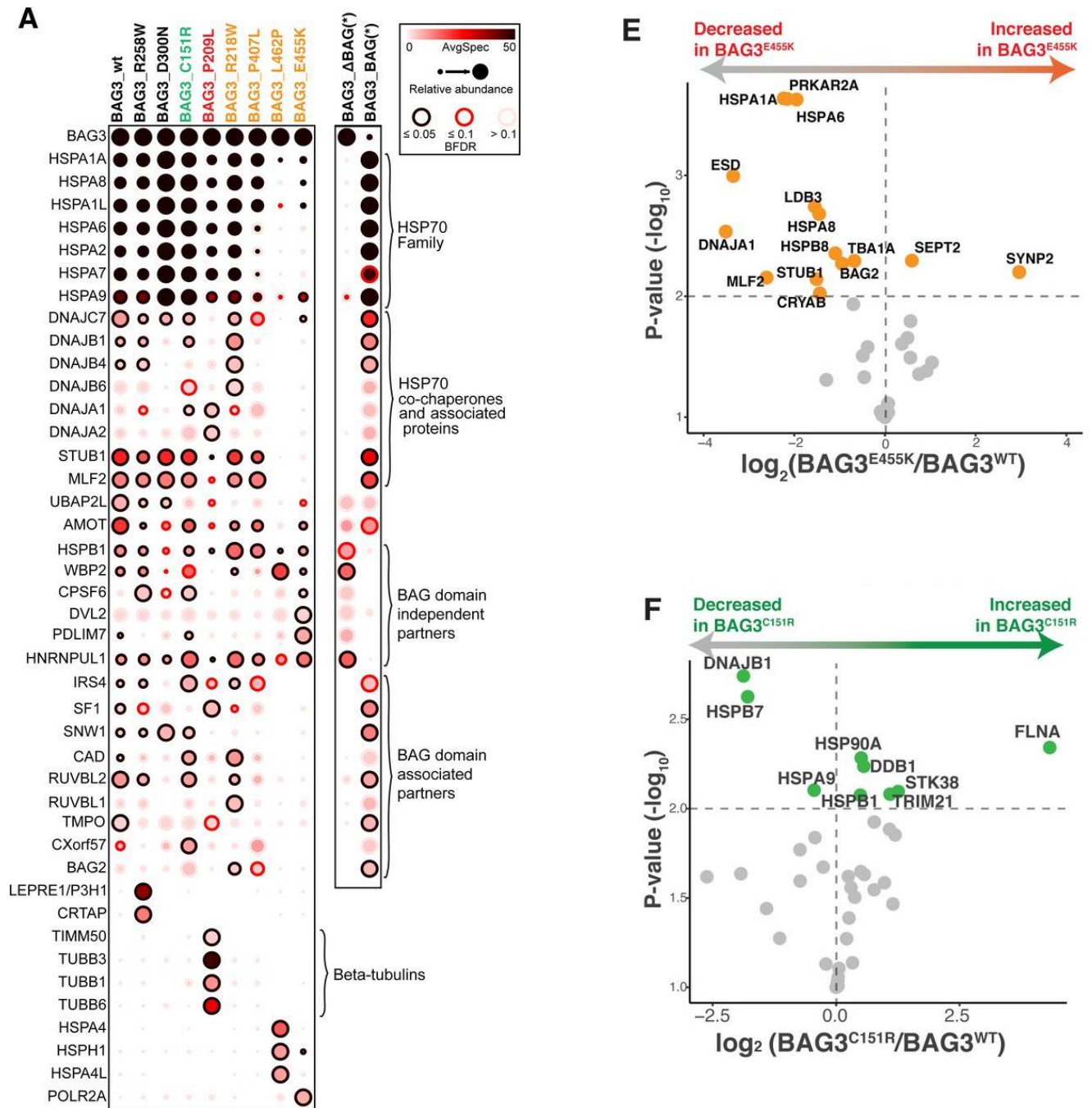


Figure 15. Les conséquences de la mutation BAG3-E455K sur l'interaction avec différents partenaires protéiques (Tiré de Perez-Bermejo et al. 2023)

(A) Profil de copréciptation entre les différents variants de BAG3 ainsi que la protéine délétée pour le domaine BAG (BAG3_ΔBAG) ou ne possédant que le domaine BAG (BAG3_BAG) **(E)** Volcano plot illustrant les différences d'interactions avec différents partenaires protéiques entre BAG3-E455K et BAG3-WT dans les CMs-iPSC. **(F)** Volcano plot illustrant les différences d'interactions avec différents partenaires protéiques entre BAG3-C151R et BAG3-WT dans les CMs-iPSC.

c. Gain de fonction

En plus du domaine BAG, le reste des mutations faux-sens identifiées se trouve majoritairement au niveau du second motif IPV (Figure 16). Initialement, l’hypothèse formulée était une perte de fonction associée à la perte de la liaison aux petites protéines chaperonnes (HSPBs) comme mécanisme cellulaire sous-jacent.

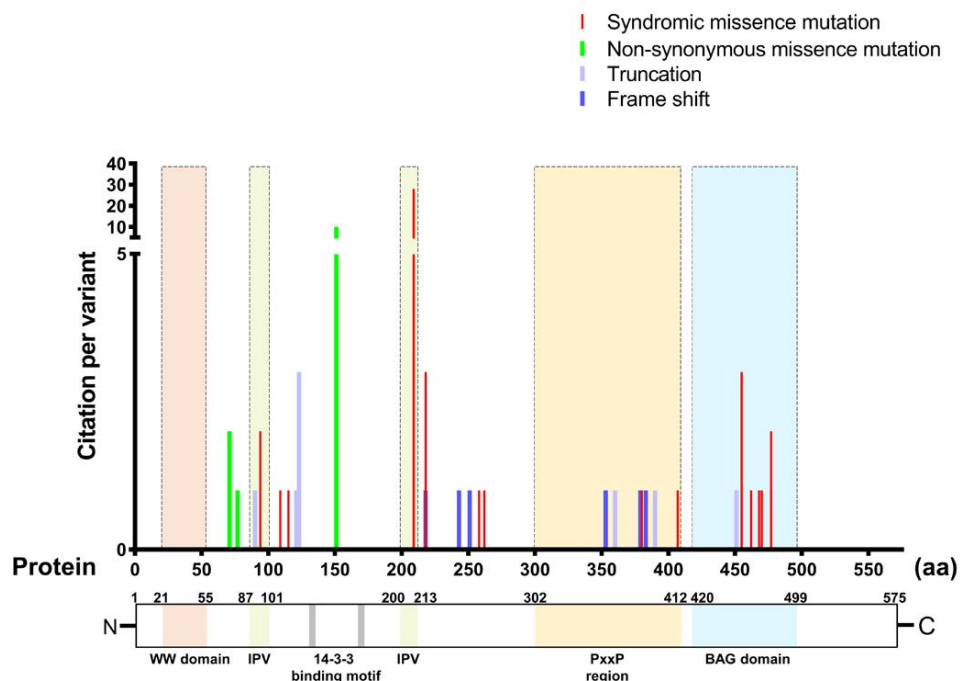


Figure 16. Illustration de la répartition des variants identifiés sur la séquence protéique de BAG3. (Adapté de Lin et al. 2021)

Cependant, l’étude de la liaison entre $BAG3^{P209L}$ et HSPB8 dans un modèle cellulaire a révélé que cette interaction n’était que modérément diminuée. Les auteurs ont démontré que des mutations au sein des deux motifs IPV sont nécessaires afin de prévenir l’interaction entre BAG3 et HSPB8 de façon certaine. Ces résultats viennent appuyer l’idée selon laquelle la perte de liaison aux HSPBs est insuffisante pour provoquer le phénotype cellulaire associé à la mutation $BAG3^{P209L}$. De manière surprenante, les auteurs ont mis en évidence que la mutation $BAG3^{P209L}$ entraîne l’accumulation d’agrégats protéiques associés aux protéines chaperonnes selon un mécanisme de gain de fonction. Cet effet aurait pour conséquence un phénomène de « chaperon-trap » impliquant la séquestration de l’ensemble du complexe BAG3-HSP70-client au sein d’agrégats ce qui *in fine*, conduirait à réduire le pool de chaperonne disponible au sein de la cellule (Meister-Broekema et al. 2018, Adriaenssens et al. 2020).

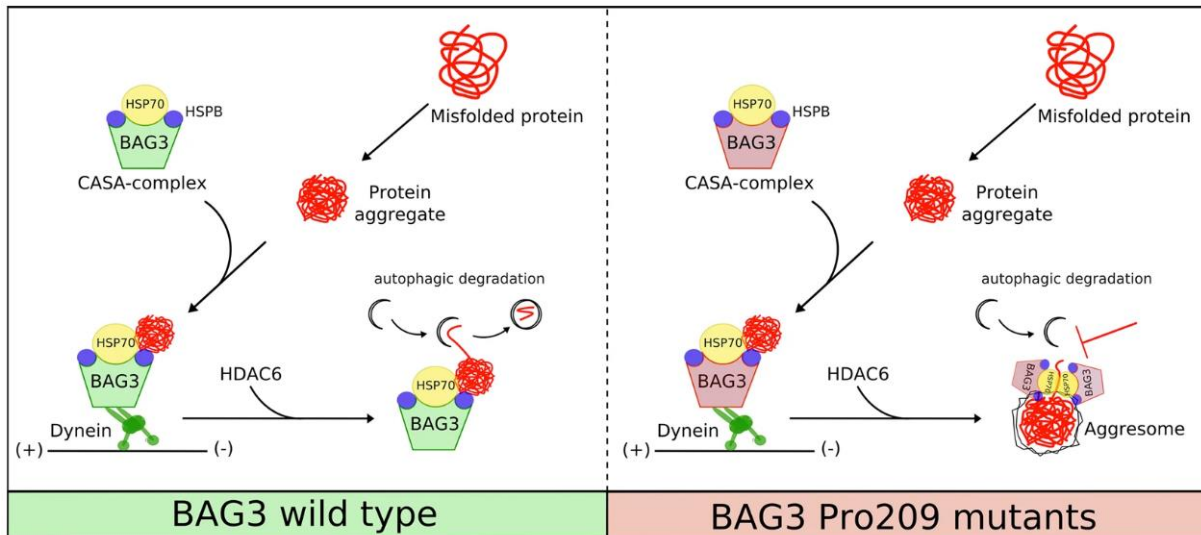


Figure 17. Mécanisme proposé illustrant la séquestration du complexe BAG3-HSP70 au sein d'agrégats en présence de la mutation BAG3-P209L. (Adapté de [Adriaenssens et al. 2020](#))

Les protéines mal repliées sont prises en charge par le complexe CASA et transportées vers le MTOC, où les autophagosomes sont rassemblés et leur contenu dégradé par les lysosomes. La mutation BAG3-P209L altère le cycle fonctionnel d'Hsp70 et par conséquent les complexes CASA, contenant la protéine BAG3 mutée, liés à leurs clients protéiques s'accumulent. Cela empêche d'une part la dégradation du cargo lié à Hsp70 et d'autre part, séquestre et diminue la disponibilité des acteurs majeurs participant à la protéostasie tels que HSPB8, SQSTM1/p62 et l'ubiquitine.

Finalement, l'ensemble de ces données suggèrent que selon le variant identifié et les mécanismes d'action par lequel la fonction de BAG3 est altérée, cela peut entraîner le développement d'un phénotype pathologique différent.

De façon intéressante, le phénotype observé dans le cas de mutations tronquantes et faux-sens (perte de fonction) est majoritairement le développement d'une CMD. Cela suggère un mécanisme global mettant en jeu une diminution des fonctions cellulaires de BAG3 qui conduirait au développement de la maladie (Table 3). Cependant, compte-tenu des nombreux autres domaines fonctionnels de BAG3 (Figure 16), on peut alors se demander si les mutations faux-sens du domaine BAG et l'haploinsuffisance engendrée par les mutations tronquantes ont réellement les mêmes conséquences au niveau cellulaire. Ainsi, ce travail de thèse a pour objectif de s'intéresser aux conséquences moléculaires et fonctionnelles d'une mutation faux-sens du domaine BAG de BAG3.

Mutation	Type de mutation	Maladie associée	Référence
R90X	Tronquante	CMD	Norton et al. 2011
A121X	Tronquante	CMD	Norton et al. 2011
R123X	Tronquante	CMD	Norton et al. 2011
M306X	Tronquante	CMD	Rafiq et al. 2017
R309X	Tronquante	CMD	Villard et al. 2011
T451X	Tronquante	CMD	Franaszczyk et al. 2014
R218Gfs	Frame shift	CMD	Norton et al. 2011
H243Tfs	Frame shift	CMD	Toro et al. 2016
Q251Rfs	Frame shift	CMD	Norton et al. 2011
Q353Rfs	Frame shift	CMD	Franaszczyk et al. 2014
G379Afs	Frame shift	CMD	Franaszczyk et al. 2014
S385Qfs	Frame shift	CMD	Villard et al. 2011
E455K	Faux-sens	CMD	Villard et al. 2011
L462P	Faux-sens	CMD	Arimura et al. 2011
V468M	Faux-sens	CMD	Villard et al. 2011
P470S	Faux-sens	MFM	Meister-Broekema et al. 2018
R477H	Faux-sens	CMD	Norton et al. 2011

Table 3. Liste des variants tronquants et faux-sens (domaine BAG) de BAG3

II. STRUCTURE ET FONCTIONS DE BAG3

Il s'agit d'une protéine possédant au sein de sa structure de multiples domaines protéiques lui permettant d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques lui conférant ainsi un éventail très varié de fonctions au sein de la cellule. Les deux fonctions majeures associées à BAG3 sont un rôle de co-chaperonne, qui en association avec les protéines de choc thermique, permet la prise en charge et l'élimination de protéines mal repliées ou agrégées et un rôle anti-apoptotique de par son interaction avec Bcl-2.

La suite de cette introduction vise donc à donner une vue d'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires dans lesquels BAG3 intervient, avec une attention particulière portée aux fonctions associées au domaine BAG, pour ainsi faire émerger une hypothèse afin d'expliquer le rôle physiopathologique des mutations de ce domaine, notamment dans le développement de la CMD.

a. Généralités sur les membres de la famille BAG

BAG3 fait partie de la famille des co-chaperonnes à domaine BAG, un domaine de liaison protéique particulièrement bien conservé au cours de l'évolution, que ce soit entre les espèces ou bien entre les différents membres de la famille BAG, suggérant ainsi un rôle biologique fondamental de ce domaine (Takayama *et al.* 1999). Historiquement, la première protéine de la famille BAG (BAG1) a été découverte en 1995 par une équipe japonaise lors de la recherche de partenaires interagissant avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Takayama *et al.* 1995). Cette découverte est à l'origine de la terminologie « BAG » pour Bcl-2 associated athanogene. En ce qui concerne BAG3, elle a été identifiée par la même équipe quelques années plus tard via un système double-hybride en recherchant des protéines interagissant avec le domaine ATPase d'HSP/HSC70, une protéine de choc thermique jouant un rôle majeur dans le maintien de la protéostasie cellulaire (Takayama *et al.* 1999). La même année, elle a également été identifiée par un autre groupe de recherche comme interagissant avec Bcl-2 et ainsi nommée Bis pour « Bcl-2 interacting death suppressor » (Lee *et al.* 1999). Finalement, cette protéine porte également un troisième nom, CAIR-1, pour « Calcium influx inhibitor stress-1 » de par la découverte de son interaction avec la phospholipase C- γ (PLC- γ), celle-ci intervenant notamment dans la régulation du calcium cytoplasmique en réponse à un signal transmembranaire (Doong *et al.* 2000). La terminologie « BAG3 » reste à ce jour la plus retrouvée et sera utilisée dans le reste de ce manuscrit.

En tout, la famille des protéines BAG est actuellement composée de 6 membres, BAG1 à BAG6, partageant un domaine protéique commun qui est le domaine BAG. Tandis que certains membres partagent des domaines protéiques distincts en plus du domaine BAG, d'autres ne possèdent que le domaine BAG comme illustré dans la figure 18.

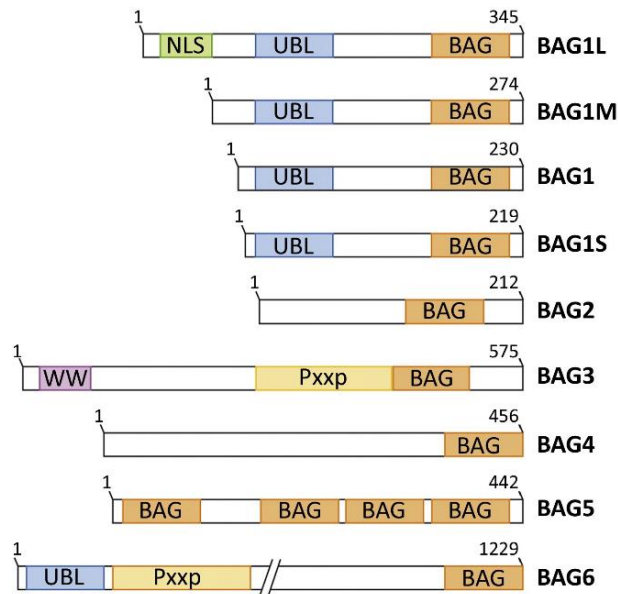


Figure 18 : Structure des membres de la famille des protéines BAG humaines (Adapté de Behl C. 2016) NLS « nuclear localization sequence », UBL : ubiquitin-like domain, BAG : Bcl-2 associated athanogene, WW : domaine tryptophane-tryptophane, Pxxp : région riche en proline.

Dans le cas des quatre isoformes de BAG1 et BAG6, le domaine UBL « ubiquitin-like protein » leur permet d’agir notamment sur la voie de dégradation des protéines ubiquitylées par le protéasome (Behl C. 2016).

Il s’agit d’une famille de protéine très conservée, avec des protéines ou homologues de la famille BAG retrouvés chez différentes espèces telles que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la drosophile *Drosophila melanogaster*, l’amphibien *Xenopus laevis*, différents mammifères en plus de l’homme tels que le rat et la souris ou encore chez les plantes *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa*. Finalement, la persistance au cours de l’évolution des protéines BAG indique un rôle central de ces protéines au niveau physiologique, lié à leur action favorisant la survie cellulaire en conditions de stress (Takayama *et al.* 2001, Kabbage *et al.* 2008, Rosati *et al.* 2011).

b. Généralités sur la structure de BAG3

En plus du domaine BAG et des motifs IPV pour « isoleucine-proline-valine » mentionnés précédemment, BAG3 possède également deux domaines WW, localisés à l'extrémité N-terminale (Takayama *et al.* 1999), un domaine PxxP riche en proline (Doong *et al.* 2000) ainsi que deux motifs contenant des phosphosérines (RSXpS) situés entre les deux motifs IPV (Figure 19).

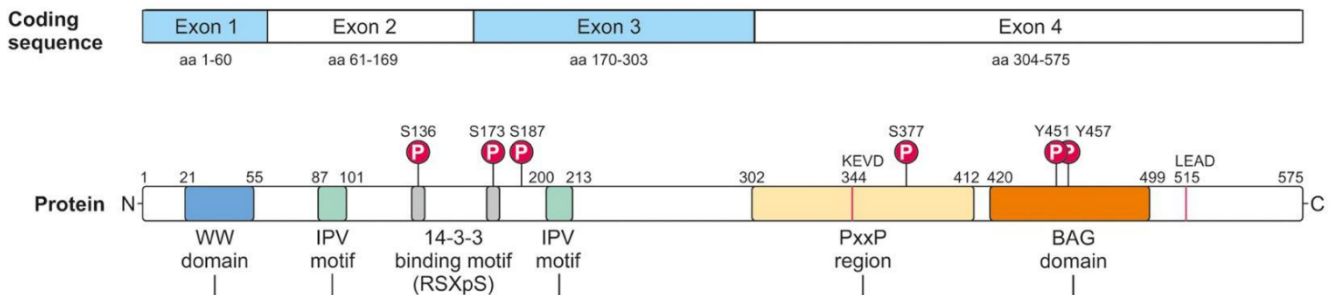


Figure 19. Structure et domaines protéiques de BAG3 (Adapté de Stürner et Behl 2017)

La séquence codante de BAG3 comprend quatre exons. La protéine BAG3 comprend divers motifs/régions et domaines caractéristiques. Il est suggéré que la protéine BAG3 soit phosphorylée au niveau des résidus sérine et tyrosine indiqués.

L'ensemble des protéines interagissant avec BAG3 à partir de ces domaines protéiques (récapitulées dans la Table 4) sont responsables des effets pléiotropes de BAG3 au niveau cellulaire.

Il a été mis en évidence que le niveau d'expression de BAG3 est modulable par diverses modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation. Il a notamment été montré que la phosphorylation de BAG3 au niveau de la sérine en position 377 est dépendante de la kinase ERK. Cette phosphorylation va par la suite entraîner l'ubiquitinylation et la dégradation de BAG3 par l'intermédiaire de FBXO22 (Liu *et al.* 2022). Selon le rôle de chaque modification post-traductionnelle, on peut alors supposer que la présence d'une mutation à proximité d'un site ces sites puisse avoir des conséquences sur les interactions entre BAG3 et ses partenaires, et donc sur son activité au niveau cellulaire.

Contrairement aux protéines intracellulaires dont la compartimentation subcellulaire est dépendante de leur fonction, BAG3 semble omniprésente au sein de la cellule afin d'établir un microenvironnement intracellulaire propre à chacune de ses fonctions (Figure 20).

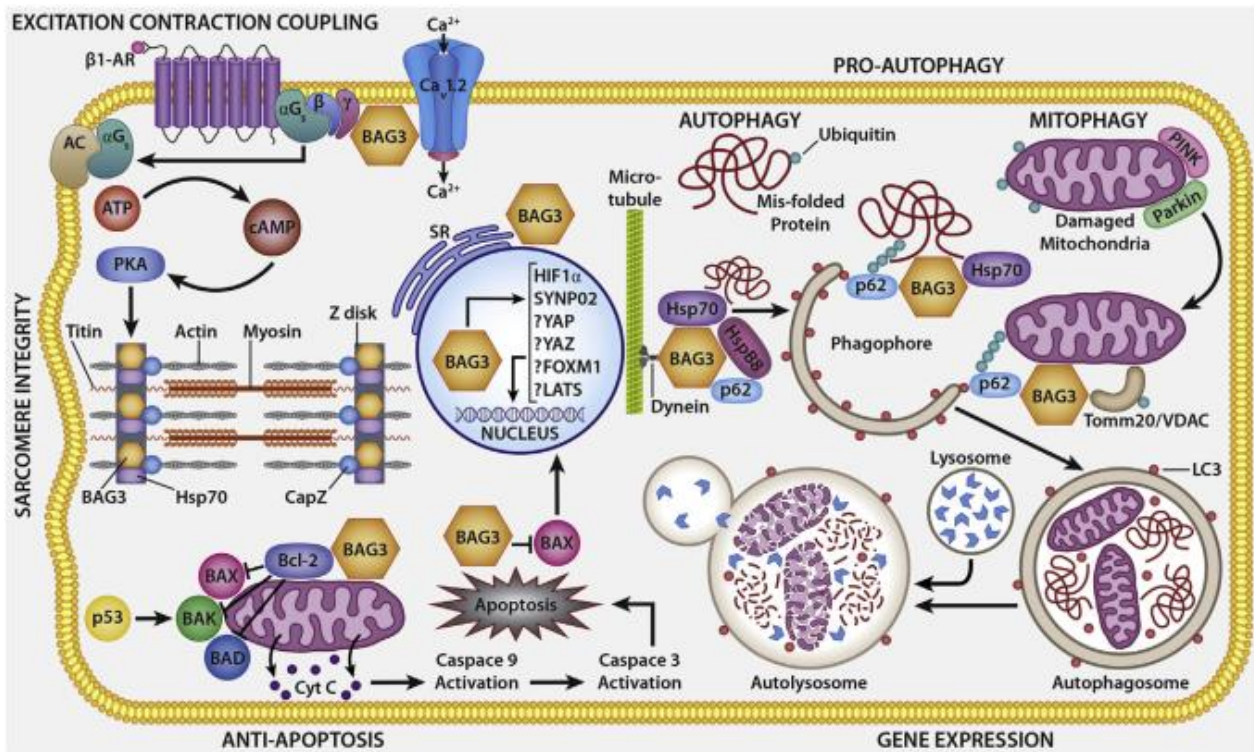


Figure 20. Les effets pléiotropes de BAG3 (Adapté de Myers et al. 2018)

Principales voies illustrant les différentes fonctions cardiaques de BAG3 : acteur clé de l'autophagie, inhibition de l'apoptose, maintien de la réponse adrénergique et du couplage excitation-contraction, soutien de la structure sarcomérique et modulation de l'expression génique.

Protéine	Domaine d'interaction	Fonction associée	Référence
SYNPO2	WW	Autophagie	Ulbricht et al. 2013
PDZGEF2	WW	Adhésion cellulaire	Iwasaki et al. 2010
AMOTL1/2	WW	Prolifération cellulaire	Ulbricht et al. 2013
LATS1/2	WW	Prolifération cellulaire	Ulbricht et al. 2013
TSC	WW	Régulation de la synthèse protéique et de l'autophagie	Kathage et al. 2017
HSPB5	IPV	Formation d'un complexe multi-chaperonne	Hishiya et al. 2011
HSPB6	IPV	Agréphagie	Fuchs et al. 2009
HSPB8	IPV	Agréphagie et régulation des granules de stress	Carra et al. 2008
HSPB1	IPV	Contrôle qualité des protéines	Rauch et al. 2017
14-3-3	RSXpS	Adressage de protéine vers l'agrésome	Xu et al. 2013
Dynéine	PxxP	Transport rétrograde vers l'agrésome	Gamerding et al. 2011
PLC- γ	PxxP	Adhésion et migration cellulaire	Doong et al. 2000
Src	PxxP	Adhésion et migration cellulaire	Colvin et al. 2014
HSC70	BAG	Reconnaissance et prise en charge de protéines agrégées ou mal-repliées	Takayama et al. 1999
HSP70	BAG	Reconnaissance et prise en charge de protéines agrégées ou mal-repliées	Doong et al. 2000
CapZβ	BAG	Structuration du sarcomère	Hishiya et al. 2010
Bcl-2	BAG	Apoptose	Lee et al. 1999
HSF1	BAG	Régulation de la translocation d'HSF1 vers le noyau	Jin et al. 2015

Table 4. Liste des protéines connues pour interagir directement avec BAG3

c. BAG3 dans le maintien de la structure du sarcomère

BAG3 est une protéine exprimée de façon ubiquitaire dont le niveau d'expression est variable selon les tissus. Elle est cependant majoritairement exprimée dans le muscle squelettique et cardiaque (Figure 21).

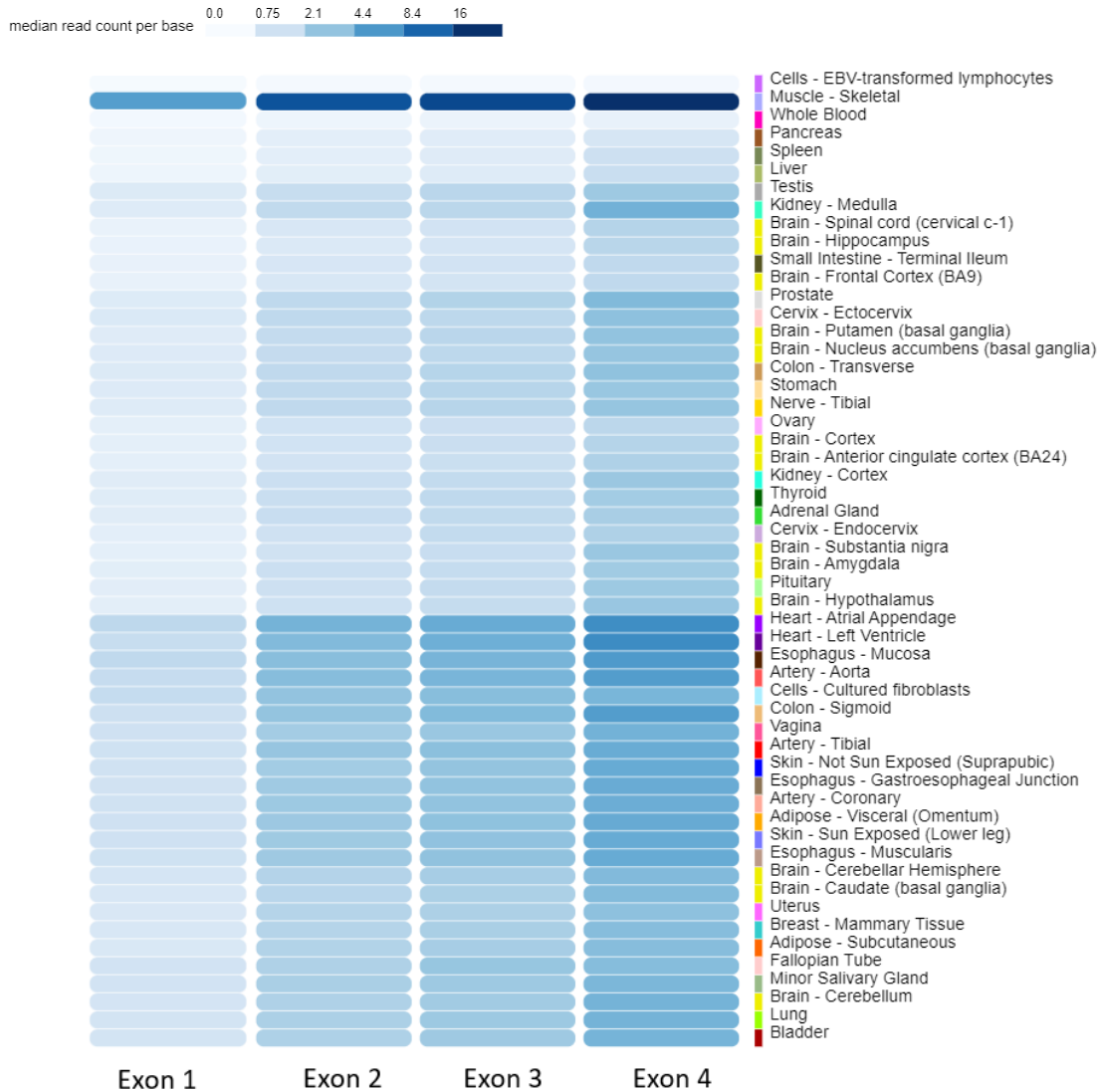


Figure 21. Expression tissulaire de chaque exon de Bag3

(Adapté du portail d'expression GTEx V8 <https://gtexportal.org/home/gene/BAG3#gene-transcript-browser-block>)

Modèles animaux

Initialement, la première étude qui a établi le lien entre BAG3 et la physiopathologie du muscle strié squelettique est l'analyse du phénotype des souris déficientes pour BAG3 (KO *Bag3*). Ces souris sont semblables aux souris WT et KO hétérozygote *Bag3* à la naissance et lors de leur

première semaine de vie. Cependant celles-ci arrêtent de prendre du poids 12 jours après la naissance, entraînant ainsi un important retard de croissance. L'analyse histologique par microscopie électronique a révélé une dégénérescence progressive des myofibrilles après la naissance, associée à un grand nombre de noyaux apoptotiques ainsi qu'une altération de la structure de la strie Z (Figure 22). Les souris déficientes pour *Bag3* développent donc une myopathie fulgurante ainsi qu'une cardiomyopathie associée à une dégénérescence du muscle cardiaque, alors que les souris KO hétérozygotes *Bag3* ne présentent aucune altération aussi bien au niveau phénotypique qu'au niveau histologique, avec Bag3 normalement localisé au niveau de la bande Z des sarcomères. L'ensemble des animaux KO homozygotes *Bag3* meurent de façon prématurée au bout de 25 jours après la naissance, très probablement d'une insuffisance respiratoire due à la dégénérescence avancée observée au niveau du diaphragme et des muscles intercostaux (Homma *et al.* 2006).

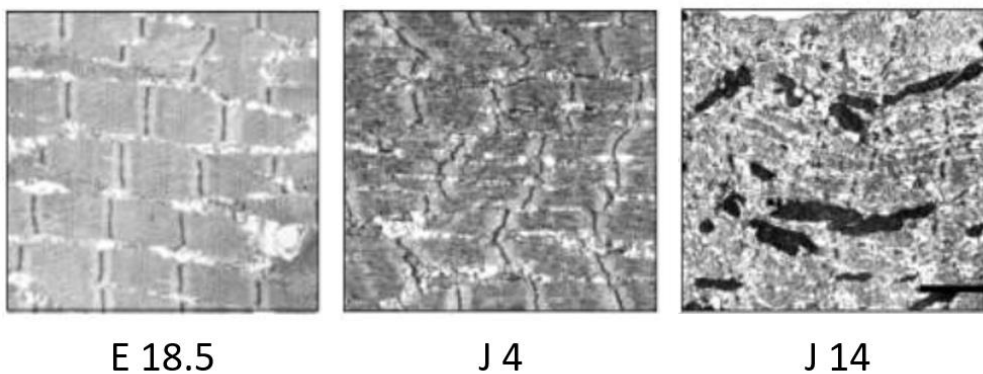


Figure 22. Dégénérescence myofibrillaire chez les souris KO homozygotes *Bag3* (Tiré de Homma *et al.* 2006) Photos d'imagerie par microscopie électronique réalisées sur des coupes de diaphragme de souris KO homozygotes *Bag3* à 18,5 jours de gestation embryonnaire (E 18.5), 4 et 14 jours après la naissance (J4 & J14).

Le deuxième modèle murin déficient pour *Bag3* qui a été étudié par la suite présente également un phénotype sévère. De façon similaire, animaux KO homozygotes *Bag3* développent un grave retard de croissance et une survie limitée à 3 semaines sans atteinte apparente chez les souris hétérozygotes KO. Les auteurs décrivent également des anomalies au niveau des stries Z et des fibres musculaires mais en revanche ne retrouvent pas de dégénérescence myofibrillaire ou d'atteinte au niveau cardiaque. Dans leur modèle, la mort prématurée des souris KO homozygotes *Bag3* serait davantage liée à une sévère détérioration métabolique plutôt qu'à une insuffisance respiratoire comme observée dans le premier modèle KO *Bag3* (Youn *et al.* 2008).

Enfin, dans le modèle drosophile, la déficience de la starvin, l'orthologue de BAG3, conduit également à une désorganisation de la strie Z associée à une perte de fonction musculaire, ainsi qu'à une létalité des larves (Coulson *et al.* 2005).

Au final, les modèles animaux déficients en BAG3, ou starvin chez la drosophile, présentent un développement musculaire normal au cours de l'embryogénèse, excluant un rôle de BAG3 dans l'assemblage musculaire initial. Cependant, lorsque les muscles sont sollicités après la naissance ou l'éclosion, on observe une détérioration rapide et dépendante de la force des disques Z.

Mécanismes cellulaires impliqués

Par la suite, des études mécanistiques visant à étudier le rôle de BAG3 réalisées sur des myocytes néonataux immatures, ont démontrées que BAG3 stabilisait la structure des sarcomères grâce au maintien de la protéine de coiffe de l'actine, CapZ β 1. Il s'agit d'une protéine sarcomérique capable de se fixer à l'extrémité + de l'actine filamenteuse (actine-F) et ainsi empêcher sa dépolymérisation. L'actine-F est la conséquence de la polymérisation de plusieurs actine-G dites globulaires. C'est donc une structure dynamique qui nécessite des protéines annexes afin d'être stabilisée, telles que CapZ β 1. De plus, il a été montré que cette protéine permet de positionner correctement les filaments d'actines au niveau de la strie Z, permettant ainsi d'établir un lien avec les sarcomères adjacents et ainsi de stabiliser la strie Z dans son ensemble (Pappas *et al.* 2008). Lorsque les cellules sont soumises à un étirement mécanique, il a été montré que BAG3 stabilise CapZ β 1, en facilitant son interaction avec HSC70, et ainsi permet de stabiliser le réseau d'actine et son ancrage au niveau de la bande Z (Hishiya *et al.* 2010). En présence d'une protéine BAG3 délétée pour son domaine BAG, les auteurs ont également démontré que BAG3 n'est plus capable d'intervenir dans la stabilité et le maintien de CapZ β 1 à la strie Z. CapZ β 1 n'est alors plus stabilisé, par l'intermédiaire d'HSC70, et est prise en charge par le protéasome pour être dégradée.

De façon intéressante, une diminution d'expression de la protéine CapZ β 1 a également été observée *in vivo* au sein de lysats protéiques obtenus à partir des cœurs explantés de souris KO homozygotes *Bag3* âgées de 14 jours. Ainsi il a été suggéré que l'altération des sarcomères observée dans ce modèle serait la conséquence de la perte de la stabilisation des myofibrilles par BAG3, par l'intermédiaire de CapZ β 1 (Hishiya *et al.* 2010).

Il convient de noter que certaines mutations BAG3 provoquent une faiblesse musculaire sévère chez l'homme, caractérisée par la détérioration des disques Z et l'accumulation d'agrégats protéiques (Béhin *et al.* 2015).

d. BAG3 dans le métabolisme

Le rôle de BAG3 dans la régulation générale du métabolisme a été mis en avant lors de l'étude du deuxième modèle murin déficient pour *Bag3* où les souris homozygotes KO présentent une nette hypoglycémie associée à des niveaux diminués de triglycéride et cholestérol (Youn *et al.* 2008). Ces animaux présentent également une réduction de la masse grasse périphérique en faveur d'un stockage lipidique au niveau du foie ainsi qu'un profil d'expression de gènes associés au métabolisme indiquant une activation de la gluconéogenèse et de la beta-oxydation dans le foie, caractéristiques de la réponse adaptative d'un organisme à la malnutrition, et plus particulièrement ici, à une hypoglycémie marquée. Les auteurs ont alors posé l'hypothèse que l'absence de *Bag3* entrainerait une déficience nutritionnelle qui aurait une influence considérable sur la croissance et la survie postnatale des animaux KO.

Dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome pancréatique (PDAC), il a été montré que BAG3 favorise la reprogrammation du métabolisme du glucose via l'interaction avec l'ARNm de l'hexokinase 2. BAG3 est capable d'augmenter l'expression de l'hexokinase 2, la première enzyme clé impliquée dans la glycolyse, au niveau transcriptionnel en stabilisant indirectement son ARNm. BAG3 entre en compétition avec protéines de liaison à l'ARN, Roquin et IMP3, et va ainsi modifier le recrutement de ces protéines au niveau de l'ARNm de l'hexokinase 2 selon son niveau d'expression. Les auteurs ont ainsi montré que l'inactivation de BAG3 va déstabiliser l'ARNm de l'hexokinase 2 via la promotion du recrutement de Roquin, tandis que la surexpression de BAG3 va stabiliser l'ARNm de l'hexokinase 2 via la promotion du recrutement d'IMP3 (An *et al.* 2017). L'étendue de ces résultats, en dehors d'un contexte de cancer, reste encore inconnue. Cependant l'hexokinase 2 étant la forme prédominante retrouvée dans les tissus insulino-sensibles, tels que le cœur et les muscles, et BAG3 y étant exprimée de façon majoritaire, un rôle plus vaste de BAG3 dans la régulation du métabolisme glucidique reste envisageable au sein de ces tissus.

En plus du rôle potentiel de BAG3 au sein des tissus insulino-sensibles, BAG3 semble également joué un rôle dans la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline par les cellules β

des îlots de Langerhans pancréatiques est dépendante du transport des granules de réserves contenant l'insuline au niveau de la membrane plasmique et de la fusion des vésicules sécrétrices à la membrane via un complexe SNARE « Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptors », composé des protéines VAMP-2, syntaxin-1 et SNAP-25. L'actine-F, en formant un réseau dense au niveau de la membrane plasmique intracellulaire, bloque l'accès et ainsi la fusion des vésicules sécrétrices à la membrane plasmique. La stimulation par le glucose des cellules β va conduire à l'activation de FAK « focal adhesion kinase » qui en agissant sur les petites GTPases qui va conduire au remodelage du réseau d'actine et ainsi permettre l'accès à la membrane plasmique des vésicules sécrétrices (Wang *et al.* 2009, Marzullo *et al.* 2020). Ainsi il a été montré que la modulation des niveaux de BAG3 impacterait la polymérisation de l'actine-F favorisant ainsi la sécrétion d'insuline. De plus, BAG3 interagirait avec SNAP-25 puis serait phosphorylé par FAK suite à une stimulation par le glucose ce qui aurait pour conséquence la perte d'interaction entre BAG3 et SNAP-25, permettant ainsi la formation du complexe SNARE et l'exocytose des vésicules sécrétrices (Iorio *et al.* 2015).

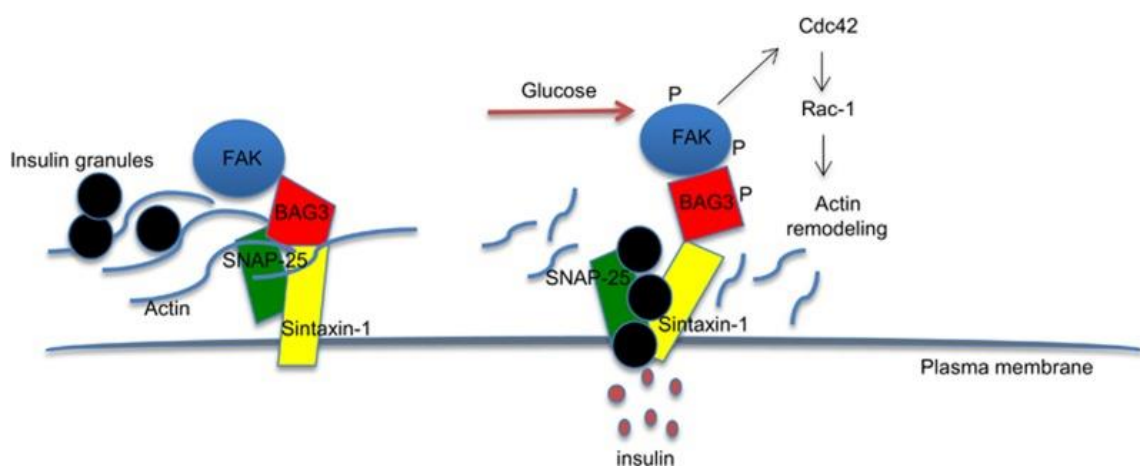


Figure 23. Rôle de BAG3 dans l'exocytose des granules d'insuline (Adapté de Iorio *et al.* 2015)

En conditions basales, la barrière composée d'actine-F (vraisemblablement stabilisée par BAG3) empêche la mobilisation des granules d'insuline vers la membrane plasmique. L'autophosphorylation de FAK, lors d'une stimulation par le glucose, conduit à l'activation des protéines de la famille Rho (Rac-1 et Cdc42) qui dirigent le remodelage de l'actine-F et à la phosphorylation de BAG3. BAG3 phosphorylé ne se lie plus à SNAP-25, permettant alors son interaction avec la syntaxine-1 et la formation du complexe t-SNARE, favorisant ainsi la sécrétion d'insuline.

La déficience de BAG3 au sein des cellules pancréatiques dans un modèle murin entraîne une hyperinsulinémie dû à une exocytose excessive de l'insuline, ce qui va finalement conduire à une résistance à l'insuline, principalement au niveau des muscles alors que le foie reste insulino-sensible. L'altération chronique du métabolisme entraîne avec le temps des

altérations histopathologiques avec notamment une forte accumulation de glycogène et de lipides au niveau du foie, rappelant une stéatose hépatique non alcoolique, ainsi qu'un épaissement de la membrane basale glomérulaire, mimant l'histopathologie retrouvée lors d'une maladie rénale chronique (Damiani *et al.* 2023). Ces résultats pourraient notamment permettre d'expliquer l'hypoglycémie retrouvée chez les souris homozygotes KO *Bag3* présentées précédemment (Youn *et al.* 2008).

e. BAG3 dans l'adhésion et la migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus dynamique, impliqué notamment dans le développement embryonnaire, l'homéostasie tissulaire et l'immunité, dans le but de promouvoir la formation de zones d'adhésion focale entre la matrice extracellulaire et la membrane des cellules. La dérégulation de la migration cellulaire est impliquée dans diverses situations pathologiques comme la formation de métastases cancéreuses. Les domaines protéiques SH2 et SH3, notamment retrouvés dans la structure de plusieurs oncoprotéines et protéines surexprimées dans les voies de signalisation dérégulées au sein de cellules tumorales, sont connus pour leur importance dans l'invasion et la progression tumorale (Mehrabi-pour *et al.* 2023). BAG3, capable d'interagir avec des protéines possédant des domaines SH3 via son domaine Pxxp, a rapidement été proposé comme protéine permettant la régulation de « protéines SH3 » impliquées dans l'adhésion et/ou la migration cellulaire.

Il a été montré que des fibroblastes murins déficients pour BAG3 présentent une formation ralentie des filopodes et des complexes d'adhérences après ensemencement sur plaque. Les auteurs ont également montré que la surexpression de BAG3 dans des cellules Cos7 et plusieurs lignées cancéreuses induisait une migration cellulaire plus importante. De façon intéressante, la diminution de la quantité protéique de BAG3 par ARN interférents diminue la migration cellulaire dans la majorité des lignées cellulaires cancéreuses testées. Cette diminution de l'expression de BAG3 a été associée à une diminution de l'activité de Rac1, suggérant un rôle de BAG3 dans la régulation des petites GTPase impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine. *In vivo*, la réduction des niveaux d'expressions de BAG3 au niveau de xénogreffes de cellules humaines cancéreuses dans des modèles murins montrent une diminution des capacités d'invasion et métastatiques des cellules tumorales (Iwasaki *et al.* 2007).

Quelques années plus tard la même équipe a montré l'interaction entre BAG3 et PDZGEF2, une protéine favorisant l'adhésion cellulaire et capable d'activer Rap1 et Rap2, de petites GTPases. Ils ont montré que la migration de cellules Cos7 transfectées avec un plasmide portant la séquence de la protéine BAG3 délétée pour son domaine WW était significativement réduite. Le domaine WW permettant l'interaction de BAG3 avec PDZGEF2 notamment, et Rap1 étant connu pour réguler positivement l'adhésion cellulaire dépendante des intégrines, les auteurs ont également pu démontrer une diminution de l'adhésion de ces cellules suggérant l'importance du domaine WW de BAG3 pour l'adhésion cellulaire ([Iwasaki et al. 2010](#)).

Le domaine Pxxp de BAG3 a également été montré comme impliqué dans l'adhésion et la migration cellulaire en régulant l'activité des protéines d'adhésion focale. Il a été montré que la surexpression de BAG3 dans des cellules de carcinomes humaines réduit significativement de la migration, de l'adhésion, ainsi que de la formation et de la signalisation d'adhésion focale. Cependant, la surexpression d'un mutant BAG3 incapable de se lier aux protéines possédant un ou plusieurs domaines SH3 améliore la migration et l'adhésion cellulaire ([Kassis et al. 2006](#)).

Finalement, la capacité de régulation par BAG3 de la migration et l'adhésion cellulaire est complexe et apparait dépendante des multiples interactions entre BAG3 et ses protéines partenaires grâce à ses différents domaines structuraux. Ainsi, des altérations de BAG3 pourraient avoir des conséquences sur la motilité et l'adhésion cellulaire, qui a terme pourrait favoriser la métastatisation.

f. BAG3 et stress cellulaire

BAG3 est la seule protéine de la famille BAG dont l'expression est inductible à la suite d'une grande variété de stimuli entraînant un stress au niveau cellulaire. Ainsi, BAG3 est retrouvé augmenté lors d'une exposition à des métaux lourds, un choc thermique ([Liao et al. 2001](#), [Pagliuca et al. 2003](#)), un stress oxydant, une inhibition du protéasome ([Liu et al. 2013](#), [Rapino et al. 2014](#)), l'hypoxie, un stress mécanique ([Brenner et al. 2023](#)), une infection bactérienne ou virale ([Franceschelli et al. 2008](#)) ou encore dans plusieurs types de tumeurs primaires ou de lignées cellulaires tumorales ([De Marco et al. 2017](#)).

La surexpression de BAG3 est concomitante avec celle d'HSP70, une protéine hautement conservée et acteur majeur de la réponse cellulaire en condition de stress chez l'ensemble des organismes vivants (Usman *et al.* 2017). L'activation transcriptionnelle de BAG3 est principalement liée à l'activité de son promoteur et à sa régulation par le facteur de transcription HSF-1 « heat-shock transcription factor ». En réponse à un stress cellulaire, HSF1 va se lier aux deux éléments HSE « heat-shock element » présents dans la séquence promotrice de BAG3 et ainsi permettre son expression transcriptionnelle (Franceschelli *et al.* 2008).

Dans un modèle cellulaire, il a également été montré que BAG3 est capable de transloquer dans le noyau lors d'un choc thermique afin de réguler la translocation nucléaire d'HSF-1 et ainsi activer la réponse transcriptionnelle cellulaire en réponse à un stress (Jin *et al.* 2015).

D'autres facteurs de transcriptions sont connus pour réguler l'expression de BAG3 tels que NFκB (Rapino *et al.* 2015), EGR-1 (Gentilella *et al.* 2008), AibZIP (Ben Aicha *et al.* 2007) et WT1 (Cesaro *et al.* 2010). De plus, il a été montré que BAG3 est capable de réguler sa propre transcription en se liant à son promoteur dans les cellules gliales (Gentilella *et al.* 2009).

g. BAG3 et apoptose

L'une des premières fonctions associées à BAG3, est son rôle primordial et sa capacité à inhiber l'apoptose via de multiples mécanismes cellulaires. Ces différents mécanismes ont principalement été mis en évidence par des études *in vitro* sur des cellules cancéreuses. L'apoptose est caractérisée par une cascade d'évènements suite à la réception d'un signal qui va aboutir à l'activation des caspases, les principaux effecteurs de la mort cellulaire par apoptose (Kögel *et al.* 2020). Les membres de la famille Bcl-2 sont des protéines bien connues de la régulation de l'apoptose. Ils peuvent être répartis en deux classes, les membres favorisant l'activation des caspases dits « pro-apoptotiques », tels que Bax, Bak ou Bad, et ceux inhibant la mort cellulaire dits « anti-apoptotique », comme Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1. Ces protéines vont permettre de réguler le déclenchement de l'apoptose via la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ces pores sont la conséquence de la libération cytosolique de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, depuis l'espace intermembranaire mitochondriale qui vont de ce fait activer les caspases et induire l'apoptose (Kale *et al.* 2018).

BAG3 est reconnu pour venir stabiliser l'effet des membres anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1, en prévenant leur dégradation par la formation d'un complexe avec HSP70, à partir de son domaine BAG, afin d'empêcher l'acheminement de ces protéines vers le protéasome (Kögel *et al.* 2020).

L'acheminement de cargo protéique par HSP70 vers le protéasome est normalement médié par BAG1 grâce à son domaine ubiquitin-like, absent dans la structure de BAG3 (Lüders *et al.* 2000). Le rôle de BAG3 dans la prévention de l'acheminement de protéines vers le protéasome pourrait être expliqué par la compétition pour la liaison à HSP70 entre BAG3 et BAG1. Quand le niveau d'expression de BAG3 augmente, celui-ci va substituer BAG1 et éventuellement empêcher le lien entre HSP70 et le protéasome de s'établir, évitant ainsi la dégradation du cargo protéique (Marzullo *et al.* 2020).

En plus de son effet sur les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, il a été reporté que BAG3 est également capable d'activer la voie anti-apoptotique dépendante de NF- κ B dans des cellules d'ostéosarcomes et de mélanomes. De la même manière que précédemment, BAG3 va prévenir l'acheminement vers le protéasome d'IKK- γ , une kinase permettant la libération intra-cytosolique de NF- κ B. Par conséquent cela va empêcher sa dégradation et ainsi permettre l'activation prolongée de NF- κ B, notamment impliqué dans la survie cellulaire (Ammirante *et al.* 2010). Cette activation prolongée va alors permettre la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau et donc favoriser la survie cellulaire.

BAG3 exerce donc sa fonction anti-apoptotique via divers mécanismes, selon le type cellulaire ou bien les partenaires protéiques disponibles, notamment via son interaction avec HSP70 depuis son domaine BAG.

Les cellules cancéreuses sont constamment soumises à un stress, notamment engendré par une synthèse protéique accélérée participant à l'accumulation de protéines mal repliées et d'autres débris cellulaires. Ainsi pour survivre, les cellules cancéreuses ont développées la capacité d'activer les systèmes de prises en charge des agrégats cellulaires et protéiques, comme l'autophagie, tout en inhibant l'apoptose, ce qui explique que cette BAG3 soit retrouvée exprimée de façon constitutive dans un certain nombre de cancers.

Une expression augmentée de BAG3 est un mauvais pronostic dans les cancers, avec notamment l'association de son activité anti-apoptotique avec la résistance à la

chimiothérapie (Festa *et al.* 2011, Kirk *et al.* 2021). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence que l'interaction BAG3/HSP70 favorise le développement tumoral alors qu'une absence d'interaction a l'effet opposé (Colvin *et al.* 2014). De ce fait, plusieurs études ont permis l'identification de petites molécules inhibitrices de l'autophagie, YM-1 puis JG-98, qui perturbent l'interaction BAG3/HSP70. Ainsi, l'utilisation de ces molécules ont notamment pour conséquence la perte de la signalisation dépendante de Src leur conférant une activité anti-proliférative *in vitro* et *in vivo* (Li *et al.* 2015, Stürner *et al.* 2017).

Cependant le développement de thérapies anti-cancéreuses visant BAG3 restent complexes notamment par l'importance de BAG3 au niveau cardiaque et l'éventuelle cardiotoxicité engendrée par ce type de thérapie (Li *et al.* 2015).

h. L'interaction BAG3/HSP70

Cette chaperonne fait partie de la famille des protéines chaperonnes HSP70 (HSPA) qui est constituée de 13 membres dont l'expression est constitutive, comme HSC70 (HSPA8), ou bien induite par un stress tel que HSP70/72 (HSPA1A). Ces chaperonnes, très conservées au cours de l'évolution, sont exprimées de façon ubiquitaire et ont pour fonction principale le repliement des protéines synthétisées de novo, la stabilisation de protéines cibles ainsi que la prise en charge de protéines dont la conformation tridimensionnelle est anormale afin d'être repliées correctement ou bien dégradées.

Les HSP70 contiennent un domaine ATPase, également appelé NBD « nucleotide-binding domain », dans leur région N-terminale ainsi qu'un domaine SBD « substrate-binding domain » dans leur région C-terminale, capable de se lier à la protéine cible. Les cycles de liaison/dissociation sont dépendants de l'ATP. En effet lorsque l'enzyme est liée à l'ATP, la liaison du SBD avec le substrat protéique est alors possible, l'hydrolyse de l'ATP en ADP permet la stabilisation de l'interaction entre le SBD et le substrat permettant ainsi une bonne liaison entre HSP70 et la protéine cible. Le passage dans la configuration où HSP70 est à nouveau liée à l'ATP déclenche la dissociation du SBD au substrat permettant ainsi à un nouveau cycle de commencer. Cependant, la capacité d'HSP70 à hydrolyser l'ATP est intrinsèquement faible. Pour faciliter ce processus, les co-chaperonnes d'HSP70 interviennent, tels que les protéines J (également appelées HSP40) et les facteurs d'échange de nucléotides (NEF). Les protéines J

partagent toutes un tronçon de 70 acides aminés, le domaine J, qui interagit avec le domaine NBD d'HSP70 afin de stimuler son activité ATPasique et faciliter la capture du client.

Dans le cadre du contrôle qualité des protéines, HSP70 interagit et collabore avec d'autres chaperonnes, comme celles de la famille HSPB, mais également un certain nombre de co-chaperonnes et de co-facteurs tels que STUB1. Ces co-facteurs et co-chaperonnes sont responsables de la régulation de l'activité d'HSP70. Les NEFs « nucleotide exchange factors », tels que HSP110 ou les membres de la famille BAG, sont capables de moduler l'échange nucléotidique (ATP/ADP) au niveau du domaine NBD et ainsi potentialiser l'activité d'HSP70 en favorisant notamment la dissociation entre HSP70 et son client (Stürner *et al.* 2017, Behl C. 2016).

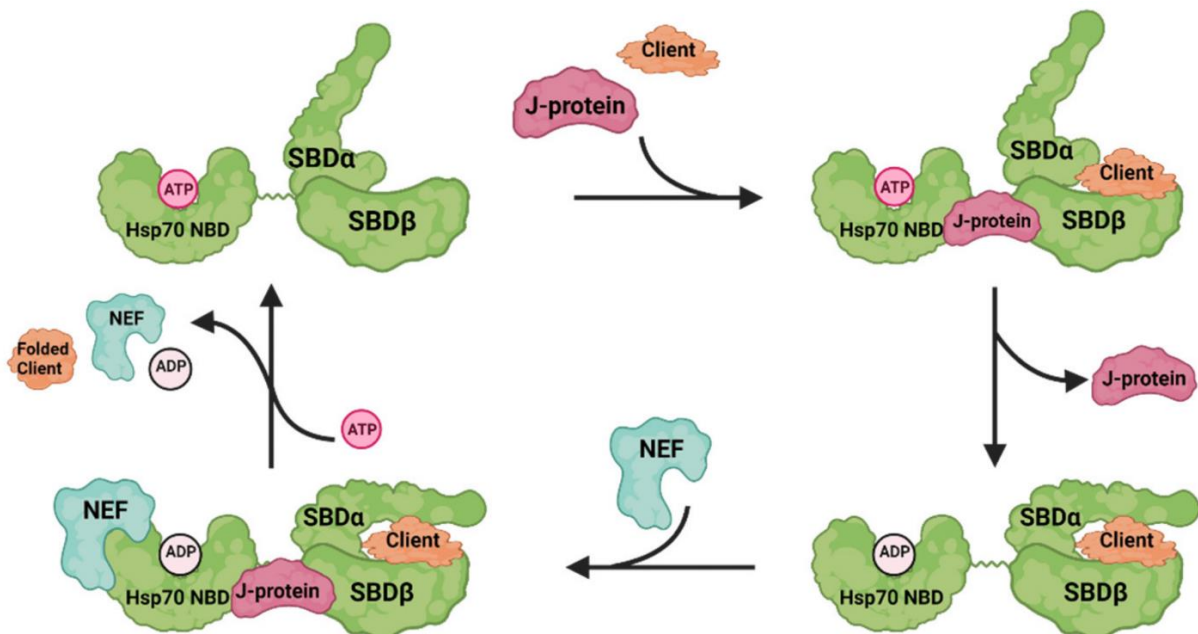


Figure 24. Illustration du cycle chaperonne d'HSP70 (Tiré de Wang *et al.* 2021)

HSP70 se compose de deux domaines reliés par un connecteur flexible : un domaine N-terminal de liaison à l'ATP (NBD) et un domaine C-terminal de liaison au substrat/client (SBD), qui est divisé en un sous-domaine β (SBDβ), hébergeant la liaison au substrat, et un sous-domaine α (SBDα), formant une structure de verrouillage afin de piéger les clients à replier. Lorsque l'ATP se lie au NBD, le SBDα s'ouvre. La co-chaperonne (protéine J) se lie à HSP70 pour stimuler son activité ATPasique et faciliter la liaison du client dans la poche hydrophobe du SBDβ. L'hydrolyse de l'ATP entraîne la fermeture du SBDα et le piégeage du client. Une autre co-chaperonne, le facteur d'échange de nucléotides (NEF), se lie au NBD d'HSP70 pour accélérer la libération d'ADP entraînant l'ouverture du SBDα et le relargage du client s'il est correctement replié.

Il existe cependant une hiérarchie en ce qui concerne l'affinité des différents membres de la famille BAG pour HSP70, il a ainsi été déterminé que BAG3 possède une plus grande affinité

pour HSP70 que BAG1 (Rauch *et al.* 2014). Cette caractéristique est notamment à l'origine du « switch BAG1/BAG3 ».

Les membres de la famille BAG interagissent avec HSP70 à partir du domaine BAG, un domaine très conservé composé de trois hélices α anti-parallèles. Situé à l'extrémité C-terminal de BAG3, il va permettre d'interagir avec le domaine ATPase d'HSC/HSP70 notamment via des interactions électrostatiques principalement au niveau des résidus Glu455, Asp465, Arg480 et Gln488 situés au niveau des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Sondermann *et al.* 2001). Ces résidus sont très conservés entre les membres de la famille BAG ainsi qu'à travers les espèces (Doong *et al.* 2002). Il a été montré que des mutations touchants ces quatre acides aminés chez BAG1 entraînent une importante perte de liaison avec le domaine ATPase d'HSC70 (Sondermann *et al.* 2001).

Ainsi, l'interaction entre BAG3 et HSP70 intervient dans de nombreux mécanismes physiologiques, aussi bien pour permettre de stabiliser une protéine cible et conserver sa fonction, telle que dans la régulation de l'apoptose ou la contraction musculaire, que pour préserver l'homéostasie de la cellule en permettant le recyclage et la dégradation de protéines obsolètes (Figure 24).

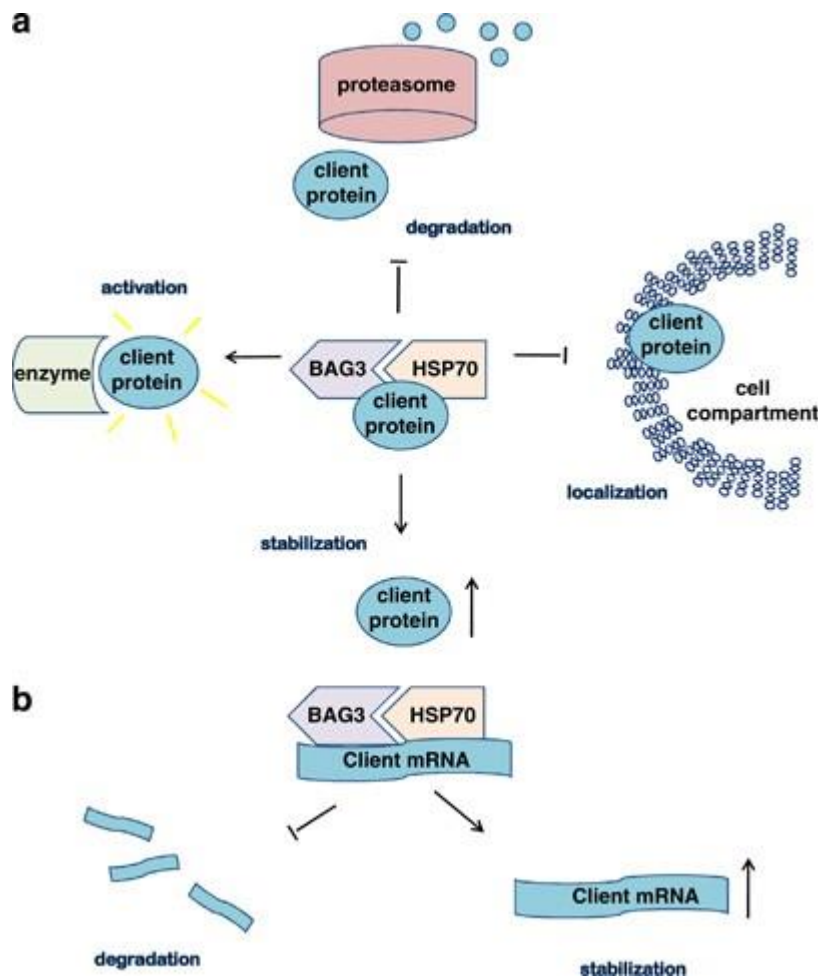


Figure 25. Mécanismes impliquant le complexe BAG3-HSP70 (Tiré de Rosati *et al.* 2011)
Mécanismes impliquant BAG3 sur (a) les protéines cibles et (b) les ARNm cibles.

III. BAG3 ET AUTOPHAGIE

Le contrôle de la qualité des protéines (PQC) est le mécanisme par lequel une cellule surveille les protéines pour s'assurer qu'elles sont correctement repliées. Le contrôle de la qualité des protéines s'effectue principalement dans le réticulum endoplasmique et peut rediriger les protéines endommagées vers la machinerie de repliement assurée par les chaperonnes pour être corrigées ou, lorsque cela est impossible, les transmettre aux systèmes de dégradation. BAG3, de par son interaction avec HSP70, va jouer un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie protéique ou protéostasie.

Un composant essentiel du PQC est constitué par les chaperonnes moléculaires qui assurent le bon repliement tridimensionnel des protéines et empêche ainsi leur agrégation (Kim *et al.* 2013). Les chaperonnes moléculaires constituent jusqu'à 10 % du protéome et jouent des

fonctions importantes dans la protéostasie en conditions physiologiques mais également en réponse à un stress (Kästle et Grune 2012). La majorité des chaperonnes moléculaires sont des protéines de choc thermique (HSP) car elles sont induites par divers stress tels qu'une élévation de la température, le stress oxydatif, l'exposition à des produits toxiques ou encore l'inflammation (Garrido *et al.* 2001). Les HSP sont divisés en plusieurs sous-groupes en fonction de leur taille, tels que Hsp70, Hsp90, Hsp60, Hsp40 (DnaJ) et les petits HSP (HSPB). Bien que ces protéines puissent agir selon des modes d'actions distincts, elles partagent toutes la reconnaissance et la capacité de liaison aux séquences hydrophobes exposées par les protéines mal repliées. La fonction principale des chaperonnes moléculaires est d'aider les protéines mal repliées ou non repliées à retrouver ou à acquérir leur conformation tridimensionnelle normale, cependant lorsque cela est impossible elles vont faciliter la dégradation des protéines mal repliées en collaboration avec les systèmes de dégradation. Dans les cellules eucaryotes, deux voies de dégradation protéiques majeures coexistent : le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie couplée à la fonction de dégradation lysosomale (Figure 26). Ces systèmes, décrits dans la suite de cette introduction, sont fondamentaux dans l'élimination de protéines et agrégats potentiellement toxiques pour les cellules, notamment les cellules post-mitotiques comme les cardiomyocytes et les neurones qui ne peuvent pas diminuer la quantité de substances toxiques par division cellulaire. Ces cellules sont donc particulièrement sensibles au stress protéotoxique et dépendantes des systèmes de maintien de la protéostasie dans lesquels BAG3 intervient notamment.

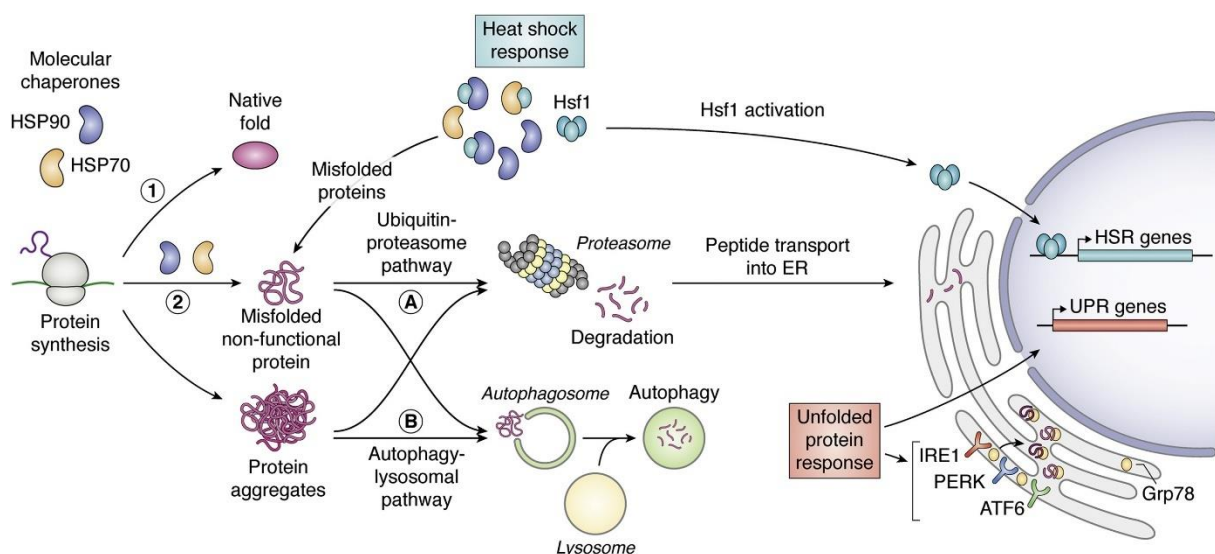


Figure 26. Vue d'ensemble du réseau participant à l'homéostasie protéique (Tiré de Mercier et LaPointe 2022)

a. L'homéostasie protéique

L'homéostasie des protéines ou « protéostasie » représente le processus qui régule l'équilibre intracellulaire des protéines afin de les maintenir fonctionnelles. La protéostasie est fondamentale afin de préserver les processus métaboliques physiologiques au sein de la cellule et permettre de répondre à tout stimulus nécessitant l'intervention des acteurs de la protéostasie. La protéostasie implique plusieurs stratégies parallèles visant à soit corriger, dégrader ou séquestrer les polypeptides obsolètes (Powers *et al.* 2009). Lorsque la performance de ces systèmes décline, avec l'âge ou suite à une altération intrinsèque, les protéines ne sont plus capables d'acquérir leur bonne conformation tridimensionnelle. Ceci va avoir pour conséquence l'accumulation d'agrégats protéiques, potentialisé lors de la survenue d'un stress cellulaire. En absence de mécanismes compensatoires, ce déséquilibre peut avoir pour conséquence l'effondrement totale du maintien de la protéostasie cellulaire, ce qui peut à terme entraîner la mort cellulaire et/ou le développement de maladies liées à la présence excessive d'agrégats protéiques comme les maladies neurodégénératives mentionnées précédemment (Hipp *et al.* 2014).

Stress du RE et réponse UPR

Les protéines synthétisées *de novo* vont pouvoir acquérir leur conformation au sein du réticulum endoplasmique (RE) ainsi que de nombreuses modifications post-traductionnelles sous la surveillance des protéines chaperonnes. Lorsque des protéines anormalement conformées s'accumulent dans la lumière du RE, cela va conduire à l'induction d'une réponse adaptative appelée « unfolded protein response » ou réponse UPR. Ce processus va permettre de rétablir l'homéostasie au sein du RE de trois manières principales. Premièrement, il va permettre à la cellule de résorber l'accumulation de protéines dans la lumière du RE, via l'atténuation de la synthèse protéique. Deuxièmement, il va permettre de réduire la surcharge protéique observée dans le RE via un programme transcriptionnel spécifique, permettant une augmentation de l'expression de protéines chaperonnes. Troisièmement, les protéines anormales sont éliminées par la machinerie de dégradation des protéines associées au RE (ERAD) qui va permettre le transport hors du RE des protéines à dégrader vers les systèmes de dégradation, le protéasome et l'autophagie. Si malgré tout l'homéostasie du RE n'est pas

rétablie, alors la deuxième phase du programme conduisant à l'apoptose se déclenche (Foufelle *et al.* 2007).

Cette réponse adaptative intégrée est contrôlée par trois protéines transmembranaires résidant dans le RE, à savoir ATF6 (activating transcription factor 6), PERK (PKR-related endoplasmic reticulum kinase) et IRE1 (inositol requiring enzyme 1). Dans un contexte physiologique ces protéines sont inactives de par leur liaison à la protéine chaperonne GRP78. Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans la lumière du RE, GRP78 va alors lier ces protéines obsolètes et ainsi libérer ATF6, PERK et IRE1, activant ainsi la réponse UPR (Figure 26).

Protéasome

Dans le cas où le repliement effectué par les protéines chaperonnes n'est pas suffisant ou impossible, les protéines mal repliées sont maintenues solubles par les protéines chaperonnes afin que les systèmes de dégradations interviennent. Les protéines solubles sont principalement prises en charge par le protéasome alors que les agrégats ou les protéines ayant une taille trop importante vont plutôt être pris en charge par le système de l'autophagie. La protéolyse médiée par le Système Ubiquitine-Protéasome ou UPS, est un procédé de dégradation très conservé ayant pour fonction de dégrader les protéines dénaturées, mal repliées ou obsolètes de manière ciblée. Ce système prend également en charge les protéines fonctionnelles qui ne sont plus nécessaires, permettant ainsi une certaine régulation de l'activité protéique. Les protéines à dégrader sont marquées par l'ajout covalent de plusieurs molécules d'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés, sur des résidus lysines retrouvés principalement en position 48 (K48), mais aussi en position 11 (K11) et 63 (K63) dans le cas d'une dégradation médiée par le protéasome (Lamark et Johansen 2012). La machinerie d'ubiquitylation est centrée autour de l'action concertée de trois enzymes, E1 (ubiquitin-activating enzyme) qui permet l'activation de l'ubiquitine en présence d'ATP et E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) qui va permettre de conjuguer l'ubiquitine à la protéine cible en coordination avec E3 (ubiquitin protein-ligase) qui contrôle la spécificité du système en reconnaissant la protéine cible. Les protéines ainsi ubiquitylées vont ensuite être reconnues et dégradées par le cœur catalytique du protéasome (Vilchez *et al.* 2014).

Ce sont les chaperonnes, associées à leur co-chaperonnes, qui vont permettre l'identification et l'adressage des cargos protéiques à dégrader vers le protéasome ou bien l'autophagie. L'avenir des substrats (dégradation, maintien ou correction) et, si besoin, leur adressage à un système de dégradation est notamment médié par des protéines interagissant avec HSP70, telles que l'ubiquitine ligase CHIP, ou les membres de la famille BAG. Comme mentionné précédemment il existe une hiérarchie parmi les membres de la famille BAG en ce qui concerne l'interaction avec HSP70 (BAG3 > BAG1 > BAG2). Ainsi lorsque BAG1 est lié à HSP70, celui-ci va favoriser l'adressage des substrats protéiques vers le protéasome en coopérant avec CHIP (Chen *et al.* 2021). A l'inverse, BAG2 est un inhibiteur de l'activité ubiquitine ligase de CHIP et va ainsi inhiber l'ubiquitination de substrat dépendante de CHIP et leur adressage au protéasome (Qin *et al.* 2016). Quant à BAG3, il a été montré qu'il est capable d'inhiber la dégradation dépendante du protéasome afin de favoriser l'orientation des substrats vers une voie de dégradation autophagique (Gamerding *et al.* 2009). De plus, BAG3 via son interaction avec HSP70, est capable de venir stabiliser certaines protéines afin de prévenir leur dégradation par le protéasome.

Cela indique que les membres de la famille BAG, via leur interaction avec HSP70 à partir du domaine BAG, sont capables de réguler le devenir du substrat protéique lié à HSP70 entre stabilisation ou dégradation par l'un des systèmes, le protéasome ou l'autophagie.

L'autophagie

L'autophagie est un procédé très conservé chez les eucaryotes qui permet la séquestration et la dégradation de matériel intracellulaire. Le matériel ainsi séquestré est ensuite digéré puis recyclé grâce aux lysosomes. La machinerie autophagique, active à l'état basale dans l'ensemble des cellules, est capable de prendre en charge une grande variété de matériel tels que les organites altérés, les protéines vieillissantes, agrégées ou mal repliées. On distingue trois sous-types qui sont la microautophagie, la macroautophagie couramment appelée autophagie dans la littérature et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (Figure 27). Ces voies aboutissent toutes à la dégradation lysosomale mais elles diffèrent de par le type de cargo pris en charge, leur régulation ou encore la manière dont le cargo est acheminé jusqu'aux lysosomes (Parzych *et al.* 2013).

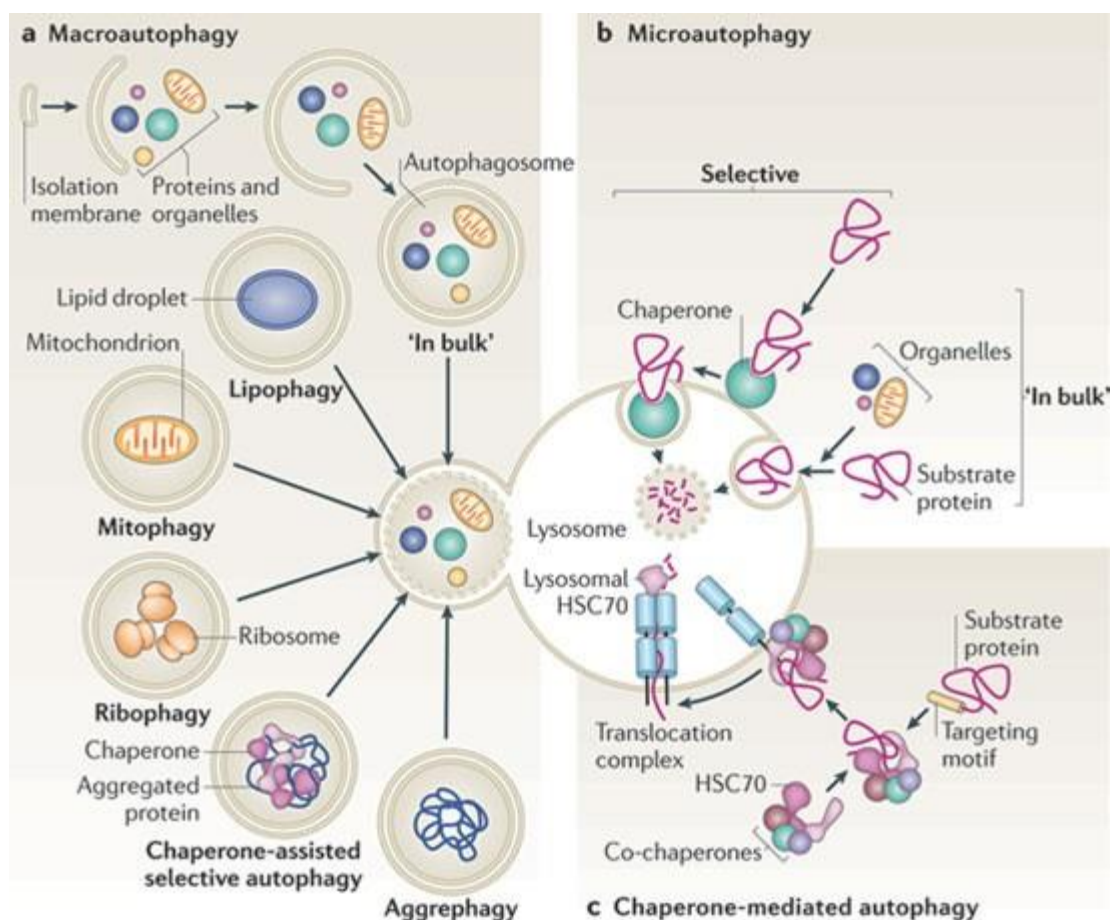


Figure 27. Les différents types d'autophagie (Tiré de Cuervo A. M. 2011)

La microautophagie

La microautophagie correspond à la dégradation directe de composés par l'invagination de la membrane lysosomale (Mijaljica *et al.* 2011). Selon la nature du contenu cytoplasmique pris en charge on distingue une voie non sélective « in-bulk » ou sélective. La microautophagie non sélective dite « in bulk » permet la dégradation aléatoire de certains éléments cytoplasmiques suite à l'invagination de la membrane lysosomale. Opposé à cela, la microautophagie sélective va permettre la dégradation de matériels spécifiques tels que certains organites comme les mitochondries (micromitophagie) ou les peroxysomes (micropexophagie) (Schuck *et al.* 2020).

L'autophagie médiée par les chaperonnes ou « CMA »

Dans le cas de la CMA, il s'agit d'un type d'autophagie strictement sélectif. Afin d'être prise en charge par la CMA, les protéines doivent porter le motif peptidique KFERQ, ce qui va permettre leur interaction avec HSP70 et leur adressage vers la membrane lysosomale. Suite à leur liaison avec la protéine membranaire lysosomale LAMP-2A, les protéines cibles sont

alors transloquées au sein des lysosomes afin d'être dégradées (Massey *et al.* 2004). Chez les mammifères, on estime qu'environ 40% des protéines contiennent un motif du type KFERQ. Ce motif, normalement masqué lorsque la protéine est conformement repliée, devient accessible en présence de défauts conformationnels ce qui entraîne sa reconnaissance par HSP70 et à terme la dégradation de la protéine par la CMA (Kaushik *et al.* 2018).

Initialement, il a été envisagé que BAG3, de par son interaction avec HSP70, intervienne dans la CMA. Cependant, contrairement à ce qui avait été proposé, c'est au niveau de la macroautophagie que le rôle de BAG3 dans l'autophagie a été mis en évidence.

La macroautophagie

Il s'agit de la forme la mieux décrite et la plus étudiée. Présente dans l'ensemble des cellules eucaryotes et particulièrement conservée au cours de l'évolution, elle diffère des cas précédents de par la séquestration à distance du matériel cellulaire. En effet, dans la macroautophagie, les substrats sont d'abord séquestrés dans des vésicules, les autophagosomes, avant d'être transportés vers les lysosomes.

La macroautophagie est un procédé complexe, très régulé et comprenant plusieurs étapes, illustrées dans la figure 28 (Parzych *et al.* 2013). Suite à l'initiation de la macroautophagie, une double membrane phospholipidique, le phagophore, se met en place. Le phagophore va s'expandre et s'allonger, afin de séquestrer les substrats à dégrader, formant ainsi un autophagosome. Les autophagosomes ainsi formés vont être transportés vers les lysosomes où une fusion des membranes externes des deux entités va avoir lieu formant ainsi l'autophagolysosome. Les éléments initialement contenus au sein de l'autophagosome ainsi que sa membrane interne vont ensuite être digérés par les protéases lysosomales, puis libérés au sein du cytosol afin d'être recyclés par la cellule.

Dans la suite de ce manuscrit, le terme « autophagie » fera systématiquement référence à la macroautophagie.

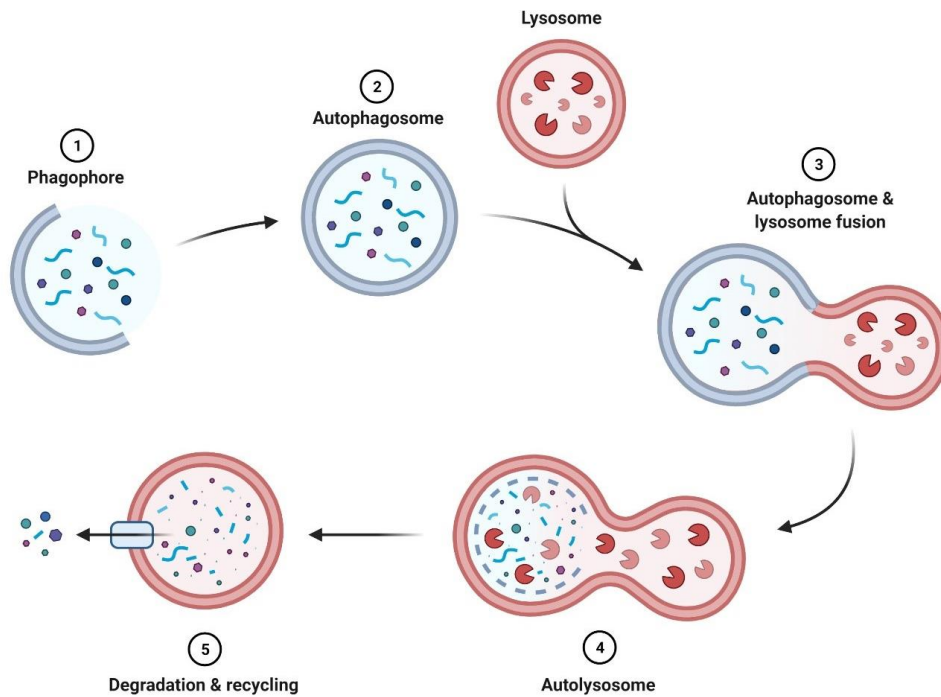


Figure 28. Les différentes étapes de la macroautophagie

(Tiré du site MRM insights : l'autophagie dans les cellules souches saines et malades 2021)

Au contraire de ce qui a été pensé pendant longtemps, l'autophagie est en partie un procédé spécifique et hautement sélectif (Stolz *et al.* 2014). Elle est apparue au cours de l'évolution comme une adaptation de la cellule eucaryote au manque de nutriment, permettant ainsi la mobilisation de nutriments en intracellulaire en sacrifiant une partie du cytosol. De plus, cette machinerie s'est adaptée afin de pouvoir prendre en charge une dégradation plus spécifique de structures excessives ou toxiques : protéines, organites et agents pathogènes intracellulaires. Contrairement à l'autophagie canonique (in bulk), qui se manifeste par une séquestration aléatoire du cytosol, l'autophagie sélective fonctionne dans des conditions riches en nutriments et se caractérise par la présence d'autophagosomes spécialisés confinant les substrats de manière sélective. Elle met en jeu des voies de signalisation et des récepteurs spécifiques à chaque élément à dégrader tout en reposant sur une machinerie autophagique commune (Rogov *et al.* 2014).

b. La machinerie autophagique

Initiation

La première étape de la formation des autophagosomes fait intervenir le complexe d'initiation ULK1, régulé en amont par la kinase mTOR (Figure 29). Ainsi, en présence de nutriments, la

kinase mTOR inhibe l'autophagie en phosphorylant ULK1/2 et ATG13. Lors d'une carence nutritionnelle, l'inhibition de mTOR par l'AMPK provoque l'activation des kinases ULK1/2 ce qui initie la formation des autophagosomes (Hansen *et al.* 2018).

Un autre complexe intervient également dans la phase initiale de l'autophagie, il s'agit du complexe de nucléation PI3K III (Figure 29). Ce complexe, également activable suite à une carence énergétique par ULK1/2, peut être en plus mobilisé indépendamment de la signalisation mTOR/AMPK sous l'influence d'un stress tel que l'hypoxie, une accumulation de protéines dans la lumière du RE ou une infection (Rogov *et al.* 2014). Ce complexe, une fois activé, va être transloqué du cytosquelette vers le site d'assemblage du phagophore (PAS). C'est au niveau du PAS que les protéines ATGs « autophagy-related genes » vont être recrutées afin d'initier la formation du phagophore.

Elongation et fermeture

Le phagophore ainsi formé va s'allonger et s'incurver progressivement. Son élongation est contrôlée par deux systèmes de conjugaison de l'ubiquitine ; Atg12/Atg5 qui va notamment permettre le recrutement du second système, Atg8/LC3, au phagophore (Hansen *et al.* 2018).

La protéine LC3, une fois conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE), va être incorporée dans la membrane du phagophore. Ainsi, la protéine LC3 existe sous une forme cytosolique LC3-I ou lipidique LC3-II, associée au phagophore (Figure 29). Elle va servir d'ancrage pour le recrutement de récepteurs, plus ou moins spécifique selon le substrat à prendre en charge, telles que les protéines SQSTM1/p62 et NBR1. Ces récepteurs vont participer à la dégradation sélective de cibles préalablement ubiquitinylées, sur des résidus lysines principalement en position 63 (K63) (Lamark *et Johansen* 2012), et sont donc retrouvés de manière ubiquitaire dans plusieurs sous-types d'autophagies sélectives (mitophagie, agréphagie ou encore la pexophagie, la dégradation sélective des peroxysomes).

LC3-II constitue donc un marqueur cellulaire des autophagosomes, largement utilisé dans la littérature pour la quantification de l'activité de la voie autophagique.

Fusion et dégradation

Une fois les autophagosomes fermés, à l'aide de protéines de type SNARE, ceux-ci se déplacent le long du réseau de microtubules grâce aux protéines motrices dynéines en

direction du centre d'organisation des microtubules (MTOC) riche en lysosomes (Jahreiss *et al.* 2008). Les autophagosomes vont alors pouvoir fusionner avec les lysosomes grâce à des récepteurs, comme LAMP-2, et des protéines de type SNARE afin de former un autophagolysosome (Figure 29). Les hydrolases acides présentes au sein des lysosomes vont ainsi dégrader le contenu initial de l'autophagosome ainsi que sa membrane interne. Les produits ainsi dégradés vont être recyclés dans le cytosol grâce aux perméases lysosomales.

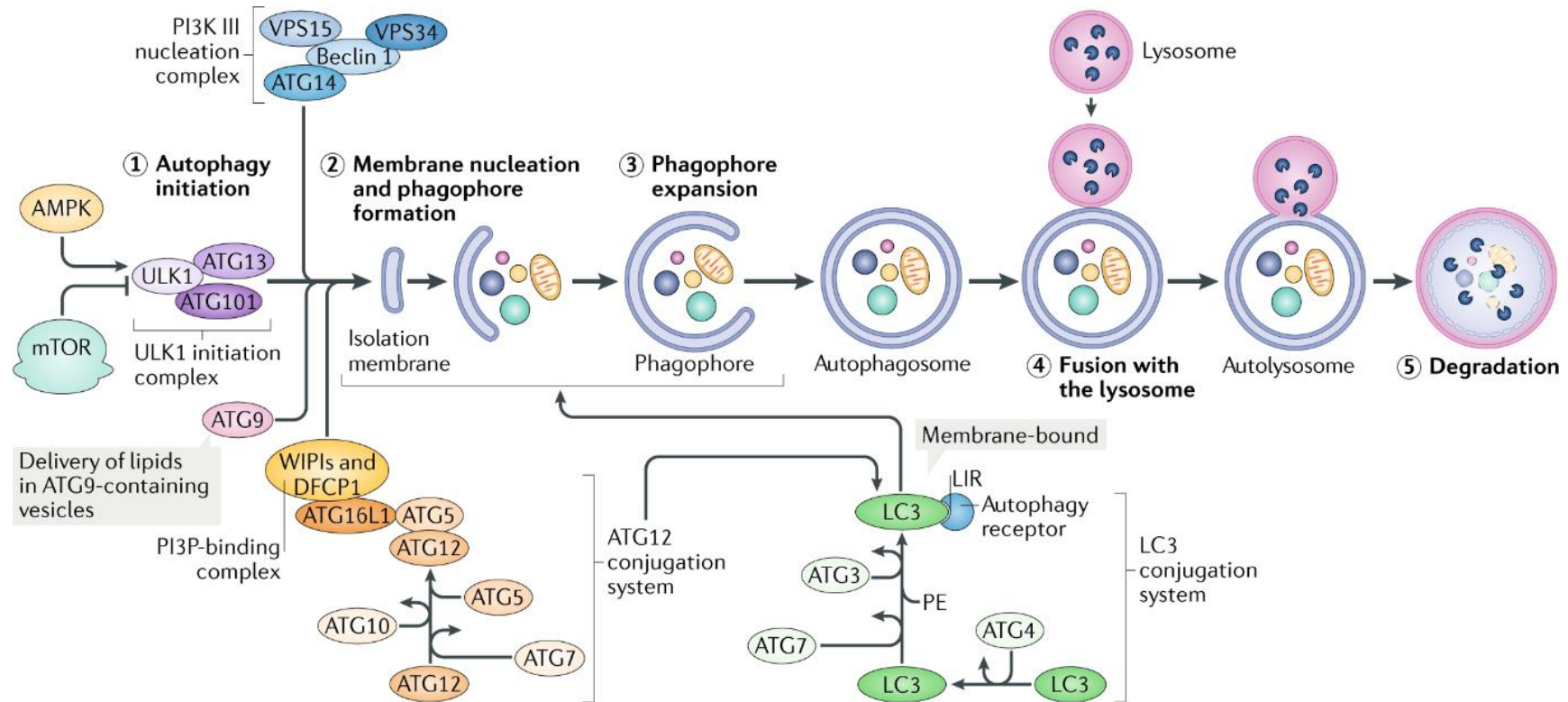


Figure 29. Vue d'ensemble de la machinerie de l'autophagie (Tiré de Hansen et al. 2018)

Les senseurs métaboliques, mTOR et AMPK, sont les principaux régulateurs de l'autophagie, mTOR agissant comme inhibiteur et AMPK comme activateur. Lorsque l'autophagie est induite le matériel cytoplasmique est séquestré par une structure composée de doubles membranes appelée phagophore. Ces structures vont ensuite se refermer jusqu'à la séquestration du matériel à dégrader dans des vésicules, alors appelées autophagosomes. Celles-ci vont ensuite fusionner avec les lysosomes et former les autolysosomes, où leur contenu est dégradé. L'autophagie est un processus en plusieurs étapes qui comprend (1) l'initiation, (2) la nucléation membranaire et la formation de phagophores, (3) l'expansion des phagophores, (4) la fusion avec le lysosome et (5) la dégradation, qui sont régulées par plusieurs protéines, appelées ATG pour « autophagie-related protein ».

c. Fonctions de l'autophagie

Fonction énergétique

La fonction initiale de l'autophagie, qui lui a donné son nom, est sa capacité à maintenir l'homéostasie énergétique lors de carence nutritionnelle. L'autophagie est un processus catabolique dont l'induction est rapide afin de mobiliser les réserves énergétiques endogènes de la cellule afin de maintenir la synthèse d'ATP (Galluzzi *et al.* 2014).

L'autophagie contribue à l'adressage de protéines, de réserves lipidiques et de glycogène aux lysosomes pour être dégradés. Les composants ainsi recyclés (acides aminés, glucose et acides gras) quittent le lysosome et sont alors disponibles pour la production d'énergie. Dans le cas d'un turnover important des protéines, les acides aminés recyclés par l'autophagie vont préférentiellement être utilisés pour la synthèse de protéines *de novo* (Figure 30). Dans le cas d'une inhibition pharmacologique ou une altération génétique de l'autophagie, il a été constaté que cela entraîne une réduction de la beta-oxydation des lipides et une accumulation de triglycérides au sein du foie sous forme de gouttelettes lipidiques (Singh *et al.* 2009).

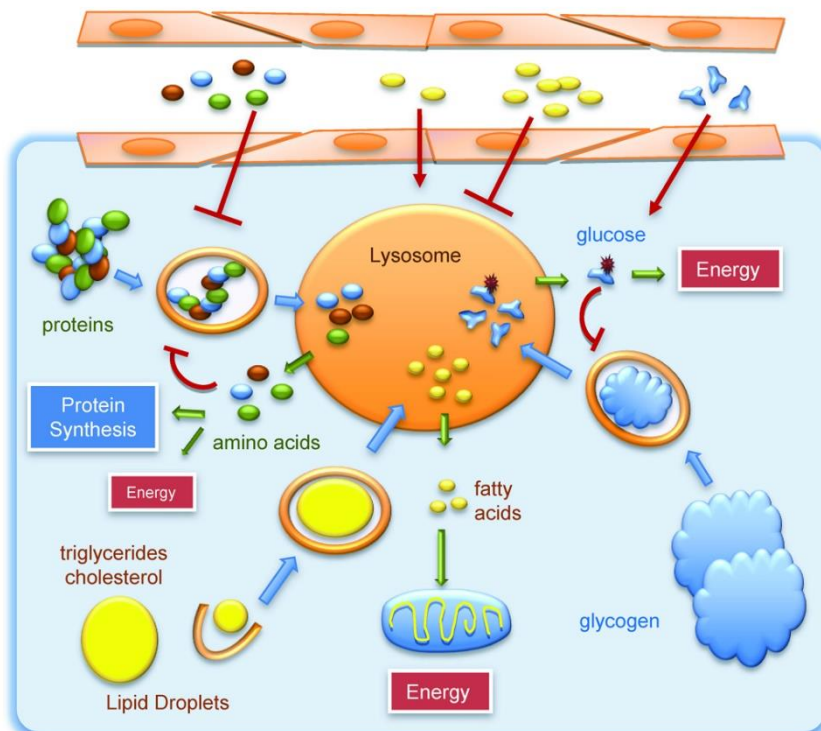


Figure 30. Le recyclage de composants intracellulaires et leur utilisation dans le maintien de la balance énergétique (Tiré de Singh et Cuervo 2011)

La macroautophagie permet le recyclage de protéines, lipides et glycogène via leur dégradation par les lysosomes. Les composants constitutifs de ces macromolécules sont relargués dans l'espace intracellulaire et deviennent alors disponibles pour la production d'énergie. Dans le cas de la

dégradation de protéines, les acides aminés ainsi libérés peuvent avoir une valeur énergétique limitée et être utilisés préférentiellement pour la synthèse de protéines *de novo*. Les taux d'acides aminés, d'acides gras libres et de sucres circulant dans le sang ou dans les milieux extracellulaires ont un impact direct sur l'activité de la macroautophagie intracellulaire.

La carence nutritionnelle est un puissant inducteur de l'autophagie *in vitro* et *in vivo*. Des études réalisées sur des modèles murins transgéniques ont révélé qu'un jeûne de 24 à 48h induit la formation d'autophagosomes dans différents organes, comme les muscles striés, le cœur, le foie, le pancréas ou encore les reins (Mizushima *et al.* 2004). Ce délai dans l'activation de l'autophagie est probablement dû à la mise en place des systèmes d'activation de l'autophagie contrôlés par les voies AMPK/mTOR. De plus, l'organisme possède des mécanismes adaptatifs rapides en réponse à la carence nutritionnelle, tels que la libération de substrats (glucose, acide gras libre) dans la circulation sanguine, par les tissus de stockage (le foie, les muscles striés squelettiques et le tissu adipeux respectivement) afin de maintenir le fonctionnement des organes qui nécessitent une forte consommation d'énergie, comme le cœur (Steinhauser *et al.* 2018).

Le cœur, représentant environ 0,5% du poids total du corps, est responsable d'environ 8% de la consommation d'ATP de l'organisme. Il s'agit d'un flux énergétique très dynamique puisque le cœur n'est capable de stocker assez d'énergie que pour quelques cycles cardiaques, nécessitant un renouvellement de ses réserves énergétiques toutes les 10 secondes environ, même au repos (Balaban R.S. 2002). Afin de répondre aux besoins énergétiques des phases de contraction-relaxation, le cœur est le tissu possédant la plus grande quantité de mitochondries, responsables de plus de 95% de la production d'ATP au sein de la cellule grâce à la phosphorylation oxydative et au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Zhao *et al.* 2019).

Pour cela, le cycle de Krebs fournit du NADH et du FADH₂ (Figure 31), qui en présence de dioxygène, va permettre le transfert de protons au niveau des complexes de la chaîne mitochondriale afin de créer un gradient de concentration protonique utilisé par l'ATP synthase mitochondriale pour phosphoryler l'ADP en ATP (Figure 31).

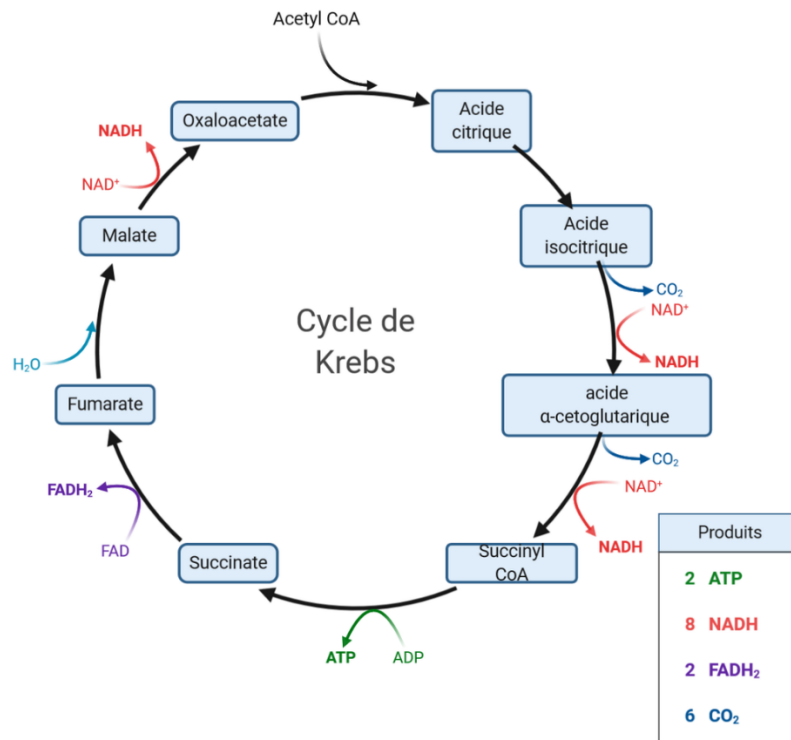


Figure 31. Production de NADH et FADH₂ par le cycle de Krebs

(Tiré de Krebs Cycle par Sapkota A. 2023) Le cycle de Krebs, également connu sous le nom de cycle de l'acide citrique ou cycle TCA, est une série de réactions qui ont lieu dans les mitochondries et qui, à partir de l'oxydation de l'acétyl CoA, va libérer 2 molécules d'ATP, 6 molécules de CO₂ et des coenzymes qui vont servir à alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale (8 NADH et 2 FADH₂).

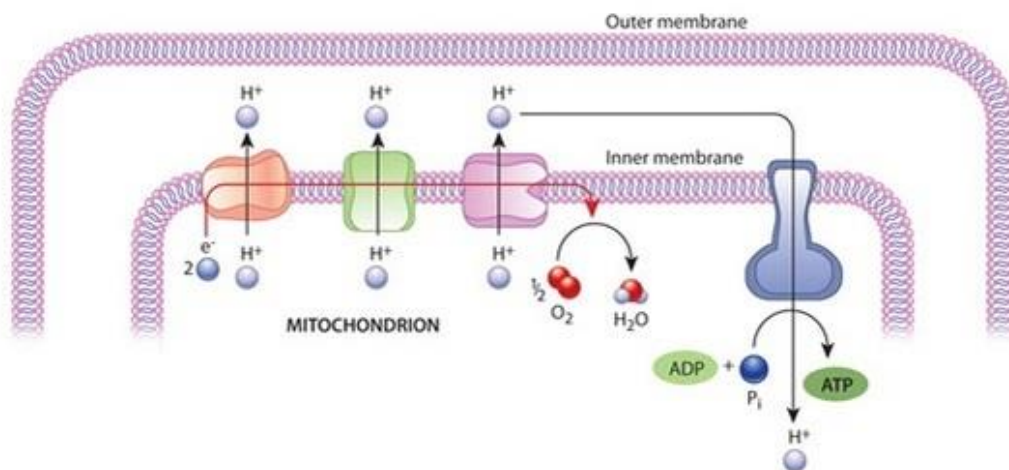


Figure 32. Le transport d'électrons et la production d'ATP au sein des mitochondries (Tiré de l'eBook Cell Biology for Seminars 2010) Le transports d'électrons, obtenus suite à la réduction des coenzymes NADH et FADH₂, va permettre de fournir l'énergie nécessaire aux différents complexes de chaîne respiratoire afin de pomper des protons (H⁺) vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique qui va, *in fine*, permettre la synthèse d'ATP à partir d'ADP.

Le cycle de Krebs fonctionne à partir d'acétyl-CoA qui provient du métabolisme du glucose (glycolyse anaérobie), du métabolisme des acides gras (béta-oxydation) et du métabolisme de

quelques acides aminés tels que la glutamine, la valine, le leucine et l'isoleucine (Spinelli *et al.* 2018).

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire génère continuellement la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « ROS » qui, à des concentrations élevées, engendre un stress oxydatif, délétère pour la cellule (Palma *et al.* 2024). Un dysfonctionnement mitochondrial est à l'origine d'un défaut de synthèse d'ATP et d'une perturbation des systèmes impliqués dans le métabolisme, notamment associé à la progression de l'insuffisance cardiaque (Zhou *et al.* 2018).

En conditions physiologiques différents combustibles sont utilisés par les cardiomyocytes afin d'alimenter le cycle de Krebs. Par ordre préférentiel d'utilisation on retrouve les acides gras (60%), le lactate (18%), le glucose (16%), les acides aminés (3%) et les corps cétoniques (3%), avec une utilisation préférentielle des acides gras estérifiés ou libres ainsi que des triglycérides. D'un point de vue énergétique, la voie métabolique la plus rentable est l'oxydation du glucose, bien que les acides gras restent le substrat majoritairement utilisé au sein du tissu cardiaque. Ainsi, selon le substrat disponible et les demandes énergétiques mises en jeu, le cœur est capable d'adapter son métabolisme énergétique afin de maintenir une quantité d'ATP nécessaire aux cycles de contraction-relaxation (Taegtmeyer H. 2002).

Au cours de la progression de l'insuffisance cardiaque, un remodelage pathologique se met en place et le métabolisme cardiaque est reprogrammé vers une utilisation accrue du glucose avec une augmentation significative de la glycolyse, tandis que la bêta-oxydation des acides gras est diminuée. Des études ont montré que l'augmentation de la glycolyse, découplée de la phosphorylation oxydative, provoque une augmentation de la production de lactate et entraîne un flux plus important de glucose dans des voies accessoires, ce qui réduit l'efficacité de la synthèse de l'ATP et exacerbe le remodelage pathologique (Zhou *et al.* 2018). Ces études ont notamment permis de faire émerger le concept qu'un cœur en insuffisance cardiaque est un organe qui n'a plus d'énergie.

Malgré la fonction de l'autophagie dans le recyclage des substrats intracellulaires et dans la mobilisation des réserves d'énergie, peu d'études ont été réalisées sur le lien entre l'insuffisance cardiaque et la fonction énergétique de l'autophagie. D'autant plus que des

altérations de l'autophagie ont été associées au développement de pathologies cardiaques. Cette notion sera approfondie plus loin dans cette introduction.

Fonction cytoprotectrice

L'autre fonction attribuable à l'autophagie et qui a déjà été mentionnée dans cette introduction est son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire notamment via son rôle dans le maintien de la qualité des protéines (PQC). L'autophagie exerce un contrôle permanent de l'homéostasie cellulaire au sein du cytoplasme afin de prendre en charge les organites endommagés, les protéines usées ou encore les protéines issues de la synthèse *de novo* dont le repliement n'a pas réussi à aboutir. Cette fonction permet notamment la prévention d'un grand nombre de maladies (Levine et Kroemer 2019).

Il a été constaté que l'activité autophagique diminue avec l'âge, contribuant probablement à l'accumulation de macromolécules et d'organites endommagés au cours du vieillissement. Il est intéressant de noter que la défaillance du processus autophagique participe à la progression de maladies associées au vieillissement, telles que la neurodégénérescence ou encore le cancer.

Le vieillissement, événement naturel survenant dans tous les organismes vivants, peut être défini comme une détérioration du fonctionnement cellulaire due à l'accumulation de dommages au fil du temps (Kaushik et Cuervo 2015). De façon intéressante plusieurs études ont permis de mettre en évidence qu'une activation de l'autophagie permet de diminuer les effets liés au vieillissement. En effet la surexpression d'*Atg5* chez la souris entraîne l'activation de l'autophagie avec une augmentation de la durée de vie moyenne par rapport aux animaux contrôles. Les souris mutées présentent des signes « anti-âge », tels qu'une sensibilité accrue à l'insuline, une fonction motrice améliorée et une meilleure régulation de la prise de poids liée à l'âge (Pyo *et al.* 2013). Chez l'homme, une augmentation des niveaux de BECLIN1, composant du complexe de nucléation dans l'initiation de l'autophagie, a été rapportée chez des personnes centenaires en particulièrement bonne santé comparé à une population jeune (Emanuele *et al.* 2014). Ainsi, l'autophagie contribue à retarder le vieillissement en réduisant le stress cytotoxique induit notamment par l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles et d'agrégats protéiques toxiques.

Finalement, avec l'âge, l'incidence du cancer augmente, probablement en raison du déclin des processus homéostatiques et de l'augmentation de l'accumulation de molécules potentiellement nocives telles que les ROS et les agrégats protéiques. Il a été proposé que l'autophagie joue un double rôle dans la tumorigenèse, étant importante à la fois dans la suppression ainsi que dans la progression et la surveillance de la tumeur (Jiang *et al.* 2015).

d. L'autophagie sélective : implication de BAG3

Comme mentionné précédemment, l'autophagie peut être associée à la dégradation d'une partie du cytosol séquestrant de façon aléatoire plusieurs composants cytosoliques, étant ainsi non sélective, activée notamment en réponse à une carence nutritionnelle. En revanche, l'autophagie sélective a des cibles spécifiques, telles que les organites endommagés (mitophagie, lysophagie, lipophagie, ribophagie), les protéines agrégées (agrégophagie) ou les bactéries envahissantes (xénophagie), ce qui l'implique de manière importante dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire. La défaillance de ces voies a été associée à diverses pathologies humaines, notamment la neurodégénérescence, une dysfonction métabolique, les infections ou encore certains types de cancer (Vargas *et al.* 2022).

« Chaperone-Assisted Selective Autophagy » ou autophagie CASA

Depuis la première étude indiquant le rôle de BAG3 dans la macroautophagie (Carra *et al.* 2008), d'autres études ont depuis permis de préciser les mécanismes impliquant BAG3. En effet, il a été montré que BAG3, en formant un complexe impliquant HSP70 et HSPB8, est impliqué dans une voie de l'autophagie sélective et dépendante de l'ubiquitine pour l'élimination des protéines ciblées par les chaperonnes (Arndt *et al.* 2010, Gamerding *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011). Il s'agit d'une voie distincte de la CMA, puisque l'autophagie CASA est dépendante de la formation des autophagosomes, qui a été principalement décrite à partir d'un modèle drosophile et de l'orthologue de BAG3, la starvin (Arndt *et al.* 2010).

D'un point de vue mécanistique, BAG3 forme un complexe avec HSP70 et HSPB8, à partir de ses domaines BAG et IPV respectivement. L'ubiquitine ligase CHIP interagit avec l'extrémité C-terminale d'HSP70, et coopère avec les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine afin d'ubiquitinyler les substrats protéiques liés à HSP70 (Zhang *et al.* 2015). Les clients cytosoliques sont généralement ciblés sur le protéasome, alors que les protéines membranaires sont endocytées et dégradées par les lysosomes suite à leur ubiquitination par

CHIP (Tawo *et al.* 2017). Cependant, lorsque CHIP ubiquitine les substrats présentés par le complexe HSP70/BAG3/HSPB8, leur dégradation autophagique est favorisée (Arndt *et al.* 2010, Crippa *et al.* 2010, Zhang et Qian 2011). La raison n'est pas complètement comprise, mais le recrutement du récepteur SQSTM1/p62 semble être une étape décisive, favorisant ainsi le chargement des substrats protéiques sur les membranes des phagophores (Carra *et al.* 2008, Gamerdinger *et al.* 2009). Il convient de noter que d'autres ubiquitines ligases associées aux chaperonnes, telles que la ligase parkine (PRKN), peuvent remplacer CHIP lors de l'initiation de l'autophagie (Imai *et al.* 2002, Morishima *et al.* 2008). En effet, une étude récente révèle une coopération de BAG3 avec la parkine dans la clairance autophagique des mitochondries endommagées (Tahrir *et al.* 2017). Finalement, la séquestration du substrat protéique au sein de l'autophagosome peut être facilitée grâce à la coopération de BAG3, via son domaine WW, avec la protéine SYNPO2 (également connue sous le nom de myopodine) (Ulbricht *et al.* 2013). La protéine recrute une machinerie de fusion membranaire (VSP16/18), qui intervient dans la formation des autophagosomes autour des complexes CASA (Figure 33).

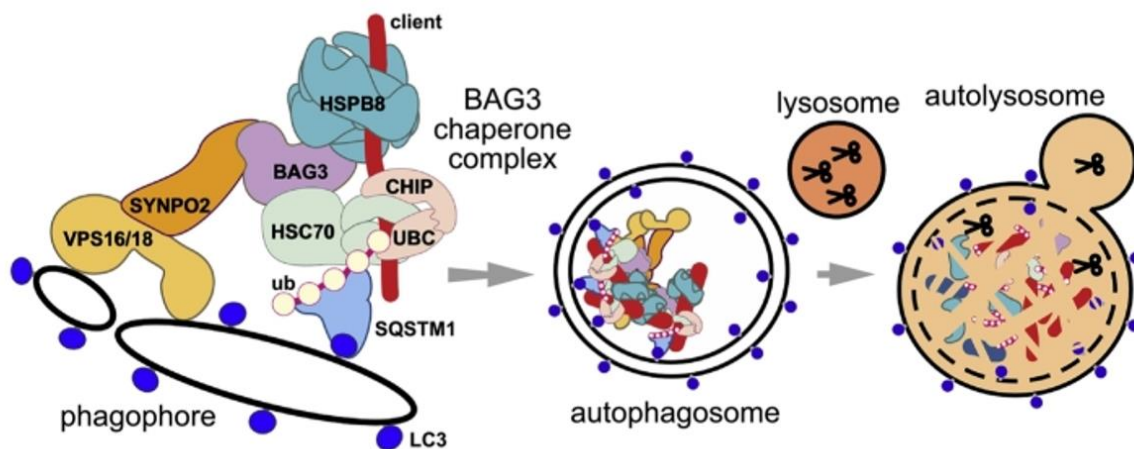


Figure 33. La machinerie CASA (Adapté de Klimek *et al.* 2019)

L'agréphaqie

Le rassemblement et la séquestration des protéines mal repliées représentent une stratégie de défense cellulaire importante contre les effets toxiques de l'agrégation des protéines (Miller *et al.* 2015). BAG3 contribue à cette séquestration non seulement par la régulation des petites protéines chaperonnes (HSPB6 et HSPB8) à partir de ses domaines IPV, mais également en favorisant le trafic intracellulaire de protéines mal repliées (Gamerdinger *et al.* 2011). Deux

motifs RSQS et un domaine PxxP riche en proline contribuent à l'association de BAG3 avec le moteur moléculaire dynéine. L'association avec la dynéine permet à BAG3 d'induire le transport rétrograde des substrats protéiques pris en charge par HSP70 le long des microtubules vers des sites périnucléaires, appelés agrésomes. Le dépôt de protéines mal repliées dans les agrésomes minimise les interférences toxiques avec les processus cellulaires essentiels et favorise une élimination efficace des agrégats par la macroautophagie (Minoia M. 2014). Il semble que les substrats protéiques pris en charge par la voie CASA puissent également être adressés au niveau des agrésomes, offrant ainsi deux mécanismes envisageables pour les clients de la voie CASA ; une voie « directe », où les substrats sont adressés directement au système de dégradation lysosomale, et « indirecte », où les clients sont adressés aux agrésomes et seront dégradés ultérieurement (Gamerding *et al.* 2011).

e. Dialogue entre les systèmes du PQC

Le protéasome et l'autophagie sont deux voies majeures de dégradation des protéines dans les cellules. De plus en plus d'études ont montré une relation coordonnée et complémentaire entre ces deux systèmes (Wang *et al.* 2013, Wilde *et al.* 2011). Lorsque les protéines mal repliées ne peuvent pas être dégradées par le protéasome cela provoque l'agrégation des protéines, ce qui peut conduire à une cytotoxicité. La voie impliquant la dégradation lysosomale de l'autophagie est un mécanisme de compensation important pour médier la dégradation des agrégats protéotoxiques. Par exemple, en présence d'inhibiteur du protéasome plusieurs études ont rapporté une élévation de l'expression protéique de LC3 ou encore une inhibition de mTORC1, permettant ainsi d'activer l'autophagie (Li *et al.* 2022).

HDAC6 est une autre protéine clé qui fait le lien entre le protéasome et l'autophagie. HDAC6 régule l'acétylation de l' α -tubuline, qui participe non seulement à la formation d'agrégats mais favorise également le transport des agrégats ubiquitinylés vers de nouvelles vésicules phagocytaires (Kulka *et al.* 2020). HDAC6 interagit avec les protéines poly-ubiquitinées et amène ces protéines aux moteurs moléculaires dynéines, qui transportent les protéines poly-ubiquitinylées vers agrésomes puis les autophagosomes (Kawaguchi *et al.* 2003). HDAC6 est impliqué dans la fusion des autophagosomes et des lysosomes, et l'inhibition d'HDAC6 peut augmenter la cytotoxicité associée aux inhibiteurs du protéasome (Wu *et al.* 2010).

De plus, les protéines de la famille BAG interviennent également dans le cross talk entre les voies du protéasome et de l'autophagie. BAG1 favorise la dégradation des protéines mal repliées par le protéasome (UPS) en interagissant avec HSP70 alors que BAG3 favorise la dégradation lysosomale via son interaction avec HSP70 et les petites protéines de choc thermique (HSPB). Dans une étude qui reproduit une ischémie cérébrale chez la souris, les auteurs ont mis en évidence qu'une ischémie cérébrale modérée (10 minutes) entraîne l'activation du système UPS mais pas de l'autophagie. De plus, un switch d'activation du système UPS vers l'autophagie est observé lors d'une ischémie cérébrale prolongée (30 et 60 minutes). Ces observations sont corrélées aux ratios d'expression des protéines BAG1 et BAG3 (Liu *et al.* 2020). En effet, BAG3 a une meilleure affinité pour la liaison à HSP70 que BAG1. Ainsi, lorsque le stress cytotoxique augmente avec la sévérité de l'ischémie, l'expression de BAG3 est induite et la protéine va entrer en compétition avec BAG1 pour la liaison à HSP70 et ainsi favoriser une voie de dégradation utilisant l'autophagie (Figure 34). De façon intéressante, une diminution de l'expression de BAG1 au profit d'une augmentation de celle de BAG3 est observée dans le vieillissement. Ce shift d'expression lors du vieillissement, aussi appelé « switch BAG1/BAG3 », mais également lors d'un stress aigu peut être considéré comme une réponse adaptative physiologique afin de potentialiser l'élimination d'agrégats protéiques (Gamerding *et al.* 2011).

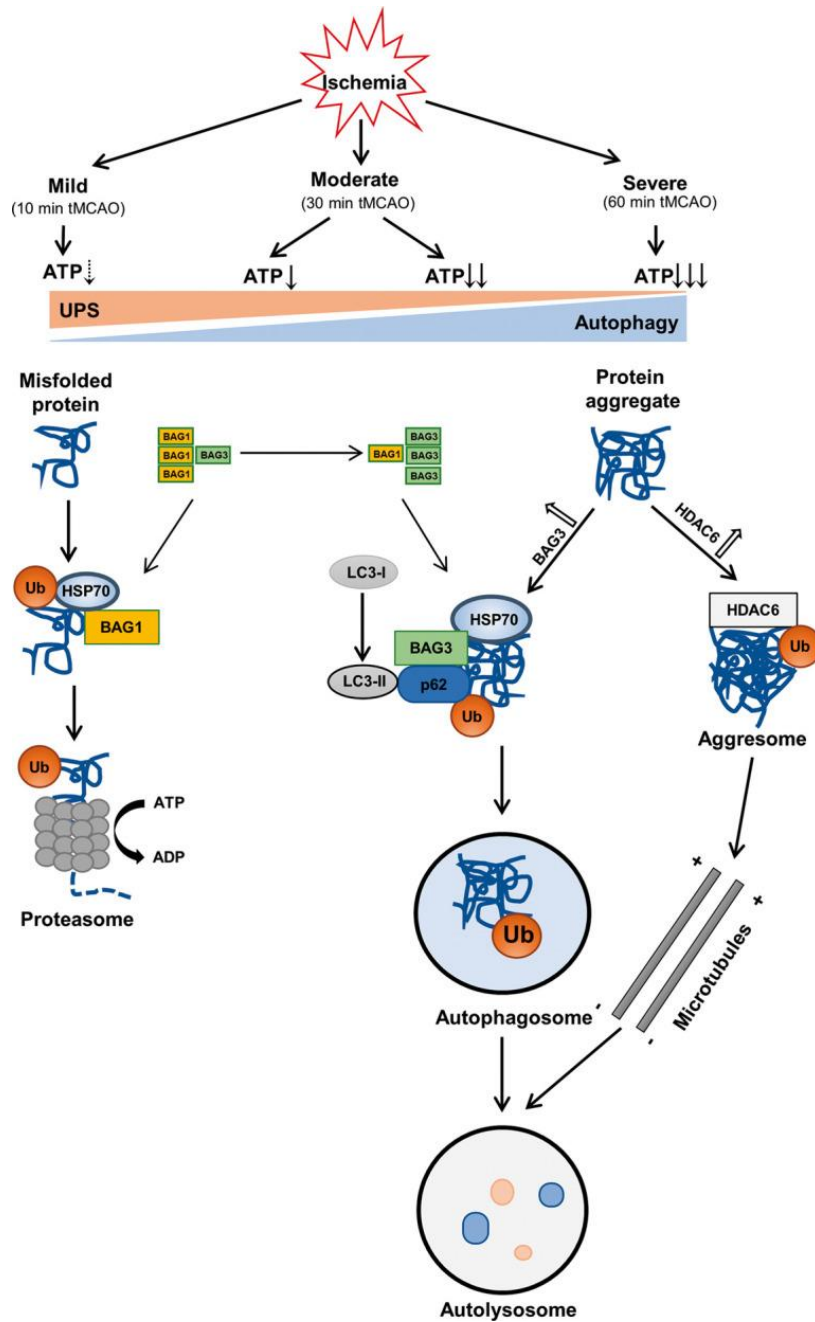


Figure 34. Schéma proposé illustrant le « switch BAG1/BAG3 » dans un modèle d'ischémie cérébrale (Tiré de Liu *et al.* 2020)

Lors d'une importante diminution en quantité d'ATP suite à une ischémie cérébrale, le système UPS est progressivement inactivé au profit de l'autophagie qui consomme moins d'énergie. En conditions physiologiques, BAG1 se lie à HSP70 et favorise une dégradation des protéines par le système UPS. Contrairement à BAG1, lorsque l'expression de BAG3 augmente suite à l'ischémie, celle-ci favorise une dégradation autophagique. En réponse à l'inactivation du protéasome, HDAC6, une déacétylase associée aux microtubules, favorise le transport des protéines à dégrader vers les agrésomes et leur dégradation autophagique. En présence de protéines agrégées, celles-ci sont ubiquitinylées et reconnues par p62/SQSTM1 et HDAC6. Elles peuvent ensuite être prises en charge par le complexe BAG3-HSP70 (CASA), être acheminées vers les agrésomes en vue d'être ultérieurement dégradées ou bien directement internalisées au sein des autophagosomes afin d'être transportées et dégradées par les lysosomes.

f. La protéotoxicité et les pathologies cardiaques

Au niveau cardiaque, l'impact de la protéotoxicité a longtemps été sous-estimé. Depuis, plusieurs études ont permis de mettre en évidence un lien entre une altération de l'expression/fonction d'acteurs de la protéostasie et une dysfonction cardiaque.

La fonction de contraction du cœur repose sur un appareil contractile complexe et très organisé, nécessitant un entretien constant à cause du stress mécanique, thermique et oxydatif exercés par les cycles de contraction/relaxation. Ceci prédispose notamment les protéines sarcomériques à un mauvais repliement et à une agrégation toxique (Martin et Kirk 2020). Les cardiomyocytes étant des cellules hautement différenciées, elles ont une capacité de régénération très limitée. Ainsi, il n'est pas surprenant d'avoir des pathologies cardiaques associées à une protéotoxicité engendrée notamment par des mutations dans les gènes codant des protéines participant au contrôle qualité des protéines (PQC).

Les chaperonnes

L'HSPB5 (α B-crystallin) est la chaperonne la plus abondante retrouvée au niveau cardiaque et est retrouvée associée au cytosquelette et aux protéines de l'appareil contractile dans les cardiomyocytes (Kumarapeli et al. 2004). Elle interagit tout particulièrement avec la desmine afin de prévenir tout repliement anormal qui entrainerait son agrégation (Wang et al. 2003). Ainsi des mutations retrouvées dans le gène codant pour α B-crystallin sont associées au développement d'une cardiomyopathie dilatée et d'une myopathie myofibrillaire (Vicart et al. 1998, Reilich et al. 2010). De manière similaire, des mutations affectant directement la desmine ont été identifiées, les patients atteints de desminopathies, terme utilisé pour regrouper les pathologies induisant l'accumulation d'agrégats de la desmine, vont notamment développer une faiblesse musculaire progressive, des arythmies cardiaques et une cardiomyopathie (Finsterer et Stöllberger 2008).

L'expression de la mutation *CryAB*^{R120G} dans des *in vivo* et *in vitro* entraîne l'apparition d'une cardiomyopathie dilatée chez les souris mutées et est associée à la formation d'agrégats denses aux électrons en microscopie électronique, comme ceux observés dans les maladies neurodégénératives (Sanbe et al. 2004, Zhang et al. 2010). *In vitro*, l'inhibition du protéasome exacerbe l'accumulation de ces agrégats, ce qui suggère que la fonction du système UPS semble essentielle à la clairance des agrégats associés à la présence de la mutation *CryAB*^{R120G}.

(Zhang *et al.* 2010). De façon intéressante, il a été démontré que cette mutation n'affectait pas la structure finale des agrégats de type amyloïdes, en revanche elle semble retarder leur formation ce qui prolonge leur existence au stade pré-amyloïde soluble, considéré comme l'espèce protéique la plus cytotoxique (Meehan *et al.* 2007, Sarparanta *et al.* 2020).

En ce qui concerne les autres HSPBs exprimées au niveau cardiaque, plusieurs mutations d'HSPB6 ont été identifiées chez plusieurs patients sans pour autant entraîner de phénotype au niveau cardiaque chez l'ensemble des porteurs de mutation. Lorsqu'un phénotype pathologique est présent il s'agit d'une cardiomyopathie dilatée. Cela suggère que des mutations d'HSPB6, lorsqu'elles sont associées à d'autres facteurs de risques ou mutations, pourraient être un facteur modificateur favorisant le développement d'une CMD (Liu *et al.* 2018, Nicolaou *et al.* 2008).

HSPB7 est connu pour être indispensable dans le développement cardiaque et plusieurs études ont permis l'identification de variants communs de ce gène comme associés à l'insuffisance cardiaque et à la cardiomyopathie dilatée, dont l'étude d'association génétique réalisée par notre équipe (Cappola *et al.* 2010, Matkovich *et al.* 2010, Stark *et al.* 2010, Villard *et al.* 2011). L'étude *in vivo* d'une altération de ce gène semble complexe, puisque la déficience de cette protéine entraîne une létalité embryonnaire dans un modèle murin (Wu *et al.* 2017).

Quant à HSPB8, deux mutations faux-sens ont été associées au développement d'une neuropathie motrice et les souris mutées développent une altération progressive de la fonction motrice associée à une sévère dégénérescence axonale ainsi qu'une atrophie musculaire avec une altération des myofibrilles (Bouhy *et al.* 2018). Lorsque la mutation *Hspb8*^{K141N} est surexprimée cardio-spécifiquement dans un modèle murin cela entraîne l'apparition d'une hypertrophie modérée associée à une légère diminution de la fonction cardiaque (Sanbe *et al.* 2013).

L'autophagie

Le rôle majeur de l'autophagie dans la physiologie a notamment été démontré par la génération de modèles murin déficients pour les gènes associés à la mise en place de la machinerie autophagique, les ATGs. Le devenir des souris mutées est variable, certaines lignées présentent une létalité embryonnaire, d'autres un phénotype sévère entraînant une

mort prématurée des animaux et d'autres ne vont pas présentées d'anomalies à première vue évidentes. Dans ce dernier cas, il s'agit de gènes qui possèdent des homologues dont la fonction va compenser le manque induit par la déficience initiale.

Parmi les phénotypes les plus sévères on retrouve notamment les modèles déficients pour *Rb1cc1* et *Atg13*, des composants du complexe d'initiation ULK1, qui entraîne une létalité embryonnaire associée à un développement cardiaque défectueux (Kuma *et al.* 2017).

La déficience cardio-spécifique d'*Atg5*, impliquée dans la formation des autophagosomes, entraîne une augmentation significative du diamètre du ventricule gauche et une diminution de la fonction systolique à l'âge de 10 mois par rapport aux souris contrôles, alors qu'elles présentaient un phénotype cardiaque normal à l'âge de 3 mois. L'analyse poussée de ce modèle a révélé une désorganisation de la structure des sarcomères et des mitochondries chez les souris mutées âgées de 3 et 10 mois, avec une diminution de la fonction respiratoire mitochondriale (Nakai *et al.* 2007).

En plus des protéines associées à la mise en place de la machinerie autophagique on retrouve également un lien physiopathologique entre les protéines associées à la fusion autophagosome/lysosome et le développement d'altérations au niveau cardiaque. En effet, la déficience en protéine LAMP-2, un constituant important de la membrane lysosomale, cause dans un modèle murin l'accumulation de vacuoles autophagiques dans de nombreux tissus, notamment le foie, le pancréas, la rate, les reins, les muscles striés squelettiques et cardiaques due à un défaut de fusion entre lysosomes et autophagosomes. Les cardiomyocytes présentent une structure anormale et la contractilité cardiaque est sévèrement réduite (Tanaka *et al.* 2000). Chez l'homme, la déficience en protéine LAMP-2 entraîne la maladie de Danon, une maladie génétique notamment associée à une sévère cardiomyopathie et une faiblesse musculaire (D'souza *et al.* 2014).

Ici, les études mentionnées concernent principalement des altérations qui vont avoir pour conséquence une diminution de la fonction autophagique, cependant dans un modèle de surcharge de pression il a été montré qu'une activité autophagique croissante était corrélée avec le développement d'un phénotype hypertrophique et la transition vers l'insuffisance cardiaque. Ces résultats suggèrent, que selon les conditions sous-jacentes, l'activité autophagique peut-être délétère et conduire à un remodelage cardiaque pathologique qui

peut progresser vers l'insuffisance cardiaque (Zhu *et al.* 2007). Par exemple, la surexpression de la beclin-1, indispensable à la formation des autophagosomes, va promouvoir l'activité autophagique et, en parallèle, la croissance hypertrophique et mal adaptative du muscle cardiaque (Zhu *et al.* 2015).

g. La protéostasie dans les cellules post-mitotiques : implication de BAG3

Dans les neurones

L'autophagie médiée par BAG3 contribue de manière significative à l'homéostasie des protéines dans les cellules post-mitotiques, telles que les neurones et les cellules musculaires (Behl *C.* 2016). Dans les neurones, BAG3 intervient dans la dégradation autophagique des protéines sujettes à l'agrégation et associées aux maladies neurodégénératives (Gamerding *et al.* 2011). Cela inclut la protéine huntingtine, qui provoque la maladie de Huntington, et du récepteur des androgènes, conduisant à une atrophie musculaire spinale bulbaire (Carra *et al.* 2008, Rusmini *et al.* 2015), les formes mutantes et mal repliées de la superoxyde dismutase SOD1, qui sont des agents responsables de la sclérose latérale amyotrophique (Gamerding *et al.* 2011) et la clairance de la protéine tau permettant ainsi d'éviter l'accumulation et l'agrégation des formes phosphorylées, observée dans la maladie d'Alzheimer et dans certaines autres neuropathologies (Krüger *et Mandelkow* 2016).

Lorsque l'activité du protéasome est altérée, suite à un traitement pharmacologique ou un stress protéotoxique, les substrats protéiques sont alors pris en charge par l'autophagie médiée par BAG3 (Minoia *et al.* 2014). En effet, l'induction de l'expression de BAG3 et de l'autophagie CASA dans le cerveau des rongeurs vieillissants permet de favoriser la dégradation autophagique au profit de la dégradation par le protéasome pour une meilleure clairance des protéines endommagées (Gamerding *et al.* 2009). En revanche, une expression réduite de BAG3 contribue à la neurodégénérescence dans les modèles cellulaires de la maladie d'Alzheimer (Renziehausen *et al.* 2015).

Dans les cellules musculaires

La désintégration observée des stries Z en l'absence de BAG3 ou stravin fonctionnelles dans les modèles animaux indique l'existence d'au moins une protéine de la strie Z qui doit être

reconnue par l'autophagie médiée par BAG3, libérée de sa structure initiale et adressée à la dégradation autophagique pour maintenir l'architecture musculaire.

C'est dans une approche biochimique, évaluant la libération médiée par BAG3 de protéines au sein de cytosquelettes isolés, que la filamine a été identifiée en tant que substrat de la voie CASA (Arndt *et al.* 2010). BAG3 se lie à la région mécanosensible de la filamine et recrute ses protéines chaperonnes partenaires pour surveiller l'état conformationnel de la filamine (Ulbricht *et al.* 2013). Les formes mécaniquement endommagées de filamine sont extraites de la strie Z et adressées à la dégradation autophagique. Les souris présentant une altération de l'autophagie, comme les souris déficientes en protéine membranaire lysosomale LAMP-2, présentent une faiblesse musculaire sévère accompagnée d'une agrégation de filamines (Arndt *et al.* 2010, Tanaka *et al.* 2000).

Parallèlement au recyclage des composants du sarcomère, BAG3 va stimuler la synthèse *de novo* de protéines cibles. En effet, BAG3 est capable de séquestrer les kinases LATS1/2 et AMOTL1/2 via ses domaines WW. Ces kinases sont des inhibiteurs des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ, composants de la voie Hippo, impliquée dans la prolifération, différenciation et la survie cellulaire (Fu *et al.* 2022). BAG3 va permettre la libération de YAP et TAZ et par conséquent leur translocation nucléaire et l'activation de la transcription de gènes cibles, comme la filamine (Dupont *et al.* 2011 & Marzullo *et al.* 2020). Par conséquent, BAG3 intervient non seulement dans la dégradation autophagique de la filamine endommagée, mais stimule également une synthèse compensatoire *de novo* de la filamine via l'activation de YAP-TAZ (Ulbricht *et al.* 2013).

Chez l'homme, il a été montré que l'exercice physique intense entraîne une induction transcriptionnelle immédiate de la filamine, de BAG3 et d'HSPB8 dans le muscle de la jambe ainsi qu'un turnover augmenté des protéines correspondantes (Ulbricht *et al.* 2015). Dans le muscle squelettique humain, la voie de l'autophagie semble ainsi agir comme un mécanisme central d'adaptation, répondant à des stimulations mécaniques aiguës et répétées.

h. BAG3 et pathologies associées

Les myopathies myofibrillaires (MFM)

Les deux domaines IPV, situés dans la région N-terminale et médiane de BAG3, permettent l'interaction avec les petites protéines de chocs thermiques, principalement HSPB8 et HSPB6 (Carra *et al.* 2008, Fuchs *et al.* 2009), mais également HSPB5 (alpha-B-cristalline) et HSPB1 avec une plus faible affinité. Cette interaction va notamment permettre de faciliter l'activité des petites protéines chaperonnes dans l'inhibition de l'agrégation protéique (Rauch *et al.* 2017).

En 2009, un groupe de recherche a découvert que la mutation faux sens engendrant la mutation de la proline en position 209 en une leucine au niveau de l'exon 3 du gène *BAG3*, codant le second motif IPV, causait un type sévère de myopathie myofibrillaire (Selcen *et al.* 2009). La myopathie myofibrillaire (MFM) est une forme de dystrophie musculaire dans laquelle une désorganisation de la strie Z et l'accumulation d'agrégats protéiques sont observées. Plusieurs gènes ont été associés à la MFM, tels que la filamine, la desmine ou encore l' α B-cristalline (*HSPB5*). Chez les trois enfants porteurs de la mutation *BAG3*^{P209L}, un affaiblissement musculaire progressif est observé, accompagné du développement d'une cardiomyopathie et d'une sévère insuffisance respiratoire. De plus, d'autres mutations faux-sens à la même position P209 (P209Q ou P209S) ont été identifiées dans plusieurs familles atteintes de MFM et/ou de neuropathie. Étant donné que ces mutations se situent dans le deuxième motif IPV de BAG3, la perte de liaison à HSPB a été suggérée comme mécanisme moléculaire sous-jacent à la maladie. Cependant, l'identification d'une nouvelle mutation dans le domaine BAG (*BAG3*^{P470S}) comme cause de MFM, dans deux familles non apparentées, remet en question l'hypothèse précédente d'une perturbation de la liaison BAG3/HSPB8 comme cause sous-jacente (Meister-Broekema *et al.* 2018).

Ces mutations étant localisées dans des domaines qui connectent BAG3 à d'autres systèmes faisant intervenir des protéines chaperonnes, laisse à penser que celles-ci entraîneraient un blocage de la liaison entre BAG3 et les HSPB et HSP70, via un mécanisme de perte de fonction. Cependant, l'étude de la liaison entre *BAG3*^{P209L} et HSPB8 dans un modèle cellulaire a révélé que cette interaction n'était que modérément diminuée. Les auteurs ont démontré que des mutations au sein des deux motifs IPV sont nécessaires afin de prévenir l'interaction entre

BAG3 et HSPB8 de façon certaine. Ces résultats viennent appuyer l'idée selon laquelle la perte de liaison aux HSPBs est insuffisante pour provoquer le phénotype cellulaire associé à la mutation *BAG3*^{P209L}. De manière surprenante, les auteurs ont mis en évidence que la mutation *BAG3*^{P209L} réduit la capacité de repliement d'HSP70, que sa fonction dans la prise en charge autophagique de substrats à dégrader est sévèrement réduite et qu'elle prévient en partie la dégradation de protéines adressées au protéasome. Ces résultats indiquent que la mutation *BAG3*^{P209L} engendre une réduction globale des procédés responsable de la prise en charge des substrats protéiques des HSPBs et d'HSP70.

Ainsi la mutation *BAG3*^{P209L}, en l'absence de machinerie capable de les prendre en charge, va provoquer l'agrégation des substrats protéiques et des protéines chaperonnes associées et par conséquent diminuer le pool disponible de chaperonnes au sein de la cellule. De manière intéressante, lorsque l'on inhibe l'interaction HSP70/BAG3^m (m=P209L, P209Q, P209S, P470S), via la délétion du domaine BAG ou par traitement pharmacologique (JG-98), cela permet de prévenir la formation d'agrégats. Ensemble, ces résultats suggèrent que les mutants BAG3 liés à MFM nécessitent une interaction avec HSP70 pour l'apparition du phénotype pathologique et entraîner la déficience des fonctions associées aux complexes chaperonnes impliquant HSP70 par un mécanisme de gain de fonction (Meister-Broekema *et al.* 2018).

La cardiomyopathie dilatée (CMD)

Suite à l'identification de mutations de BAG3 associée à la CMD, plusieurs modèles murins ont été générés afin de mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques associés.

La mutation faux sens E455K, touchant l'un des acides aminés avec un rôle majeur dans l'interaction BAG3/HSP70 (Sondermann *et al.* 2001), a été modélisée *in vivo* au sein d'une lignée murine knock-in (KI). De façon intéressante, les souris *Bag3*^{E455K} présentent un phénotype similaire à celles déficientes pour *Bag3* (Homma *et al.* 2006, Youn *et al.* 2008, Fang *et al.* 2017), avec un important retard de croissance et une mort prématurée des animaux homozygotes vers l'âge de 4 semaines (Fang *et al.* 2017).

Afin de contrecarrer la mortalité associée à la déficience et à la mutation E455K de BAG3, plusieurs modèles murins présentant une déficience de BAG3 et/ou la mutation E455K restreinte au niveau cardiaque (*Bag3* cKO) ont été générés. Ces modèles présentent une survie prolongée allant jusqu'à plusieurs mois, un élargissement des cavités cardiaques et une

diminution progressive de la fonction systolique cardiaque, caractéristiques d'une CMD (Fang *et al.* 2017, Yun *et al.* 2021, Yang *et al.* 2022). L'analyse approfondie des mécanismes impliqués a révélé une accumulation de protéines insolubles, une diminution de l'expression protéique des petites chaperonnes (HSPB5, HSPB6 et HSPB8) et une altération de l'autophagie (Fang *et al.* 2017). Les lignées murines modélisant une déficience et/ou la mutation E455K de BAG3, globale ou cardio-restrictive, sont récapitulées dans le Table 5.

Pour conclure, bien que ces modèles mettent en avant le rôle de BAG3 dans la protéostasie et établissent un lien physiopathologique entre cette fonction et le développement d'une CMD, les données transmises par ces modèles restent bien souvent incomplètes. Cela est principalement dû au fait qu'ils présentent une construction génétique restrictive ou complexe afin de limiter la létalité associée à des altérations de la fonction de BAG3. De ce fait peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne notamment les mécanismes physiopathologiques associés à l'expression globale de mutation du domaine BAG dans un contexte de CMD.

Modèle	Spécificité	Phénotype cardiaque	Limite	Référence
Bag3 KO	Déficiência globale de <i>Bag3</i>	Non mentionné ou observation d'une dégénérescence du muscle cardiaque dans un modèle	Mortalité précoce (3 à 4 semaines)	Homma et al. 2006 Youn et al. 2008 Fang et al. 2017
Bag3 KI E455K	Expression globale de la mutation <i>Bag3</i> ^{E455K}	Non mentionné	Mortalité précoce (3 à 4 semaines)	Fang et al. 2017
Bag3 cKO	Déficiência de <i>Bag3</i> restreinte au niveau cardiaque	Dilatation des cavités cardiaque et réduction progressive de la fonction systolique	Génotype restreint	Fang et al. 2017 Myers et al. 2018 Yun et al. 2021 Yang et al. 2022
Bag3 KI E455K/wt/cKO	Expression globale de la mutation <i>Bag3</i> ^{E455K} à l'état hétérozygote combinée à la déficiência de BAG3 restreinte au niveau cardiaque	Dilatation des cavités cardiaque et réduction progressive de la fonction systolique	Génotype complexe/ restreint	Fang et al. 2017

Table 5. Modèle murin déficient pour *Bag3* et/ou exprimant la mutation *Bag3*^{E455K}

IV. CONCLUSION

BAG3 est une protéine multifonctionnelle avec un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie protéique. Elle exerce ce rôle à travers les différentes interactions protéiques possibles médiées par les multiples domaines au sein de sa structure, en particulier son interaction avec HSP70 à partir de son domaine BAG. Ainsi, elle va être indispensable à la survie cellulaire, notamment lorsqu'il s'agit de cellules post-mitotiques comme les cardiomyocytes.

Son implication dans plusieurs voies sélectives de l'autophagie va notamment permettre la surveillance, le maintien et le renouvellement des protéines impliquées dans l'appareil contractile cardiaque dont la fonction est constamment menacée par la tension mécanique engendrée par la contraction cardiaque.

Ainsi, l'implication de BAG3 au sein de pathologies cardiaques, comme la cardiomyopathie dilatée, n'est pas étonnant, d'autant plus que si l'on prend en compte l'ensemble des facteurs impliqués, de façon définitive ou encore incertaine, on retrouve principalement des altérations au niveau des protéines impliquées dans l'appareil contractile ou bien dans les systèmes qui permettent son maintien et son renouvellement.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'hypothèse centrale que ce projet propose d'évaluer est que l'altération génétique du domaine BAG, et par conséquent la fonction de BAG3 dépendante de son interaction avec HSP70, serait responsable du développement d'une CMD notamment au travers d'une altération de la protéostasie. BAG3 étant connu pour intervenir au niveau de l'autophagie CASA et de l'agréphagie, nous avons alors supposé que des mutations faux sens du domaine BAG de BAG3 pourraient engendrer une altération de la macroautophagie sélective.

Plusieurs mutations affectant le domaine BAG de BAG3 ont été identifiées par notre équipe par le screening génétique de cas de CMD familiaux (Villard *et al.* 2011). Pour rappel, quatre mutations non-sens (STOP) et deux mutations faux sens ont été identifiées lors de cette étude (Figure 35).

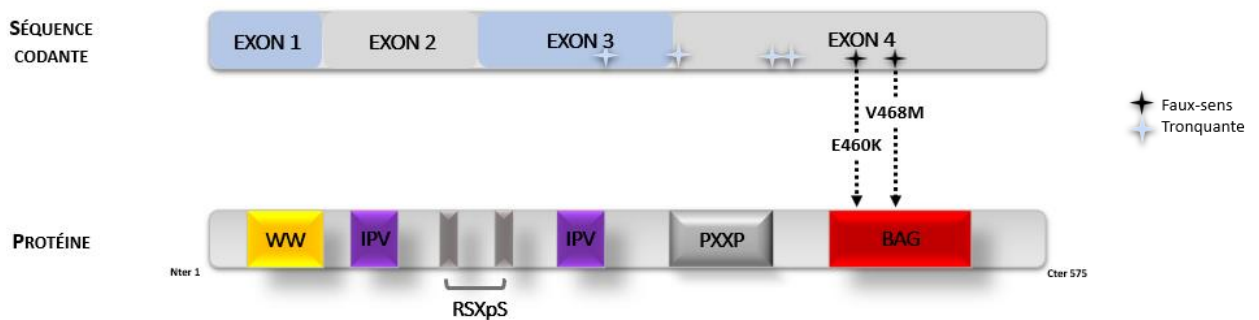


Figure 35. Mutations de BAG3 identifiées par séquençage chez des cas familiaux de CMD

En ce qui concerne la mutation faux sens *Bag3*^{E455K}, sa modélisation dans une lignée murine knock-in (KI) a déjà été étudiée et est limitée par le phénotype sévère et la létalité précoce associée (Fang *et al.* 2017).

Ainsi ce projet propose de générer un nouveau modèle murin KI porteur d'une autre mutation faux sens du domaine BAG afin de contrecarrer les limites observées pour le modèle murin *Bag3*^{E455K}. Il s'agit de la seconde mutation faux sens identifiée précédemment, la V468M, qui possède un orthologue murin, la V473M. Cette mutation n'intervient que marginalement dans l'interaction BAG3-HSP70, nous avons alors supposé qu'elle pourrait entraîner un phénotype moins sévère chez la souris que la mutation E455K qui elle, est directement impliquée dans cette interaction (Sondermann *et al.* 2001).

La première partie de ce projet a eu pour but de caractériser le phénotype des souris *Bag3*-V473M, notamment leur survie et croissance post-natale ainsi que leur phénotype cardiaque, afin de déterminer si cette nouvelle lignée présente un phénotype moins sévère que les souris *Bag3*^{E455K} et permet bien de récapituler un phénotype de CMD.

De par notre hypothèse d'une protéostasie altérée dans le cas de mutations faux sens du domaine BAG de BAG3, la deuxième partie de ce projet a eu pour but d'évaluer l'activité autophagique au sein du muscle cardiaque des souris *Bag3*^{V473M}.

Enfin, la troisième partie de ce projet concerne la recherche, par plusieurs approches omiques, de voies altérées par la mutation *Bag3*-V473M aux stades précoce et tardif du développement de la maladie, permettant notamment la mise en évidence de voies participant à la mise en place de la CMD mais également à sa progression lorsque des mutations faux sens du domaine BAG de BAG3 sont impliquées.

En parallèle de ce projet central, ce travail de thèse propose également l'étude du potentiel thérapeutique de la thérapie génique impliquant le gène *BAG3* dans un modèle de CMD d'origine génétique. Le modèle murin *Lmna*^{H222P/H222P} développe une CMD associée à une altération de l'autophagie (Choi *et al.* 2012, Vignier *et al.* 2019). Ainsi, de par la fonction pro-autophagique de BAG3 nous avons supposé qu'une thérapie génique par expression de BAG3 pourrait permettre d'améliorer le phénotype de CMD observé dans ce modèle.

MATÉRIELS & MÉTHODES

PROJET I : Etude des conséquences phénotypiques et moléculaires de la mutation *Bag3*^{V473M} dans un modèle murin

I. Modèle d'étude

a. Génération de la lignée BAG3^{V473M}

Objectif : Obtenir un modèle murin KI d'une mutation faux-sens et pénétrant de *Bag3*

La lignée murine KI BAG3^{V473M} a été générée selon nos recommandations par la société Genoway (Lyon, France). La mutation V473M de *Bag3* est l'orthologue murin de la mutation V468M humaine, identifiée chez deux patients apparentés atteints de CMD (Villard *et al.* 2011). Il s'agit d'une mutation faux-sens localisée au sein de l'exon 4 qui code le domaine BAG, commun à l'ensemble des membres de la famille BAG.

Une approche par CRISPR/Cas9 a été utilisée sur des souris de fond génétique C57BL/6N provenant de Janvier Labs France. Deux ARN guides ciblant l'exon 4 de *Bag3* ont été choisis afin d'introduire une coupure double brin spécifique. Suite au clivage par la Cas9, le système de réparation recombinaison homologue va permettre l'insertion d'une séquence codant pour la mutation V473M (ssODN). La séquence du ssODN est identique à la région cible à l'exception d'un ATG codant pour la méthionine à la place du GTA qui code pour la valine en position 473.

Les animaux mosaïques obtenus et validés pour la présence de la mutation ont ensuite été croisés avec des animaux WT. La transmission germinale de la mutation a ensuite permis d'obtenir des animaux hétérozygotes pour la mutation V473M. Ceux-ci ont ensuite été croisés entre eux pour obtenir notamment des animaux homozygotes et contrôles WT correspondants.

Les animaux sont hébergés sur des portoirs ventilés avec un système d'abreuvoir automatique et un accès illimité à la nourriture dans une pièce avec des cycles jour/nuit de 12h. L'ensemble des procédures effectuées ont été réalisées en accord avec la Directive 2010/63/UE du Parlement européen et approuvée par le comité d'éthique locale (#22847; #36375).

b. Génotypage de la lignée BAG3^{V473M}

Objectif : Identifier le génotype de chaque animal

Les génotypages ont été réalisés à partir des phalanges de souriceaux prélevées lors de leur identification grâce au kit Phire Tissue Direct PCR Master Mix (#F-170S, Thermofisher). Une PCR est réalisée avec un couple de primer spécifique de la région de l'exon 4 de *Bag3* contenant le codon 473 (Table 6). Les produits PCR sont ensuite soumis à une digestion enzymatique par Avall pendant au moins 2 heures à 37°C. Cela permet de cliver spécifiquement l'allèle muté et ainsi de le différencier par sa taille de l'allèle sauvage lors du dépôt du produit de PCR sur gel d'agarose.

II. Analyses *in vivo*

a. Echocardiographies

Objectif : Evaluer la fonction cardiaque

L'échocardiographie est une méthode non invasive et indolore, qui permet l'étude de la fonction cardiaque. Les échographies cardiaques ont été réalisées avec le Dr Nathalie Mougenot de l'UMS28 grâce à l'échographe Vivid 7 Dimension (General Electrics) équipé d'une sonde de fréquence 9-14MHz. Les souris sont légèrement anesthésiées par de l'isoflurane gazeux 0,5-1% et placées sur un plateau chauffant permettant de limiter la diminution de leur température corporelle due à l'anesthésie. Les mesures sont effectuées de manière à être le plus proche des conditions physiologiques, c'est à dire lorsque la fréquence cardiaque est supérieure à 600 bpm. Les paramètres anatomiques tels que l'épaisseur du septum interventriculaire (SIV), de la paroi postérieure du VG (PPVG) et le diamètre du VG ont été mesurés en diastole et en systole grâce au mode TM. Les paramètres de contractilité tels que la fraction d'éjection (FE) et la fraction de raccourcissement (FR) sont obtenus à partir des volumes télé-diastolique et -systolique mesurés sur la moyenne d'au moins 3 cycles cardiaques indépendants. Les paramètres les plus utilisés pour évaluer la fonction systolique utilisés sont le %FR et la FE, qui en temps normal chez la souris C56BL/6N WT, ont une valeur autour de 45% et 80% respectivement.

b. Modulation de l'autophagie

Objectif : Evaluer le flux autophagique

L'autophagie est un processus dynamique continu qui implique la dégradation d'éléments cytosoliques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'étude de ce dynamisme est appelée analyse du flux autophagique et fait référence à l'évaluation de l'ensemble du processus autophagique, c'est-à-dire de l'activité catabolique autophagique dans une cellule (Klionsky *et al.* 2016). Actuellement, il n'existe pas de « norme de référence » pour mesurer le flux autophagique. Communément, c'est la détection de la macroautophagie, c'est-à-dire la détection ou l'estimation de la quantité d'autophagosomes qui est utilisée pour analyser l'autophagie dans une cellule. A l'état basal, la quantité d'autophagosomes dans la cellule est approximativement constante (Loos *et al.* 2014). Une perturbation du flux autophagique, médiée par une carence en nutriment ou par l'utilisation d'inhibiteurs, peut modifier en retour la quantité d'autophagosomes détectés dans une cellule. Par exemple, l'inhibition de l'étape de fusion autophagosome/lysosome entraîne leur accumulation dans la cellule (du Toit *et al.* 2018). L'analyse de cette accumulation peut permettre d'évaluer le flux autophagique : la vitesse d'accumulation de ces autophagosomes est un indicateur de la vitesse initiale du flux autophagique, de même que la quantité d'autophagosomes accumulés est un indicateur de l'intensité du flux.

Modulation du flux autophagique

Les souris âgées de 3 mois (N=8-9 par groupe) ont été soumises à un jeûne (24h) puis nourries pendant 2h (07:00-09:00) puis à nouveau soumises à un jeûne (24h) afin d'induire l'activation de l'autophagie de manière synchrone (Ezaki *et al.* 2011). Comme mentionné précédemment, un inhibiteur de la dégradation lysosomale, ici la chloroquine, a été utilisé pour mesurer le flux autophagique. Une solution de chloroquine (50mg/kg) ou de NaCl 0.9% a été injectée en intrapéritonéale 4h avant le sacrifice des souris. L'expression de la protéine LC3-II, un marqueur des autophagosomes, a ensuite été mesurée par western-blot en présence et en absence de chloroquine afin d'estimer le flux autophagique.

Une carence nutritionnelle est un puissant activateur de l'autophagie « bulk » non-sélective. Afin d'apporter un stimulus qui permettrait d'activer de façon spécifique l'autophagie sélective nous avons croisé notre lignée *Bag3-V473M* avec une lignée KI murine portant la

mutation *Des*-R405W à l'état hétérozygote, l'orthologue murin de la mutation *DES*-R406W qui est responsable du développement d'une desminopathie chez l'homme. Cette mutation entraîne la production d'une desmine protéotoxique pro-agrégante (Herrmann *et al.* 2020) et représente donc un possible cargo pour les voies sélectives de l'autophagie, en partie médiées par BAG3.

Ce double mutant a été généré par le croisement de souris *Bag3*^{V473M/V473M} femelles avec des mâles *Des*^{R405W/wt}. Les souriceaux issus de ce croisement ont été génotypés pour le desmine afin d'identifier les souris porteuses de la mutation *Des*-R405W. Les souris mâles doubles hétérozygotes (*Bag3*^{V473M/wt}-*Des*^{R405W/wt}) ont été croisé en retour avec des souris *Bag3*^{V473M/V473M} femelles afin d'obtenir des souris *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt}.

c. Tests de tolérance

Objectif : Evaluer la réponse de l'organisme des souris suite à un bolus de glucose ou bien d'insuline.

Les souris *Bag3*^{V473M/V473M} et WT âgées de 5 mois (N=6-9 par groupe) ont été soumises à un jeûne (5h) puis ont reçu un bolus de glucose (2g/kg) par gavage ou d'insuline (1U/kg, Sigma) par injection intrapéritonéale dans le cadre d'un OGTT « Oral Glucose Tolerance Test » ou d'un ITT « Insulin Tolerance Test » respectivement. Pour ces deux tests, la glycémie a été mesurée grâce à un glucomètre (Accu-Chek Performa, Roche) à partir d'une goutte de sang (veine caudale) à 0-, 15-, 30-, 60-, 90-, et 120-minutes après l'administration du bolus.

d. Résonance Magnétique Nucléaire

Objectif : Déterminer la proportion de masse grasse corporelle.

Les souris *Bag3*^{V473M/V473M} et WT âgées de 5 mois (N=6-11 par groupe) ont été scannées par RMN (Minispec Bruke), une méthode non-invasive, dans le but de déterminer la proportion de fluide, de masse grasse et de masse maigre. La calibration quotidienne du Minispec a été effectuée avant les mesures selon les recommandations du fabricant. Les souris sont placées dans un cylindre et maintenues immobiles par l'insertion d'un piston. Le cylindre est ensuite inséré dans la chambre d'analyse pendant environ 2 minutes le temps de l'acquisition.

III. Analyses histologiques

a. Immunomarquages

Objectif : Evaluer les conséquences tissulaires de la CMD au niveau cardiaque.

Après sacrifice, les cœurs des souris sont explantés et lavés dans du PBS froid et inclus en OCT avant d'être plongés dans une solution d'isopentane refroidie à l'azote liquide. Les tissus sont ensuite coupés de sorte à générer des coupes longitudinales de 6 μ m d'épaisseur puis séchées pendant 1 heure sous la hotte avant d'être fixées pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde 4%. Les coupes sont perméabilisées pendant 5 minutes avec une solution de PBA-triton 0.2% puis saturées pendant 30 minutes avec une solution de BSA 2% à température ambiante. L'incubation avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage est faite sur la nuit en chambre humide à 4°C. Après rinçage, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 1 heure à température ambiante puis lavées avant d'être montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Dako (Sigma).

L'acquisition des immunofluorescences a été effectuée avec un microscope Olympus IX-71 équipé d'un objectif à immersion (x60). Les images sont ensuite déconvoluées grâce au système de microscopie du DeltaVision Elite (GE Healthcare). La reconstruction 3D et l'analyse quantitative ont été effectuées grâce au logiciel Imaris (Bitplane, v 8/9).

b. Colorations

Cœur

Objectif : Evaluer les conséquences tissulaires de la CMD au niveau cardiaque

Après sacrifice, les cœurs des souris sont explantés et lavés dans du PBS froid et fixé sur la nuit dans du paraformaldéhyde 4%. Les tissus cardiaques sont déshydratés par plusieurs bains (20 minutes chacun) successifs contenant des solutions d'éthanol de concentration croissante (50 à 100%), puis placés dans 3 bains successifs d'1 heure contenant une solution de salicylate de méthyle. Les tissus sont ensuite inclus en paraffine et coupés de sorte à générer des coupes transversales dans la partie médiane du cœur de 6 μ m d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenues sont ensuite déparaffinées puis colorées avec une solution de rouge Sirius ou d'Hématoxyline/Eosine, avant de finalement être monté entre lame et lamelle avec le milieu

de montage Eukitt (Sigma). L'acquisition des images est réalisée avec un microscope Nikon Eclipse Ti.

Le logiciel d'analyse d'image Histolab (GT Vision) a été utilisé pour la quantification de la fibrose sur les colorations en rouge Sirius.

Muscle squelettique

Objectif : Evaluer la présence d'une éventuelle dégénérescence musculaire

Après sacrifice, le muscle de la patte arrière (gastrocnémien) a été isolé et inclus en OCT avant d'être plongé dans une solution d'isopentane refroidie à l'azote liquide. Les muscles ont été coupés de sorte à générer des coupes transversales de 12 μ m d'épaisseur depuis la partie médiane. Les coupes ainsi obtenues sont fixées successivement par des solutions d'éthanol à 95% et de paraformaldéhyde à 4% avant d'être colorées avec des solutions d'Hématoxyline/Eosine. Les colorations sont ensuite montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Eukitt (Sigma). L'acquisition des images est réalisée avec un microscope Nikon Eclipse Ti. Le logiciel ImageJ a été utilisé pour la quantification de l'aire et du nombre de fibre musculaire.

Foie

Objectif : Evaluer la présence de gouttelettes lipidiques au sein du tissu hépatique

Après sacrifice, les foies des souris sont prélevés et lavés dans du PBS froid avant d'être inclus en OCT. Le foie est ensuite coupé de sorte à générer des coupes de 7 μ m d'épaisseur qui sont par la suite fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% avant d'être colorées avec une solution de red-oil. Les colorations sont ensuite montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Dako (Sigma). L'acquisition des images est réalisée avec un microscope Nikon Eclipse Ti.

IV. Analyses biochimiques et biomoléculaire

a. Biochimie

Objectif : Estimer l'expression d'une protéine cible

Extraction et dosage des protéines

L'extrait protéique est obtenu à partir d'un échantillon de ventricule conservé à -80°C . L'homogénéisation des tissus est réalisée grâce au TissueLyser (QUIAGEN), 100 μL de tampon d'extraction froid pour 5mg de tissu est ajouté par échantillon (150 mM NaCl, 50 mM TRIS pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, pH ajusté à 7.4), auquel est ajouté extemporanément un cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma Aldrich p8340 1/1000). Les tissus sont homogénéisés pendant 5 minutes à 50 Hz, l'homogénat est ensuite incubé sur roue 30 min à 4°C avec 1% de Triton-X100. Le surnageant est récupéré dans un tube froid après centrifugation à 3000g pendant 5min à 4°C , il est par la suite aliquoté et conservé à -80°C pour éviter toute dégradation protéique.

La quantité totale de protéine par échantillon est déterminée à l'aide du kit de dosage BCA Pierce™ (#23225, Thermofisher). Une solution stock de BSA (2mg/mL) est utilisée pour réaliser la gamme d'étalonnage (Table 7) afin d'estimer la concentration d'échantillons diluée au 1/5^{ème} dans le tampon de lyse.

	Tampon de lyse (μL)	BSA (μL)	[BSA] finale (mg/mL)
A	0	300 (stock)	2
B	125	375 (stock)	1.5
C	325	325 (stock)	1
D	175	175 (B)	0.75
E	325	325 (C)	0.5
F	325	325 (E)	0.25
G	325	325 (F)	0.125
H	400	100 (G)	0.025
I	400	0	0

Table 7. Préparation de la gamme d'étalonnage

Western-blot

Les protéines (30 μg) sont tout d'abord dénaturées pendant 10 minutes à 95°C en présence d'un tampon de charge (#NP0007, Thermofisher). Elles sont ensuite déposées sur gel de

polyacrylamide Bis-Tris 10/12% (#NP0341, Thermofisher) où elles seront séparées selon leur taille par électrophorèse, puis finalement transférées sur une membrane de nitrocellulose (#1704158, BioRad). La saturation de la membrane est effectuée dans une solution de blocage (lait écrémé dilué à 5% ou BSA 5% dans du PBS 1X) sous agitation à température ambiante pendant au moins 1 heure, puis l'anticorps primaire est ajouté sur la nuit à 4°C toujours sous agitation. Après plusieurs étapes de lavage, les membranes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP (R&D Systems) dilué au 1/1000 dans la solution de blocage. La révélation est faite à l'aide du réactif ECL (Cytiva).

Protéine cible	Référence	Dilution	Espèce	PM (kDa)
Anticorps primaires				
Gapdh	Proteintech 60004-Ig	1/10 000 (WB)	souris	40
Bag3	Proteintech 10599-AP	1/3 000 (WB) 1/100 (IF)	lapin	90
α-actinine	Abcam ab9465	1/100 (IF)	souris	/
Desmine	Proteintech 16520-AP	1/5 000 (WB) 1/100 (IF)	lapin	55
Desmine (ub)	Proteintech 67793-Ig	1/5 000 (WB)	souris	180
Anticorps secondaires				
Anti-rabbit IgG	R&D Systems HAF007	1/1000 (WB)	chèvre	/
Anti-mouse IgG	R&D Systems HAF008	1/1000 (WB)	chèvre	/
Anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Dylight 800 35571	1/10 000 (WB)	chèvre	/
Anti-mouse IgG	Thermo Fisher Dylight 680 10170	1/10 000 (WB)	âne	/
Anti-rabbit IgG	Jackson Alexa 488 111-545-144	1/1 000 (IF)	chèvre	/
Anti-mouse IgG	BETHYL Dylight 597 A90-116D4	1/1 000 (IF)	chèvre	/

Table 8. Projet II – Liste des anticorps utilisés

b. Biologie moléculaire

Objectif : Déterminer l'expression d'un gène cible

Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est faite à partir d'un échantillon de ventricule conservé à -80°C. Après ajout d'1mL de Trizol (QIAGEN), le tissu est homogénéisé grâce au TissueLyser QIAGEN pendant 5 minutes à 50 Hz. Les ARN sont extraits sous hotte par l'ajout de 160 μ L de chloroforme et placé sur glace pendant 15 minutes. La phase aqueuse contenant les ARN est séparée de la phase organique par centrifugation pendant 15 minutes à 12000g à 4°C. La phase aqueuse est ensuite prélevée et les ARN présents sont précipités avec 800 μ L

d'isopropanol. Les ARN précipités sont ensuite isolés par centrifugation à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN ainsi formé est lavé à l'éthanol 70% et re-suspendu avec 30µL d'eau RNase free. La solution d'ARN est par la suite dosée par absorbance à 260nm au Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher).

Afin de déterminer la pureté de notre solution d'ARN, les ratios 260/280 et 260/230 sont évalués. Des ratios proches de 2 indique l'absence de contamination. Plus spécifiquement, Le premier permet de déterminer si les ARN sont contaminés par des protéines, le second permet d'évaluer la contamination au phénol présent dans le Trizol ajouté au début de l'extraction.

Rétro-transcription (RT) et synthèse d'ADN complémentaire

La réaction de reverse-transcription est réalisée à partir d'1µg d'ARN conservés à -80°C grâce au kit M-MLV Reverse Transcriptase Invitrogen™ (28025013). Un mélange réactionnel composé de d'ARN (1µg), d'oligo-dT (50mM), et de dNTP (10mM) est chauffé pendant 5 minutes à 65°C afin de permettre aux amorces de se fixer aux ARNm. Par la suite, un tampon adapté à la réaction de rétro-transcription (5X), du DTT (0,1M) et l'enzyme RNaseOUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40U/µL) sont ajoutés puis incubé à 37°C pendant 2 minutes afin de préparer le mélange réactionnel à l'ajout de M-MLV RT (200U). La réaction s'effectue pendant 50 min à 37°C, puis est arrêtée par l'inactivation de la M-MLV RT par une incubation à 70°C pendant 15 minutes.

L'ARN total a été extrait des cœurs de souris à l'aide du TRIzol (Life Technologies, Thermo Fisher) conformément aux recommandations du fabricant. L'ADNc a été synthétisé à l'aide de la transcriptase inverse MMLV (Thermo Fisher). Les séquences d'amorces pour la RT-qPCR sont répertoriées dans le tableau 2. Les réactions de qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SensiFAST (Meridian) dans des plaques PCR à 96 puits dans un thermocycleur QuantStudio 3 (Thermo Fisher).

PCR quantitative (qPCR)

Les réactions de qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SensiFAST (Meridian) à partir de 50ng d'équivalent ARN et d'amorces spécifiques à chaque gène cible (0.5µM) dans des plaques PCR à 96 puits dans un thermocycleur QuantStudio 3 (Thermo Fisher).

L'expression de notre gène cible est comparée à l'expression d'un gène de ménage, ici le gène *Rplp0*, connu notamment pour son expression stable au sein du tissu cardiaque.

Gène cible		Séquence
qPCR		
<i>Nppa</i>	Forward	5'-AACAGCTTCCGGTACCGAAG-3'
	Reverse	5'-GTGGCAATGTGACCAAGCTG-3'
<i>Nppb</i>	Forward	5'-AGCTCTTGAAGGACCAAGGC-3'
	Reverse	5'-ACAACCTTCAGTGCGTTACAGC-3'
<i>Col1a1</i>	Forward	5'-AGCCGCAAAGAGTCTACATGT-3'
	Reverse	5'-GCTGACTTCAGGGATGTCTTCT-3'
<i>Col3a1</i>	Forward	5'-GCAGTCCAACGTAGATGAATTGG-3'
	Reverse	5'-TCTGGGTTGGGGCAGTCTAG-3'
<i>Bag3</i>	Forward	5'-CAAGATCCAGGGCGATGACT-3'
	Reverse	5'-GGTTTGTTCGGGTTGGGT-3'
Génotypage		
<i>Bag3</i>	Forward	5'-GCCATCCTGGAGAAGGTACA-3'
	Reverse	5'-ACCTTCCTGACGCCATCTCT-3'
<i>Desmine</i>	Forward	5'-CTGGAGGAGGAGATCCGACA-3'
	Reverse	5'-GGCCCTCGTTAATTTTCTGC-3'

Table 6. Projet II – Liste des amorces d'oligonucléotides

V. Analyses omiques

a. Protéomique

Objectif : Caractériser le protéome cardiaque des souris *Bag3*-V473M

Les protéines cardiaques ont été extraites comme décrit précédemment. L'analyse protéomique a été réalisée par la plateforme P3S (Paris).

Les échantillons (N=6 par groupe) ont été soumis à une digestion trypsique en utilisant une colonne S-TRAP™ (Protifi) selon les recommandations du fabricant. Les peptides ont été séchés puis re-suspendus dans une solution de 2% acétonitrile / 0.1% acide folique. Une étape de dessalage est ensuite appliquée (Empore SPE Disks C18, Sigma Aldrich) en utilisant le robot DigestProMSi (CEM). Les peptides dessalés sont ensuite séchés et re-suspendus dans une solution de 2% acétonitrile / 0.1% acide folique avant d'être analysés par une UHPLC nanoElute (Bruker) couplée à un spectromètre de masse (Bruker) comme décrit précédemment (Akkurt *et al.* 2021).

Les protéines ont été identifiées par MaxQuant (v 1.6.17.0) et comparée au protéome de référence de la souris (Uniprot) complétée avec la séquence peptidique de la mutation *Bag3-V473M* (63778 entrées, 18/02/2021). Le filtrage des données (au moins 4 valeurs par groupe), et l'imputation de valeurs manquantes ainsi que l'analyse statistique (Limma) ont été effectués par Prostar (v 1.22.6).

b. Transcriptomique

Objectif : Caractériser le transcriptome cardiaque des souris *Bag3-V473M*

Les ARN cardiaques ont été extraits (N=3 par groupe) comme décrit précédemment et leur qualité a été vérifiée afin de sélectionner des ARN de bonne qualité (RIN>7) pour l'analyse de RNA-Seq. Les données de RNA-Seq ont été générées par la plateforme de Séquençage de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM, Paris). La préparation de la banque d'ARNm a été réalisée selon les recommandations du fabricant (ILLUMINA Stranded mRNA Prep). Les échantillons ainsi obtenus ont été séquencés (Novaseq 6000 ILLUMINA ; cartouche de SP-200 cycles) afin d'obtenir 2x800 millions de reads (100 bases par ARN) correspondant à 2x50Millions de reads par échantillons après démultiplexage.

L'analyse bio-informatique des fichiers fastq générés a été réalisée par le Dr Lieng Taing. Le pipeline de cette analyse (*nf-core/rnaseq*, Di Tommaso *et al.* 2017) a été utilisé avec les options définies par défaut à partir du génome de référence de la souris (GRCm39). La qualité des fichiers fastq a été vérifiée et validée pour chaque échantillon (MultiQC). Les adaptateurs présents dans les séquences ont été supprimés (trimgalore v0.6.7 et cutadapt v4.6.) puis celles-ci ont été alignées sur le génome de référence de la souris (STAR v5.1). Les fichiers bam ont été utilisés pour vérifier manuellement la présence ou non de la mutation *Bag3-V473M* (IGV v2.11.9). La quantification de l'expression des transcrits pour chaque gène a été déterminée (Salmon v1.10.1) avant d'effectuer l'analyse d'expression différentielle pour chaque gène au sein des groupes (R v4.3.1, DESeq2 v1.40.2). Les gènes sont estimés différentiellement exprimés si leur p-value corrigée est inférieure au seuil de 0.05.

c. Lipidomique

Objectif : Caractériser la signature lipidique cardiaque des souris *Bag3-V473M*

L'analyse du lipidome cardiaque a été réalisée par la plateforme de lipidomique de l'IHU ICAN (Paris) sur des cœurs explantés de souris *Bag3^{V473M/V473M}* et WT précédemment inclus dans l'OCT (N=5 par groupe). Ainsi, les tissus ont été placés sur glace afin de faire fondre l'OCT avant d'être lavés 3 fois avec de l'eau glacée.

Les lipides cardiaques ont ensuite été extraits à partir de 20µL de tissus homogénéisés (équivalent à 1mg) avec 1,5 ml de chloroforme et 750µL de méthanol avant d'être soumis à une sonication pendant 15 minutes. Une séparation de phase est ensuite créée par l'ajout de 450µL de carbonate d'ammonium (250mM) suivi d'une étape de sonication de 15 minutes. Les lipides ainsi extraits (phase organique) sont séchés et re-suspendus dans 200µL de solvant pour spectroscopie de masse (LC-MS).

Les lipides ont ensuite été quantifiés par LC-ESI/MS/MS avec un spectromètre de masse (QTrap 4000) associé à une colonne de chromatographie (UFLC Prominence).

Un volume de 4µL de la solution de lipides re-suspendus a été injecté dans la colonne (Ascentis C18 2.7µM 2.1x150mm) constituée de phases mobiles composées de A (acétonitrile/eau 60/40) et B (isopropanol/acétonitrile 90 :10) en présence de formate d'ammonium et d'acide formique.

Un programme R développé par la plateforme de lipidomique de l'ICAN a été utilisé pour l'analyse bio-informatique.

d. Analyses d'enrichissements

Objectif : Identifier les voies et fonctions biologiques associées à une liste de transcrits ou de protéines différentiellement exprimées.

Clue-GO

Clue-GO (Bindea *et al.* 2009) (v2.5.10) est une application utilisable dans Cytoscape (v3.10.1) qui permet de réaliser des analyses d'enrichissement à partir d'une liste de gènes ou de protéines différentiellement exprimés en utilisant différents types d'annotations tout permettant une clustérisation des termes pertinents afin d'éviter leur redondance. Ici seule

l'ontologie de gènes de la catégorie « processus biologiques » de Gene Ontology (GO-BP) a été utilisée. Les paramètres de clustérisation par défaut de Clue-GO ont été conservés en appliquant un seuil de significativité de p-value corrigée <0.01 .

Ingenuity Analysis Pathway (IPA)

Cette analyse a été réalisée par Morgane Le Gall de la plateforme PROTEOM'IC de l'Institut Cochin. IPA est un outil développé par QIAGEN qui exploite l'enrichissement (over-representation analysis) afin de donner un sens biologique à une liste de transcrits différentiellement exprimés. Ainsi, IPA permet d'identifier les voies de signalisation et fonctions biologiques les plus enrichies dans une analyse comparative. Le Z-score attribué par IPA permet d'estimer l'activation ou l'inhibition pour chaque voie identifiée. Ici, un Z-score positif suggère une activation de la voie alors qu'un Z-score négatif suggère son inactivation. Une valeur absolue de $|Z\text{-score}| > 2$ suggère une activation/inhibition significative de la voie associée.

e. Visualisation des données

Objectif : Identifier rapidement et visuellement les changements au sein d'un large ensemble de données.

Volcano-plot

L'ensemble des volcano plot ont été générés par l'outil en ligne VolcaNoseR ([Goedhart et al. 2020](#)) à partir des $\log_2(\text{Fold Change})$ et des p-values corrigées. Les seuils de FDR 1% et de 20% Fold Change ont généralement été appliqués afin de mettre en évidence les gènes/protéines retrouvées différentiellement exprimés.

Heat-map

L'ensemble des heat-map ont été générées par l'outil en ligne Heatmapper ([babicki et al. 2016](#)) à partir du comptage de reads normalisés pour chaque gène dans les différents échantillons.

VI. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism9 v9.0.0 (GraphPad). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SD. Après avoir évalué le type de distribution des données de chaque groupe, le test t de Student ou de Mann-Whitney sont appliqués afin de comparer les différences entre deux groupes. Pour les comparaisons de plus de deux groupes, une analyse par ANOVA à 1 facteur est utilisée. Si celle-ci présente une p-value <0.05 , elle est alors suivie d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Tukey ou de Kruskal-Wallis.

PROJET II : Evaluation de l'effet thérapeutique de la surexpression de *Bag3* dans un modèle murin de CMD d'origine génétique

I. Modèle d'étude

Nous disposons au laboratoire de la lignée KI du gène *Lmna* portant la mutation H222P, prêtée par le Dr Gisèle Bonne. Cette lignée possède un phénotype de CMD décrit chez les souris homozygotes alors que les hétérozygotes ne présentent pas de phénotype. Les souris *Lmna*^{H222P/H222P} de fond génétique 129/SvJ développent une cardiomyopathie dilatée à partir de l'âge de 4 mois, avec un phénotype plus prononcé chez les mâles qui ont une espérance de vie comprise entre 5 et 9 mois (Arimura *et al.* 2005). Nous avons utilisé les souris mâles homozygotes *Lmna*-H222P du fond génétique C57/B6, dont le phénotype a été décrit plus récemment, qui présentent une réduction de la fonction cardiaque à partir de 5 mois, et une espérance de vie comprise entre 7 et 11 mois (Vignier *et al.* 2019).

II. Surexpression de *BAG3*

Les adénovirus associés sont des virus composés d'un ADN simple brin d'environ 4,7 Kb contenu dans une capsid. Ces virus sont non pathogènes et très utilisés en thérapie génique de par leur facilité de manipulation pour le transfert de gène. Ici nous utilisons des AAV de sérotype 2.9, qui ont un tropisme d'expression cardiaque. Ces AAV comportent deux transgènes distincts : le cDNA du gène *BAG3* humain ou le cDNA de la GFP, servant ici de contrôle négatif. Pour assurer la sélectivité d'expression cardiomyocytaire, ils sont sous le contrôle d'un promoteur cardiaque troponine (cTnT). Enfin, afin de repérer les cellules infectées, nous avons associé un marqueur fluorescent (GFP ou dsRED). Les AAV ont été préparés par un laboratoire spécialisé à Nantes à partir des plasmides préparés au laboratoire.



Figure 36. Structure des AAV utilisés

Hs-BAG3 : séquence codante pour la protéine BAG3 humaine ; GFP : green fluorescent protein ; IRES : internal ribosome entry site, permet la synthèse indépendante entre les transgènes Hs-BAG3/GFP et la DsRED ; DsRED : protéine fluorescente rouge.

Les souriceaux mâles, sexés à J1, sont injectés à J3 par voie trans-jugulaire avec une dose de 2.5E+11 de particules virales. Le succès de l'injection est évalué d'une part visuellement par

l'observation du blanchissement de la jugulaire et d'autre part au niveau des cœurs explantés de souris ayant reçu l'un des deux AAV par RT-qPCR.

Gène cible	Séquence	
PCR quantitative		
Hs-BAG3	Forward	5'-TCATCTGTCCAGGGTGCATCG-3'
	Reverse	5'-TGGTTTGTTCAGGCTGGG-3'
GFP	Forward	5'-GCAGAAGAACGGCATCAAGGT-3'
	Reverse	5'-ACGAACTCCAGCAGGACCATG-3'

Table 9. Projet II – Liste des amorces d'oligonucléotides utilisées en qPCR

III. Etude du phénotype cardiaque

La fonction cardiaque des souris des 3 groupes d'études (Hs-BAG3, GFP et non-injectées) a été suivie par échocardiographie à partir de l'âge de 2 mois jusqu'à l'âge de 6 mois.

Les souris sont ensuite sacrifiées et le cœur est ensuite prélevé afin de procéder aux analyses histologiques, biochimiques et moléculaires.

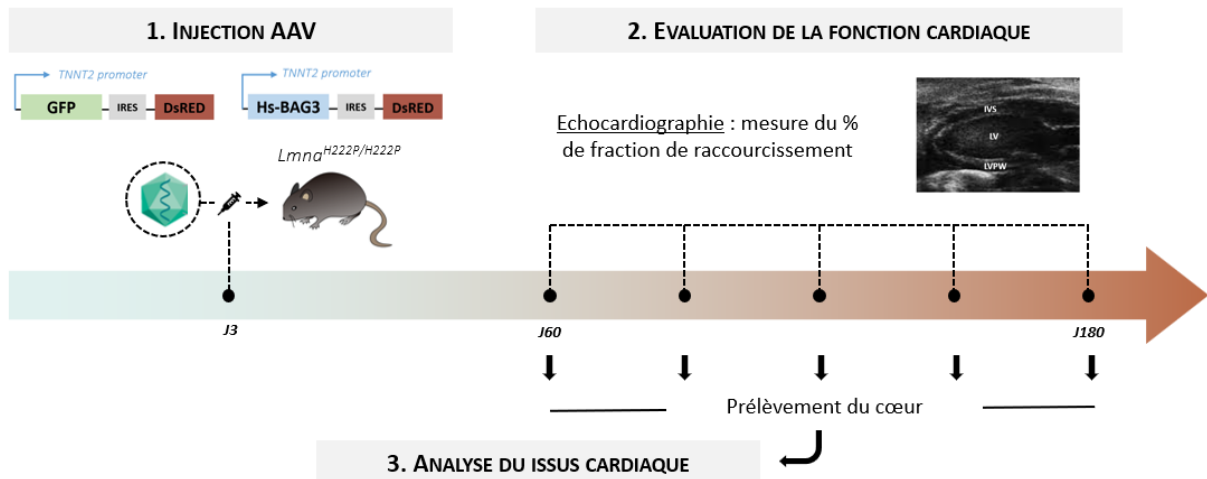


Figure 37. Projet II – Déroulement expérimental

Protéine cible	Référence	Dilution	Espèce	PM (kDa)
Anticorps primaires				
Lamine A/C	Santa Cruz H110	1/1000 (WB)	lapin	74-80
Gapdh	Proteintech 60004-Ig	1/10 000 (WB)	souris	40
Hs-BAG3	Abcam ab225561	1/100 (IF)	lapin	/
GFP	Cliniscience TP401	1/300 (IF)	lapin	/
α-actinine	Abcam ab9465	1/100 (IF)	souris	/
Anticorps secondaires				
Anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Dylight 800 35571	1/10 000 (WB)	chèvre	/
Anti-mouse IgG	Thermo Fisher Dylight 680 10170	1/10 000 (WB)	âne	/
Anti-rabbit IgG	Jackson Alexa 488 111-545-144	1/1 000 (IF)	chèvre	/
Anti-mouse IgG	BETHYL Dylight 597 A90-116D4	1/1 000 (IF)	chèvre	/

Table 10. Projet II – Liste des anticorps utilisés

RÉSULTATS

PROJET I : Etude des conséquences phénotypiques et moléculaires de la mutation *Bag3*^{V473M} dans un modèle murin

I. Introduction

La mise en évidence du gène *BAG3* lors de la recherche de facteurs de risques génétiques suivi de l'identification de variants forts de ce gène dans des cas familiaux de CMD vient renforcer l'hypothèse d'un mécanisme commun regroupant plusieurs gènes associés à la CMD, qui serait ici une altération de la protéostasie. En effet, si l'on prend en compte, d'une part, l'importance des systèmes de maintien de l'homéostasie protéique, dans lesquels *BAG3* intervient, au sein de cellules post-mitotiques comme les cardiomyocytes notamment dans le renouvellement des composants essentiels à la contraction cardiaque et d'autre part, qu'un certain nombre de mutations associées à la CMD touche ces composants, on peut alors supposer que la CMD pourrait être la conséquence pathologique d'une altération des composants essentiels à la contraction cardiaque et/ou des systèmes d'entretien permettant leur renouvellement.

Ma thèse a donc eu pour but d'étudier les mécanismes physiopathologiques associés à la présence d'une mutation pénétrante faux-sens du domaine BAG, identifiée pour le gène *BAG3* chez des patients atteints de CMD, en la modélisant au sein d'une lignée murine.

Pour cela nous avons fait générer un modèle murin knock-in portant la mutation *Bag3*^{V473M} et tout d'abord vérifié qu'il reproduisait un phénotype de CMD par une évaluation fonctionnelle du phénotype cardiaque. Nous nous sommes ensuite intéressés aux conséquences au niveau cellulaire de cette mutation, notamment en évaluant le flux autophagique cardiaque chez les souris mutées, de par la fonction maintenant bien décrite de *BAG3* dans plusieurs voies spécifiques de l'autophagie. Nous avons poursuivi cette étude par la réalisation d'une analyse protéomique afin de mettre en évidence, en plus de l'autophagie, d'autres éventuelles perturbations des systèmes participant au contrôle qualité des protéines.

BAG3 étant une protéine multifonctionnelle, nous avons également souhaité étendre notre recherche des conséquences moléculaires de la mutation par l'étude du profil transcriptomique cardiaque des souris mutées. Cela a été permis par la réalisation de RNA-Seq, réalisés à différents stades d'avancement de la maladie, permettant ainsi l'identification

de mécanismes, à la fois précoces et tardifs, associés à la CMD dépendante d'une mutation du gène *Bag3*.

Les résultats obtenus sur ce projet font l'objet d'un article en cours de préparation disponible ci-après.

II. Article : La mutation *Bag3*^{V473M} entraîne des altérations de la protéostasie et du métabolisme conduisant à une CMD dans un modèle knock-in murin

Bag3 V473M mutation causes proteostasis and metabolic alterations leading to dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model

Océane Piedallu¹, Nathalie Mougenot², Lieng Taing¹, Laetitia Duboscq-Bidot^{1,3}, Solène Chardonnet⁴, Cédric Pionneau⁴, Morgane Le Galle⁵, Marie Lhomme³, Maharajah Ponnaiah³, Philippe Charron^{1,3,6,7}, Éric Villard^{1,3}

¹ UMR_S 1166, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France.

² UMS28, Sorbonne Université, Plateforme d'Expérimentation Cœur, Muscles, Vaisseaux (PECMV), Paris, France.

³ Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (ICAN), Paris 75013, France. UMS PASS, Sorbonne

⁴ Université, INSERM, Plateforme Post-Génomique de la Pitié Salpêtrière (P3S), Paris, France.

⁵ CNRS UMR8104, Inserm U1016, Université Paris Cité, Plateforme PROTEOMIC, Paris, France.

⁶ APHP, Département de Cardiologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

⁷ AP-HP, Département de Génétique, Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

Corresponding author: Eric Villard, Ph.D.; Mailing address: 91 boulevard de l'Hôpital, 75013, Paris, France; Phone: +33140779545; Email: eric.villard@sorbonne-universite.fr

Abstract

Missense and truncating mutation in *BAG3*, encoding the co-chaperone protein BCL-2-associated athanogene 3 (*BAG3*), are frequently identified in dilated cardiomyopathy patients. Previous studies in experimental models demonstrated that *BAG3* loss-of-function acts through impairment of cellular proteostasis, and more specifically altering components of the macroautophagic pathways. Clustering of disease associated missense mutations in the C-terminal BAG domain of *BAG3*, involved in interaction loss with the major HSP70 chaperone, suggests they acts through specific mechanisms linked to HSP70 function involved in proteotoxic stress response. However, previous attempts to model BAG domain mutation led to early mortality, due to drastic interaction loss with HSP70, and preventing comprehensive study of the underlining mechanisms. We hypothesized that the human DCM associated V468M mutation, marginally involved in HSP70 contact, would generate an hypomorphic phenotype in mice thus allowing to interrogate underlining molecular and physiopathological consequences of BAG domain mutations. Accordingly, we generated a full knock-in of the orthologous V473M mutation in mice that developed severe cardiac insufficiency by 5 months of age in males, delayed by three months in heterozygous mice and females. The mutant mice were deficient in basal macroautophagy yet showed activation upon starvation-induced stimulation, indicating an alteration of specific rather than bulk macroautophagy. Co-expressing a proteotoxic pro-aggregative mutant desmin in *Bag3*-V473M mice

unexpectedly improved cardiac function and increased desmin ubiquitinylation rather than exacerbate DCM features. This suggests that normal Bag3 function may worsen mutant-desmin associated proteotoxicity through aggrephagic pathway overload, while HSP70-interacting deficient V473M mutant may be incompetent in desmin aggregates cargo processing. Proteomic and transcriptomic analysis confirmed proteostasis dysregulation in mutant mice but also witness an early metabolic alteration consistent with a cardiac shift in energy supply from fatty-acids to glucose as an early event in the onset of the disease. To conclude, our results shows that *Bag3* BAG domain mutation impaired specific macroautophagy resulting in early cardiac metabolic dysregulation.

Key Words

BAG3, dilated cardiomyopathy, knock-in mouse model, proteostasis, desmin, metabolism

Introduction

Dilated cardiomyopathy is a rare (1/2500) human heart disease with a poor prognosis and no recognized cause, diagnosed when contractile function is impaired with a reduced ejection fraction (HFrEF) and the left ventricle is dilated. A genetic component has been proposed in up to 50% of cases in familial and sporadic forms (Fatkin *et al.*, 2021). The strongest genetic association was originally identified at the B-cell lymphoma 2-associated athanogene 3 (*BAG3*) gene locus together with the identification of mutations co-segregating with DCM in families (Villard *et al.*, 2011). Of note, the DCM-associated mutations are mainly frame-shifts and stops but also missenses affecting conserved residues in the C-terminal part of the protein (the BAG domain) reducing binding activity with known protein ligand such as the major HSP70 chaperone (Perez-Bermejo *et al.*, 2023; Sondermann *et al.*, 2001).

The protein encoded BAG3 is ubiquitously expressed, but is particularly abundant in striated muscle and the central nervous system. BAG3 has several protein-binding domains and has therefore been associated with various cellular processes essential for cardiac function and stress response (Behl, 2016). It inhibits apoptosis by binding to Bcl-2 (Lee *et al.*, 1999), stabilizes myofibrillar structure (Hishiya *et al.*, 2010) and participates in various selective macroautophagy pathways leading to lysosomal degradation and recycling processes (Rogov *et al.*, 2014) such as aggrephagy (Gamerding *et al.*, 2011), chaperone-assisted selective autophagy (Martin *et al.*, 2021) or mitophagy (Tahrir *et al.*, 2017). Among the well characterized domains, IPV domains interacts with small chaperon of the HSPB family and the highly conserved BAG domain, through interaction with HSP70 or pro-apoptotic Bcl-2, have been extensively linked to regulation of protein quality control by selective macroautophagy or apoptosis, respectively. Interestingly, various gene invalidation of major autophagy effectors also often leads to cardiomyopathies in mice strongly suggesting a central role of proteostasis in cardiac function (Henning and Brundel, 2017). The macroautophagy (hereafter referred to as “autophagy”) pathway is highly conserved during evolution as a response to starvation by

unspecific “self-eating” generation of nutrients regulated by the AMPK/mTORC1 balance (bulk autophagy). It is also a specific recycling mechanism guarding against stress-induced accumulation of toxic protein aggregates or organelles such as damaged mitochondria (Rogov *et al.*, 2014).

Bag3 knock-out (KO) mice die at 3-weeks of age showing growth retardation and signs of skeletal and cardiac muscle degeneration limiting studies of BAG3 function (Fang *et al.*, 2017; Homma *et al.*, 2006; Youn *et al.*, 2008). Similarly, the homozygous knock-in (KI) of the orthologue of E455K BAG domain mutation, identified as co-segregating with DCM in human kindred (Villard *et al.*, 2011), display very similar phenotype as fully *Bag3* invalidated animals suggesting paramount function of the HSP70 interacting domain of BAG3 (Fang *et al.*, 2017). Interestingly, cardiac-restricted *Bag3* KO mice, either expressing one E455K allele or not, survived several months and recapitulate progressive cardiac insufficiency, and insoluble protein accumulation demonstrating a cardioprotective role of BAG3 linked to proteostasis control (Fang *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2021).

Despite clearly suggestive of a protein quality control deficit associated with *Bag3* mutations these models provided incomplete information's due to restricted or complex genotype pattern designed to circumvent early lethality (Fang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2022). To circumvent these limitations, we have developed a full knock-in mouse model expressing the orthologue mutation of human V468M (mouse V473M) that display progressive cardiac insufficiency, mitigated in heterozygous mutation carriers and in females as observed in human DCM, thus allowing to investigate early and late pathomechanisms of DCM due to *Bag3* BAG domain mutation.

Materials and Methods

Generation and genotyping of *Bag3*^{V473M} knock-in mice line

Bag3^{V473M} knock-in mice line was generated according to our specifications by Genoway (Lyon, France). The V473M mutation is the murine orthologous of the V468M mutation, identified in two related patients with DCM (Villard *et al.*, 2011). It is a non-sense mutation located in exon 4, coding the BAG domain shared by all BAG family members. The Val⁴⁷³ codon of *Bag3* was targeted using a CRISPR/Cas9 approach in C57BL/6N genetic background mice. The resulting mutation create a cutting site for restriction enzyme Avall, allowing the genotyping of *Bag3*^{V473M} knock-in mice line using enzymatic digestion after DNA amplification by PCR. Mice were housed in ventilated racks with an automatic watering system and unlimited access to food. The racks were placed in a room with standard temperature, humidity and light environment. All animal procedures and protocols were performed in accordance with European Union guidelines and French regulations for animal experimentation, and approved by Sorbonne University local committee (#22847; #36375).

Generation of *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} mice line

This double mutant was generated by crossing *Bag3*^{V473M/V473M} females with males from the *Des*^{R405W/wt} knock-in mice line (Herrmann *et al.*, 2020), kindly provided by Dr Lilienbaum. Pups born from this breeding were genotyped for *Desmin* in order to identify mice carrying the *Des*-R405W mutations (*Bag3*^{V473M/wt}-*Des*^{R405W/wt}). Double heterozygous mutant males were then back-crossed with *Bag3*^{V473M/V473M} females in order to obtain *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} mice.

Echocardiographic Assessment of Cardiac Function

Serial echocardiography was performed every month from 2 months after birth up until cardiac systolic dysfunction limit fixed at 20% of fractional shortening was reached. Anaesthesia was induced in mice (n=4-10 animals per group) by 2% isoflurane then reduced to 0.5% in order to maintain mice's heart rate above 600bpm. A heating pad was used to maintain body temperature during the recordings. M-mode echocardiography was performed with a MX550D probe connected to a VIVO 3100 ultrasound system (Visual Sonic). Cardiac parameters were determined from at least 3 independent cardiac cycles.

Insulin (ITT) and glucose tolerance test (OGTT)

At 5-months of age, *Bag3*^{V473M/V473M} and WT mice were fasted for 5 hours before OGTT or ITT. The OGTT was performed using a 2g/kg glucose bolus (Sigma-Aldrich) injected in intraperitoneal cavity (n=6-9 mice per group). The ITT was performed using insulin (1U/kg body weight) (Novo Nordisk) injected intraperitoneally (n=6-9 mice per group). For both tests, blood samples were collected from tail vein at 0-, 15-, 30-, 60-, 90-, and 120-minutes post-injection, and glucose concentrations were determined using a glucose meter (Accu-Chek Performa, Roche).

Autophagic flux study

Mice were fasted for 24h, fed a pelleted laboratory diet for 2h (07:00-09:00) then re-fasted for another 24h in order to synchronously induce autophagy (Ezaki *et al.*, 2011). A lysosomal degradation inhibitor, chloroquine, was used to measure autophagic flux. A chloroquine (12.5 mg/mL in 0.9% NaCl) at a dose of 50mg/kg or 0.9% NaCl solution, was injected intraperitoneally 4h prior to euthanasia. LC3-II, an autophagosome marker, protein level was measured with or without chloroquine to measure autophagic flux.

Quantitative RT-qPCR

Total RNA was extracted from mouse cardiac ventricles using TRIzol reagent (Life Technologies, Thermo Fisher) according to the manufacturer's recommendations. cDNA was generated using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher) and qPCR reactions were performed using Sensi FAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, Meridian Bioscience) on

QuantStudio 3 real-time PCR system (Thermo Fisher). Each mRNA relative quantification was determined using the $\Delta\Delta C_t$ method after normalization to the C_t value for *Rplp0* RNA. Primer sequences used are listed in Supplemental Table 1.

Histology

Heart

Hearts were harvested, washed in cold PBS, and fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Hearts were dehydrated using successive ethanol concentrations (50 to 100%), placed 3 hours in methyl salicylate, and then embedded in paraffin and coronally sectioned (6 μ m thickness). Sections were stained with Sirius Red or H&E, mounted and imaged using Nikon Inverted Fluorescence Microscope Slide scanning system. Histolab Image Analysis software (GT Vision) was used for fibrosis quantification.

Skeletal muscle

Hind limb gastrocnemius muscles were isolated, embedded in OCT medium and frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane. Mid-tier muscles were transversely sectioned (12 μ m thickness), fixed successively in 95% ethanol and 4% paraformaldehyde and stained with Hematoxylin (Mayer)/Eosin Y solutions. Sections were mounted using Eukitt quick mounting medium (Sigma-Aldrich) and imaged using Nikon Inverted Fluorescence Microscope. Image J software was used for area and number of muscle fibers quantifications.

Liver

Hearts were harvested, washed in cold PBS, and embedded in OCT medium and frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane. 7 μ m-thick cryo-sections were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with a red-oil solution. Sections were mounted with Dako mounting medium and images were acquired using Nikon Inverted Fluorescence Microscope.

Immunofluorescence of desmin aggregates

Hearts were harvested, washed in cold PBS, and snap frozen in OCT embedding medium. 7 μ m cryo-sections were generated, air-dried for 1h and fixed 10 min with 4% paraformaldehyde. Sections were permeabilized with PBS-Triton 0.2% for 5 min and blocked with 2% serum bovine albumin for 30 min at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in blocking solution was done overnight at 4°C. After washing, sections were incubated with secondary antibodies at room temperature for 1h, washed and mounted with Dako mounting medium.

Epifluorescence imaging was performed using an Olympus IX-71 microscope equipped with a 60x/1.42 NA PlanApo oil immersion objective. Digital images were captured in the Z-axis in 0.1 μ m increments. Images were deconvoluted using acquired PSF with DeltaVision Elite microscopy system (GE Healthcare). Fluorescence quantification was performed using ImageJ

software (NIH). Three-dimensional reconstruction and quantitative analysis were performed with Imaris-software supervised machine learning (Bitplane, version 8/9). Ten stacks were used for volume rendering and processed blind of the genotypes. For each genotype, n=4 to 6 mice hearts were used and three 140 μm^2 fields/mouse were quantitated for intensity and number of voxels; otherwise, three consecutive stacks were used for image panels.

Protein extraction

Mouse cardiac ventricles were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen. Cardiac protein extracts were obtained by homogenizing tissue in cold lysis buffer (150mM NaCl, 50mM TRIS pH 7.4, 5mM EDTA, 0.5% NP40 (Sigma Aldrich) and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) 1/1000) with a TissueLyser LT (Qiagen) and cold 5mm stainless steel beads (Qiagen) at 50 Hz for 5 minutes. Samples were centrifuge at 100g for 1 minute to eliminate undisrupted tissue. TritonX100 at 1% was used to solubilized cellular membranes under agitation at 4°C for 30 minutes. Supernatant is collected after samples centrifugation at 3000g for 5 minutes. Proteins concentration is determined with Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific), aliquoted and stored at -80°C.

Total RNA extraction

Mouse cardiac ventricles were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen. Cardiac extracts were obtained by homogenizing tissue in cold TRIzol (ThermoFisher) with a TissueLyser LT (Qiagen) and cold 5mm stainless steel beads (Qiagen) at 50 Hz for 5 minutes. Aqueous phase and organic phase are separated after adding 160 μL of chloroform and vigorous agitation. After 15 minutes incubation at 4°C samples are centrifuged at 13000g, 4°C for 15 minutes. RNA containing aqueous phase is collected and RNA are precipitated with 800 μL isopropanol. Samples are centrifugated at 15000g, 4°C for 15 minutes. Supernatant is discarded and RNA pellet is washed two times with 1mL and 500 μL EtOH 75% respectively. RNA pellet is then air dried and suspended in 30 μL nuclease free water. RNA concentration is determined with absorbance measurement at 260nm with a Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher). Samples are stored at -80°C.

Immunoblotting

Cardiac proteins (30 μg) were mixed with NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen), denatured at 95°C for 10 minutes and loaded in 12% Bis-Tris pre-cast polyacrylamide gels (ThermoFisher). Samples were migrated at 150V for 35 minutes, protein were then transferred on Trans-blot nitrocellulose membrane using a Trans-Blot Turbo Transfer System at 25V 2.5A for 10 minutes (Biorad). Membranes were stained with Ponceau S solution (Sigma Aldrich) for 2 minutes, washed 3 times with dH₂O before scanning for total protein quantification using ImageJ. Membranes were incubated with blocking solution (5% dry milk in 1X PBS) for at least 1h30 at room temperature under constant agitation before incubation with primary antibody diluted in blocking solution over night at 4°C. After being washed 3 times with a PBS-Tween 0.1%

solution, membranes were incubated with secondary antibody diluted in blocking solution for 2H at room temperature under agitation. Primary and secondary antibodies are listed in Supplemental Table 2. Membranes were washed 3 times with PBS-Tween 0.1% then incubated with ECL detection reagent (Life Science) and chemi-luminescence signals were captured with ImageQuant Las4000 imager (GE Healthcare). Proteins signals were quantified using ImageJ.

Proteomic analysis

Mouse cardiac ventricles were harvested and snap-frozen in liquid nitrogen. Cardiac protein extracts were obtained by homogenizing tissue in lysis buffer (150mM NaCl, 50mM TRIS ph 7.4, 5mM EDTA, 0.5% NP40 and protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich) 1/1000) with a TissueLyser LT (Qiagen) at 50 Hz for 5 minutes. The proteomic analysis was performed at the P3S core facility (Paris, France). Samples were subjected to tryptic digestion using S-TRAP™ column (Protifi) according to manufacturer instructions. The peptides were dried out in a speed vacuum and resuspended in 2 % ACN / 0.1 % FA. Automated StageTips desalting was performed with 3 layers of C18-RP phase (Empore SPE Disks C18, Sigma Aldrich) in a 10 µL tip using the DigestProMSi robot (CEM). The desalted peptides were dried and resuspended in 2 % ACN / 0.1 % FA. Peptides were analysed with a nanoElute UHPLC (Bruker) coupled to a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker) as previously described (Akkurt Arslan *et al.*, 2021).

Proteins were identified using MaxQuant (v 1.6.17.0) with the following parameters: FDR < 1%, 40 ppm mass tolerance, carbamidomethyl as fixed modification, acetyl (protein N-terminal) and oxidation (on M residue) as variable modifications, up to 3 missed cleavages, match between run activated, LFQ min ratio set to 2, normalization. Protein identifications were performed against the Uniprot reference mouse proteome database completed with the BAG3V473M sequence (63778 entries, 18/02/2021). Data filtering (at least 4 values in at least 1 group), missing value imputation (SLSA for partially missing values, DET quantile 2.5 for missing values in entire condition) and statistical analysis (Limma and slim posthoc test with 5% FDR) were performed with Prostar (v 1.22.6). For ClueGO analysis, we selected significantly differentially expressed protein with |fold-change|>20%; p<0.05 and maximum 2 imputed values per group.

Transcriptomic Analysis

Cardiac ventricles RNA quality was verified to obtain high-quality (RIN>7) RNA for RNA-sequencing. mRNA library preparation was realized following manufacturer's recommendations (Stranded mRNA Prep from ILLUMINA). Final samples pooled library prep were sequenced on Novaseq 6000 ILLUMINA with SP-200 cycles cartridge (2x800Millions of 100 bases reads) with 2 runs (15plex and 12plex). Corresponding to 2x50Millions of reads per sample after demultiplexing.

We used nf-core/rnaseq (nf-core/rnaseq, n.d.) Nextflow (Di Tommaso *et al.*, 2017) pipeline with the Mus musculus genome assembly GRCm39 and gene catalog version "M28" (both

downloaded from genecode) with default options. According to the MultiQC generated reports, the quality check parameters were satisfactory for all samples. The first batch have between 132 M to 176M reads (~150M on average), the second batch have between 101M to 220M reads (~183 M on average). Regarding the relatively large gap between the library size in the second batch, we decided to keep it as it is, after running the whole pipeline and differentially expressed genes analysis and similar results were found when the incriminated libraries were removed (data not shown). Briefly quality control was performed by fastqc v0.11.9, adapter sequences were then removed automatically by trimgalore v0.6.7 and cutadapt v4.6. Paired reads are then aligned using STAR v5.1, bam files were used to manually check on IGV v2.11.9 for the presence or not of the BAG3 mutation. Salmon v1.10.1 was used to quantify the expression of the transcripts. Differentially Expressed Genes were identified using R(R Core Team (2023), n.d.) v4.3.1 and bioconductor package DESeq2 (Love *et al.*, 2014) v1.40.2, normalized counts were obtained using counts function from BiocGenerics v0.46 package on the DESeq2 object, they were then used for various representation and PCA analysis using FactoMineR v2.8 package. For each comparison, only the concerned samples were included for the analysis.

Genes were declared differentially expressed if their adjusted p value weren't NA (sign that they are either not expressed in either of our conditions or that they did not pass DESeq2 quality control) and below 0.05 threshold. Differentially expressed terms were analyzed using ClusterProfiler v4.8.2 package and datas from GO.db v3.17, reactome, panther, Dose v3.26 and KEGGREST v 1.40. Terms were declared differentially expressed if their adjusted p value were below 0.05. Several informations were annotated from Org.mm.eg.db v3.17 and Orthology.db v3.17.

NMR analysis

Bag3^{V473M/V473M} and WT 5-month-old mice (n=6-11 per group) were scanned using the Bruker Minispec Live Mice Analyzer (Bruker Optics, Inc). The minispec body composition analyser is based on time domain NMR (TD-NMR) and is non-invasive tool for measurement of lean tissue, fat and fluid in living mice. Before testing, a daily quality control check is performed according to the manufacturer's instructions. Mice are placed in a clear, plastic cylinder and kept immobile by insertion of a tight-fitting plunger into the cylinder. The tube was then lowered into the sample chamber of the instrument for approximately 2 minutes, the duration of the scan.

Statistics

Statistical significance was assessed using Prism software (GraphPad, PrismV9.01). Two groups were compared using Student's t test or non-parametric Mann-Witney-Wilcoxon test. One-way ANOVA was used with 3 or more groups followed by post-hoc multiple comparisons Tukey test analysis.

Results

Bag3-V473M leads to progressive cardiac insufficiency.

Using CRISPR/Cas9 editing in mice we generated a knock-in model carrying the V473M mutation of *Bag3*, the murine orthologous of the human DCM associated *BAG3*-V468M mutation (Villard *et al.*, 2011) (**Fig. 1A**). *Bag3* mutation carriers (*Bag3*^{V473M/V473M}; *Bag3*^{V473M/wt}) were viable, fertile, and born at Hardy-Weinberg equilibrium for sex and genotype ratios (**Supp. Fig. 1A-D**). All mice present a normal growth pattern, with expected sexual morphological dimorphism and no early lethality (**Supp. Fig. 1A-I and Supp. Fig. 2**). Tissues analysis of *Bag3*^{V473M/V473M} mice at 5 months did not show any evidence of reduced thymus and spleen weights or muscle degeneration (**Supp. Fig. 3 and Supp. Table 3**) as reported previously in *Bag3* KO mice (Homma *et al.*, 2006; Youn *et al.*, 2008). Cardiac Sirius red staining indicated significant increase of interstitial fibrosis (2-fold; $p < 0.0001$), as confirmed by qPCR mRNA level quantification of *Col3a1* (4-fold increase vs WT, $p = 0.0079$) and *Col1a1* (2-fold increase vs WT, $p = 0.0440$) markers with chamber enlargement and wall thickening, suggestive of functional alteration (**Fig. 1B-D**). Indeed, *Bag3*-V473M carrier mice developed cardiac insufficiency echocardiographic functional evaluation revealed systolic dysfunction, with decreased fractional shortening and ejection fraction (**Fig. 1E-H and Supp. Table 4-5**). In addition, structurally, hearts from mutated mice were dilated with increased systolic and diastolic left ventricle inner diameter worsening with age (**Fig. 1I-J**) and revealed decreased thickness of cardiac walls (**Fig. 1J and Supp. Table 4-5**). Remarkably and compatible with observations in human DCM, the phenotype is both sex- and mutation-dose-dependent, *Bag3*^{V473M/V473M} males being the most affected (**Fig. 1K-N**). Expression of cardiac foetal gene markers, *Nppa* and *Nppb*, *Fhl1*, *Myh6*, *Myh7* remain unchanged suggesting limited cardiac stress in mutated mice hearts despite functional alteration (**Supp. Table 6**). Taken together, *Bag3*^{V473M/V473M} and *Bag3*^{V473M/wt} mice display a clear DCM phenotype with genetic codominance allowing for analysis of early and late physiopathological molecular pathway associated with V473M *Bag3* mutation. While functionally penetrant, at heterozygous or homozygous state, the *Bag3*-V473M mutation do not modify *Bag3* mRNA and protein levels (**Supp. Fig. 1J-K**) and allelic ratios of peptide expression in mutated mice (**Supp. Fig. 1E-F**), indicating altered protein function rather than haploinsufficiency.

Autophagy is altered in *Bag3*^{V473M/V473M} mice.

Since *BAG3* was described to participate in selective autophagy processes, we first evaluate if it was altered in our model *in vivo*. We measured basal autophagic flux in mutated mice hearts from *Bag3*^{V473M/V473M} and WT line at 3 months. We quantified LC3-II accumulation, a recognized surrogate of autophagosome numbers, upon chloroquine blockage of lysosomal degradation (Yoshii and Mizushima, 2017). Normalized LC3-II level increased in WT mice under chloroquine treatment indicating abolished basal cardiac autophagic flux in *Bag3*^{V473M/V473M} mice (**Fig. 2A-C**). We then asked whether *Bag3*-V473M was also able to block starvation-

induced non-selective autophagy. Weight loss of mice confirmed identical response to starvation in the two genotypes (**Fig. 2D-F**). Autophagy induction was confirmed by decreased of mTORC1(Ser2448) phosphorylation (**Fig. 2G-H**) (Uddin *et al.*, 2011). Interestingly, autophagic flux is restored in *Bag3*^{V473M/V473M} fasted mice, indicating that the starvation-induced autophagy either not or only marginally inhibited by *Bag3*-V473M mutation (**Fig. 2I-K**).

Since BAG3 was reported as targeting misfolded and aggregate-prone protein to autophagy (Gamerding *et al.*, 2011) we evaluated the effect of *Bag3*-V473M mutation in the genetic context of desmin-mediated proteotoxic stress *in vivo* (**Fig. 3A**). *Des*^{R405W/wt} mice express desmin forming aggregates, as observed in human carriers of the orthologue mutation (Herrmann *et al.*, 2020). Indeed, quantitation of desmin by immunoblot indicated increased amount in *Des*^{R405W/wt} hearts. We anticipated a better control of desmin aggregates numbers in WT mice vs *Bag3*^{V473M/V473M}. We observed the contrary with a decrease to the level of *Bag3*^{V473M/V473M} in *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} double mutant (**Fig. 3B-C**). This was further confirmed by immune-histochemical labelling of *Des*^{R405W/wt} hearts displaying significantly more desmin aggregates compare to *Bag3*^{V473M/V473M} and the double mutant while the sarcomeric structure was grossly preserved (**Fig. 3D-E and Supp. Fig.4C**).

We thus submitted *Des*^{R405W/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} to chloroquine injection to estimate basal autophagic flux. Autophagy was abolished for both lines indicating an autophagy blockade due to *Des*-R405W mutation independent of *Bag3* genotype (**Fig. 3F-H**). The normalization of desmin level, correlated to aggregates number decrease, might thus be independent of autophagy activity. Interestingly, ubiquitinated desmin level was increased in *Bag3* mutant mice suggesting a potential shift between autophagy to ubiquitin proteasome system (UPS) for desmin degradation (**Fig. 3I-J**).

Altogether, *Bag3*-V473M appear to have a protective role against desmin mediated proteotoxicity. Mice carrying the *Des*-R405W mutation associates with restrictive cardiomyopathy phenotype with reduced end-diastolic volume but no sign of decreased ejection fraction (Herrmann *et al.*, 2020). We thus evaluate structural and functional parameters of mice hearts from *Des*^{R405W/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} mice to measure if *Bag3*-V473M mutation could compensate for *Des*-R405W mutation effect (**Supp. Table 7**). The *Des*^{R405W/wt} mice aged 3-months were very similar to WT animals for functional parameter (LVEF=81±4% in WT vs. 82±5% in *Des*^{R405W/wt}) but structurally we observed a slight decrease in left ventricular diameter (LVIDd=0.37±0.03mm in WT vs. 0.34±0.02mm in *Des*^{R405W/wt}; p=0.0798) witnessing restrictive cardiomyopathy as reported previously (Herrmann *et al.*, 2020). On a *Bag3*^{V473M/V473M} background with cardiac dilatation (LVIDd=0.44±0.02mm) and reduced systolic function (LVEF=60±6%) the heterozygous *Des*-R405W mutation was correcting ventricular function (LVEF=75±5%; p<0.0001) but also the ventricular diameter increase (LVIDd=0.38±0.02mm; p<0.0001) suggesting additive opposed effects of the two

mutations (**Fig. 3K-L**). As anticipated from the observed desmin protein amount decrease in *Bag3*^{V473M/V473M}, the *Des*-R405W associated decrease in diameter was also significantly normalized by *Bag3*-V473M (LVIDd=0.44±0.02mm for *Bag3*^{V473M/V473M}-*Des*^{R405W/wt} vs. 0.34±0.02 in *Des*^{R405W/wt}; p<0.0001) suggesting attenuation of the deleterious effects of the *Des*-R405W mutation (**Fig.3 M-N and Supp. Fig. 4G-H**).

Proteomic analysis of *Bag3*^{V473M} mice

We wanted to confirm at the proteome level that *Bag3* mutation was involved in proteostasis regulation as shown by our experimental results. We carried out a comparative cardiac proteome analysis between *Bag3*^{V473M/V473M} and WT 5-month-old male mice. We identified a total 2008 proteins from which 121 were found differently expressed ($|\text{fold-change}| > 20\%$; p-val<0.05). We used ClueGO (Bindea *et al.*, 2009), a functional gene ontology analysis tool to identify pathway proteomic signature associated with *Bag3*-V473M (**Fig. 4A-B and Supp. Table 8**).

Expectedly from the observed cardiac insufficiency phenotype of the mutant mice, terms such as “regulation of cardiac contraction” (Term corr.P-Value=4.8.10⁻⁴) or from known roles of BAG3 in proteostasis such as “chaperone-mediated protein folding” (corr.P-Value=5.3 10⁻⁷) were enriched (**Fig. 4C**). Among the set of differentially expressed proteins (DEP) within the “chaperone-mediated protein folding” term (GO:0061077) the proteins appeared upregulated (**Fig. 4E**). As examples, chaperones coding gene *Unc45b* (Sala *et al.*, 2017) (FC=+1.2), *Cct2* encoding a member of the TRiC chaperonin complex interacting with BAG3 (Fontanella *et al.*, 2010) (FC=+1.2), or *Hsph1* encoding an HSP70 family protein (FC=+1.5) are increased (**Fig. 4B&E**).

Other terms aggregating genes related to cellular metabolic pathways and mitochondria suggests a possible default in mitochondrial function (**Fig. 4D**). Representative terms include “purine ribonucleotide biosynthesis” (corr.P-Value=3.8 10⁻⁵), acyl-CoA biosynthetic process (corr.P-Value=2.7.10⁻³) or “mitochondrial transport” (corr.P-Value=2.9.10⁻³) which were significantly enriched in *Bag3*^{V473M/V473M} mice. As examples we found genes associated with pyruvate decreased availability for TCA cycle (*Ldhd*: FC=+1.3 ; *Pdhx*: FC=-1.3 ; *Pdha1*: FC=-1.2), reduced expression of genes associated with Fatty Acid to Acyl-CoA synthesis (*Acsl6*: FC=-1.4; *Acsl1*: FC=-1.2) and of Coenzyme A import into the mitochondria (*Slc25a42*: FC=-1.2).

Cardiac transcriptome of *Bag3*^{V473M} mice

To better envision the other potential unanticipated consequences of *Bag3*-V473M mutation, not captured through proteomic analysis, we subsequently conducted a bulk-RNA transcriptomic analysis. Capitalizing on the mild phenotype associated with heterozygous *Bag3*-V473M mutation we analysed the cardiac transcriptome of 5-month-old *Bag3*^{V473M/wt} vs WT to monitor early disease settings. We compared 3 animals per group (**Fig. 5A**) showing 833 differentially expressed genes (DEG) with a $|\text{Fold-Change}| > 1.2$ and FDR<0.01 (**Fig. 5B-C**).

Using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), a QUIAGEN™ dedicated software, gene enrichment in several canonical pathways were identified (**Supp. Table 9**). Among the significantly upregulated (Z -score >1.5) were genes participating to canonical pathways (**Fig. 5D**) such as “Apoptosis Signaling” ($Z=1.6$; corr.P-Value= 4.10^{-3}) a known function linked to BAG3 (Kögel *et al.*, 2020; Rosati *et al.*, 2011), “CLEAR Signaling Pathway” ($Z=1.6$; corr.P-Value= $1.7.10^{-4}$) which related to autophagy activation (Palmieri *et al.*, 2011), PTEN signalling ($Z=2.6$; corr.P-Value= 2.10^{-5}) or multiple PPAR and RXRa activation and signalling pathways ($Z=2.1$; corr.P-Value= 9.10^{-6}) all known to participate cardiac energy metabolism (Madrado and Kelly, 2008; Worby and Dixon, 2014). Indeed, the mutant *Bag3* mice display a doubling (not shown) in fat mass, in line with the drop in mRNA count for cardiac *Ppara* gene (FC=-1.5; corr.P-Value= 8.10^{-6}) and *Ppargc1a* encoding PGC-1a (FC=-1.9; corr.P-Value= 3.10^{-11}). Remarkably, the 2 pathways identified after proteomic analysis, ie proteostasis (autophagy) and lipid (fatty acid) metabolism, were also significant in the analysis. Inversely, a plethora of canonical pathways were downregulated making the results difficult to interpret (Fig. 5D presents the 5% most significant; whole dataset in Supp. Table 9). However, among the most significantly downregulated was the signature for hypertrophic cardiomyopathy in line with the functional phenotype of the mice ($Z=-4.9$; corr.P-Value= 1.10^{-7}).

These results confirm the altered lipid metabolism signature observed in the cardiac proteome of homozygous *Bag3*^{V473M/V473M} mice, suggesting, in addition to proteostasis pathway activation, a deficient fatty acid metabolism in the early stage of *Bag3*-associated DCM.

Discussion

We have generated a new mouse model recapitulating dilated cardiomyopathy phenotype, including gender and mutation dose severity as observed in humans. Known null knock-out (KO) *Bag3* (also known as CAIR1 and BIS) mice models are lethal before the age of 1 necessitating cardiac-restricted or -inducible design to delay the onset of the disease, however constraining the conclusions (Homma *et al.*, 2006; Youn *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2021). The two full *Bag3* KO mice, despite reporting contradictory phenotype still debated, could present with muscular and metabolic disorder leading to severe nutritional deficit and early death, also described in *Drosophila m.* invalidation of the *BAG3* gene orthologue *starvin* (Coulson *et al.*, 2005; Homma *et al.*, 2006; Youn *et al.*, 2008). Cardiac-restricted and/or -inducible KO develop cardiac insufficiency by 3 months of age, clearly demonstrating the cardioprotective role of BAG3 (Fang *et al.*, 2017; Myers *et al.*, 2018; Yun *et al.*, 2021). Since *Bag3* missense mutation causing DCM are clustering within exon 4 encoding BAG domain, KO might not address potential specificity of BAG domain mutation. Several reports showed BAG domain interaction with the constitutive and cognate HSP70 chaperone (Colvin *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2017; McDermott-Roe *et al.*, 2019; Johnson and Gestwicki, 2022). Impairment of any or several of the multiple function mediated by BAG3-HSP70 interaction, the most described being related to protein quality control (PQC; proteostasis), might thus be initiating

in cardiac insult (Lin *et al.*, 2022). More specifically, through HSP70 interaction, BAG3 was described to play a facilitating role in various PQC functions collectively called autophagy consisting of selective or non-selective (bulk) engulfment of cytoplasmic materials and organelles in so-called autophagosomes that ultimately fuse to lysosomes for recycling and nutrient supply.

Knowing whether haploinsufficiency and loss of function of the BAG domain, which leads to undiscernible CMD in humans, act according to the same pathophysiology could be of major importance at the dawn of the era of gene-based therapies. Since BAG3 expression was found decreased in heart failure patients (Feldman *et al.*, 2014), gene replacement or complementation have been shown to preserve cardiac function either in ischemia/reperfusion or TAC induced heart failure (Knezevic *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2016). Similar approach might also prove useful in preventing BAG3 genetic loss-of function, however, deserve careful evaluation of distinct effect that might arise from haploinsufficient versus BAG domain causing mutation.

In the present work, we generated full knock-in of the hypomorphic V473M mutation of the BAG domain in *Bag3*, orthologous to the V468M mutation causing DCM in humans, enabling us to study the onset of the disease in homozygous carriers of the mutation from birth to 5 months of age. In addition, a 3-month delay in disease severity was observed in both females and heterozygous carriers. The previously published KI of the E455K BAG domain, very similar to ours conceptually, induced early death in homozygous (3 weeks post birth), thus comparably limited as KO models (Homma *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2017). Analysis of the residue involved in the BAG domain to HSP70 using crystallography reveal the central role of E455 residue in line with the severe cardiac phenotype of the KI mouse (Sondermann *et al.*, 2001; Villard *et al.*, 2011). We anticipated successfully a hypomorphic effect of the V473M substitution since it appeared more loosely involved in HSP70 interaction. Our *Bag3*-V473M model therefore represents a good opportunity to identify the pathways deregulated at the early stage of DCM and, in perspective, to gain a better understanding of the causes of the gender dimorphism observed in humans.

In 5-month-old homozygous *Bag3* KI mice, presenting with advanced cardiac insufficiency, we have first demonstrated that basal autophagy is impaired. However, upon starvation and induced mTOR pathway inhibition, autophagy cardiac response remains active. This observation is supportive of a role of BAG3 restricted to specific autophagy but independent on bulk autophagy upon AMPK/mTOR balance. The described function of BAG3 on mTORC1 inhibition seems not impaired in this experiment. This might be due either to the normal function of BAG3 WW domain involved in this function or to partial mTOR inhibition restricted to specific spatial cellular compartment as described previously (Kathage *et al.*, 2017).

One of the main specific autophagy pathways where BAG3 role has been described is triggered by aggregates accumulation, called aggregophagy. We used the desmin model *Des*^{R406/wt} to

challenge the *Bag3* KI mice with a specific autophagy trigger. Indeed, the desmin R405W mutation was described to generate soluble aggregates in cardiac tissue (Herrmann *et al.*, 2020). While we anticipated that soluble desmin aggregates would lead to activation of specific autophagy in WT mice, we measured a full blockade of basal autophagy, as for *Bag3*^{V468M} mice suggesting impairment of the specific autophagy pathway. Such observation has been reported for other proteinopathies related to insoluble proteotoxic accumulation of pro-aggregative proteins associated with neuronal, muscular and cardiac disease (Kurtishi *et al.*, 2019; Pattison *et al.*, 2011). Restoration or stimulation of autophagy was shown to be beneficial in diverse desmin-related (Pattison *et al.*, 2011).

Very surprisingly we observed a rescue of the structural Des-R405W associated phenotype in mice hearts. An intriguing hypothesis might be that mutant desmin aggregates are cargos for WT BAG3-HSP70 proteins and impaired this selective autophagy pathway, while mutant BAG3 cannot participate the pathway due to diminished interaction with HSP70. Interestingly, we observed an increasing amount of ubiquitinated desmin in double mutant mice suggesting that mutant soluble desmin aggregates, not sequester in autophagy machinery, might become substrates for UPS (Minoia *et al.*, 2014; Vermeer *et al.*, 2021). Even more surprising was the functional rescue observed for heart function indicating that desmin R405W might compensate for V473M BAG3 deleterious effect. Since Des-R405W was associated *in vivo* in human and mice with restrictive cardiomyopathy, the resulting phenotype appear additive of opposite effects. Supporting this view, GWAS in humans have demonstrated that the opposed and concomitant effects of the same genetic determinant affect susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy (Tadros *et al.*, 2021).

Our multi-omics approach also underlined that metabolism homeostasis dysregulation might participate to the disease setting. Alteration of cardiac energy metabolism is a known contributor of cardiac failure (Lopaschuk *et al.*, 2021). In the present work we observed dysregulation of mitochondrial function and membrane transport concomitant to lipid metabolism modification. Further experiments are needed to understand the underlying mechanisms, and how the BAG domain loss-of-function might interact with mitochondrial function and energy metabolism. To supply the high heart energy demand cardiomyocytes mainly oxidizes lipids through FAO and glucose to fuel mitochondrial TCA cycle and produce ATP. Since autophagy participate to nutrient production through lysosomal hydrolysis (Singh and Cuervo, 2011) and it is also known to regulate lipid metabolism (Singh *et al.*, 2009), it is tempting to speculate that decreased autophagy linked to BAG3 loss of function may affect nutrient supply to the cell. The increased in fat mass, altered PPAR signalling related gene expression and a decreased systemic glycemia (glycemia=174±13mg/dL in WT vs. 146±26mg/dL in *Bag3*^{V473M/V473M}; p=0.0008; not shown) suggest a shift from lipid towards glucose consumption constitutive of an energy deficit, a known condition associated to heart failure (Lopaschuk *et al.*, 2010, 2021). Starvation induced autophagy was not blocked by *Bag3* mutation in our experiments, suggesting that *Bag3* dependant autophagy might contribute a

substantial amount of nutrient to cardiomyocytes. A similar study as the present one was conducted on the transgenic *Pln*^{R9C} mice measuring temporal change in transcriptome signature during transition from DCM to heart failure ([Burke et al., 2016](#)). The authors identified a comparable metabolic gene transcription dysregulation suggesting that metabolic dysregulation is an early common event to various primary causing stress. This has potential important implication in the seek for broad range therapeutic strategy targeting early causes of heart failure.

Sources of funding

This work was supported by academic fundings from Inserm and Sorbonne University. OP was supported by a grant of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Acknowledgments

We thank Dr A. Lilienbaum for kindly providing the *Des*^{R405W/wt} mouse line used in this study.

Legend of Figures

Figure 1. *Bag3*^{V473M} mutation leads to DCM in mice

(A) Schema of targeting strategy for the generation of *Bag3*^{V473M} knock-in mouse line. **(B)** Representative images of H/E and Sirius red colorations and **(C)** fibrosis quantification of Sirius red-stained heart sections of 5-month-old *Bag3*^{wt} (N=8) and *Bag3*^{V473M/V473M} (N=5) mice, Student's *t* test *****p*<0.0001. **(D)** RT-qPCR quantification of collagen genes expression levels normalized to *Rplp0* levels, N=3 per group, Student's *t* test *Col1a1* **p*=0.0440; *Col3a1* ***p*=0.0079. **(E)** Representative images from parasternal short axis view of the heart acquired in M-Mode for 5-month-old *Bag3*^{wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} male mice. **(F)** Left-Ventricle Fractional Shortening (LVFS) of male *Bag3*^{wt}, *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} mice from age 2 to 8 months, N=5-14. **(G)** LVFS and **(H)** LV Ejection Fraction (LVEF) quantifications at 5-month-of-age, N=12-14 per group, one-way ANOVA *****p*<0.0001; multiple comparisons assessed by Tukey test *****p*<0.0001. **(I)** Diastolic and systolic LV Inner Diameter (LVID) of male *Bag3*^{wt}, *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} mice from age 2 to 6 months, N=5-14. **(J)** Diastolic and systolic LVID, LV posterior wall thickness (LVPWT) and interventricular septum (IVS) quantifications at 5-month-of-age, N=12-14 per group, 1-way ANOVA *****p*<0.0001 (LVID, LVPWTs, IVSs) ****p*<0.001 (LVPWTd) n.s. *p*=0.0690; multiple comparisons assessed by Tukey test **p*<0.05 ****p*<0.001 *****p*<0.0001. **(K)** LV fractional shortening quantification of 5-month-old male and female *Bag3*^{V473M/V473M} mice, N=9-13, Student's *t* test *****p*<0.0001. **(L)** LVFS quantification of 5-month-old male *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} mice, N=12-13, Student's *t* test *****p*<0.0001. Data were normalized using *Gapdh* protein and *Rplp0* mRNA expression levels. Data are presented as the mean ± SD.

Figure 2. Autophagic flux is decreased in *Bag3*^{V473M} mice

(A) Schematic experimental set-up of autophagic flux analysis using chloroquine **(B)** Total protein and respective immunoblot analysis of LC3B in WT and *Bag3*^{V473M} mice injected with chloroquine or saline solution. **(C)** Quantification of cardiac LC3-II protein level normalized to total loaded protein quantity between chloroquine and saline injected mice, N=4-5 mice per group, Student's *t* test WT **p*=0.0161; *Bag3*^{V473M} *p*=0.2738. **(D)** Schematic experimental set-up of autophagic flux analysis using chloroquine and synchronous autophagy activation with a starvation/feeding/starvation protocol. **(E)** Starvation protocol effect on WT and *Bag3*^{V473M} mice body weight after 24 and 48h. **(F)** Quantification of body weight loss after 48H of discontinuous starvation protocol, N=6-8 per group, Student's *t* test WT***p*=0.0042; *Bag3*^{V473M} ***p*=0.0046. **(G)** Total protein and respective immunoblot analysis of phosphorylated mTOR (p-mTOR) and total mTOR (mTOR) in WT and *Bag3*^{V473M} mice. **(H)** Quantification of cardiac p-mTOR protein level normalized to total mTOR and loaded protein quantity between fasted and non-fasted mice, N=4-5 mice per group, Student's *t* test WT ***p*=0.0065; *Bag3*^{V473M} ***p*=0.0019. **(I)** Total protein and respective immunoblot analysis of LC3B in WT and *Bag3*^{V473M} mice injected with chloroquine or saline solution, included in the starvation protocol. **(J)** Quantification of cardiac LC3-II protein level normalized to total loaded protein quantity between WT and *Bag3*^{V473M} fasted or non-fasted mice injected with either chloroquine or saline solution (N=4-5 mice per group, Student's *t* test fasted WT: *p*=0.2423; fasted *Bag3*^{V473M} **p*=0.0157). Data are presented as the mean ± SD.

Figure 3. *Des*-R405W leads to DCM-phenotype improvement in *Bag3*-V473M mice

(A) Schematic experimental set-up of mutant *Bag3*-V473M and *Des*-R405W mice breeding **(B)** Total protein (Ponceau stain - P) and respective immunoblot analysis of desmin in WT, *Des*^{R405W/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M}_*Des*^{R405W/wt} ("Bag-Des") mice. **(C)** Quantification of cardiac desmin protein level normalized to total loaded protein quantity between groups (N=3-4 mice per group, one-way ANOVA *p*<0.0001; Tukey post-hoc test WT vs. *Des*^{R405W/wt} **** *p*<0.0001; WT vs. *Bag-Des* **p*<0.05; *Des*^{R405W/wt} vs. *Bag-Des* ****p*<0.001. **(D)** Representative image after desmin immunolabelling in mice heart (green) Nuclei in blue (DAPI). Down panels are magnification of squared area in upper panel **(E)** Quantification of 3D desmin aggregates. One-way-ANOVA: *p*<0.0001; Tukey post-hoc test: **p*>0.0001. **(F)** Schematic experimental set-up of autophagic flux analysis in *Des*^{R405W/wt} and Bag-Des mice using chloroquine for 4 hours **(G)** Total protein (Ponceau red - P) and respective immunoblot analysis of LC3B (LC3II) in *Des*^{R405W/wt} and Bag-Des mice injected with chloroquine (+) or saline solution (-). **(H)** Quantification of cardiac LC3-II protein level normalized to total loaded protein quantity between chloroquine and saline injected mice (N=4 mice per group, Student's *t* test *Des*^{R405W/wt} *p*=0.2524; Bag-Des *p*=0.4691). **(I)** Total protein (Ponceau red -P) and respective immunoblot analysis of ubiquitinated desmin (180kDa; ub-desmin) in WT, *Bag3*^{V473M/V473M}, *Bag-Des* and *Des*^{R405W/wt} mice. **(J)** Quantification of cardiac ub-desmin protein level normalized

to total loaded protein quantity between groups (N=4 mice per group, one-way ANOVA $p < 0.0001$; post-hoc Tukey test: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p = 0.05$). **(K)** LV ejection fraction (LVEF) and **(L)** Diastolic LV inner diameter (LVID) quantifications in 3-months-old *Bag3*^{V473M/V473M} and Bag-Des male mice (N=6-11, Student's t test **** $p < 0.0001$). **(M)** Diastolic and **(N)** systolic LVID quantifications between 3-month-old male *Des*^{R405W/wt} and Bag-Des mice. (N=6-14; Student's t test ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$)

Figure 4. Proteomic analysis of 5-month-old *Bag3*^{V473M/V473M} vs. WT mice

(A) Scheme of proteomic experiment and analysis. Comparison of 5-month-old *Bag3*^{V473M/V473M} vs. WT mice cardiac proteome (N=6 per group). Analysis uniquely identified 2008 proteins. Applied p -val < 0.05 , Fold-Change (FC) 20% and ≤ 2 imputed values per group cut-off left 121 Differentially Expressed Proteins (DEP) used in C. **(B)** Volcano-plot of proteins with ≤ 2 imputed values per group (1843/2008; 92%). Labelled proteins relate to pathways identified in C. **(C)** Functional Enrichment Analysis using ClueGO – Gene Ontology Biological Process. Most significant term in each group (see D) identified is presented with % of genes in the term pathway (Bonferroni corrected term p -value in red). **(D)** Enriched GO terms groups clustered by ClueGO shown in functional network. GO terms included are presented as nodes with size equivalent to % genes per term. **(E)** Heat-map of all genes encoding identified proteins constitutive of the most significant terms in chaperone related group (GO:0061077).

Figure 5. Transcriptomic analysis of 5-month-old *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT mice

(A) Scheme of RNA-Seq analyses. **(B)** Volcano-plot of the whole transcriptome comparative analysis. Labelled are differential expressed genes (DEG) identified within IPA “PPAR Signalling” pathway. **(C)** Heat-map of the 833 DEG between *Bag3*^{V473M/wt} and WT mice cardiac transcriptomes. **(D)** IPA identified UP- and DOWN-regulated pathways in *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT transcriptome

Legend of Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Characterization of the *Bag3*^{V473M} mouse line

(A) Quantification of the pup's number per litter, 1-way ANOVA $p = 0.8773$ and **(B)** number of litters per breeding length (weeks) in WT N=3, *Bag3*^{V473M/V473M} N=5 and *Bag3*^{V473M/wt} N=4 lines, 1-way ANOVA $p = 0.6439$. **(C)** Pie chart showing pups sex ratio of *Bag3*^{V473M/wt} line, Chi² test $p = 0.838$. **(D)** Proportion of WT, *Bag3*^{V473M/V473M} and *Bag3*^{V473M/wt} genotype in total, male and female pups of *Bag3*^{V473M/wt} line, Chi² tests *Bag3*^{V473M/wt} $p = 0.412$; male $p = 0.211$; female $p = 0.977$. **(E)** Endogenous and mutated peptide intensity normalized to total peptide intensity measured in LC-MS/MS in *Bag3*^{V473M/wt} 8-months old mice. **(F)** Quantification of endogenous and mutated peptide intensity, Chi² test $p = 0.06$. **(G)** Kaplan-Meier survival curves for WT, *Bag3*^{V473M/V473M} and *Bag3*^{V473M/wt} mice, N=50 mice per group, log-rank (Mantel-Cox) test

p=0.0699. **(H)** Growth curves of WT, *Bag3*^{V473M/V473M} and *Bag3*^{V473M/wt} mice, N=7-51 mice per group. **(I)** Body weight quantification of 9-weeks-old WT, *Bag3*^{V473M/V473M} and *Bag3*^{V473M/wt} mice, N=7-26, one-way ANOVA p=0.6334. **(J)** Representative immunoblot analysis of BAG3 and GAPDH cardiac protein level in WT, *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} mice. **(K)** Quantifications of cardiac Bag3 protein and *Bag3* mRNA levels in WT, 8-month-old *Bag3*^{V473M/wt} and 5-month-old *Bag3*^{V473M/V473M} mice, N=9-22 mice per group, Student's *t* test p>0.2548. Data were normalized using GAPDH protein and *Rplp0* mRNA expression levels. **(L)** Representative electrophoresis of PCR amplified mouse tail DNA after *Avall* enzymatic digestion. The V473M mutation of *Bag3* create a cutting site for restriction enzyme *Avall*. Data are represented as the mean ± SD.

Supplementary Figure 2. RNA-Seq reads alignments for the *Bag3*^{V473M/wt} mice

IGV software alignments of RNA-Seq reads for the 3 *Bag3*^{V473M/wt} mice showing the equilibrated expression of the two alleles in 3 independent heterozygous mice. The GTA codon is the WT Val473 allele while ATG codon was knocked-in using CRISP/Cas9 and encode the Met473. Expression was not biased towards the expected 50% ratio (A:1380 reads; G:1523 reads, Chi² test p=0.06).

Supplementary Figure 3. Extra-cardiac histologic analysis from *Bag3*^{V473M} mouse line

(A) Representative images of gastrocnemius muscle from 5-months-old WT and *Bag3*^{V473M/V473M} mice stained with hematoxylin/eosin at magnification x20 and x40; scale bar=50µm. **(B)** Quantification of average number of muscles fibers, p=0.8771, and **(C)** average gastrocnemius muscle fibers area per section, p=5942. **(D)** Quantification of absolute gastrocnemius muscle weight, N=7-8 mice per group, p=0.6867. **(E)** Representative images of liver cryo-section from 5-months-old WT and *Bag3*^{V473M/V473M} mice stained with red-oil at magnification x40; scale bar=50µm. **(F)** Quantification of absolute liver weight N=7-8 mice per group, p=0.1564. **(G)** Representative images of 5-months-old WT and *Bag3*^{V473M/V473M} thymus and **(h)** spleen. **(I)** Quantification of the absolute weight of thymus and **(J)** spleen in each group, N=7-8, p=0.9841 and p=0.3996 respectively. All data are presented as the mean ± SD, p-value assessed by 2-tailed Student's *t* test.

Supplementary Figure 4. *Bag-Des* mice characterization

A) Total protein and respective immunoblot analysis of desmin in WT, *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M} mice. **(B)** Quantification of cardiac desmin protein level normalized to total loaded protein (P- Ponceau red) quantity between groups, N=3-4 mice per group, one-way ANOVA p=0.2052. **(C)** Immunofluorescent labelling of a-actinin2 (ACTN2 in red) and desmin (Green) in mice hearts. **(D)** Diastolic and **(E)** systolic LV inner diameter plus **(F)** LV ejection fraction quantifications between 3-month-old male WT and *Des*^{R405W/wt} mice, N=6-11, (Student's *t* test for LVEF p=0.5632; LVIDd p=0.0798; LVIDs p=0.4278). **(G)** Diastolic and **(H)** systolic LV inner diameter quantifications between 3-months-old male *Des*^{R405W/wt},

Bag3^{V473M/wt-Des^{R405W/wt} and *Bag3*^{V473M/V473M-Des^{R405W/wt} mice, (N=5-15, one-way ANOVA ****p<0.0001 and **p=0.0024 respectively; LVIDs *Des*^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/wt-Des^{R405W/wt} n.s. p=0.0697, *Des*^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/V473M-Des^{R405W/wt} **p=0.0016, *Bag3*^{V473M/wt-Des^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/V473M-Des^{R405W/wt} n.s. p=0.5992 ; LVIDd *Des*^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/wt-Des^{R405W/wt} *p=0.0478, *Des*^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/V473M-Des^{R405W/wt} ****p<0.0001, *Bag3*^{V473M/wt-Des^{R405W/wt} vs. *Bag3*^{V473M/V473M-Des^{R405W/wt} ****p<0.0001).}}}}}}}}}}

Conflict of Interest Statement

None

Bibliography

- Akkurt Arslan, M., Kolman, I., Pionneau, C., Chardonnet, S., Magny, R., Baudouin, C., Brignole-Baudouin, F., Kessal, K., 2021. Proteomic Analysis of Tears and Conjunctival Cells Collected with Schirmer Strips Using timsTOF Pro: Preanalytical Considerations. *Metabolites* 12, 2. <https://doi.org/10.3390/metabo12010002>
- Behl, C., 2016. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 672–688. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.04.007>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Colvin, T.A., Gabai, V.L., Gong, J., Calderwood, S.K., Li, H., Gummuluru, S., Matchuk, O.N., Smirnova, S.G., Orlova, N.V., Zamulaeva, I.A., Garcia-Marcos, M., Li, X., Young, Z.T., Rauch, J.N., Gestwicki, J.E., Takayama, S., Sherman, M.Y., 2014. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res.* 74, 4731–4740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0747>
- Coulson, M., Robert, S., Saint, R., 2005. Drosophila starvin encodes a tissue-specific BAG-domain protein required for larval food uptake. *Genetics* 171, 1799–1812. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.043265>
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E.W., Barja, P.P., Palumbo, E., Notredame, C., 2017. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat. Biotechnol.* 35, 316–319. <https://doi.org/10.1038/nbt.3820>
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., Iwata, J., Tanida, I., Furuya, N., Zheng, D.-M., Tada, N., Tanaka, K., Kominami, E., Ueno, T., 2011. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7, 727–736. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15371>
- Fang, X., Bogomolovas, J., Wu, T., Zhang, W., Liu, C., Veevers, J., Stroud, M.J., Zhang, Z., Ma, X., Mu, Y., Lao, D.-H., Dalton, N.D., Gu, Y., Wang, C., Wang, M., Liang, Y., Lange, S., Ouyang, K., Peterson, K.L., Evans, S.M., Chen, J., 2017. Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 127, 3189–3200. <https://doi.org/10.1172/JCI94310>
- Fatkin, D., Calkins, H., Elliott, P., James, C.A., Peters, S., Kovacic, J.C., 2021. Contemporary and Future Approaches to Precision Medicine in Inherited Cardiomyopathies: JACC Focus Seminar 3/5. *J. Am. Coll. Cardiol.* 77, 2551–2572. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.12.072>
- Feldman, A.M., Begay, R.L., Knezevic, T., Myers, V.D., Slavov, D.B., Zhu, W., Gowan, K., Graw, S.L., Jones, K.L., Tilley, D.G., Coleman, R.C., Walinsky, P., Cheung, J.Y., Mestroni, L., Khalili, K., Taylor, M.R.G., 2014. Decreased levels of BAG3 in a family with a rare variant and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Cell. Physiol.* 229, 1697–1702. <https://doi.org/10.1002/jcp.24615>

- Fontanella, B., Birolo, L., Infusini, G., Cirulli, C., Marzullo, L., Pucci, P., Turco, M.C., Tosco, A., 2010. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 641–650. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.008>
- Gamerding, M., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Clement, A.M., Behl, C., 2011. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* 12, 149–156. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.203>
- Henning, R.H., Brundel, B.J.J.M., 2017. Proteostasis in cardiac health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 637–653. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.89>
- Herrmann, H., Cabet, E., Chevalier, N.R., Moosmann, J., Schultheis, D., Haas, J., Schowalter, M., Berwanger, C., Weyerer, V., Agaimy, A., Meder, B., Müller, O.J., Katus, H.A., Schlötzer-Schrehardt, U., Vicart, P., Ferreira, A., Dittrich, S., Clemen, C.S., Lilienbaum, A., Schröder, R., 2020. Dual Functional States of R406W-Desmin Assembly Complexes Cause Cardiomyopathy With Severe Intercalated Disc Derangement in Humans and in Knock-In Mice. *Circulation* 142, 2155–2171. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050218>
- Hishiya, A., Kitazawa, T., Takayama, S., 2010. BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ. Res.* 107, 1220–1231. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225649>
- Homma, S., Iwasaki, M., Shelton, G.D., Engvall, E., Reed, J.C., Takayama, S., 2006. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am. J. Pathol.* 169, 761–773. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060250>
- Johnson, O.T., Gestwicki, J.E., 2022. Multivalent protein-protein interactions are pivotal regulators of eukaryotic Hsp70 complexes. *Cell Stress Chaperones* 27, 397–415. <https://doi.org/10.1007/s12192-022-01281-1>
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Lüdecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., Fürst, D.O., Höhfeld, J., 2017. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>
- Knezevic, T., Myers, V.D., Su, F., Wang, J., Song, J., Zhang, X.-Q., Gao, E., Gao, G., Muniswamy, M., Gupta, M.K., Gordon, J., Weiner, K.N., Rabinowitz, J., Ramsey, F.V., Tilley, D.G., Khalili, K., Cheung, J.Y., Feldman, A.M., 2016. Adeno-associated Virus Serotype 9 - Driven Expression of BAG3 Improves Left Ventricular Function in Murine Hearts with Left Ventricular Dysfunction Secondary to a Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl. Sci.* 1, 647–656. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.08.008>
- Kögel, D., Linder, B., Brunschweiler, A., Chines, S., Behl, C., 2020. At the Crossroads of Apoptosis and Autophagy: Multiple Roles of the Co-Chaperone BAG3 in Stress and Therapy Resistance of Cancer. *Cells* 9, 574. <https://doi.org/10.3390/cells9030574>
- Kurtishi, A., Rosen, B., Patil, K.S., Alves, G.W., Møller, S.G., 2019. Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 56, 3676–3689. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1334-z>
- Lee, J.H., Takahashi, T., Yasuhara, N., Inazawa, J., Kamada, S., Tsujimoto, Y., 1999. Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* 18, 6183–6190. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203043>
- Lin, H., Koren, S.A., Cvetojevic, G., Girardi, P., Johnson, G.V.W., 2022. The role of BAG3 in health and disease: A “Magic BAG of Tricks.” *J. Cell. Biochem.* 123, 4–21. <https://doi.org/10.1002/jcb.29952>
- Lopaschuk, G.D., Karwi, Q.G., Tian, R., Wende, A.R., Abel, E.D., 2021. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ. Res.* 128, 1487–1513. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318241>
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., Stanley, W.C., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 207–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Madrazo, J.A., Kelly, D.P., 2008. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.03.021>
- Martin, T.G., Myers, V.D., Dubey, P., Dubey, S., Perez, E., Moravec, C.S., Willis, M.S., Feldman, A.M., Kirk, J.A., 2021. Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nat. Commun.* 12, 2942. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23272-z>
- McDermott-Roe, C., Lv, W., Maximova, T., Wada, S., Bukowy, J., Marquez, M., Lai, S., Shehu, A., Benjamin, I., Geurts, A., Musunuru, K., 2019. Investigation of a dilated cardiomyopathy-associated variant in BAG3 using genome-edited iPSC-derived cardiomyocytes. *JCI Insight* 4, e128799, 128799. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128799>
- Minoia, M., Boncoraglio, A., Vinet, J., Morelli, F.F., Brunsting, J.F., Poletti, A., Krom, S., Reits, E., Kampinga, H.H., Carra, S., 2014. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy* 10, 1603–1621. <https://doi.org/10.4161/auto.29409>
- Myers, V.D., Tomar, D., Madesh, M., Wang, J., Song, J., Zhang, X.-Q., Gupta, M.K., Tahrir, F.G., Gordon, J., McClung, J.M., Kontos, C.D., Khalili, K., Cheung, J.Y., Feldman, A.M., 2018. Haplo-insufficiency of Bcl-2-associated athanogene 3 in mice results in progressive left ventricular dysfunction, β -adrenergic insensitivity, and increased apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 233, 6319–6326. <https://doi.org/10.1002/jcp.26482>
- nf-core/rnaseq, n.d. nf-core/rnaseq v3.14.0 - Hassium Honey Badger.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., Ballabio, A., 2011. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3852–3866. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr306>
- Pattison, J.S., Osinska, H., Robbins, J., 2011. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ. Res.* 109, 151–160. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237339>
- Perez-Bermejo, J.A., Judge, L.M., Jensen, C.L., Wu, K., 2023. Functional analysis of a common BAG3 allele associated with protection from heart failure. *Nat Cardiovascular Res* 2, 615–628.
- R Core Team (2023), n.d. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., Kirkin, V., 2014. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell* 53, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.014>
- Rosati, A., Graziano, V., Laurenzi, V.D., Pascale, M., Turco, M.C., 2011. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis.* 2, e141–e141. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.24>
- Sala, A.J., Bott, L.C., Morimoto, R.I., 2017. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J. Cell Biol.* 216, 1231–1241. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612111>
- Singh, R., Cuervo, A.M., 2011. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 13, 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.004>
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135. <https://doi.org/10.1038/nature07976>
- Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F.U., Moarefi, I., 2001. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* 291, 1553–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1057268>
- Su, F., Myers, V.D., Knezevic, T., Wang, J., Gao, E., Madesh, M., Tahrir, F.G., Gupta, M.K., Gordon, J., Rabinowitz, J., Ramsey, F.V., Tilley, D.G., Khalili, K., Cheung, J.Y., Feldman, A.M., 2016. Bcl-2-associated athanogene 3 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *JCI Insight* 1, e90931. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90931>
- Tadros, R., Francis, C., Xu, X., Vermeer, A.M.C., Harper, A.R., Huurman, R., Kelu Bisabu, K., Walsh, R., Hoorntje, E.T., Te Rijdt, W.P., Buchan, R.J., van Velzen, H.G., van Slegtenhorst, M.A., Vermeulen, J.M., Offerhaus,

- J.A., Bai, W., de Marvao, A., Lahrouchi, N., Beekman, L., Karper, J.C., Veldink, J.H., Kayvanpour, E., Pantazis, A., Baksi, A.J., Whiffin, N., Mazzarotto, F., Sloane, G., Suzuki, H., Schneider-Luftman, D., Elliott, P., Richard, P., Ader, F., Villard, E., Lichtner, P., Meitinger, T., Tanck, M.W.T., van Tintelen, J.P., Thain, A., McCarty, D., Hegele, R.A., Roberts, J.D., Amyot, J., Dubé, M.-P., Cadrin-Tourigny, J., Giraldeau, G., L'Allier, P.L., Garceau, P., Tardif, J.-C., Boekholdt, S.M., Lumbers, R.T., Asselbergs, F.W., Barton, P.J.R., Cook, S.A., Prasad, S.K., O'Regan, D.P., van der Velden, J., Verweij, K.J.H., Talajic, M., Lettre, G., Pinto, Y.M., Meder, B., Charron, P., de Boer, R.A., Christiaans, I., Michels, M., Wilde, A.A.M., Watkins, H., Matthews, P.M., Ware, J.S., Bezzina, C.R., 2021. Shared genetic pathways contribute to risk of hypertrophic and dilated cardiomyopathies with opposite directions of effect. *Nat. Genet.* 53, 128–134. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00762-2>
- Tahir, F.G., Knezevic, T., Gupta, M.K., Gordon, J., Cheung, J.Y., Feldman, A.M., Khalili, K., 2017. Evidence for the Role of BAG3 in Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* 232, 797–805. <https://doi.org/10.1002/jcp.25476>
- Uddin, M.N., Ito, S., Nishio, N., Suganya, T., Isobe, K., 2011. Gadd34 induces autophagy through the suppression of the mTOR pathway during starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 692–698. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.077>
- Vermeer, M.C., Bolling, M.C., Bliley, J.M., Arevalo Gomez, K.F., Pavez-Giani, M.G., Kramer, D., Romero-Herrera, P.H., Westenbrink, B.D., Diercks, G.F., van den Berg, M.P., Feinberg, A.W., Silljé, H.H.W., van der Meer, P., 2021. Gain-of-function mutation in ubiquitin-ligase KLHL24 causes desmin degradation and dilatation in hiPSC-derived engineered heart tissues. *J. Clin. Invest.* 131, e140615. <https://doi.org/10.1172/JCI140615>
- Villard, E., Perret, C., Gary, F., Proust, C., Dilanian, G., Hengstenberg, C., Ruppert, V., Arbustini, E., Wichter, T., Germain, M., Dubourg, O., Tavazzi, L., Aumont, M.-C., DeGroot, P., Fauchier, L., Trochu, J.-N., Gibelin, P., Aupetit, J.-F., Stark, K., Erdmann, J., Hetzer, R., Roberts, A.M., Barton, P.J.R., Regitz-Zagrosek, V., Cardiogenics Consortium, Aslam, U., Duboscq-Bidot, L., Meyborg, M., Maisch, B., Madeira, H., Waldenström, A., Galve, E., Cleland, J.G., Dorent, R., Roizes, G., Zeller, T., Blankenberg, S., Goodall, A.H., Cook, S., Tregouet, D.A., Tiret, L., Isnard, R., Komajda, M., Charron, P., Cambien, F., 2011. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 32, 1065–1076. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr105>
- Worby, C.A., Dixon, J.E., 2014. PTEN. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 641–669. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-082411-113907>
- Yang, J., Grafton, F., Ranjbarvaziri, S., Budan, A., Farshidfar, F., Cho, M., Xu, E., Ho, J., Maddah, M., Loewke, K.E., Medina, J., Sperandio, D., Patel, S., Hoey, T., Mandegar, M.A., 2022. Phenotypic screening with deep learning identifies HDAC6 inhibitors as cardioprotective in a BAG3 mouse model of dilated cardiomyopathy. *Sci. Transl. Med.* 14, eabl5654. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl5654>
- Yoshii, S.R., Mizushima, N., 2017. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
- Youn, D.-Y., Lee, D.-H., Lim, M.-H., Yoon, J.-S., Lim, J.H., Jung, S.E., Yeum, C.E., Park, C.W., Youn, H.-J., Lee, J.-S., Lee, S.-B., Ikawa, M., Okabe, M., Tsujimoto, Y., Lee, J.-H., 2008. Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of spleen and thymus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1349-1357. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90704.2008>
- Yun, H.H., Jung, S.Y., Park, B.W., Ko, J.S., Yoo, K., Yeo, J., Kim, H.L., Park, H.J., Youn, H.J., Lee, J.H., 2021. An Adult Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy Caused by Inducible Cardiac-Specific Bis Deletion. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 1343. <https://doi.org/10.3390/ijms22031343>

FIGURE 1

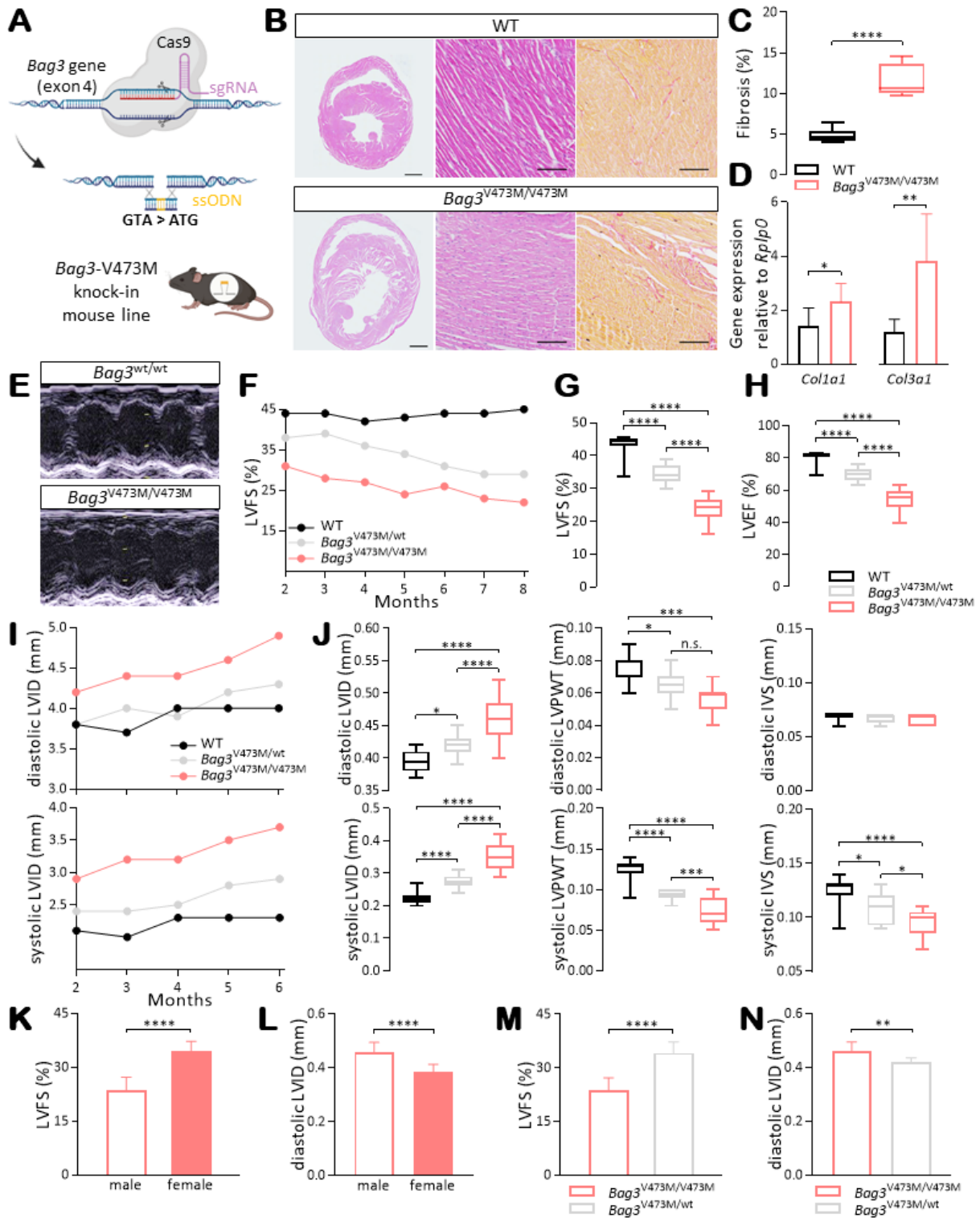


FIGURE 2

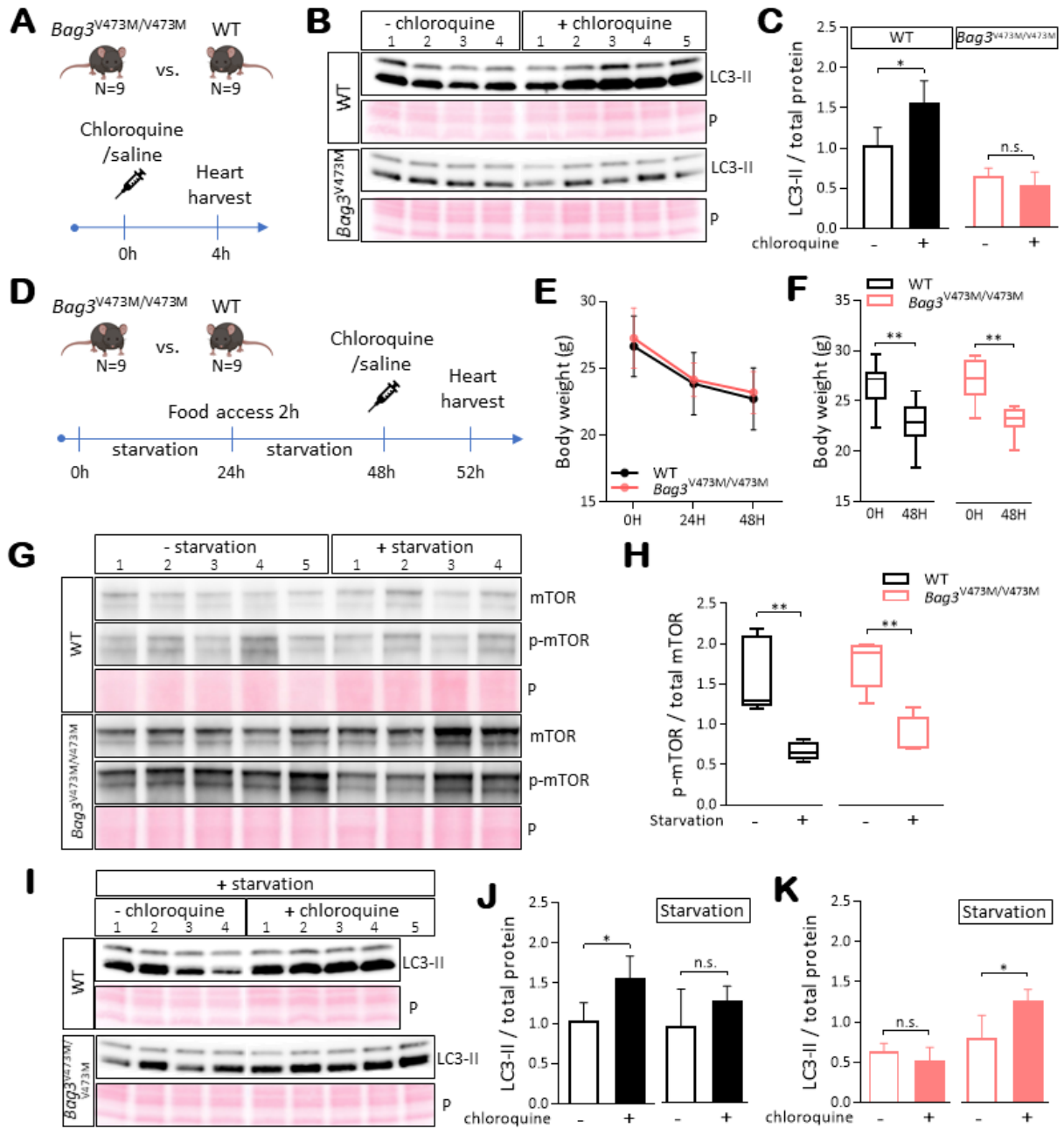
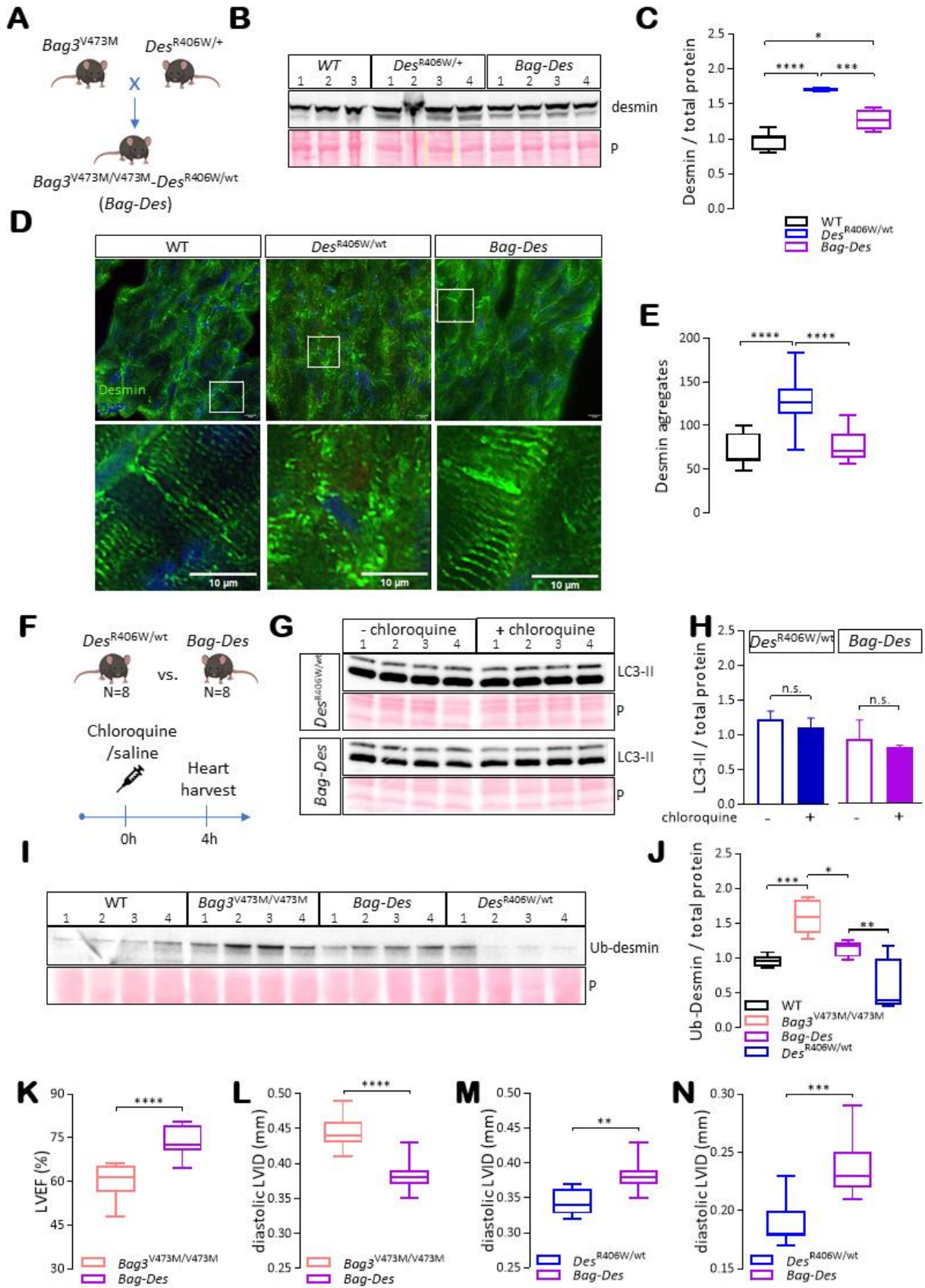


FIGURE 3



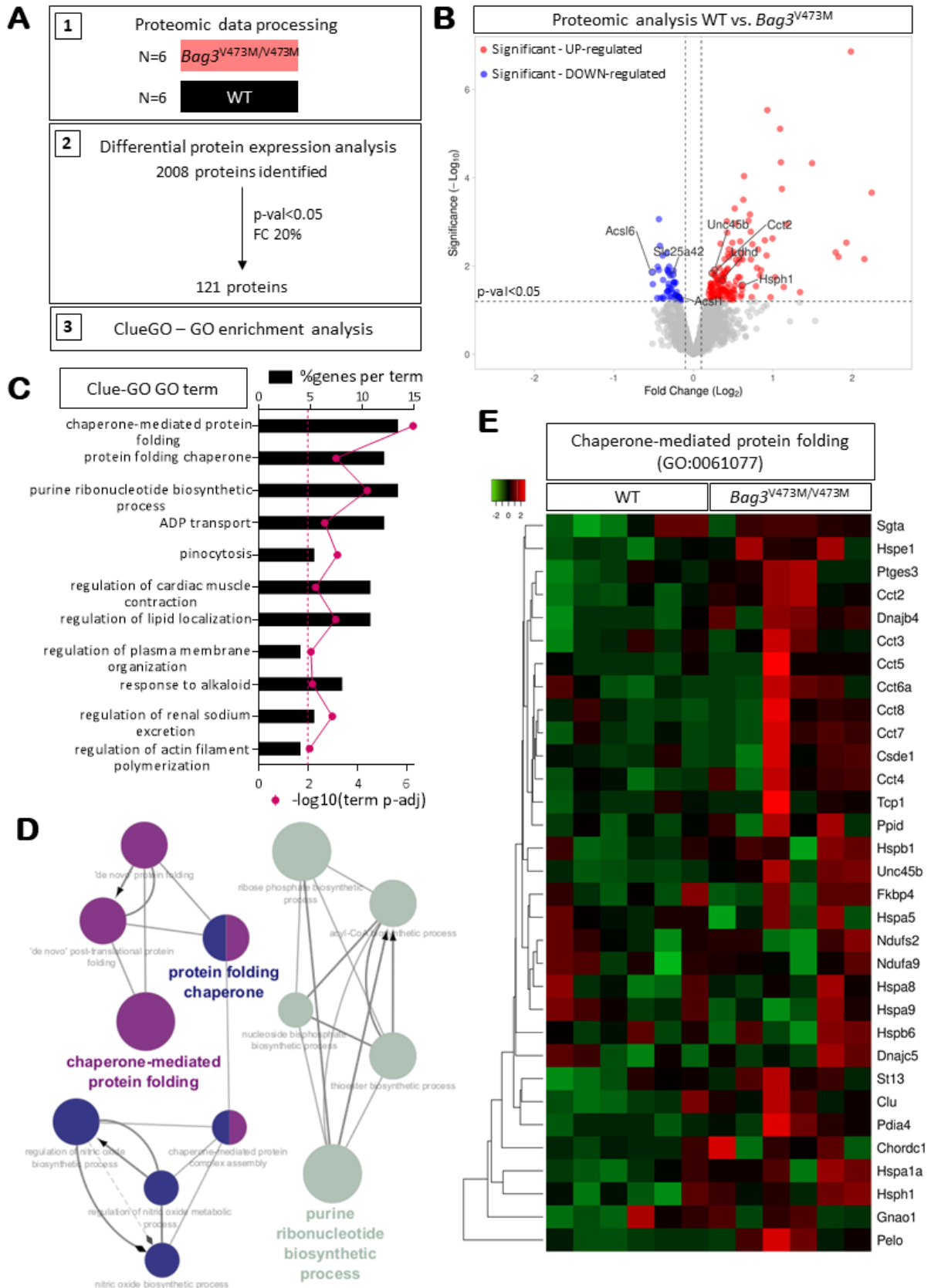
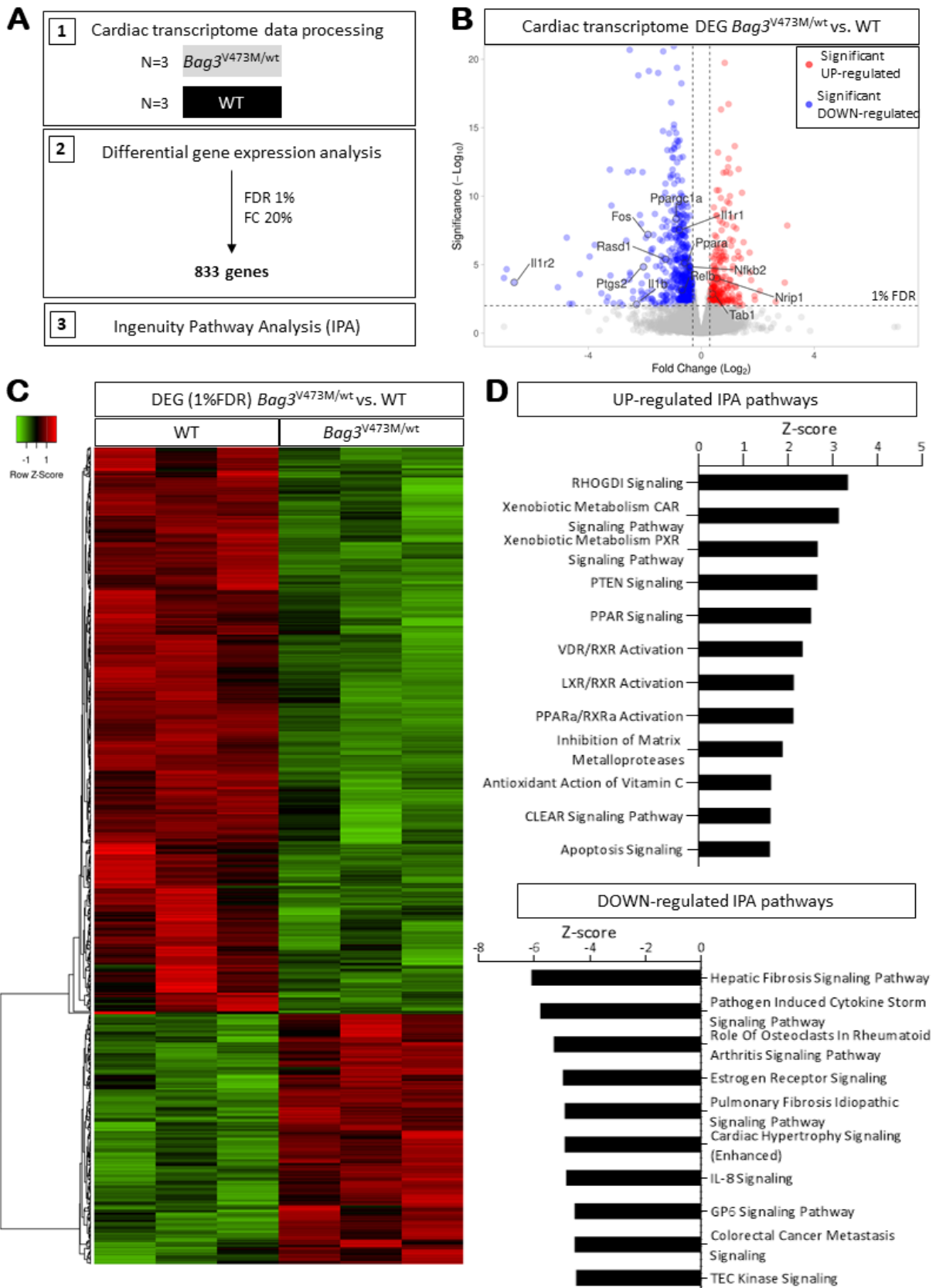


FIGURE 5



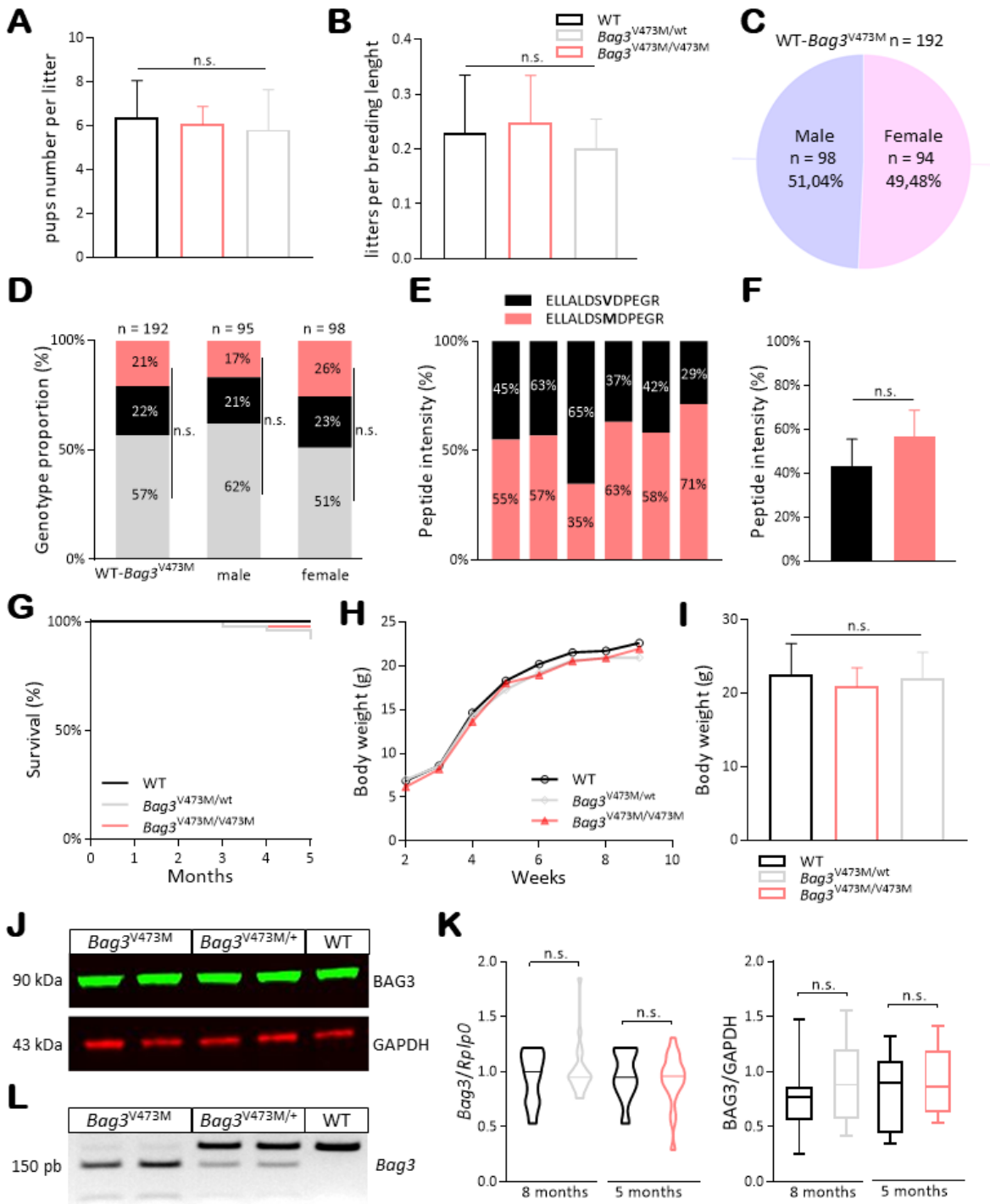
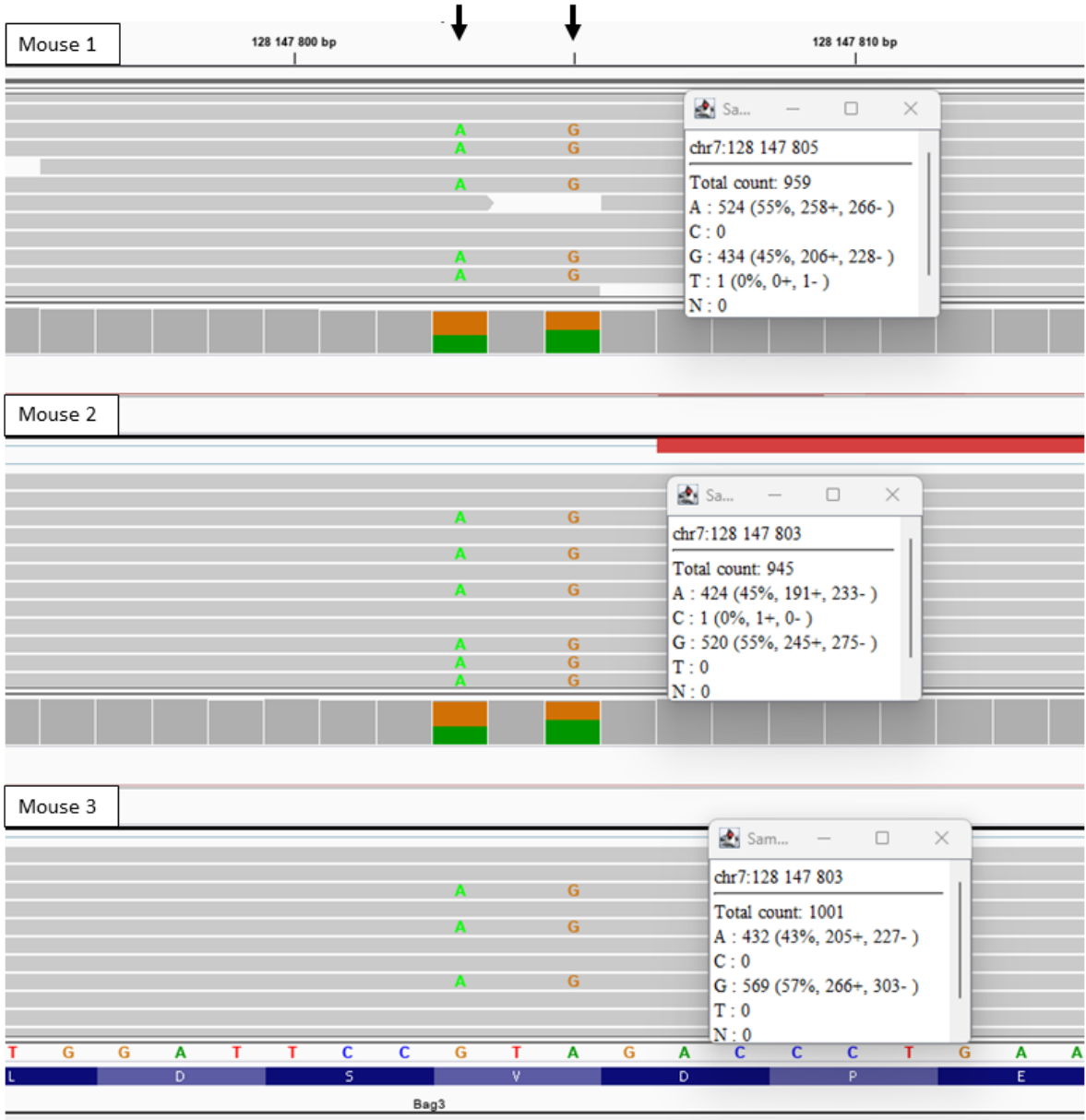
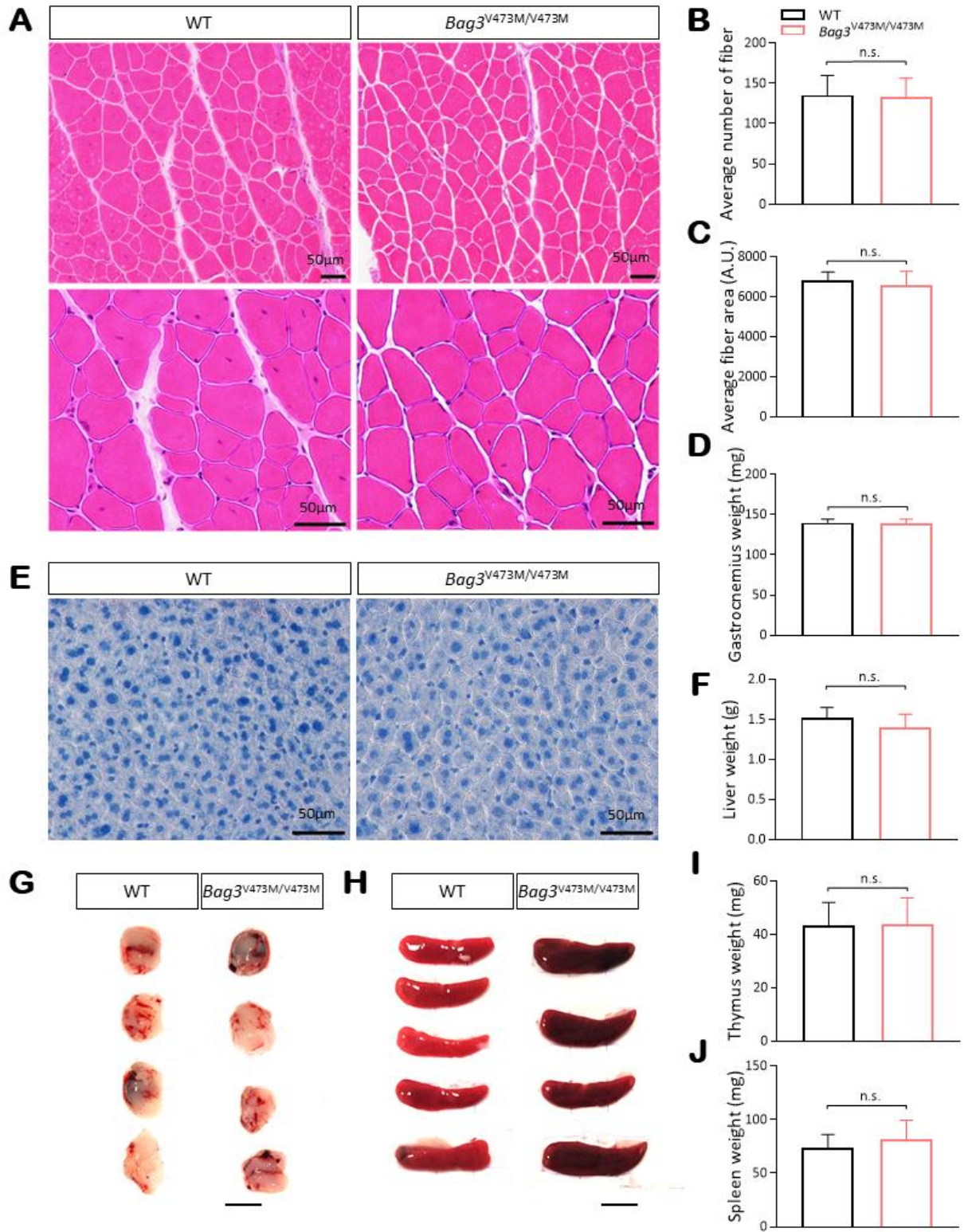
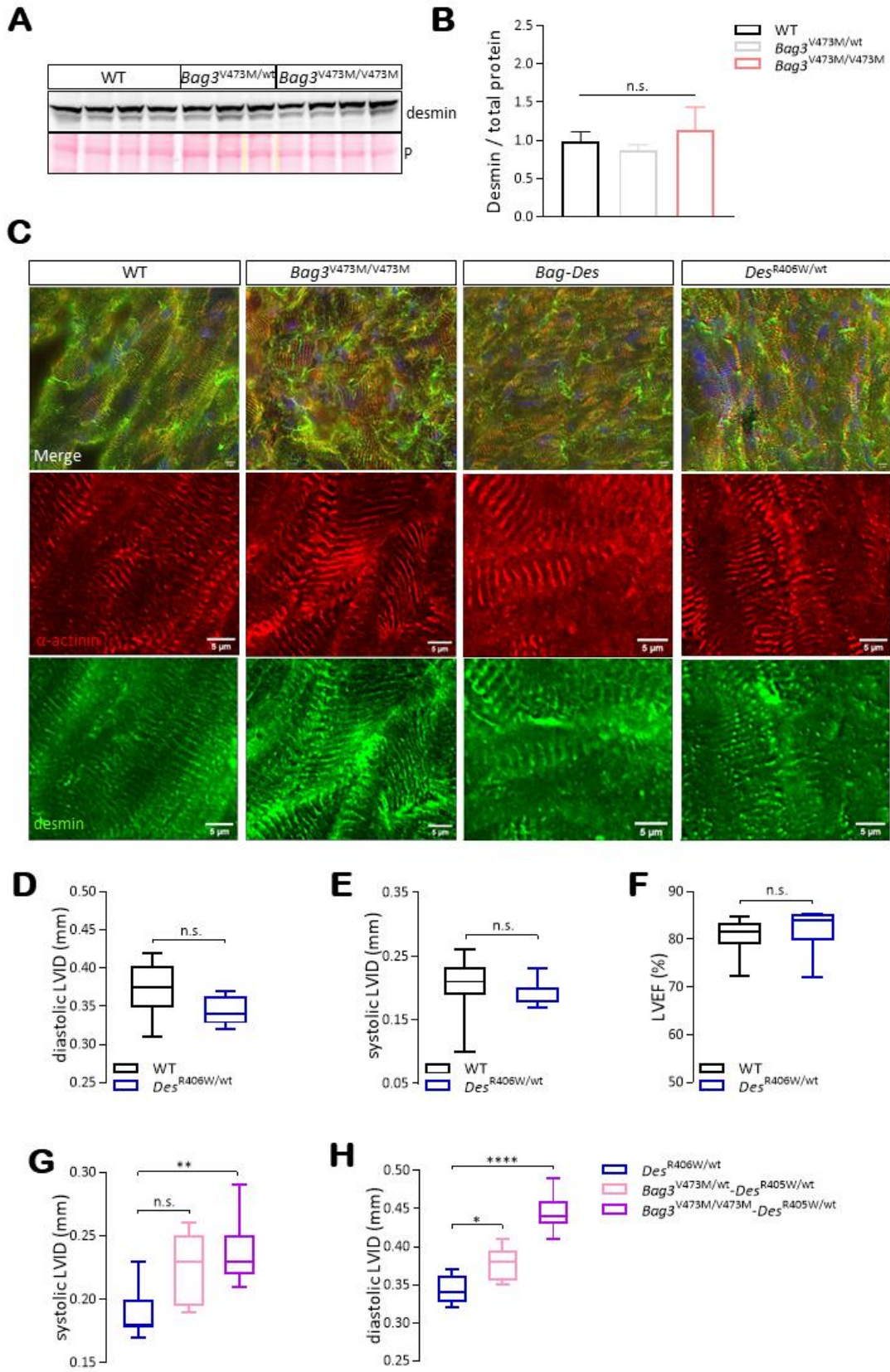


FIGURE S2







Gene name	Primer Sequence	
Quantitative PCR		
<i>Nppa</i>	Forward	5'-AACAGCTTCCGGTACCGAAG-3'
	Reverse	5'-GTGGCAATGTGACCAAGCTG-3'
<i>Nppb</i>	Forward	5'-AGCTCTTGAAGGACCAAGGC-3'
	Reverse	5'-ACAACCTTCAGTGC GTTACAGC-3'
<i>Col1a1</i>	Forward	5'-AGCCGCAAAGAGTCTACATGT-3'
	Reverse	5'-GCTGACTTCAGGGATGTCTTCT-3'
<i>Col3a1</i>	Forward	5'-GCAGTCCAACGTAGATGAATTGG-3'
	Reverse	5'-TCTGGGTTGGGGCAGTCTAG-3'
<i>Bag3</i>	Forward	5'-CAAGATCCAGGGCGATGACT-3'
	Reverse	5'-GGTTTGTTCGGGTTGGGT-3'
Genotyping		
<i>Bag3</i>	Forward	5'-GCCATCCTGGAGAAGGTACA-3'
	Reverse	5'-ACCTTCCTGACGCCATCTCT-3'
<i>Desmin</i>	Forward	5'-CTGGAGGAGGAGATCCGACA-3'
	Reverse	5'-GGCCCTCGTTAATTTTCTGC-3'

Supplemental Table 1. List of PCR and qPCR primers

Target	Reference	Working dilution	Species	MW (kDa)
Primary antibodies				
BAG3	Proteintech 10599-AP	1/3000 (WB)	rabbit	74-80
p-mTOR	Santa Cruz sc-293133	1/500 (WB)	mouse	220
mTOR	Santa Cruz sc-517464	1/500 (WB)	mouse	220
LC3-B	Sigma Aldrich L7543	1/1 000 (WB)	rabbit	18-16
P62/SQSTM1	Abcam ab56416	1/1 000 (WB)	mouse	62
Desmin	Proteintech 16520-AP	1/5000 (WB) 1/100 (IF)	rabbit	55
Secondary antibodies				
Anti-rabbit IgG	R&D Systems HAF008	1/1 000 (WB)	goat	/
Anti-mouse IgG	R&D Systems HAF007	1/1 000 (WB)	goat	/
Anti-rabbit IgG	Jackson Alexa 488 111-545-144	1/1 000 (IF)	goat	/
Anti-mouse IgG	BETHYL Dylight 597 A90-116D4	1/1 000 (IF)	goat	/

Supplemental Table 2. List of antibodies

TABLE S3

	<i>Bag3</i> ^{wt/wt}	<i>Bag3</i> ^{V473M/wt}	<i>Bag3</i> ^{V473M/V473M}		
Mice number	7	5	8		
Body weight (g)	36 ± 3	36 ± 4	32 ± 2		
Liver				p (<i>Bag3</i>^{wt} vs. <i>Bag3</i>^{V473M/wt})	p (<i>Bag3</i>^{wt} vs. <i>Bag3</i>^{V473M})
Absolute (g)	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,8745	0,1564
Relative (%)	4,3 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,5 ± 0,4	0,6847	0,4033
Heart					
Absolute (mg)	136 ± 12	147 ± 15	139 ± 20	0,1893	0,5092
Relative (%)	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,42 ± 0,05	0,0748	0,1213
Kidneys					
Absolute (mg)	180 ± 6	177 ± 9	176 ± 16	0,9297	0,1324
Relative (%)	0,51 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,53 ± 0,03	0,8664	0,1314
Lungs					
Absolute (mg)	126 ± 12	128 ± 20	124 ± 9	0,8518	0,4555
Relative (%)	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,06	0,38 ± 0,02	0,9655	0,0865
Spleen					
Absolute (mg)	75 ± 14	76 ± 11	81 ± 18	0,7536	0,3996
Relative (%)	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,06	0,7875	0,0510
Thymus					
Absolute (mg)	44 ± 7	44 ± 7	43 ± 10	0,8582	0,9841
Relative (%)	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,9742	0,2757

Supplemental Table 3. Major organs weights of *Bag3*^{wt}, *Bag3*^{V473M/wt} and *Bag3*^{V473M} 5-month-old male micep-values assessed by 2-tailed Student's *t* test

TABLE S4

Parameter	2 months			4 months			6 months			8 months		
	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m
Mice number	8	13	12	9	11	12	7	7	5	8	8	5
HR (beats/min)	634 ± 23	630 ± 20	641 ± 26	639 ± 20	643 ± 28	645 ± 23	643 ± 22	633 ± 32	642 ± 41	639 ± 33	633 ± 25	623 ± 34
CO (mL/min)	70 ± 12	69 ± 11	77 ± 12	79 ± 11	72 ± 13	78 ± 10	83 ± 10	81 ± 19	92 ± 8	94 ± 9	85 ± 16	70 ± 12**
LV study												
EF (%)	81 ± 3	75 ± 6*	65 ± 8****	78 ± 5	73 ± 3**	59 ± 6****	81 ± 2	73 ± 6****	56 ± 9****	82 ± 1	62 ± 3****	51 ± 11****
FS (%)	44 ± 3	38 ± 5*	31 ± 6****	42 ± 4	36 ± 3**	27 ± 3****	44 ± 2	31 ± 3****	26 ± 6****	45 ± 2	29 ± 2****	22 ± 6****
Stroke vol. (μL)	113 ± 23	106 ± 13	119 ± 21	125 ± 18	109 ± 19	123 ± 15	130 ± 14	127 ± 28	146 ± 19	148 ± 14	131 ± 24	116 ± 18**
h/r (%)	36 ± 3	34 ± 5	31 ± 4*	33 ± 3	35 ± 3	28 ± 3**	32 ± 2	30 ± 2**	24 ± 4***	35 ± 3	29 ± 1***	28 ± 2**
Systole												
IVS (mm)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1*	1.0 ± 0.1**	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1*	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1*	1.0 ± 0.1**	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1***	0.9 ± 0.1****
LV (mm)	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.2*	2.9 ± 0.4***	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.2 ± 0.3****	2.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2****	3.7 ± 0.6****	2.3 ± 0.1	3.1 ± 0.2****	3.5 ± 0.5****
LVWT (mm)	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1****	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1****	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1****	0.8 ± 0.2***	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1****	0.8 ± 0.1****
ESV (μL)	26 ± 7	36 ± 11*	66 ± 24***	33 ± 10	42 ± 10	89 ± 24****	33 ± 8	64 ± 11****	134 ± 52***	31 ± 6	81 ± 16****	114 ± 50***
Diastole												
IVS (mm)	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0*
LV (mm)	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.2 ± 0.3*	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.3	4.4 ± 0.3***	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.9 ± 0.5**	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3*
LVWT (mm)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
EDV (μL)	151 ± 44	144 ± 17	186 ± 43	158 ± 22	150 ± 29	211 ± 34***	164 ± 18	193 ± 36	296 ± 85**	183 ± 17	214 ± 42****	230 ± 51**

Supplemental Table 4. Echocardiographic parameters of male *Bag3*^{V473M} mice

m/wt, heterozygous mice; m/m, homozygous mice; HR, heart rate; CO, cardiac output; LV, left ventricle; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; IVS, interventricular septum; LVWT, left ventricle wall thickness, ESV, end-systolic volume; EDV, end-diastolic volume.

Significantly different data (* vs. WT) are highlighted, p-values assessed by 2-tailed Student's *t* test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

TABLE S5

Parameter	4 months			6 months			8 months			10 months		
	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m	WT	m/wt	m/m
Mice number	8	15	9	8	15	9	8	15	9	3	10	3
HR (beats/min)	641 ± 23	641 ± 20	637 ± 20	635 ± 26	637 ± 19	637 ± 16	640 ± 22	652 ± 30	646 ± 31	624 ± 15	624 ± 16	612 ± 19
CO (mL/min)	58 ± 12	61 ± 9	60 ± 15	76 ± 22	66 ± 11	71 ± 12	76 ± 15	61 ± 7**	63 ± 7*	80 ± 10	67 ± 7*	63 ± 6
LV study												
EF (%)	83 ± 2	81 ± 3	77 ± 7*	81 ± 2	73 ± 6***	68 ± 4****	82 ± 1	68 ± 4****	57 ± 5****	81 ± 0	64 ± 2****	60 ± 11*
FS (%)	45 ± 2	44 ± 3	40 ± 6*	44 ± 2	36 ± 5***	33 ± 3****	45 ± 1	33 ± 3****	26 ± 3****	43 ± 0	30 ± 2****	28 ± 7*
Stroke vol. (μL)	90 ± 18	96 ± 16	97 ± 26	129 ± 27	103 ± 15**	113 ± 23	120 ± 24	96 ± 12**	101 ± 13	133 ± 21	108 ± 9**	103 ± 5
h/r (%)	37 ± 4	35 ± 3	34 ± 3	35 ± 3	32 ± 3	31 ± 3*	34 ± 2	30 ± 3**	27 ± 3****	32 ± 2	28 ± 2*	28 ± 4
Systole												
IVS (mm)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1**	1.0 ± 0.1**	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1****	0.9 ± 0.0****	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1**	0.8 ± 0.1*
LV (mm)	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.3*	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.3*	2.7 ± 0.3***	2.1 ± 0.2	2.6 ± 0.2****	3.1 ± 0.3****	2.3 ± 0.2	2.8 ± 0.1***	3.0 ± 0.4
LVWT (mm)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1****	0.9 ± 0.1****	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1****	0.8 ± 0.0****	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.1***	0.8 ± 0.1*
ESV (μL)	19 ± 6	23 ± 10	29 ± 15	28 ± 5	41 ± 14*	53 ± 18**	29 ± 8	46 ± 11**	78 ± 20****	33 ± 6	60 ± 9***	73 ± 32
Diastole												
IVS (mm)	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0***	0.6 ± 0.0***	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0*	0.6 ± 0.1
LV (mm)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.8 ± 0.4	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.3	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.3*
LVWT (mm)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1**	0.5 ± 0.1*	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
EDV (μL)	109 ± 21	119 ± 24	124 ± 34	144 ± 36	141 ± 24	168 ± 38	145 ± 28	139 ± 20	178 ± 27*	163 ± 21	165 ± 16	177 ± 31

Supplemental Table 5. Echocardiographic parameters of female *Bag3*^{V473M} mice

m/wt, heterozygous mice; m/m, homozygous mice; HR, heart rate; CO, cardiac output; LV, left ventricle; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; IVS, interventricular septum; LVWT, left ventricle wall thickness, ESV, end-systolic volume; EDV, end-diastolic volume.

Significantly different data (* vs. WT) are highlighted, p-values assessed by 2-tailed Student's *t* test, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Gene	baseMean	Lof2FoldChange	p-adjusted
Nppa	6700,0	-0,77	0,25
Nppb	3529,9	-1,46	0,28
Fhl1	5622,1	0,18	0,38
Myh6	1538837,0	0,02	0,93
Myh7	5619,9	-0,21	0,88

Supplemental Table 4. Expression levels of heart failure biomarkers in *Bag3*^{wt} vs. *Bag3*^{V473M} RNA-Seq analysis

TABLE S7

Parameter	2 months		3 months		4 months		5 months	
	<i>Des</i> ^{m/wt}	<i>Bag3</i> ^{m/m-Des} ^{m/wt}	<i>Des</i> ^{m/wt}	<i>Bag3</i> ^{m/m-Des} ^{m/wt}	<i>Des</i> ^{m/wt}	<i>Bag3</i> ^{m/m-Des} ^{m/wt}	<i>Des</i> ^{m/wt}	<i>Bag3</i> ^{m/m-Des} ^{m/wt}
Mice number	6	8	6	15	N/A	5	N/A	5
HR (beats/min)	628 ± 21	609 ± 16	621 ± 23	628 ± 38	N/A	623 ± 18	N/A	643 ± 37
CO (mL/min)	53 ± 5*	59 ± 16[§]	55 ± 9*	65 ± 11*	N/A	64 ± 9[§]	N/A	60 ± 7[§]
LV study								
EF (%)	84 ± 1	68 ± 6†	82 ± 5	75 ± 5†[§]	N/A	67 ± 6[§]	N/A	58 ± 11
FS (%)	46 ± 1	33 ± 4†	45 ± 5	38 ± 4†[§]	N/A	33 ± 4[§]	N/A	27 ± 7
Stroke vol. (μL)	85 ± 6*	95 ± 28[§]	87 ± 14	99 ± 31[§]	N/A	104 ± 11[§]	N/A	90 ± 10[§]
h/r (%)	39 ± 2*	31 ± 4†	37 ± 3	33 ± 3†[§]	N/A	31 ± 2	N/A	29 ± 3
Systole								
IVS (mm)	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1†	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1[§]	N/A	1.0 ± 0.1	N/A	0.9 ± 0.1
LV (mm)	1.8 ± 0.1*	2.6 ± 0.4†	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.3†[§]	N/A	2.7 ± 0.2[§]	N/A	2.9 ± 0.4[§]
LVWT (mm)	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1†	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1[§]	N/A	0.9 ± 0.1	N/A	0.8 ± 0.2
ESV (μL)	18 ± 4*	48 ± 17†	18 ± 8	37 ± 13†[§]	N/A	52 ± 8[§]	N/A	66 ± 23[§]
Diastole								
IVS (mm)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	N/A	0.6 ± 0.0	N/A	0.6 ± 0.0[§]
LV (mm)	3.4 ± 0.1*	3.8 ± 0.4[§]	3.4 ± 0.2	3.8 ± 0.2†[§]	N/A	4.0 ± 0.0[§]	N/A	4.0 ± 0.2[§]
LVWT (mm)	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1†	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	N/A	0.6 ± 0.1	N/A	0.6 ± 0.1
EDV (μL)	100 ± 6*	143 ± 45†[§]	103 ± 15*	141 ± 27†[§]	N/A	157 ± 7[§]	N/A	159 ± 17[§]

Supplemental Table 5. Echocardiographic parameters of male *Des*^{R405W/wt} and *Bag3*^{V473M-Des}^{R405W/wt} mice

m/wt, heterozygous mice; m/m, homozygous mice; HR, heart rate; CO, cardiac output; LV, left ventricle; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; IVS, interventricular septum; LVWT, left ventricle wall thickness, ESV, end-systolic volume; EDV, end-diastolic volume.

Significantly different data (* vs. WT or † vs. *Des*^{m/wt} or [§] vs. *Bag3*^{m/m}) are highlighted, p-values assessed by 2-tailed Student's *t* test.

III. Résultats hors-article

a. Réplication du transcriptome cardiaque *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT

L'analyse du premier transcriptome cardiaque chez les souris *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT (Batch A) a révélé 833 gènes différentiellement exprimés (GDE) avec un FDR à 1%. L'analyse des voies cellulaires associées à ces GDE par Ingenuity Pathway Analysis (IPA) a permis de mettre en évidence 262 voies avec un $|Z\text{-score}| > 1.5$. Parmi ces voies, 248 (95%) apparaissent comme sous-régulées chez les souris *Bag3*^{V473M/wt} ce qui complexifie l'interprétation des résultats.

C'est pourquoi une réplication de ce RNA-Seq a été réalisée sur 3 souris *Bag3*^{V473M/wt} indépendantes (Batch B). L'analyse bio-informatique est identique à celle du Batch A et a permis de mettre en évidence une forte corrélation positive ($p < 0.0001$) entre les deux analyses (**Fig. 38A-B**).

Dans cette seconde analyse (Batch B), 387 GDE avec un FDR à 1% et un $|\text{Log}_2(\text{Fold-Change})| > 0.32$ ont été identifiés (**Fig. 38A**). Nous nous sommes intéressés aux GDE répliqués du Batch A dans le Batch B qui constituent un pool de 205 gènes avec un FDR < 1%, et 76 gènes avec une $p\text{-value corr.} < 10^{-4}$, au sein des deux analyses (**Fig. 38A et C**). Cette liste de gènes, trop courte pour être analysée par IPA, a été analysée avec ClueGO afin d'identifier les voies cellulaires majeures dérégulées au stade précoce de la CMD dans notre modèle (**Fig. 38D-F**).

Cette analyse a permis de mettre en évidence des voies associées à la régulation du métabolisme des acides gras ($P\text{-Value corr.} = 6.5 \cdot 10^{-4}$) et à la sécrétion d'insuline ($P\text{-Value corr.} = 6.2 \cdot 10^{-3}$), notamment impliquées dans le métabolisme énergétique cardiaque ([Lopaschuk et al. 2021](#)) (**Fig. 38D**). De façon intéressante, parmi les gènes répliqués, on retrouve des gènes associés à la régulation de la différenciation des adipocytes ([Vas et al. 2019](#), [Wang et al. 2022](#)) (*Sh3pxd2b* : FC=-3.4, *Ptgs2* : FC=-4.1) et au développement du tissu adipeux ([Huang et al. 2023](#)) (*Ppargc1a* : FC=-1.9).

Ces résultats confirment la signature altérée du métabolisme lipidique observée dans l'analyse de protéomique réalisée chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M} suggérant un déficit du métabolisme lipidique à la fois à un stade précoce et à un stade avancé de la maladie. En effet, en plus de *Ppargc1a*, l'activateur transcriptionnel de *Pparg*, *Pparg* (FC=-1.4), *Ppard* (FC=-1.2) et *Ppara* (FC=-1.5) sont retrouvés diminués chez les souris *Bag3*^{V473M/wt} ([Madrazo et Kelly 2008](#)).

Les acides gras et le glucose représentent la source majeure d'énergie au niveau cardiaque, et puisque des altérations du métabolisme énergétique cardiaque contribuent à l'insuffisance cardiaque (Lopaschuk *et al.* 2021) nous nous sommes davantage intéressés aux métabolismes du glucose et des acides gras au sein de notre modèle.

b. Evaluation de la tolérance au glucose et à l'insuline chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M}

Pour étudier le métabolisme du glucose, un test de tolérance au glucose a été réalisé chez des souris *Bag3*^{V473M/V473M} âgées de 5 mois, après 5 heures de jeûne. Contrairement aux souris WT, des taux de glycémie plus faibles sont observés chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M} à jeun (glycémie = 174 ± 13mg/dL chez les WT vs. 146 ± 26mg/dL chez les *Bag3*^{V473M/V473M}; p=0.0008) et perdure après administration du bolus de glucose (gavage de 2g/kg) (**Fig. 39A-B**). Ces résultats indiquent une meilleure tolérance au glucose chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M}. De plus, lorsqu'un test de tolérance à l'insuline (injection intrapéritonéale de 1 U/kg) a été réalisé, une réponse hypoglycémique significativement accrue a été observée chez les souris mutées par rapport aux souris WT. Ainsi, au bout de 60 minutes, alors que les souris WT ne présentaient qu'une diminution de 38 % de la glycémie, les souris transgéniques présentaient une diminution de 67 % de la glycémie (**Fig. 39C-D**). Tous ces résultats suggèrent que les souris *Bag3*^{V473M/V473M} développent une sensibilité accrue à l'insuline conduisant à une meilleure internalisation du glucose. Cependant, l'expression des hexokinases 1 et 2, médiatrices de l'étape initiale de la glycolyse, sont retrouvées diminuées dans le cœur des souris *Bag3*^{V473M/V473M} (*Hk1* : FC=-1.2, *Hk2* : FC=-1.2), suggérant une autre utilisation que la production d'ATP du glucose internalisé.

c. Etude de la signature lipidique chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M}

Suite à l'observation d'un enrichissement des gènes participant à la différenciation des adipocytes et au développement du tissu adipeux, nous avons estimé par résonance magnétique nucléaire (RMN) la proportion de masse grasse chez des souris *Bag3*^{V473M/V473M} par rapport aux souris WT à l'âge de 5 mois. À un poids corporel similaire (33.2 ± 3.4g chez les WT et 34.6 ± 4.1g chez les *Bag3*^{V473M/V473M}), il existe une augmentation significative de la proportion de masse grasse chez les souris mutées. Ainsi, alors que les souris WT présentent en moyenne 11% de masse grasse, les souris *Bag3*^{V473M/V473M} présentent 22% de masse grasse,

soit une augmentation totale de 50% par rapport aux souris WT, suggérant un stockage anormal des lipides chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M} (Fig. 39E-F). De plus, l'impact de la mutation *Bag3*-V473M sur le profil lipidomique cardiaque a été étudié par spectrométrie de masse. L'analyse en composantes principales (ACP) a révélé un profil métabolique distinct entre les souris mutées et témoins à 5 mois (non montré). L'analyse statistique montre que 56 espèces de lipides sont altérées de manière significative et que plus de 90 % d'entre elles sont retrouvées enrichies et concerne les acides gras libres (FFA), les diacylglycérides (DAG) et les triacylglycérides (TAG) (Fig. 39G-H). Pour la classe des triglycérides, les altérations observées dépendent de la longueur de la chaîne carbonée avec un enrichissement des espèces avec une chaîne longue et polyinsaturée et une diminution pour les espèces avec un chaîne carbonée courte (C16). Cette répartition est notamment observée dans le lipidome cardiaque de souris soumise à un régime riche en gras (HFD), ce qui est corrélé avec l'observation d'une proportion augmentée de masse grasse chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M}.

Dans l'ensemble, le myocarde des souris *Bag3*^{V473M/V473M} est principalement enrichi en FFA, DAG pour plus de 20 espèces et en TAG longs polyinsaturés. Les TAG étant la forme de stockage des acides gras, dans l'ensemble, nos résultats suggèrent une accumulation accrue d'acides gras chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M}. Cette accumulation ne semble pas être liée à une diminution de l'expression des lipases impliquées dans la libération de FFA à partir de TAG et DAG, au contraire celles-ci présentent une expression augmentée chez les souris *Bag3*^{V473M/V473M} (*Lipe* : FC=+1.9, *Mgl1* : FC=+1.4) pouvant expliquer l'accumulation des espèces obtenues à partir des TAG comme les FFA et les DAG. Ces résultats suggèrent plutôt un déficit dans l'utilisation *a posteriori* de ces espèces par la cellule.

d. Analyse de trajectoires : *Bag3*^{V473M/wt} vs. *Bag3*^{V473M/V473M}

Après s'être intéressé aux gènes et voies impliqués au stade précoce de la CMD chez les souris *Bag3*^{V473M/wt}, nous avons comparé les transcriptomes cardiaques de ces animaux avec les souris *Bag3*^{V473M/V473M}. Cette approche avait pour but, d'une part, de déterminer si les signaux associés à la mise en place du phénotype pathologique sont conservés à un stage plus avancé de la maladie et, d'autre part, d'identifier les signaux qui perdurent du stade précoce vers le stade tardif et donc associés à la progression de la maladie.

Pour cela, les analyses de trajectoires ont été réalisées à deux niveaux ; premièrement en comparant l'expression des gènes répliqués entre les deux génotypes (**Fig. 40**) et deuxièmement en comparant les voies identifiées par IPA (**Fig. 41**).

La comparaison du transcriptome cardiaque des souris *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT (Analyse A) a identifiée 833 GDE (FDR 1%, FC 20%) et la comparaison du transcriptome cardiaque des souris *Bag3*^{V473M/V473M} vs. WT (Analyse B) a identifiée 999 GDE (FDR 1%, FC 20%). Nous nous sommes intéressés aux GDE répliqués de l'Analyse A dans l'Analyse B qui constituent un pool de 452 (**Fig. 40A**). Les signaux les plus significatifs de cette liste de gènes ont ensuite été analysés avec ClueGO afin d'identifier les voies cellulaires majeures dérégulées à la fois aux stades précoce et tardif de la maladie.

De façon intéressante, une grande proportion des GDE de l'Analyse A sont répliqués au sein de l'Analyse B (452/833 ; 54%) (**Fig. 40A**), confirmé par la réplication en RT-qPCR des signaux communs les plus significatifs (**Fig. 40D**). De plus, l'analyse bio-informatique, identique entre les deux analyses, a permis de mettre en évidence une forte corrélation positive (**** $p < 0.0001$; $r^2 = 0.4123$) entre les deux analyses (**Fig. 340B-C**).

L'analyse d'enrichissement par ClueGO a permis de mettre en évidence des voies associées à l'organisation de la structure de l'actomyosine (P-Value corr.= $4.6 \cdot 10^{-7}$) et à la régulation du phénomène d'anoïkose, un sous-type d'apoptose (P-Value corr.= $5.4 \cdot 10^{-3}$), ayant déjà été associé à la fonction de BAG3 ([Rosati et al. 2011](#), [Luthold et al. 2020](#)) (**Fig. 40D**). On retrouve également la réponse cellulaire au manque de glucose (P-Value corr.= $5.6 \cdot 10^{-3}$) avec l'expression fortement diminuée de *Sik1* (FC=-4.4), une kinase dont l'expression a déjà été montrée comme inversement corrélée à l'accumulation de lipides intra-cellulaires en condition de concentration élevée en glucose ([Zhang et al. 2017](#)).

En ce qui concerne la comparaison des voies identifiées par IPA, 270 voies ont été identifiées dans l'Analyse A et 230 dans l'Analyse B avec un $|Z\text{-score}| > 1$. Associé à la corrélation positive observée entre les deux analyses, près de 90% de ces voies sont répliquées de l'Analyse A vers l'Analyse B (**Fig. 40A**).

L'analyse de trajectoires effectuée sur ces voies communes a permis d'identifier 15 voies dont le $|Z\text{-score}| > 2$ chez les souris *Bag3*^{V473M/wt} et $-1 < Z\text{-score} < 1$ *Bag3*^{V473M/V473M}, suggérant l'implication de ces voies dans la mise en place du phénotype pathologique mais pas dans la

progression de la maladie. Parmi ces voies on retrouve notamment deux grandes fonctions regroupant, d'une part, les voies associées à la régulation du cytosquelette d'actine (« sperm motility » et « RHOA signaling ») et, d'autre part, les voies associées à la signalisation β -adrénergique (« melatonin signaling », « CREB signaling in neurons », « GCPR-mediated nutrient sensing in enteroendocrine cells », « dopamine-DARPP32 feedback in cAMP signaling », « protein kinase A signaling » et « cardiac β -adrenergic signaling ») (**Fig. 41B**).

Finalement, les voies identifiées par IPA retrouvées à la fois à un stade précoce et tardif de la maladie ($|Z\text{-score}| > 2$ dans les deux analyses) sont nombreuses (n=95), ce qui complexifie l'analyse ce résultat. On peut cependant remarquer les voies relatives à la signalisation PPAR (« PPAR α /RXR α activation » et « PPAR signaling ») présentent dans les deux analyses à la fois (**Fig. 41C**).

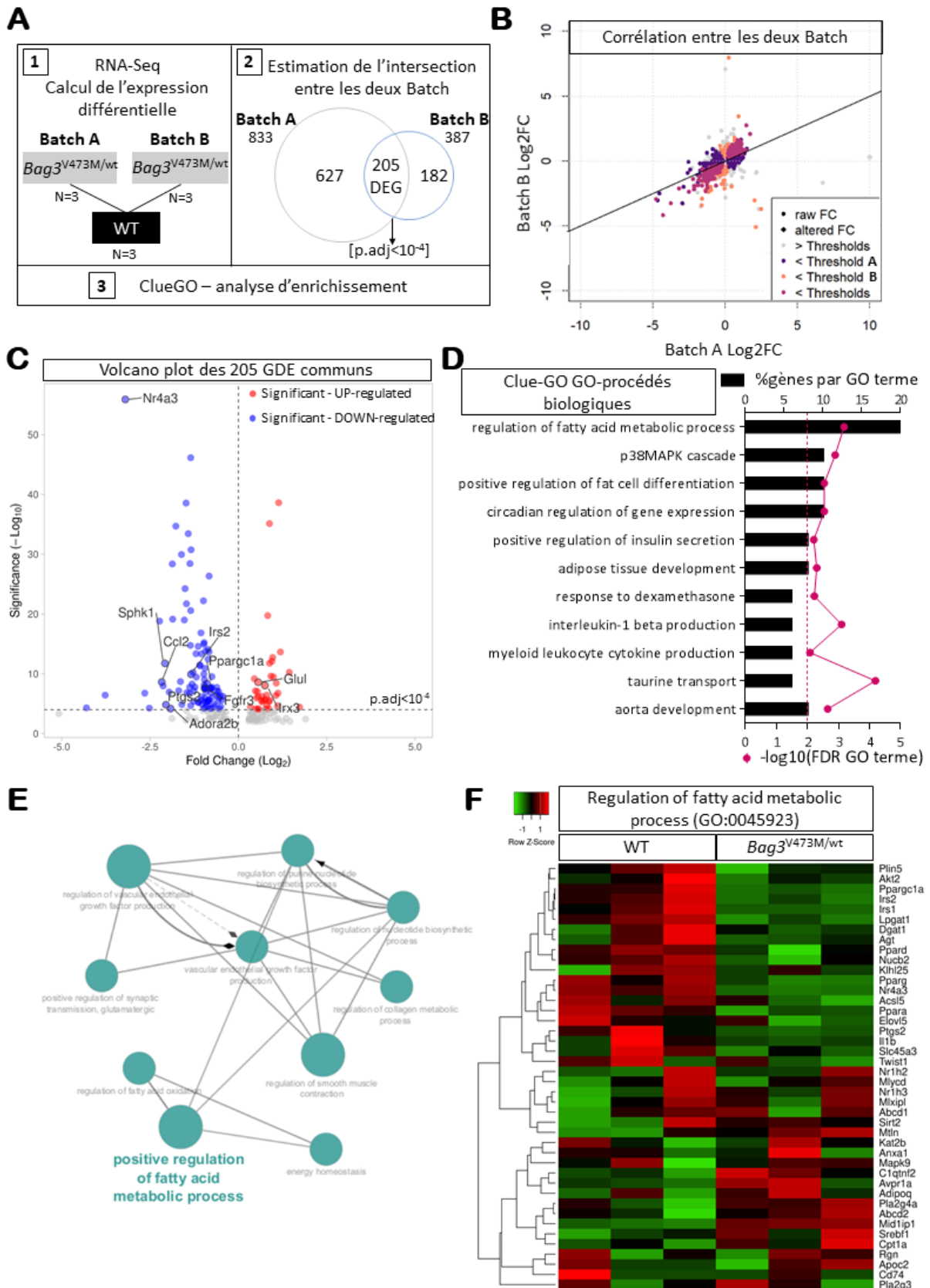


Figure 38. Le transcriptome cardiaque de souris *Bag3*^{V473M/wt} réalisé à un stade précoce de la CMD met en évidence une dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique

Légende Figure 38.

(A) Schéma de l'analyse RNA-Seq. Comparaison du transcriptome cardiaque de 2 groupes indépendants de souris *Bag3*^{V473M/wt} (Analysis A et B) vs. WT âgées de 5 mois, N=3 par groupe. Avec une FDR à 1% et un Fold Change (FC) de 20%, la liste des gènes différentiellement exprimés (GDE) répliqués du Batch A dans le Batch B a ensuite été déterminée. Un seuil de p-value corr.<10⁻⁴ a permis de mettre en évidence 76 gènes par la suite utilisés dans une analyse d'enrichissement. **(B)** Régression linéaire entre les Log2FC du Batch A et B. Les log2FC des gènes avec une baseMean>100 ont été utilisés (test tau de corrélation de Kendall ****p<0.0001). **(C)** Volcano-plot des gènes répliqués entre les deux batch avec un FDR 1% ; les gènes appartenant à la voie de régulation des procédés métaboliques des acides gras sont affichés. **(D)** Analyse d'enrichissement réalisée par Clue-GO (GO-Procédés Biologiques) sur les gènes répliqués entre les deux analyses ; un FDR 1% a été appliqué. **(E)** Représentation en réseau du groupe avec la p-value la plus significative identifiée lors de l'analyse d'enrichissement par Clue-GO. Les termes GO sont regroupés selon un réseau fonctionnel d'interaction, chaque nœud représente un terme et la taille du nœud est corrélée au %gènes par GO terme. **(F)** Heat-map du terme GO:0045923 représentant l'ensemble des gènes du terme identifiés dans l'analyse du transcriptome cardiaque des souris *Bag3*^{V473M/wt} vs. WT.

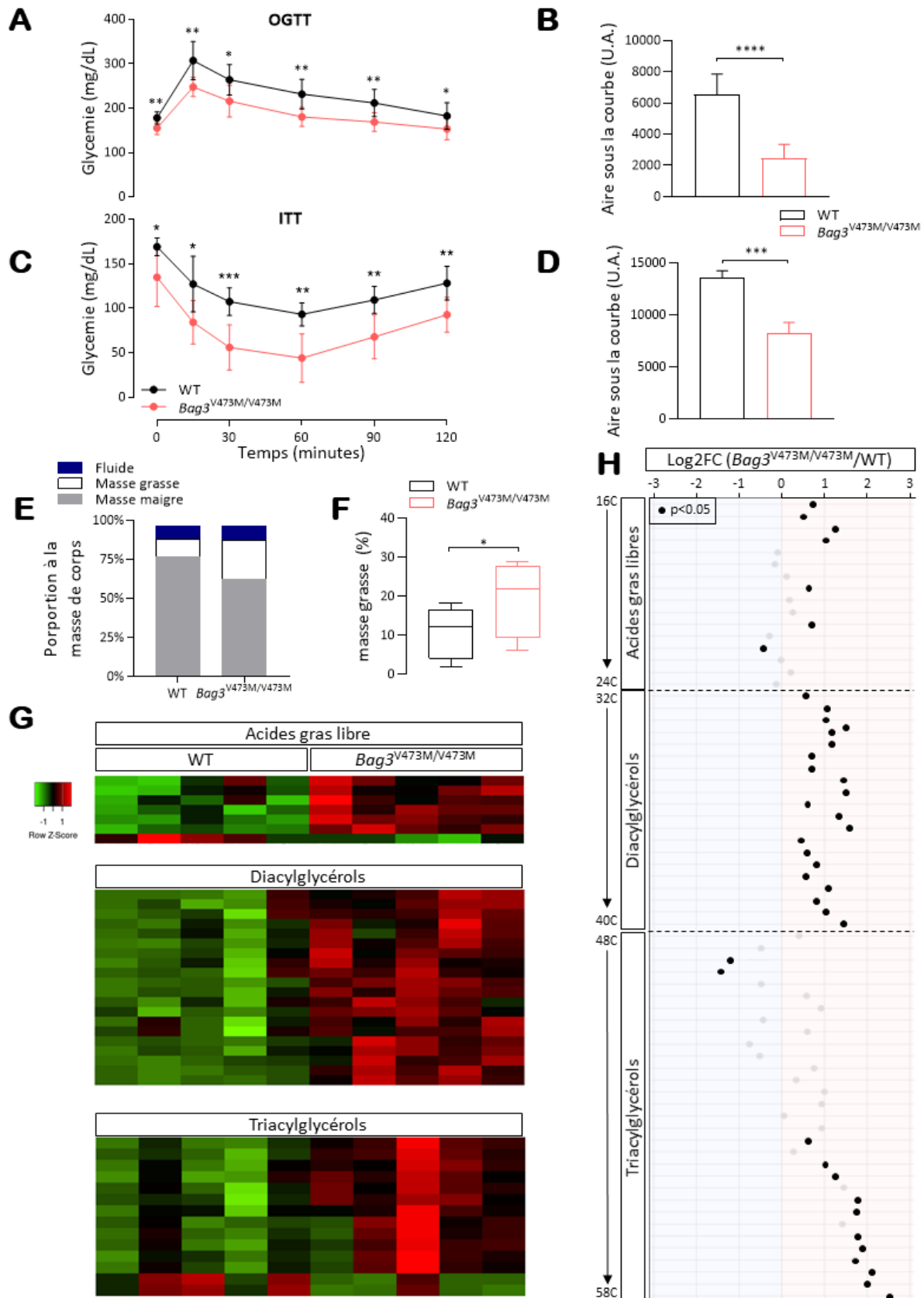


Figure 39. La mutation *Bag3*-V473M engendre une hypoglycémie, une meilleure sensibilité à l'insuline et une signature lipidique cardiaque enrichie chez les souris mutées.

Légende Figure 39.

(A) Test de tolérance au glucose (OGTT) et **(C)** à l'insuline (ITT) chez les souris WT et *Bag3*^{V473M/V473M} âgées de 5 mois après 5h de jeûne. Quantification de l'aire sous la courbe pour **(B)** l'OGTT et **(D)** l'ITT (n=4-9 souris par groupe ; test t de Student ***p<0.001 ****p<0.0001). **(E)** Pourcentage de fluide, masse grasse et masse maigre, par rapport à la masse du corps, dans chaque groupe à l'âge de 5 mois (n=6-11 souris par groupe). **(F)** Quantification du pourcentage de masse grasse. Les données sont représentées selon la moyenne ± SD; *p<0.05 par le test t de Student. **(G)** Heat-map des espèces identifiées par lipidomique réalisée sur tissus cardiaques de souris WT et *Bag3*^{V473M/V473M} âgées de 5 mois (n=5 souris par groupe). **(H)** Dot-plot représentant le Log2FC entre les souris WT et *Bag3*^{V473M/V473M} pour chaque espèce identifiée. Les espèces sont réparties par groupe et sont triées par ordre décroissant selon la longueur de la chaîne carbonée. Les points noirs représentent les espèces pour lesquelles la p-value associée est inférieure à 0.05.

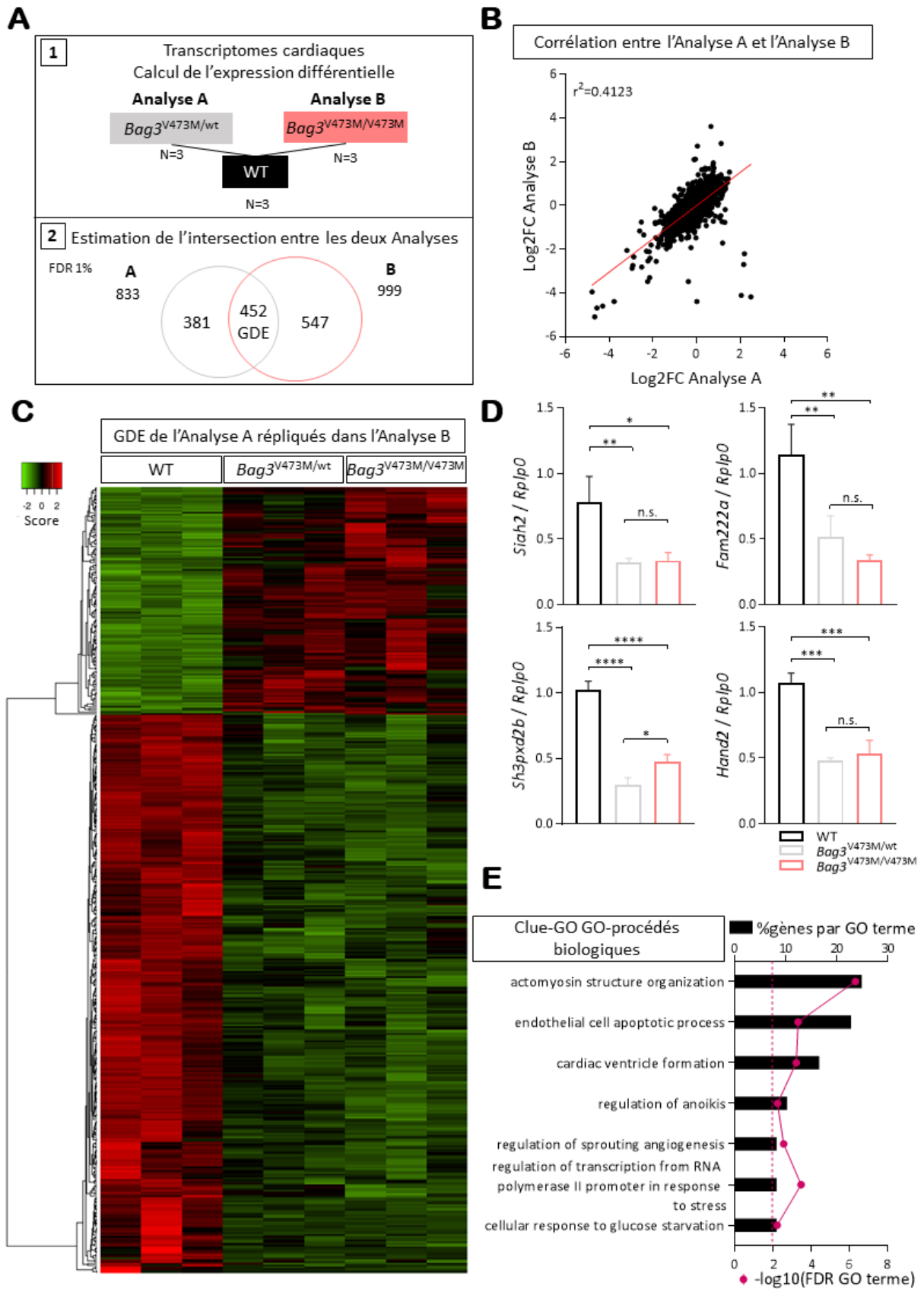


Figure 40. Analyse de trajectoires basées sur l'expression différentielle des gènes

Légende Figure 40.

(A) Schéma de l'analyse RNA-Seq. Comparaison du transcriptome cardiaque de souris *Bag3*^{V473M/wt} (Analysis A) et *Bag3*^{V473M/V473M} vs. WT (Analysis B) âgées de 5 mois, N=3 par groupe. Avec une FDR à 1%, la liste des gènes différentiellement exprimés (GDE) répliqués de l'Analyse A dans l'Analyse B a ensuite été déterminée. **(B)** Régression linéaire entre les Log2FC de l'Analyse A et B. Une corrélation positive est observée avec un $r^2=0.4123$; $p<0.0001$. **(C)** Heat-map des 452 GDE répliqués à partir du comptage normalisé des reads associés à chaque gène. **(D)** Quantifications de l'expression des transcrits de *Siah2*, *Fam222a*, *Sh3pxd2b* et *Hand2* normalisée par rapport au niveau d'expression de *Rplp0*. Les signaux répliqués les plus forts ont été utilisés pour répliquer et valider les résultats des transcriptomes cardiaques en RT-qPCR (p-values calculées par ANOVA 1-facteur, les comparaisons deux à deux ont ensuite été réalisées par le test de Tukey; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$). **(E)** Analyse d'enrichissement réalisée par Clue-GO (GO-Procédés Biologiques) sur les gènes répliqués entre les deux analyses.

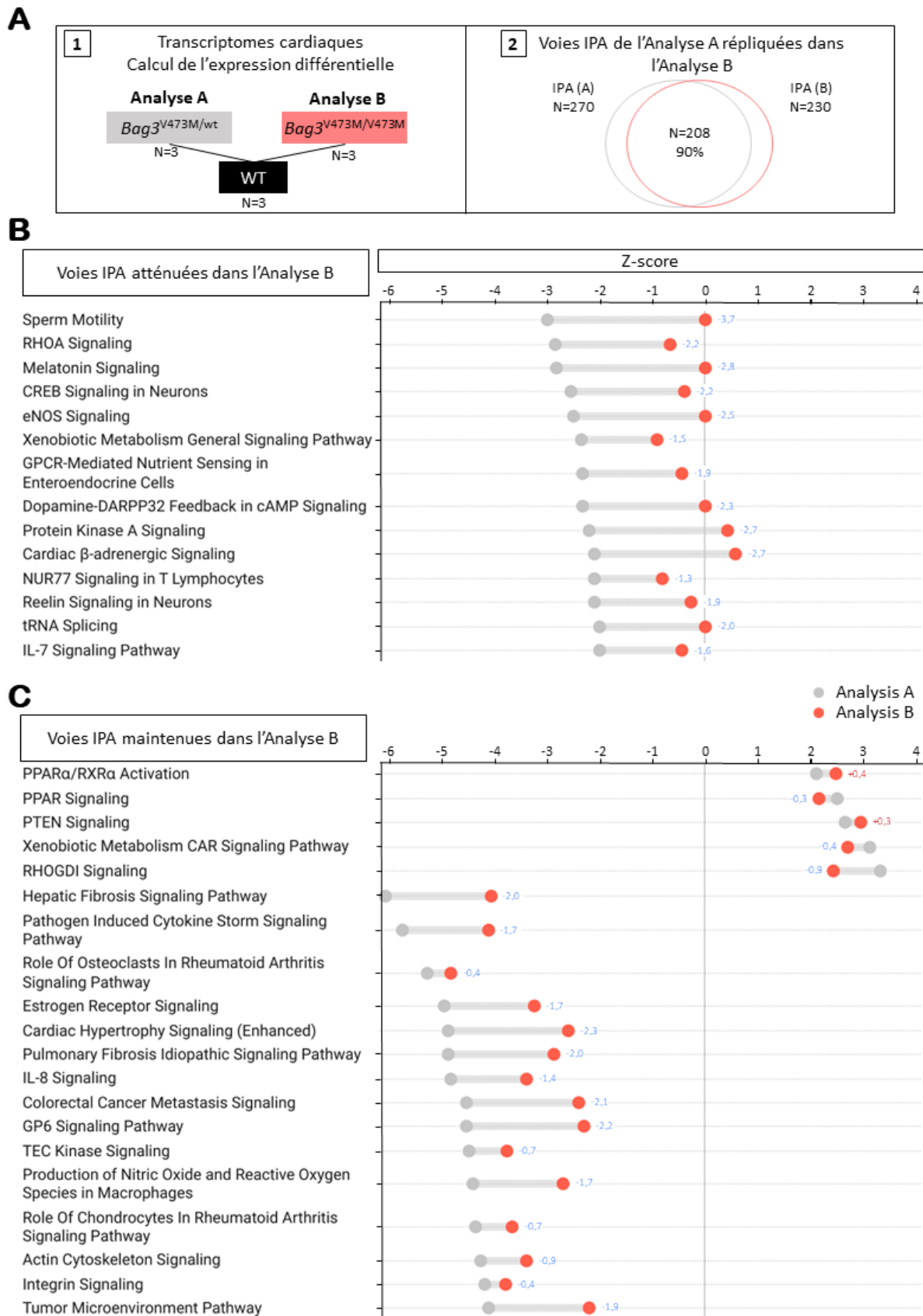


Figure 41. Analyse de trajectoire basée sur les voies identifiées par IPA

Légende Figure 41.

(A) Schéma de l'analyse RNA-Seq. Comparaison du transcriptome cardiaque de souris *Bag3*^{V473M/wt} (Analysis A) and *Bag3*^{V473M/V473M} vs. WT (Analysis B) âgées de 5 mois, N=3 par groupe. Une analyse IPA (Ingenuity Analysis Pathway) a été effectuée pour chaque comparaison sur les gènes différentiellement exprimés (FC 20% p-adj<0.05). Les voies identifiées par IPA ($|Z\text{-score}| > 1$), répliquées de l'analyse A vers l'Analyse B ont ensuite été identifiées. **(B)** Dot-plot représentant les voies IPA répliquées pour lesquelles la valeur absolue du Z-score était supérieure à 2 dans l'Analyse A et se retrouve inférieure à 1 dans l'Analyse B, ou bien **(C)** pour lesquelles la valeur absolue du Z-score reste supérieure à 2 dans les deux Analyses.

PROJET II : Evaluation de l'effet thérapeutique de la surexpression de *Bag3* dans un modèle murin de CMD d'origine génétique

I. Introduction

La cardiomyopathie dilatée représente un groupe de maladies génétiquement très hétérogènes, avec près de 50 gènes ayant été associés au développement de la maladie, chacun présentant lien physiopathologique plus ou moins avéré avec la CMD. Parmi les gènes classifiés comme définitivement associés à la cardiomyopathie dilatée, on retrouve notamment le gène *LMNA* codant pour les composants de la lamine nucléaire (laminines A/C). Les pathologies causées par des mutations de ce gène sont appelées laminopathies. Elles entraînent notamment une atteinte des muscles striés squelettiques et/ou cardiaque et les mécanismes physiopathologiques associés restent encore mal compris.

Un des modèles le plus étudié de laminopathies est la lignée murine porteuse de la mutation *Lmna*^{H222P/H222P}, identifiée dans des cas familiaux de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss. Les souris mutées présentent une atteinte musculaire, affectant leur motricité, et développent une CMD conduisant *in fine* à la mort des souris mâles vers l'âge de 9 mois (Arimura *et al.* 2005). L'étude dans ce modèle des mécanismes physiopathologiques sous-jacents pointe notamment vers une hyperactivation de la signalisation mTOR et une altération de l'autophagie. Ainsi, il a été montré qu'une inhibition de cette signalisation permettait d'améliorer la fonction cardiaque chez les souris mutées, notamment via une activation de l'autophagie (Choi *et al.* 2012).

Compte tenu du rôle majeur que BAG3 exerce dans l'autophagie, nous avons cherché à savoir si une surexpression de *BAG3* au niveau cardiaque chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P} permettrait de stopper ou reverser le phénotype de CMD observé dans ce modèle.

Pour cela, des souris mâles *Lmna*^{H222P/H222P} ont été injectées 3 jours après leur naissance avec un AAV9 cardio-spécifique exprimant soit l'ADNc du gène *BAG3* humain (AAV_Hs-BAG3) ou la GFP (AAV_GFP) sous le contrôle du promoteur *TNNT2*. L'expression des transgènes a ensuite été confirmée avant de procéder à l'évaluation fonctionnelle de la fonction cardiaque au sein de ces groupes.

Les résultats obtenus pour ce projet sont présentés ci-dessous.

II. Résultats

L'expression des transgènes (Hs-BAG3 et GFP) a été confirmée dans le muscle cardiaque des souris injectées à J-3 respectivement avec l'un des AAV au niveau transcriptionnel et protéique (**Fig. 42A-C**). De façon inattendu, l'analyse des caractéristiques et des paramètres échocardiographiques montre que les souris *Lmna*^{H222P/H222P} injectées avec l'AAV_Hs-BAG3 ont un taux de survie abaissée (AAV_Hs-BAG3 : 20% vs. AAV_GFP : 100% à 6 mois ; p=0.0028) ainsi que des signes précoces d'insuffisance cardiaque dès l'âge de 6 semaines, comparé à 12 semaines pour les contrôles (AAV_GFP ; N.I. non injectées). La fonction cardiaque des souris *Lmna*^{H222P/H222P} injectées avec l'AAV_Hs-BAG3 continue de se détériorer avec le temps (AAV_Hs-BAG3 : 29±5% vs. AAV_GFP : 41±3% à 2,5 mois ; p<0.0001) jusqu'au décès des animaux (**Fig. 42D-F**).

En se basant sur les conséquences sévères au niveau cardiaque engendrées par la déficience globale en lamine A/C dans un modèle murin (*Lmna* KO), nous avons alors émis l'hypothèse que la lamine mutée serait un substrat de l'autophagie dépendante de BAG3. Ainsi, la surexpression de *BAG3* dans le modèle murin *Lmna*^{H222P/H222P} entrainerait une augmentation de la dégradation de la lamine A/C qui conduirait à terme à une déficience globale de la protéine, mimant ainsi le phénotype sévère du modèle *Lmna* KO.

Cependant, la quantification de l'expression protéique de la lamine A/C entre les différents groupes (AAV_Hs-BAG3 : 0.6±0.3 vs. AAV_GFP : 1.1±0.5 ; p=0.0504 or vs. N.I. : 0.4±0.2 ; p=0.6559) n'a pas permis de mettre en évidence une diminution de cette protéine en présence du transgène Hs-BAG3 dans les souris *Lmna*^{H222P/H222P} injectées (**Fig. 42G-H**).

Ainsi, ce projet aura permis de mettre en évidence un important effet négatif de l'expression cardio-spécifique du transgène Hs-BAG3 sur la survie et la fonction cardiaque des souris *Lmna*^{H222P/H222P}, non associé à une augmentation de la dégradation de la lamine A/C. La thérapie génique utilisant le gène *BAG3* est actuellement étudiée pour lutter contre l'insuffisance cardiaque. Ainsi, il serait pertinent de poursuivre l'étude des mécanismes sous-jacents à ce résultat inattendu.

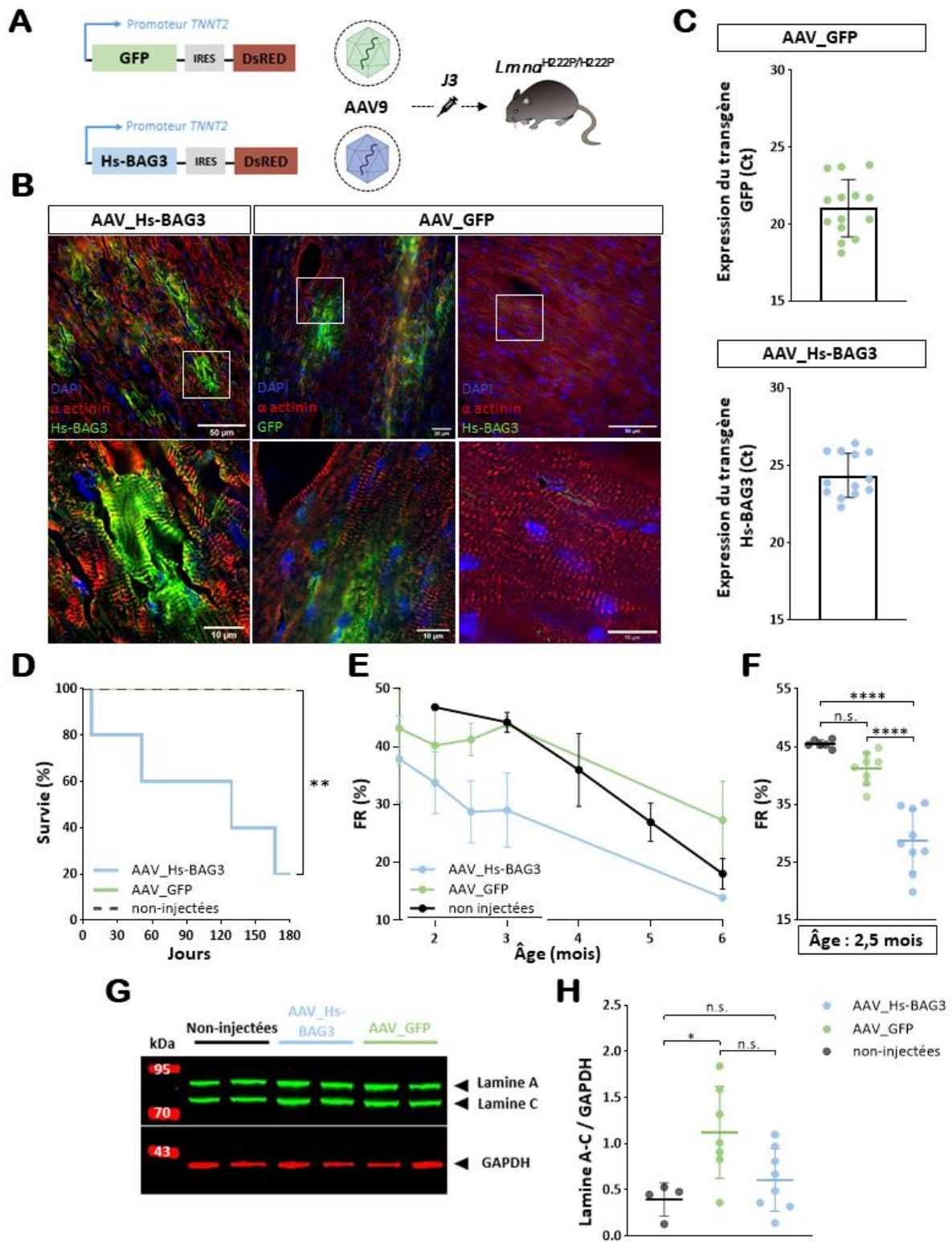


Figure 42. L'expression cardio-spécifique de BAG3 exacerbe l'insuffisance cardiaque dans le modèle de CMD murin *Lmna*H222P/H222P

Légende Figure 42.

(A) Représentation schématique du plan expérimental. **(B)** Immunofluorescences mettant en évidence l'expression des transgènes réalisées sur coupes de tissus ventriculaires de souris injectées respectivement soit avec l'AAV_Hs-BAG3 ou l'AAV_GFP. **(C)** Expression transcriptionnelle des transgènes chez les souris injectées, les niveaux d'expression représentent les Ct obtenus en RT-qPCR pour chacun des groupes (N=13-14). **(D)** Courbes de survie respective pour chacun des groupe (N=4-6) ; test du log-rank (Mantel-Cox) AAV_Hs-BAG3 vs. AAV_GFP/N.I. **p=0.0028. **(E)** Mesures de fraction de raccourcissement (%FR) obtenues par échocardiographies dans les différents groupes de souris âgées de 1,5 à 6 mois (N=1-9). **(F)** Quantification du %FR à 2,5 mois (N=6-9) ; ANOVA 1 facteur ****p<0.0001, comparaisons multiples avec le test de Tukey AAV_Hs-BAG3 vs. AAV_GFP ****p<0.0001, AAV_Hs-BAG3 vs. N.I. ****p<0.0001, AAV_GFP vs. N.I. p=0.1172. **(G)** Western blot représentatif de la lamine A/C et la gapdh. **(H)** Quantification du niveau d'expression de la lamine A/C rapporté à celui de la gapdh chez les différents groupes (N=4-8), ANOVA 1 facteur *p=0.0156, comparaisons multiples avec le test de Tukey AAV_Hs-BAG3 vs. AAV_GFP p=0.0504, AAV_Hs-BAG3 vs. N.I. p=0.6559, AAV_GFP vs. N.I. *p=0.0221. Les données sont représentées selon la moyenne \pm SD.

DISCUSSION

Discussion

Conséquences fonctionnelles de la mutation *Bag3*-V473M

Nous avons généré un nouveau modèle murin qui récapitule le phénotype de la cardiomyopathie dilatée, y compris le dimorphisme sexuel observé chez l'homme. Les mutations pénétrantes du gène *BAG3* chez l'homme sont exclusivement retrouvées à l'état hétérozygote avec un mode de transmission autosomique dominant (Richard *et al.* 2018), laissant supposer que les mutations pénétrantes à l'état homozygotes ne sont pas viables. Notre modèle, à la différence d'autres modèles murins génétiques de CMD, présente un phénotype pathologique chez les deux génotypes de souris mutées avec une sévérité dépendante du nombre de copie de la mutation.

Dans ce travail, la lignée murine knock-in (KI) de la mutation V473M du domaine BAG de *Bag3*, orthologue de la mutation V468M provoquant une CMD chez l'homme, nous a permis d'étudier les mécanismes de mise en place de la maladie chez les animaux mutés. Chez les mâles homozygotes, les premiers signes d'une dysfonction cardiaque apparaissent dès l'âge de 2 mois et sont décalés dans le temps d'environ 3 mois pour les hétérozygotes et les femelles. Le modèle murin KI de la mutation E445K du domaine BAG publié précédemment est très similaire à notre modèle d'un point de vue conceptuel. Cependant, contrairement à notre modèle qui ne présente pas de retard de croissance ou de mortalité précoce, la mutation *Bag3*-E455K conduit à une mort prématurée chez les souris homozygotes environ 3 semaines après la naissance, et présente donc les mêmes limites rapportées pour les modèles KO complet de *Bag3* (Homma *et al.* 2006, Fang *et al.* 2017). L'analyse par cristallographie du résidu Glu⁴⁵⁵ a révélé un rôle central de cet acide aminé dans la l'interaction BAG3-HSP70, ce qui est en accord avec le phénotype sévère observé chez le modèle murin KI *Bag3*^{E455K} (Sondermann *et al.* 2001, Villard *et al.* 2011). Compte tenu que le résidu Val⁴⁶⁸ ne semble impliqué que marginalement dans l'interaction entre BAG3 et HSP70, et que la mutation V468M n'induit pas de changement de charge, comme c'est le cas pour la mutation E455K, nous avons anticipé avec succès un effet moins sévère de cette substitution. Notre modèle *Bag3*-V473M représente donc une bonne opportunité d'identifier les voies dérégulées aux stades précoce et tardif de la CMD et, en particulier, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés aux mutations du domaine BAG de BAG3.

Apports et limites des autres modèles *Bag3*

Les modèles murins knock-out (KO) connus de *Bag3* (également appelé Cair1 et Bis) sont létaux dans la période post-natale de 3 à 4 semaines (Homma *et al.* 2006, Youn *et al.* 2008, Fang *et al.* 2017). Ainsi, afin de retarder l'apparition de la maladie ou d'atténuer les symptômes associés, des modèles murins avec un phénotype restreint au niveau cardiaque ou inductible ont été générés (Fang *et al.* 2017, Myers *et al.* 2018, Yun *et al.* 2021, Yang *et al.* 2022), limitant toutefois la portée translationnelle des résultats observés par la construction génétique restrictive ou complexe de ces modèles, très éloignée de ce qui est observé chez l'homme (Qu *et al.* 2022).

Les modèles murins complets KO *Bag3*, malgré certaines divergences phénotypiques encore débattues, semblent présenter des altérations des muscles striés squelettiques et cardiaque ainsi que des troubles métaboliques conduisant à un déficit nutritionnel sévère et à une mort précoce des animaux (Homma *et al.* 2006, Youn *et al.* 2008, Fang *et al.* 2017). Un phénotype similaire a également été décrit dans un modèle de drosophile lorsque l'orthologue du gène *BAG3*, la starvin, est invalidé (Coulson *et al.* 2005). Les modèles KO cardiaques restreints (cKO) et/ou inductibles présentent une dilatation des cavités cardiaques et réduction progressive de la fonction systolique avec le développement d'une insuffisance cardiaque vers l'âge de 3 mois, démontrant clairement le rôle cardioprotecteur de *Bag3* (Fang *et al.* 2017, Myers *et al.* 2018, Yun *et al.* 2021, Yang *et al.* 2022).

Etant donné que les mutations faux-sens de *BAG3* responsables de CMD clustérisent dans l'exon 4 codant le domaine BAG, les modèles murins KO pourraient ne pas reproduire la spécificité potentielle associée aux mutations de ce domaine. Savoir si l'haploinsuffisance et la perte de fonction du domaine BAG, toutes deux conduisant à un phénotype indiscernable de CMD chez l'homme, mettent en jeu les mêmes mécanismes physiopathologiques pourrait être d'une importance majeure à l'aube de l'ère des thérapies géniques. Puisque que l'expression de *BAG3* a été retrouvée diminuée chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque (Feldman *et al.* 2014), il a été démontré que l'apport supplémentaire de cette protéine par thérapie génique préservait la fonction cardiaque dans des modèles *in vivo* d'ischémie/reperfusion ou d'insuffisance cardiaque par ligature coronaire (Knezevic *et al.* 2016, Su *et al.* 2016). Une approche similaire pourrait également s'avérer utile pour prévenir la perte de fonction liée à des mutations de *BAG3*. Cependant ce type d'étude devrait porter

une attention particulière à distinguer les potentielles différences résultantes du type de mutations impliquées, haplo-insuffisante versus touchant au domaine BAG de *BAG3*.

Impact de la mutation *Bag3*-V473M sur la protéostasie

Plusieurs études ont montré que ce domaine est à l'origine de l'interaction entre BAG3 et la protéine de choc thermique HSP70 (Colvin *et al.* 2014, Fang *et al.* 2017, McDermott-Roe *et al.* 2019, Johnson *et Gestwicki* 2022). L'altération d'une ou de plusieurs fonctions médiées par l'interaction BAG3-HSP70, la plus décrite étant liée au contrôle de la qualité des protéines (PQC ; protéostasie), pourrait ainsi être à l'origine d'une atteinte cardiaque (Lin *et al.* 2022). Plus précisément, grâce à l'interaction avec HSP70, BAG3 a été décrite comme impliquée dans diverses fonctions liées au PQC et notamment le système de dégradation associé au lysosome, communément appelé autophagie. Cette voie consiste à séquestrer de manière sélective ou non « bulk » une grande variété de composants cytosoliques (protéines, lipides et mitochondries en autres) au sein d'une double membrane qu'on appelle autophagosome. Ces structures vont ensuite fusionner avec les lysosomes et ainsi permettre la dégradation et le recyclage de matériel cytoplasmique, impliqué notamment dans l'apport de nutriments en cas de carence nutritionnelle.

Chez des souris *Bag3*-V473M homozygotes âgées de 5 mois, présentant une insuffisance cardiaque avancée, nous avons d'abord démontré que l'autophagie, à son niveau basal, est altérée. Cependant, lorsque l'on stimule la macroautophagie chez les souris mutées en les soumettant à un jeûne, ce qui a pour conséquence moléculaire l'inhibition de la voie mTOR (mTORC1), on observe au niveau cardiaque une activation de la macroautophagie. Cette observation suggère un rôle de *Bag3* indépendant de l'autophagie « in-bulk » sous le contrôle des voies AMPK/mTOR et conforte son rôle décrit dans l'autophagie spécifique. La fonction décrite de BAG3 sur l'inhibition de mTORC1 ne semble pas altérée dans cette étude. Cela pourrait être dû soit à la fonction normale du domaine *Bag3* WW impliqué dans cette fonction, soit à une inhibition partielle de mTOR limitée à un compartiment cellulaire spatial spécifique, comme décrit précédemment (Kathage *et al.* 2017).

La mutation *Bag3*-V473M entraîne une dérégulation métabolique chez les souris mutées

Notre approche multi-omique, en plus de confirmer une altération de la protéostasie chez les souris *Bag3*-V473M, a permis de mettre en évidence une altération précoce des voies métaboliques qui pourrait participer au déclenchement et à la progression de la maladie.

L'altération du métabolisme énergétique cardiaque est un contributeur connu à l'insuffisance cardiaque (Lopaschuk *et al.* 2021). Dans ce travail, nos résultats suggèrent une altération de la fonction mitochondriale dans la production d'ATP concomitante à une modification du métabolisme lipidique. D'autres expériences sont nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents et comment la perte de fonction du domaine BAG pourrait interagir avec la fonction mitochondriale et le métabolisme énergétique. Pour répondre à la demande élevée en énergie cardiaque, les cardiomyocytes oxydent principalement les lipides, grâce à la bêta-oxydation des acides gras, et le glucose pour alimenter le cycle de Krebs produire de l'ATP au niveau des mitochondries. Étant donné que l'autophagie participe au recyclage et à la disponibilité de nutriments cytosoliques par l'hydrolyse lysosomale (Singh *et Cuervo*, 2011) et qu'elle est également connue pour réguler le métabolisme des lipides (Singh *et al.* 2009), il est tentant de supposer qu'une diminution de l'autophagie liée à la perte de fonction de *Bag3* pourrait affecter l'apport en nutriments au sein de la cellule. Les souris *Bag3-V473M* présentent un doublement de la proportion de masse grasse, et une diminution de l'expression transcriptionnelle de *Ppargc1a* codant pour PGC-1 α , une protéine favorisant notamment la bêta-oxydation des acides gras et le transport d'acides gras libres vers les mitochondries (Dobrzyn *et al.* 2010). L'analyse du lipidome cardiaque des souris *Bag3-V473M* a révélé une accumulation au niveau cardiaque de triglycérides (TAG), de diacylglycérols (DAG) et d'acides gras libres (FFA). Cette observation, associée avec l'expression augmentée des lipases impliquées dans la libération de DAG et FFA à partir de TAG, suggère une altération *a posteriori* de l'utilisation de ces espèces au sein de la cellule chez les souris *Bag3-V473M*.

Une autre hypothèse possible concerne le rôle décrit de BAG3 dans la mitophagie (Tahrir *et al.* 2017, Ren *et al.* 2021). Il a été montré que BAG3 est capable d'être recrutée au niveau des mitochondries et de réguler les niveaux d'expression de parkin/PINK et ainsi faciliter la mitophagie (Schänzer *et al.* 2018, Kapadia *et al.* 2020). De plus, la déficience de BAG3 engendre la diminution de l'expression de parkin et conduit à l'accumulation de mitochondries altérées (Schänzer *et al.* 2018). L'ensemble de ces données suggèrent que la mutation V473M de *Bag3* pourrait entraîner une altération de la mitophagie et ainsi conduire à l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles au sein des cellules. On peut alors supposer que ces mitochondries puissent être également déficiente dans l'utilisation des

substrats énergétiques cardiaque et induire l'accumulation de lipides observée dans notre modèle.

Les tests de tolérance au glucose et à l'insuline réalisés *in vivo* ont permis de mettre en évidence une meilleure réponse au glucose et une plus grande sensibilité à l'insuline. L'ensemble de ces résultats suggèrent un shift d'une consommation de lipides vers une consommation de glucose constitutive d'un déficit énergétique, aujourd'hui bien décrit dans l'insuffisance cardiaque (Lopaschuk *et al.* 2010, 2021). L'autophagie induite par une carence nutritionnelle n'est pas altérée dans notre modèle, ce qui suggère que l'autophagie dépendante de *Bag3* pourrait apporter une quantité substantielle de nutriments aux cardiomyocytes. Une étude similaire a été menée sur des souris mutées portant une mutation du gène codant le phospholamban *Pln*^{R9C} où les auteurs ont évalué les changements du transcriptome cardiaque des souris mutées au cours de la progression du phénotype de CMD vers l'insuffisance cardiaque (Burke *et al.* 2016). Les auteurs ont identifié une signature transcriptomique du métabolisme semblable à ce que nous observons dans notre modèle, ce qui suggère qu'une dérégulation métabolique pourrait être un événement précoce commun à diverses mutations. Cela pourrait avoir une implication importante dans la recherche de stratégies thérapeutiques à large spectre ciblant les causes précoces de l'insuffisance cardiaque.

Amélioration du phénotype de CMD chez les souris *Bag3-V473M/Des-R405W*

De manière très surprenante, lorsque nous croisons notre lignée *Bag3-V473M* avec une lignée *Des-R405W*, associée à la production d'une desmine protéotoxique pro-agrégante responsable de desminopathie humaine, nous observons une amélioration de la fonction cardiaque et des paramètres structuraux dans le cœur des souris *Bag3-V473M/Des-R405W*. L'une des hypothèses envisagées serait que les agrégats formés par la desmine mutée seraient des cargos pris en charge par le complexe *Bag3-HSP70* dans une voie spécifique de l'autophagie, l'agrégophagie. On peut alors imaginer que la prise en charge de la desmine mutée par le complexe *Bag3-HSP70* pourrait entraîner une surcharge de la voie ce qui, d'une part la rendrait dysfonctionnelle et, d'autre part, entraînerait la séquestration des protéines *Bag3* WT et *HSP70* au sein des agrésomes et diminuerait ainsi la quantité de complexe *Bag3-HSP70* disponible au sein de la cellule (notion de « chaperon-trap »).

Au contraire lorsque *Bag3* est muté cela pourrait entraîner une déficience dans la prise en charge de la desmine mutée par le complexe Bag3-HSP70, suite à une perte de liaison partielle avec HSP70 depuis le domaine BAG, et ainsi prévenir l'accumulation protéotoxique de desmine mutée au sein de la cellule.

De façon intéressante, dans notre lignée *Bag3-V473M/Des-R405W*, nous observons une quantité augmentée de desmine ubiquitinylée par rapport aux souris *Des-R405W*, ce qui suggère que les agrégats composés de desmine mutante, non séquestrés dans la machinerie de l'autophagie, pourraient devenir des substrats de BAG1 et donc être orienté vers le système de dégradation médié par le protéasome, l'UPS (Minoia *et al.* 2014, Vermeer *et al.* 2021). On peut imaginer qu'en présence d'une altération de l'interaction Bag3-Hsp70, Bag1 devient plus à même d'interagir avec Hsp70 et ainsi favorise la dégradation par le protéasome. De manière surprenante, la quantité de desmine ubiquitinylée est encore plus importante chez les souris *Bag3-V473M* (non montré), ce qui suggère bien que l'augmentation de l'ubiquitylation de la desmine est spécifique et liée à la mutation *Bag3-V473M*. Le système UPS apparaît alors ici comme un mécanisme adaptatif lors d'une inhibition de l'autophagie. Cependant, le dialogue entre ces deux voies est rarement explicité dans ce sens. En effet, le phénomène décrit dans la littérature concerne davantage une activation de l'autophagie en réponse à une inhibition du protéasome, qui est un système rapidement inactivé par un stress protéotoxique (Thibaudeau *et al.* 2018, Dikic I. 2017). Ainsi, même en présence d'une quantité plus importante de desmine ubiquitinylée chez les souris *Bag3-V473M*, le système de protéasome pourrait être incapable de répondre entièrement à la demande de la cellule en matière de protéostasie, favorisant ainsi la dérégulation du PQC dans ce modèle.

En ce qui concerne l'amélioration de la fonction cardiaque chez les souris *Bag3-V473M* par la mutation *Des-R405W*, cette observation semble provenir de l'addition des effets opposés des deux mutations. En effet, la mutation *Des-R405W* a été associée *in vivo* chez l'homme et la souris à une cardiomyopathie restrictive, alors que la mutation *Bag3-V473M* est associée au développement d'une cardiomyopathie dilatée (Herrmann *et al.* 2020, Villard *et al.* 2011). Ce phénomène a notamment été mis en évidence par la réalisation d'une GWAS chez l'homme qui a permis de mettre en avant des associations impliquant les mêmes SNP/gènes selon les différents sous-types de cardiomyopathies, mais dont les effets sont opposés (Tadros *et al.* 2021).

La thérapie génique par BAG3 aggrave le phénotype de CMD chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P}. Cet effet adverse de la fonction associée à Bag3-WT dans un modèle de CMD d'origine génétique, rappelle l'aggravation du phénotype cardiaque observée suite à la thérapie génique permettant l'expression de la protéine BAG3 humaine dans le modèle murin *Lmna*^{H222P/H222P}. Nous avons alors suggéré comme hypothèse une dégradation accrue de la lamine mutée par le complexe *Bag3*-HSP70 ce qui aurait eu pour conséquence un phénotype plus sévère, similaire à celui observé pour les souris *Lmna* KO (Sullivan *et al.* 1999, Arimura *et al.* 2005). Cependant cette hypothèse a été invalidée suite à la quantification de l'expression protéique de la lamine qui ne montre pas de différence significative entre les souris non-injectées et injectées avec l'AAV codant pour la protéine BAG3 humaine ou la GFP. On peut alors imaginer un mécanisme d'action similaire à celui explicité précédemment. En effet, la suractivation de la voie mTOR mise en évidence chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P} suggère que l'autophagie est altérée dans ce modèle (Choi *et al.* 2012). Ainsi, l'apport de la protéine BAG3-WT et de sa fonction pro-autophagique pourrait induire ici une pression supplémentaire sur un système déjà altéré ce qui, *in fine*, pourrait exacerber l'effet de la mutation *Lmna*-H222P et expliquer l'effet adverse de la thérapie génique par BAG3-WT dans ce modèle. Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer les conséquences de l'expression de la mutation *Bag3*-V473M dans un modèle de laminopathie afin de savoir si les résultats que nous obtenons avec le modèle *Des*-R405W peuvent être répliqués dans un autre modèle de CMD associé à une altération de l'autophagie.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Conclusion & Perspectives

Ce travail de thèse a permis de générer avec succès un nouveau modèle murin récapitulant le phénotype de cardiomyopathie dilatée, y compris le dimorphisme sexuel observé chez l'homme, sans pour autant reproduire les limitations associées au modèle similaire publié précédemment. Ce modèle knock-in exprime la mutation V473M du domaine BAG de Bag3, orthologue de la mutation V468M causant une CMD chez l'homme, qui affecte l'interaction avec la chaperonne HSP70, acteur clé des grandes fonctions de la protéostasie cellulaire. Ce modèle expérimental nous a permis de mettre en évidence certains mécanismes précoces et tardifs impliqués dans le développement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection abaissée.

Dérégulation de la protéostasie et du métabolisme chez les souris *Bag3-V473M*

Les souris mutantes présentent une déficience de la fonction macroautophagique en condition basale, mais pas en condition de carence nutritionnelle induite par un jeûne, indiquant une altération de la macroautophagie spécifique. Des analyses omiques et métaboliques montrent, une fois de plus, une dérégulation de la protéostasie chez les souris KI *Bag3-V473M* mais également une altération métabolique. Dès le stade précoce de la maladie, les souris mutées présentent une altération dans l'utilisation des substrats énergétiques cardiaques en faveur de la glycolyse. Ces résultats suggèrent que la présence de la mutation *Bag3-V473M* conduit à une altération de la macroautophagie spécifique ainsi qu'à une accumulation de lipides associée à un défaut d'utilisation des substrats énergétiques par les mitochondries. BAG3 semble jouer un rôle dans la clairance autophagique des mitochondries endommagées (Tahrir *et al.* 2017). On peut alors supposer que la mitophagie pourrait également être altérée dans notre modèle ce qui aurait pour conséquences l'accumulation de mitochondries endommagées et l'apparition d'un stress oxydatif (Ren *et al.* 2021), ce qui pourrait expliquer l'altération dans l'utilisation des substrats énergétiques cardiaques observée dans notre modèle.

Amélioration du phénotype de CMD chez les souris *Bag3-V473M/Des-R405W*

Nous avons démontré que la co-expression d'une desmine mutée protéotoxique pro-agrégante dans la lignée *Bag3-V473M* améliore de façon surprenante la fonction cardiaque plutôt que d'exacerber le phénotype de CMD. Ces résultats suggèrent que la perte d'interaction Bag3-HSP70 induit par la mutation *Bag3-V473M* est bénéfique en présence d'une desmine mutée. Afin de valider cette hypothèse il serait intéressant d'évaluer l'éventuel

effet thérapeutique des molécules inhibant l'interaction BAG3-HSP70, comme JG-98 et YM-01 (Li *et al.* 2015). Dans un modèle cellulaire exprimant la mutation protéotoxique pro-agrégante BAG3-P209L responsable de myopathie humaine, les mécanismes sous-jacents impliqueraient une séquestration des complexes BAG3-HSP70 au sein des agrégats en présence de la mutation. Comme observé dans notre modèle *Bag3-V473M/Des-R405W*, lorsque l'on inhibe pharmacologiquement l'interaction Bag3-HSP70 dans un modèle cellulaire BAG3-P209L, on prévient la formation d'agrégat (Meister-Broekema *et al.* 2018). On peut alors supposer que la mutation *Des-R405W* pourrait participer au phénomène de « chaperon-trap » et qu'en présence d'une mutation *Bag3-V473M*, on prévient ainsi la formation d'agrégats. Si l'on prévient la formation d'agrégats de desmine mutées en présence de la mutation *Bag3-V473M*, on peut alors supposer que la desmine mutée pourrait devenir un substrat de BAG1 et ainsi être orienté vers d'autres voies de dégradation comme le système UPS. Pour cela, il faudra évaluer la co-localisation de BAG1 avec la desmine mutée et déterminer si une inhibition du protéasome dans la lignée *Bag3-V473M/Des-R405W* provoque une aggravation du phénotype de CMD.

La thérapie génique par BAG3 aggrave le phénotype de CMD chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P}

Nous avons démontré que l'expression de la protéine BAG3 humaine dans un modèle génétique de CMD, ici la ligné murine *Lmna*^{H222P/H222P}, exacerbe de façon inattendue le phénotype de CMD. Puisque la mutation *Bag3-V473M* permet d'améliorer le phénotype de CMD dans un autre modèle murin de CMD d'origine génétique, il serait intéressant de déterminer l'effet de cette mutation au sein du modèle *Lmna*^{H222P/H222P}.

Finalement, ces résultats suggèrent que selon la mutation et les mécanismes sous-jacents associés, l'expression d'une forme sauvage ou mutée de BAG3 peut conduire à la fois à l'aggravation ou à l'amélioration du phénotype de CMD. Il semble donc nécessaire d'identifier les causes précises responsable d'un phénotype pathologique avant d'envisager la thérapie génique impliquant le gène BAG3 comme suggérée par certains auteurs (Kirk *et al.* 2021, Wang *et al.* 2023).

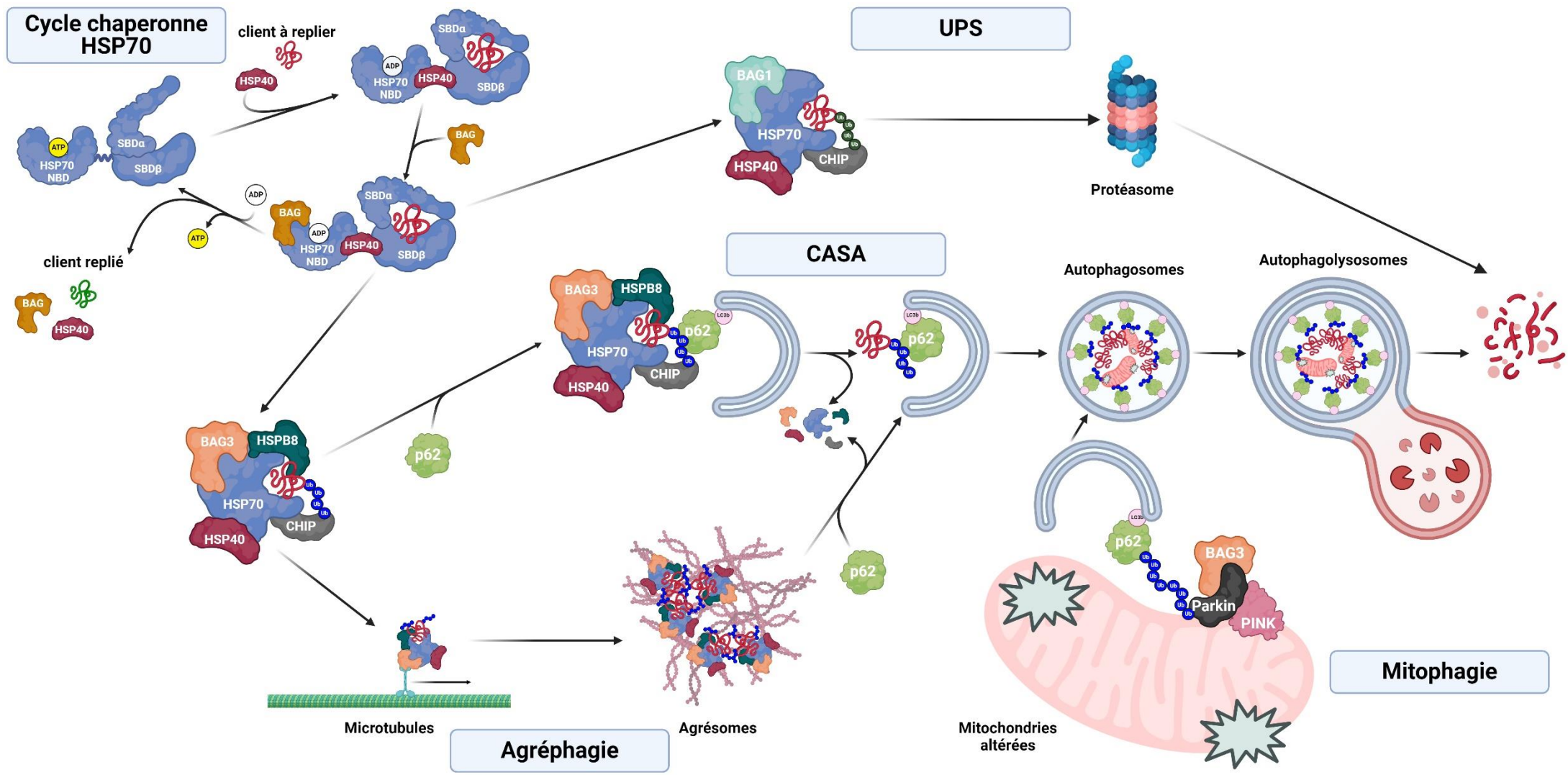


Figure 43. Schéma bilan : les rôles de Bag3 dans l'homéostasie cardiaque en conditions physiologiques

BAG3 et BAG1 sont des co-chaperonnes d'HSP70, favorisant la libération du cargo protéique. Lorsque le client doit être dégradé, et selon la co-chaperonne associée à HSP70, celui-ci va être dirigé vers l'autophagie (BAG3) ou le système UPS (BAG1). BAG3 est impliqué dans plusieurs voies de la macroautophagie sélective, l'autophagie CASA, l'agrèphagie et la mitophagie. Sa fonction permet de prendre en charge et de dégrader les protéines mal repliées, potentiellement protéotoxiques, et les mitochondries endommagées afin de préserver l'homéostasie cellulaire des cardiomyocytes, essentielle pour assurer une fonction cardiaque normale. Schéma créé sur Biorender.com

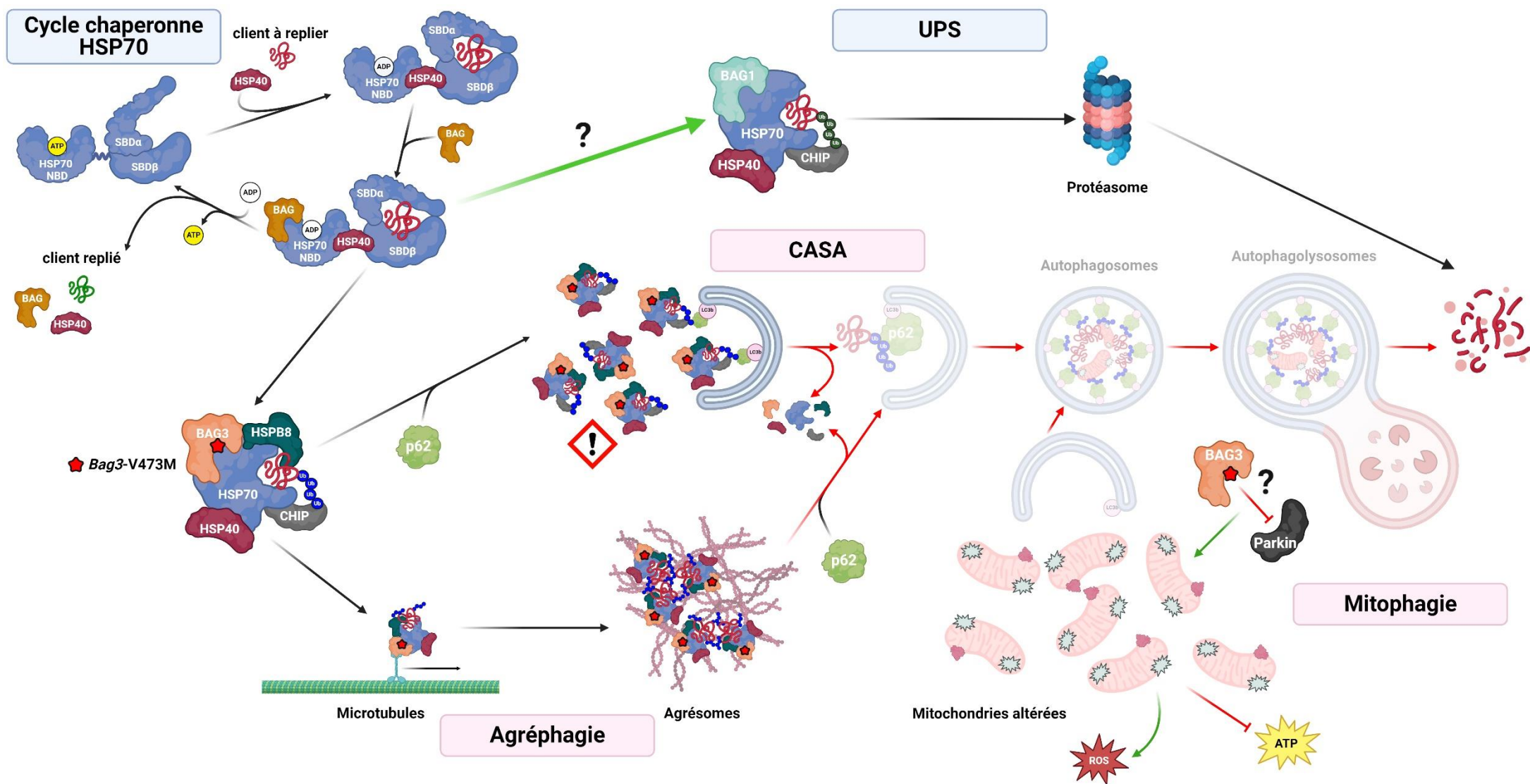


Figure 44. Schéma bilan : impact de la mutation Bag3-V473M sur les rôles de Bag3 dans l'homéostasie cardiaque

BAG3 et BAG1 sont des co-chaperonnes d'HSP70, favorisant la libération du cargo protéique. Lorsque le client doit être dégradé, et selon la co-chaperonne associée à HSP70, celui-ci va être dirigé vers l'autophagie (BAG3) ou le système UPS (BAG1). BAG3 est impliqué dans plusieurs voies de la macroautophagie sélective, l'autophagie CASA, l'agrèphagie et la mitophagie. En présence de la mutation *Bag3-V473M*, la libération du client par HSP70, lorsqu'elle est associée à Bag3, est altérée. Ainsi, cela a pour conséquence une diminution de la délivrance des cargos protéiques à dégrader vers les autophagosomes, entraînant une accumulation des complexes *Bag3-HSP70* associés aux clients ubiquitinylés. Une partie des clients ubiquitinylés, s'ils sont solubles, pourrait être redirigés vers le système UPS via le complexe Bag1-HSP70. La mutation *Bag3-V473M* pourrait également inhiber la fonction de Parkin dans la mitophagie et ainsi conduire à une accumulation de mitochondries altérées au sein des cellules. Cela aurait pour conséquence, d'une part, d'augmenter la production de ROS, et d'autre part, de limiter la fonction mitochondriale dans l'utilisation des substrats énergétiques cardiaques dans la production d'énergie (ATP). Finalement, la mutation *Bag3-V473M* entraîne une altération de la protéostasie et du métabolisme énergétique cardiaque, probablement via une altération de l'activité mitochondriale, compromettant ainsi l'homéostasie des cardiomyocytes conduisant à une fonction cardiaque diminuée. Schéma créé sur Biorender.com

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ababio Y**, Kelly S, Angeli F, Berghout J, Huang K, Liu K, Burns S, Senerchia C, Moccia R, Brooks G. Prevalence and Clinical Burden of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in the United States. *AJM Open*. 2023 Dec. doi.org/10.1016/j.ajmo.2023.100038.
- Adriaenssens E**, Tedesco B, Mediani L, Asselbergh B, Crippa V, Antoniani F, Carra S, Poletti A, Timmerman V. BAG3 Pro209 mutants associated with myopathy and neuropathy relocate chaperones of the CASA-complex to aggresomes. *Sci Rep*. 2020 May 29;10(1):8755. doi: 10.1038/s41598-020-65664-z.
- Akkurt Arslan M**, Kolman I, Pionneau C, Chardonnet S, Magny R, Baudouin C, Brignole-Baudouin F, Kessal K. Proteomic Analysis of Tears and Conjunctival Cells Collected with Schirmer Strips Using timsTOF Pro: Preanalytical Considerations. *Metabolites*. 2021 Dec 21;12(1):2. doi: 10.3390/metabo12010002.
- Ammirante M**, Rosati A, Arra C, Basile A, Falco A, Festa M, Pascale M, d'Avenia M, Marzullo L, Belisario MA, De Marco M, Barbieri A, Giudice A, Chiappetta G, Vuttariello E, Monaco M, Bonelli P, Salvatore G, Di Benedetto M, Deshmane SL, Khalili K, Turco MC, Leone A. IKK γ protein is a target of BAG3 regulatory activity in human tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7497-502. doi: 10.1073/pnas.0907696107.
- An MX**, Li S, Yao HB, Li C, Wang JM, Sun J, Li XY, Meng XN, Wang HQ. BAG3 directly stabilizes Hexokinase 2 mRNA and promotes aerobic glycolysis in pancreatic cancer cells. *J Cell Biol*. 2017 Dec 4;216(12):4091-4105. doi: 10.1083/jcb.201701064.
- Arbelo E**, Protonotarios A, Gimeno JR, Arbustini E, Barriales-Villa R, Basso C, Bezzina CR, Biagini E, Blom NA, de Boer RA, De Winter T, Elliott PM, Flather M, Garcia-Pavia P, Haugaa KH, Ingles J, Jurcut RO, Klaassen S, Limongelli G, Loeys B, Mogensen J, Olivotto I, Pantazis A, Sharma S, Van Tintelen JP, Ware JS, Kaski JP; ESC Scientific Document Group. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2023 Oct 1;44(37):3503-3626. doi: 10.1093/eurheartj/ehad194.
- Arimura T**, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacène E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Amthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan 1;14(1):155-69. doi: 10.1093/hmg/ddi017.
- Arimura T**, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair Z-disc assembly and enhance sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat*. 2011 Dec;32(12):1481-91. doi: 10.1002/humu.21603.
- Arndt V**, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, Fürst DO, Saftig P, Saint R, Fleischmann BK, Hoch M, Höhfeld J. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*. 2010 Jan 26;20(2):143-8. doi: 10.1016/j.cub.2009.11.022.

B

- Babicki S**, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1):W147-53. doi: 10.1093/nar/gkw419.
- Balaban RS**. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Oct;34(10):1259-71. doi: 10.1006/jmcc.2002.2082.

Béhin A, Salort-Campana E, Wahbi K, Richard P, Carlier RY, Carlier P, Laforêt P, Stojkovic T, Maisonobe T, Verschueren A, Franques J, Attarian S, Maues de Paula A, Figarella-Branger D, Bécane HM, Nelson I, Duboc D, Bonne G, Vicart P, Udd B, Romero N, Pouget J, Eymard B. Myofibrillar myopathies: State of the art, present and future challenges. *Rev Neurol (Paris)*. 2015 Oct;171(10):715-29. doi: 10.1016/j.neurol.2015.06.002.

Behl C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Aug;37(8):672-688. doi: 10.1016/j.tips.2016.04.007.

Ben Aicha S, Lessard J, Pelletier M, Fournier A, Calvo E, Labrie C. Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiol Genomics*. 2007 Oct 22;31(2):295-305. doi: 10.1152/physiolgenomics.00097.2007.

Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009 Apr 15;25(8):1091-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.

Bondue A, Arbustini E, Bianco A, Ciccarelli M, Dawson D, De Rosa M, Hamdani N, Hilfiker-Kleiner D, Meder B, Leite-Moreira AF, Thum T, Tocchetti CG, Varricchi G, Van der Velden J, Walsh R, Heymans S. Complex roads from genotype to phenotype in dilated cardiomyopathy: scientific update from the Working Group of Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2018 Aug 1;114(10):1287-1303. doi: 10.1093/cvr/cvy122.

Bouhy D, Juneja M, Katona I, Holmgren A, Asselbergh B, De Winter V, Hochepped T, Goossens S, Haigh JJ, Libert C, Ceuterick-de Groote C, Irobi J, Weis J, Timmerman V. A knock-in/knock-out mouse model of HSPB8-associated distal hereditary motor neuropathy and myopathy reveals toxic gain-of-function of mutant Hspb8. *Acta Neuropathol*. 2018 Jan;135(1):131-148. doi: 10.1007/s00401-017-1756-0.

Bozkurt B, et al. Universal definition and classification of heart failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure: Endorsed by the Canadian Heart Failure Society, Heart Failure Association of India, Cardiac Society of Australia and New Zealand, and Chinese Heart Failure Association. *Eur J Heart Fail*. 2021 Mar;23(3):352-380. doi: 10.1002/ejhf.2115.

Bracher A, Verghese J. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci*. 2015 Apr 7;2:10. doi: 10.3389/fmolb.2015.00010.

Brandão M, Bariani R, Rigato I, Bauce B. Desmoplakin Cardiomyopathy: Comprehensive Review of an Increasingly Recognized Entity. *J Clin Med*. 2023 Apr 3;12(7):2660. doi: 10.3390/jcm12072660.

Brenner CM, Choudhary M, McCormick MG, Cheung D, Landesberg GP, Wang JF, Song J, Martin TG, Cheung JY, Qu HQ, Hakonarson H, Feldman AM. BAG3: Nature's Quintessential Multi-Functional Protein Functions as a Ubiquitous Intra-Cellular Glue. *Cells*. 2023 Mar 19;12(6):937. doi: 10.3390/cells12060937.

Bruno AP, Festa M, Dal Piaz F, Rosati A, Turco MC, Giuditta A, Marzullo L. Identification of a synaptosome-associated form of BAG3 protein. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(19):3104-5. doi: 10.4161/cc.7.19.6774.

Burke MA, Chang S, Wakimoto H, Gorham JM, Conner DA, Christodoulou DC, Parfenov MG, DePalma SR, Eminaga S, Konno T, Seidman JG, Seidman CE. Molecular profiling of dilated cardiomyopathy that progresses to heart failure. *JCI Insight*. 2016 May 5;1(6):e86898. doi: 10.1172/jci.insight.86898.

C

Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016 Sep 15;6(3):70-80.

Cappola TP, Li M, He J, Ky B, Gilmore J, Qu L, Keating B, Reilly M, Kim CE, Glessner J, Frackelton E, Hakonarson H, Syed F, Hindes A, Matkovich SJ, Cresci S, Dorn GW 2nd. Common variants in HSPB7 and FRMD4B associated with advanced heart failure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Apr;3(2):147-54. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.109.898395.

Cappola TP, Matkovich SJ, Wang W, van Booven D, Li M, Wang X, Qu L, Sweitzer NK, Fang JC, Reilly MP, Hakonarson H, Nerbonne JM, Dorn GW 2nd. Loss-of-function DNA sequence variant in the CLCNKA chloride channel implicates the cardio-renal axis in interindividual heart failure risk variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 8;108(6):2456-61. doi: 10.1073/pnas.1017494108.

Carra S, Seguin SJ, Landry J. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*. 2008 Feb;4(2):237-9. doi: 10.4161/auto.5407.

Cassani M, Fernandes S, Vrbsky J, Ergir E, Cavalieri F, Forte G. Combining Nanomaterials and Developmental Pathways to Design New Treatments for Cardiac Regeneration: The Pulsing Heart of Advanced Therapies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Apr 24;8:323. doi: 10.3389/fbioe.2020.00323.

Cesaro E, Montano G, Rosati A, Crescitelli R, Izzo P, Turco MC, Costanzo P. WT1 protein is a transcriptional activator of the antiapoptotic bag3 gene. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1204-6. doi: 10.1038/leu.2010.68.

Chen X, Htet ZM, López-Alfonzo E, Martin A, Walters KJ. Proteasome interaction with ubiquitinated substrates: from mechanisms to therapies. *FEBS J*. 2021 Sep;288(18):5231-5251. doi: 10.1111/febs.15638. Epub 2020 Dec 11.

Chiappetta G, Basile A, Barbieri A, Falco A, Rosati A, Festa M, Pasquinelli R, Califano D, Palma G, Costanzo R, Barcaroli D, Capunzo M, Franco R, Rocco G, Pascale M, Turco MC, De Laurenzi V, Arra C. The anti-apoptotic BAG3 protein is expressed in lung carcinomas and regulates small cell lung carcinoma (SCLC) tumor growth. *Oncotarget*. 2014 Aug 30;5(16):6846-53. doi: 10.18632/oncotarget.2261.

Choi JC, Muchir A, Wu W, Iwata S, Homma S, Morrow JP, Worman HJ. Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Sci Transl Med*. 2012 Jul 25;4(144):144ra102. doi: 10.1126/scitranslmed.3003875.

Colvin TA, Gabai VL, Gong J, Calderwood SK, Li H, Gummuluru S, Matchuk ON, Smirnova SG, Orlova NV, Zamulaeva IA, Garcia-Marcos M, Li X, Young ZT, Rauch JN, Gestwicki JE, Takayama S, Sherman MY. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res*. 2014 Sep 1;74(17):4731-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0747.

Coulson M, Robert S, Saint R. *Drosophila* starvin encodes a tissue-specific BAG-domain protein required for larval food uptake. *Genetics*. 2005 Dec;171(4):1799-812. doi: 10.1534/genetics.105.043265.

Crippa V, Sau D, Rusmini P, Boncoraglio A, Onesto E, Bolzoni E, Galbiati M, Fontana E, Marino M, Carra S, Bendotti C, De Biasi S, Poletti A. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum Mol Genet*. 2010 Sep 1;19(17):3440-56. doi: 10.1093/hmg/ddq257.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jul 13;12(8):535-41. doi: 10.1038/nrm3150. PMID: 21750569.

D

Damiani V, Lamolinara A, Cicalini I, Cufaro MC, Del Pizzo F, Di Marco F, Del Boccio P, Dufrusine B, Hahne M, Lattanzio R, Pieragostino D, Iezzi M, Federici M, Turco MC, Maiorana A, Dionisi-Vici C, De Laurenzi V. Pancreatic beta-cell specific BAG3 knockout results in chronic hyperinsulinemia inducing insulin resistance. *Mol Metab*. 2023 Aug;74:101752. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101752.

De Marco M, Basile A, Iorio V, Festa M, Falco A, Ranieri B, Pascale M, Sala G, Remondelli P, Capunzo M, Firpo MA, Pezzilli R, Marzullo L, Cavallo P, De Laurenzi V, Turco MC, Rosati A. Role of BAG3 in cancer progression: A therapeutic opportunity. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Jun;78:85-92. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.049.

De Marco M, Falco A, Reppucci F, Marzullo L, Rosati A, Armentaro G, Minniti A, Iannone C, Del Papa N, Caporali R, Turco MC. POS0624 BAG3 PROTEIN: A PROMISING NOVEL BIOMARKER OF FIBROSIS IN SYSTEMIC SCLEROSIS. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2023;82:585-586.

Derosa G, Maffioli P, Rosati A, De Marco M, Basile A, D'Angelo A, Romano D, Sahebkar A, Falco A, Turco MC. Evaluation of BAG3 levels in healthy subjects, hypertensive patients, and hypertensive diabetic patients. *J Cell Physiol*. 2018 Mar;233(3):1791-1795. doi: 10.1002/jcp.26093.

Di Bona A, Scalco A, Bariani R, Kuperwasser N, Albiero M, David P, Celeghin R, Della Barbera M, Fadini GP, pilichou K, Bauce B, Rizzo S, Thiene G, Pende M, Basso C, Mongillo M, Zaglia T, Generation and phenotyping of a novel knock-in mouse model of desmoplakin-dependent arrhythmogenic cardiomyopathy, ESC Condress, 2021 Aug 30

Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:193-224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.

Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyn A. Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. *J Appl Physiol* (1985). 2010 Dec;109(6):1653-61. doi: 10.1152/jappphysiol.00598.2010.

Domínguez F, Cuenca S, Bilińska Z, Toro R, Villard E, Barriales-Villa R, Ochoa JP, Asselbergs F, Sammani A, Franaszczyk M, Akhtar M, Coronado-Albi MJ, Rangel-Sousa D, Rodriguez-Palomares JF, Jiménez-Jáimez J, Garcia-Pinilla JM, Ripoll-Vera T, Mogollón-Jiménez MV, Fontalba-Romero A, Garcia-Medina D, Palomino-Doza J, de Gonzalo-Calvo D, Cicerchia M, Salazar-Mendiguchia J, Salas C, Pankuweit S, Hey TM, Mogensen J, Barton PJ, Charron P, Elliott P, Garcia-Pavia P; European Genetic Cardiomyopathies Initiative Investigators. Dilated Cardiomyopathy Due to BLC2-Associated Athanogene 3 (BAG3) Mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Nov 13;72(20):2471-2481. doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.2181.

Doong H, Price J, Kim YS, Gasbarre C, Probst J, Liotta LA, Blanchette J, Rizzo K, Kohn E. CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene*. 2000 Sep 7;19(38):4385-95. doi: 10.1038/sj.onc.1203797.

Doong H, Vrilaas A, Kohn EC. What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett*. 2002 Dec 15;188(1-2):25-32. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00456-1.

D'souza RS, Levandowski C, Slavov D, Graw SL, Allen LA, Adler E, Mestroni L, Taylor MR. Danon disease: clinical features, evaluation, and management. *Circ Heart Fail*. 2014 Sep;7(5):843-9. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001105.

Du CK, Morimoto S, Nishii K, Minakami R, Ohta M, Tadano N, Lu QW, Wang YY, Zhan DY, Mochizuki M, Kita S, Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Iwamoto T, Ohtsuki I, Sasaguri T. Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. *Circ Res*. 2007 Jul 20;101(2):185-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.106.146670.

du Toit A, Hofmeyr JS, Gniadek TJ, Loos B. Measuring autophagosome flux. *Autophagy*. 2018;14(6):1060-1071. doi: 10.1080/15548627.2018.1469590.

Du XJ. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 15;63(3):510-9. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.027.

Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011 Jun 8;474(7350):179-83. doi: 10.1038/nature10137.

E

Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2008 Jan;29(2):270-6. doi: 10.1093/eurheartj/ehm342.

Elliott P, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. 2004 Jun 5;363(9424):1881-91. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16358-7.

Emanuele E, Minoretta P, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H, Yilmaz Y, Garatachea N, Lucia A. Can enhanced autophagy be associated with human longevity? Serum levels of the autophagy biomarker beclin-1 are increased in healthy centenarians. *Rejuvenation Res*. 2014 Dec;17(6):518-24. doi: 10.1089/rej.2014.1607.

Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K, Hiraoka Y, Taka H, Fujimura T, Takehana K, Yoshida M, Iwata J, Tanida I, Furuya N, Zheng DM, Tada N, Tanaka K, Kominami E, Ueno T. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*. 2011 Jul;7(7):727-36. doi: 10.4161/auto.7.7.15371.

F

Fang X, Bogomolovas J, Wu T, Zhang W, Liu C, Veevers J, Stroud MJ, Zhang Z, Ma X, Mu Y, Lao DH, Dalton ND, Gu Y, Wang C, Wang M, Liang Y, Lange S, Ouyang K, Peterson KL, Evans SM, Chen J. Loss-of-function mutations in co-chaperone BAG3 destabilize small HSPs and cause cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2017 Aug 1;127(8):3189-3200. doi: 10.1172/JCI94310.

Fang X, Bogomolovas J, Trexler C, Chen J. The BAG3-dependent and -independent roles of cardiac small heat shock proteins. *JCI Insight*. 2019 Feb 21;4(4):e126464. doi: 10.1172/jci.insight.126464.

Feldman AM, Begay RL, Knezevic T, Myers VD, Slavov DB, Zhu W, Gowan K, Graw SL, Jones KL, Tilley DG, Coleman RC, Walinsky P, Cheung JY, Mestroni L, Khalili K, Taylor MR. Decreased levels of BAG3 in a family with a rare variant and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Cell Physiol*. 2014 Nov;229(11):1697-702. doi: 10.1002/jcp.24615.

Feldman AM, Gordon J, Wang J, Song J, Zhang XQ, Myers VD, Tilley DG, Gao E, Hoffman NE, Tomar D, Madesh M, Rabinowitz J, Koch WJ, Su F, Khalili K, Cheung JY. BAG3 regulates contractility and Ca(2+) homeostasis in adult mouse ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Mar;92:10-20. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.015.

Festa M, Del Valle L, Khalili K, Franco R, Scognamiglio G, Graziano V, De Laurenzi V, Turco MC, Rosati A. BAG3 protein is overexpressed in human glioblastoma and is a potential target for therapy. *Am J Pathol*. 2011 Jun;178(6):2504-12. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.002.

Finsterer J, Stöllberger C. Primary myopathies and the heart. *Scand Cardiovasc J*. 2008 Feb;42(1):9-24. doi: 10.1080/14017430701854953.

Flum M, Kleemann M, Schneider H, Weis B, Fischer S, Handrick R, Otte K. miR-217-5p induces apoptosis by directly targeting PRKCI, BAG3, ITGAV and MAPK1 in colorectal cancer cells. *J Cell Commun Signal*. 2018 Jun;12(2):451-466. doi: 10.1007/s12079-017-0410-x.

Foufelle F, Ferré P. La réponse UPR: son rôle physiologique et physiopathologique [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*. 2007 Mar;23(3):291-6. French. doi: 10.1051/medsci/2007233291.

Franaszczyk M, Bilinska ZT, Sobieszcańska-Matek M, Michalak E, Sleszycka J, Sioma A, Matek ŁA, Kaczmarska D, Walczak E, Włodarski P, Hutnik Ł, Milanowska B, Dzielinska Z, Religa G, Grzybowski J, Zieliński T, Ploski R. The BAG3 gene variants in Polish patients with dilated cardiomyopathy: four novel mutations and a genotype-phenotype correlation. *J Transl Med*. 2014 Jul 9;12:192. doi: 10.1186/1479-5876-12-192.

Franceschelli S, Rosati A, Lerosé R, De Nicola S, Turco MC, Pascale M. Bag3 gene expression is regulated by heat shock factor 1. *J Cell Physiol*. 2008 Jun;215(3):575-7. doi: 10.1002/jcp.21397.

Fu M, Hu Y, Lan T, Guan KL, Luo T, Luo M. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Nov 8;7(1):376. doi: 10.1038/s41392-022-01191-9.

Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ, Landry J. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*. 2009 Dec 14;425(1):245-55. doi: 10.1042/BJ20090907.

G

Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell*. 2014 Dec 4;159(6):1263-76. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.006. PMID: 25480292; PMCID: PMC4500936.

Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J*. 2009 Apr 8;28(7):889-901. doi: 10.1038/emboj.2009.29.

Gamerding M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep*. 2011 Feb;12(2):149-56. doi: 10.1038/embor.2010.203.

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Aug 24;286(3):433-42. doi: 10.1006/bbrc.2001.5427.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):1789-1858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.

Gentilella A, Khalili K. Autoregulation of co-chaperone BAG3 gene transcription. *J Cell Biochem*. 2009 Dec 1;108(5):1117-24. doi: 10.1002/jcb.22343.

Gentilella A, Passiatore G, Deshmane S, Turco MC, Khalili K. Activation of BAG3 by Egr-1 in response to FGF-2 in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2008 Aug 28;27(37):5011-8. doi: 10.1038/onc.2008.142.

Goedhart J, Luijsterburg MS. VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Sci Rep*. 2020 Nov 25;10(1):20560. doi: 10.1038/s41598-020-76603-3.

González-Pacheco H, Álvarez-Sangabriel A, Martínez-Sánchez C, Briseño-Cruz JL, Altamirano-Castillo A, Mendoza-García S, Manzur-Sandoval D, Amezcua-Guerra LM, Sandoval J, Bojalil R, Araiza-Garaygordobil D, Sierra-Lara D, Guiza-Sánchez CA, Gopar-Nieto R, Cruz-Rodríguez C, Valdivia-Nuño JJ, Salas-Teles B, Arias-Mendoza A. Clinical phenotypes, aetiologies, management, and mortality in acute heart failure: a single-institution study in Latin-America. *ESC Heart Fail*. 2021 Feb;8(1):423-437. doi: 10.1002/ehf2.13092.

Granzier HL, Radke MH, Peng J, Westermann D, Nelson OL, Rost K, King NM, Yu Q, Tschöpe C, McNabb M, Larson DF, Labeit S, Gotthardt M. Truncation of titin's elastic PEVK region leads to cardiomyopathy with diastolic dysfunction. *Circ Res*. 2009 Sep 11;105(6):557-64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200964.

Grimes KM, Prasad V, McNamara JW. Supporting the heart: Functions of the cardiomyocyte's non-sarcomeric cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Jun;131:187-196. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.04.002.

GTEx Analysis Release V8 (dbGaP Accession phs000424.v8.p2), page visitée le 19 Novembre 2023, <https://www.gtexportal.org/home/gene/BAG3>.

H

Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Sep;19(9):579-593. doi: 10.1038/s41580-018-0033-y.

Herrmann H, Cabet E, Chevalier NR, Moosmann J, Schultheis D, Haas J, Schowalter M, Berwanger C, Weyerer V, Agaimy A, Meder B, Müller OJ, Katus HA, Schlötzer-Schrehardt U, Vicart P, Ferreira A, Dittrich S, Clemen CS, Lilienbaum A, Schröder R. Dual Functional States of R406W-Desmin Assembly Complexes Cause Cardiomyopathy With Severe Intercalated Disc Derangement in Humans and in Knock-In Mice. *Circulation.* 2020 Dec;142(22):2155-2171. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050218.

Hershberger RE, Cowan J, Jordan E, Kinnamon DD. The Complex and Diverse Genetic Architecture of Dilated Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2021 May 14;128(10):1514-1532. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318157.

Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol.* 2013 Sep;10(9):531-47. doi: 10.1038/nrcardio.2013.105.

Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* 2014 Sep;24(9):506-14. doi: 10.1016/j.tcb.2014.05.003.

Hishiya A, Kitazawa T, Takayama S. BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circ Res.* 2010 Nov 12;107(10):1220-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225649.

Hishiya A, Salman MN, Carra S, Kampinga HH, Takayama S. BAG3 directly interacts with mutated alphaB-crystallin to suppress its aggregation and toxicity. *PLoS One.* 2011 Mar 15;6(3):e16828. doi: 10.1371/journal.pone.0016828.

Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol.* 2006 Sep;169(3):761-73. doi: 10.2353/ajpath.2006.060250.

Huang M, Claussnitzer M, Saadat A, Coral DE, Kalamajski S, Franks PW. Engineered allele substitution at PPARGC1A rs8192678 alters human white adipocyte differentiation, lipogenesis, and PGC-1 α content and turnover. *Diabetologia.* 2023 Jul;66(7):1289-1305. doi: 10.1007/s00125-023-05915-6.

Huggins GS, Kinnamon DD, Haas GJ, Jordan E, Hofmeyer M, Kransdorf E, Ewald GA, Morris AA, Owens A, Lowes B, Stoller D, Tang WHW, Garg S, Trachtenberg BH, Shah P, Pamboukian SV, Sweitzer NK, Wheeler MT, Wilcox JE, Katz S, Pan S, Jimenez J, Aaronson KD, Fishbein DP, Smart F, Wang J, Gottlieb SS, Judge DP, Moore CK, Mead JO, Ni H, Burke W, Hershberger RE; DCM Precision Medicine Study of the DCM Consortium. Prevalence and Cumulative Risk of Familial Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *JAMA.* 2022 Feb 1;327(5):454-463. doi: 10.1001/jama.2021.24674.

I

Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, Takahashi R. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell.* 2002 Jul;10(1):55-67. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00583-x.

Iorio V, Festa M, Rosati A, Hahne M, Tiberti C, Capunzo M, De Laurenzi V, Turco MC. BAG3 regulates formation of the SNARE complex and insulin secretion. *Cell Death Dis.* 2015 Mar 12;6(3):e1684. doi: 10.1038/cddis.2015.53.

Isaacs WB, Kim IS, Struve A, Fulton AB. Biosynthesis of titin in cultured skeletal muscle cells. *J Cell Biol.* 1989 Nov;109(5):2189-95. doi: 10.1083/jcb.109.5.2189.

Iwasaki M, Homma S, Hishiya A, Dolezal SJ, Reed JC, Takayama S. BAG3 regulates motility and adhesion of epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10252-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0618.

Iwasaki M, Tanaka R, Hishiya A, Homma S, Reed JC, Takayama S. BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 24;400(3):413-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.092.

J

Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic.* 2008 Apr;9(4):574-87. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x.

Jain A, Norton N, Bruno KA, Cooper LT Jr, Atwal PS, Fairweather D. Sex Differences, Genetic and Environmental Influences on Dilated Cardiomyopathy. *J Clin Med.* 2021 May 25;10(11):2289. doi: 10.3390/jcm10112289.

Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J Clin Invest.* 2015 Jan;125(1):47-54. doi: 10.1172/JCI73942.

Jin YH, Ahn SG, Kim SA. BAG3 affects the nucleocytoplasmic shuttling of HSF1 upon heat stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 21;464(2):561-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.006.

Johnson OT, Gestwicki JE. Multivalent protein-protein interactions are pivotal regulators of eukaryotic Hsp70 complexes. *Cell Stress Chaperones.* 2022 Jul;27(4):397-415. doi: 10.1007/s12192-022-01281-1.

Jordan E, Peterson L, Ai T, Asatryan B, Bronicki L, Brown E, Celeghin R, Edwards M, Fan J, Ingles J, James CA, Jarinova O, Johnson R, Judge DP, Lahrouchi N, Lekanne Deprez RH, Lumbers RT, Mazzarotto F, Medeiros Domingo A, Miller RL, Morales A, Murray B, Peters S, Pilichou K, Protonotarios A, Semsarian C, Shah P, Syrris P, Thaxton C, van Tintelen JP, Walsh R, Wang J, Ware J, Hershberger RE. Evidence-Based Assessment of Genes in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation.* 2021 Jul 6;144(1):7-19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053033.

K

Kabbage M, Dickman MB. The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci.* 2008 May;65(9):1390-402. doi: 10.1007/s00018-008-7535-2.

Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):65-80. doi: 10.1038/cdd.2017.186.

Kapadia M, De Snoo ML, Kalia LV, Kalia SK. Regulation of Parkin-dependent mitophagy by Bcl-2-associated athanogene (BAG) family members. *Neural Regen Res.* 2021 Apr;16(4):684-685. doi: 10.4103/1673-5374.295330.

Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, Tzimas C, Sanoudou D, Termglinchan V, Kong CW, Rushing S, Hansen J, Ceholski D, Kolokathis F, Kremastinos D, Katoulis A, Ren L, Cohen N, Gho JMIH, Tsiapras D, Vink A, Wu JC, Asselbergs FW, Li RA, Hulot JS, Kranias EG, Hajjar RJ. Correction of human

phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nat Commun.* 2015 Apr 29;6:6955. doi: 10.1038/ncomms7955.

Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn EC. CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res.* 2006 Sep 10;312(15):2962-71. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.05.023.

Kästle M, Grune T. Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;109:113-60. doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00004-3.

Kathage B, Gehlert S, Ulbricht A, Lüdecke L, Tapia VE, Orfanos Z, Wenzel D, Bloch W, Volkmer R, Fleischmann BK, Fürst DO, Höhfeld J. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Jan;1864(1):62-75. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.10.007.

Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jun;19(6):365-381. doi: 10.1038/s41580-018-0001-6.

Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 2003 Dec 12;115(6):727-38. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00939-5.

Kim S, Gross DS. Mediator recruitment to heat shock genes requires dual Hsf1 activation domains and mediator tail subunits Med15 and Med16. *J Biol Chem.* 2013 Apr 26;288(17):12197-213. doi: 10.1074/jbc.M112.449553.

Kirk JA, Cheung JY, Feldman AM. Therapeutic targeting of BAG3: considering its complexity in cancer and heart disease. *J Clin Invest.* 2021 Aug 16;131(16):e149415. doi: 10.1172/JCI149415.

Klimek C, Jahnke R, Wördehoff J, Kathage B, Stadel D, Behrends C, Hergovich A, Höhfeld J. The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019 Oct;1866(10):1556-1566. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.007.

Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.

Knezevic T, Myers VD, Gordon J, Tilley DG, Sharp TE 3rd, Wang J, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM. BAG3: a new player in the heart failure paradigm. *Heart Fail Rev.* 2015 Jul;20(4):423-34. doi: 10.1007/s10741-015-9487-6.

Knezevic T, Myers VD, Su F, Wang J, Song J, Zhang XQ, Gao E, Gao G, Muniswamy M, Gupta MK, Gordon J, Weiner KN, Rabinowitz J, Ramsey FV, Tilley DG, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM. Adeno-associated Virus Serotype 9 - Driven Expression of BAG3 Improves Left Ventricular Function in Murine Hearts with Left Ventricular Dysfunction Secondary to a Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 2016 Dec;1(7):647-656. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.08.008.

Kögel D, Linder B, Brunschweiler A, Chines S, Behl C. At the Crossroads of Apoptosis and Autophagy: Multiple Roles of the Co-Chaperone BAG3 in Stress and Therapy Resistance of Cancer. *Cells.* 2020 Feb 28;9(3):574. doi: 10.3390/cells9030574.

Krüger L, Mandelkow EM. Tau neurotoxicity and rescue in animal models of human Tauopathies. *Curr Opin Neurobiol.* 2016 Feb;36:52-8. doi: 10.1016/j.conb.2015.09.004.

Kulka LAM, Fangmann PV, Panfilova D, Olzscha H. Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 3;8:425. doi: 10.3389/fcell.2020.00425.

Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy.* 2017 Oct 3;13(10):1619-1628. doi: 10.1080/15548627.2017.1343770.

Kumarapeli AR, Wang X. Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Dec;37(6):1097-109. doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.07.004.

L

Lakdawala NK, Dellefave L, Redwood CS, Sparks E, Cirino AL, Depalma S, Colan SD, Funke B, Zimmerman RS, Robinson P, Watkins H, Seidman CE, Seidman JG, McNally EM, Ho CY. Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: the distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Jan 26;55(4):320-9. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.017.

Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:736905. doi: 10.1155/2012/736905.

Lee JH, Takahashi T, Yasuhara N, Inazawa J, Kamada S, Tsujimoto Y. Bcl-2, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene.* 1999 Nov 4;18(46):6183-90. doi: 10.1038/sj.onc.1203043.

Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 2019 Jan 10;176(1-2):11-42. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048.

Li N, Chen M, Cao Y, Li H, Zhao J, Zhai Z, Ren F, Li K. Bcl-2-associated athanogene 3(BAG3) is associated with tumor cell proliferation, migration, invasion and chemoresistance in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2018 Aug 6;18(1):793. doi: 10.1186/s12885-018-4657-2.

Li X, Colvin T, Rauch JN, Acosta-Alvear D, Kampmann M, Dunyak B, Hann B, Aftab BT, Murnane M, Cho M, Walter P, Weissman JS, Sherman MY, Gestwicki JE. Validation of the Hsp70-Bag3 protein-protein interaction as a potential therapeutic target in cancer. *Mol Cancer Ther.* 2015 Mar;14(3):642-8. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0650.

Li Y, Li S, Wu H. Ubiquitination-Proteasome System (UPS) and Autophagy Two Main Protein Degradation Machineries in Response to Cell Stress. *Cells.* 2022 Mar 1;11(5):851. doi: 10.3390/cells11050851.

Liao Q, Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, Takayama S, Reed JC, Kleeff J, Büchler MW. The anti-apoptotic protein BAG-3 is overexpressed in pancreatic cancer and induced by heat stress in pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett.* 2001 Aug 17;503(2-3):151-7. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02728-4.

Lin H, Koren SA, Cvetojevic G, Girardi P, Johnson GVW. The role of BAG3 in health and disease: A "Magic BAG of Tricks". *J Cell Biochem.* 2022 Jan;123(1):4-21. doi: 10.1002/jcb.29952.

Liu BQ, Du ZX, Zong ZH, Li C, Li N, Zhang Q, Kong DH, Wang HQ. BAG3-dependent noncanonical autophagy induced by proteasome inhibition in HepG2 cells. *Autophagy.* 2013 Jun 1;9(6):905-16. doi: 10.4161/auto.24292.

Liu GS, Zhu H, Cai WF, Wang X, Jiang M, Essandoh K, Vafiadaki E, Haghighi K, Lam CK, Gardner G, Adly G, Nicolaou P, Sanoudou D, Liang Q, Rubinstein J, Fan GC, Kranias EG. Regulation of BECN1-mediated autophagy by HSPB6: Insights from a human HSPB6S10F mutant. *Autophagy*. 2018;14(1):80-97. doi: 10.1080/15548627.2017.1392420.

Liu P, Cong X, Liao S, Jia X, Wang X, Dai W, Zhai L, Zhao L, Ji J, Ni D, Liu Z, Chen Y, Pan L, Liu W, Zhang J, Huang M, Liu B, Tan M. Global identification of phospho-dependent SCF substrates reveals a FBXO22 phosphodegron and an ERK-FBXO22-BAG3 axis in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2022 Jan;29(1):1-13. doi: 10.1038/s41418-021-00827-7.

Liu X, Yamashita T, Shang J, Shi X, Morihara R, Huang Y, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Ohta Y, Abe K. Molecular switching from ubiquitin-proteasome to autophagy pathways in mice stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020 Jan;40(1):214-224. doi: 10.1177/0271678X18810617.

Loos B, du Toit A, Hofmeyr JH. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy*. 2014;10(11):2087-96. doi: 10.4161/15548627.2014.973338.

Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ Res*. 2021 May 14;128(10):1487-1513. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318241.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jan;90(1):207-58. doi: 10.1152/physrev.00015.2009.

Lüders J, Demand J, Höhfeld J. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem*. 2000 Feb 18;275(7):4613-7. doi: 10.1074/jbc.275.7.4613.

Luthold C, Varlet AA, Lambert H, Bordeleau F, Lavoie JN. Chaperone-Assisted Mitotic Actin Remodeling by BAG3 and HSPB8 Involves the Deacetylase HDAC6 and Its Substrate Cortactin. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 25;22(1):142. doi: 10.3390/ijms22010142.

M

Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Jun;44(6):968-975. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.021.

Marcello M, Cetrangolo V, Savarese M, Udd B. Use of animal models to understand titin physiology and pathology. *J Cell Mol Med*. 2022 Oct;26(20):5103-5112. doi: 10.1111/jcmm.17533.

Martin TG, Kirk JA. Under construction: The dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. *J Mol Cell Cardiol*. 2020 Nov;148:89-102. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.08.018.

Marzullo L, Turco MC, De Marco M. The multiple activities of BAG3 protein: Mechanisms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020 Aug;1864(8):129628. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129628.

Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2420-34. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.010.

Mathew T, Williams L, Navaratnam G, Rana B, Wheeler R, Collins K, Harkness A, Jones R, Knight D, O'Gallagher K, Oxborough D, Ring L, Sandoval J, Stout M, Sharma V, Steeds RP; British Society of Echocardiography Education Committee. Diagnosis and assessment of dilated cardiomyopathy: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res Pract*. 2017 Jun;4(2):G1-G13. doi: 10.1530/ERP-16-0037.

- Matkovich SJ**, Van Booven DJ, Hindes A, Kang MY, Druley TE, Vallania FL, Mitra RD, Reilly MP, Cappola TP, Dorn GW 2nd. Cardiac signaling genes exhibit unexpected sequence diversity in sporadic cardiomyopathy, revealing HSPB7 polymorphisms associated with disease. *J Clin Invest*. 2010 Jan;120(1):280-9. doi: 10.1172/JCI39085.
- Mazzarotto F**, Tayal U, Buchan RJ, Midwinter W, Wilk A, Whiffin N, Govind R, Mazaika E, de Marvao A, Dawes TJW, Felkin LE, Ahmad M, Theotokis PI, Edwards E, Ing AY, Thomson KL, Chan LLH, Sim D, Baksi AJ, Pantazis A, Roberts AM, Watkins H, Funke B, O'Regan DP, Olivotto I, Barton PJR, Prasad SK, Cook SA, Ware JS, Walsh R. Reevaluating the Genetic Contribution of Monogenic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2020 Feb 4;141(5):387-398. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.037661.
- McDermott-Roe C**, Lv W, Maximova T, Wada S, Bukowy J, Marquez M, Lai S, Shehu A, Benjamin I, Geurts A, Musunuru K. Investigation of a dilated cardiomyopathy-associated variant in BAG3 using genome-edited iPSC-derived cardiomyocytes. *JCI Insight*. 2019 Nov 14;4(22):e128799. doi: 10.1172/jci.insight.128799.
- McNally EM**, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):19-26. doi: 10.1172/JCI62862.
- McNally EM**, Mestroni L. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):731-748. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309396.
- Meehan S**, Knowles TP, Baldwin AJ, Smith JF, Squires AM, Clements P, Treweek TM, Ecroyd H, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Macphee CE, Dobson CM, Carver JA. Characterisation of amyloid fibril formation by small heat-shock chaperone proteins human alphaA-, alphaB- and R120G alphaB-crystallins. *J Mol Biol*. 2007 Sep 14;372(2):470-84. doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.060.
- Mehrabipour M**, Jasemi NSK, Dvorsky R, Ahmadian MR. A Systematic Compilation of Human SH3 Domains: A Versatile Superfamily in Cellular Signaling. *Cells*. 2023 Aug 12;12(16):2054. doi: 10.3390/cells12162054.
- Meister-Broekema M**, Freilich R, Jagadeesan C, Rauch JN, Bengoechea R, Motley WW, Kuiper EFE, Minoia M, Furtado GV, van Waarde MAWH, Bird SJ, Rebelo A, Zuchner S, Pytel P, Scherer SS, Morelli FF, Carra S, Wehl CC, Bergink S, Gestwicki JE, Kampinga HH. Myopathy associated BAG3 mutations lead to protein aggregation by stalling Hsp70 networks. *Nat Commun*. 2018 Dec 17;9(1):5342. doi: 10.1038/s41467-018-07718-5.
- Mercier R**, LaPointe P. The role of cellular proteostasis in antitumor immunity. *J Biol Chem*. 2022 May;298(5):101930. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101930.
- Mestroni L**, Brun F, Spezzacatene A, Sinagra G, Taylor MR. GENETIC CAUSES OF DILATED CARDIOMYOPATHY. *Prog Pediatr Cardiol*. 2014 Dec;37(1-2):13-18. doi: 10.1016/j.ppedcard.2014.10.003.
- Mijaljica D**, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011 Jul;7(7):673-82. doi: 10.4161/auto.7.7.14733.
- Miller SB**, Ho CT, Winkler J, Khokhrina M, Neuner A, Mohamed MY, Guilbride DL, Richter K, Lisby M, Schiebel E, Mogk A, Bukau B. Compartment-specific aggregases direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J*. 2015 Mar 12;34(6):778-97. doi: 10.15252/embj.201489524.
- Minoia M**, Chaperones, protein homeostasis & protein aggregation diseases, 2014 Jun 30

Mitrut R, Stepan AE, Pirici D. Histopathological Aspects of the Myocardium in Dilated Cardiomyopathy. *Curr Health Sci J*. 2018 Jul-Sep;44(3):243-249. doi: 10.12865/CHSJ.44.03.07.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1101-11. doi: 10.1091/mbc.e03-09-0704.

Morishima Y, Wang AM, Yu Z, Pratt WB, Osawa Y, Lieberman AP. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Hum Mol Genet*. 2008 Dec 15;17(24):3942-52. doi: 10.1093/hmg/ddn296.

Muranova LK, Shatov VM, Slushchev AV, Gusev NB. Quaternary Structure and Hetero-Oligomerization of Recombinant Human Small Heat Shock Protein HspB7 (cvHsp). *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 21;22(15):7777. doi: 10.3390/ijms22157777.

Myers VD, McClung JM, Wang J, Tahrir FG, Gupta MK, Gordon J, Kontos CH, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM. The Multifunctional Protein BAG3: A Novel Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *JACC Basic Transl Sci*. 2018 Feb;3(1):122-131. doi: 10.1016/j.jacbts.2017.09.009.

Myers VD, Tomar D, Madesh M, Wang J, Song J, Zhang XQ, Gupta MK, Tahrir FG, Gordon J, McClung JM, Kontos CD, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM. Haplo-insufficiency of Bcl-2-associated athanogene 3 in mice results in progressive left ventricular dysfunction, β -adrenergic insensitivity, and increased apoptosis. *J Cell Physiol*. 2018 Sep;233(9):6319-6326. doi: 10.1002/jcp.26482.

N

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May;13(5):619-24. doi: 10.1038/nm1574.

Nicolaou P, Knöll R, Haghighi K, Fan GC, Dorn GW 2nd, Hasenfub G, Kranias EG. Human mutation in the anti-apoptotic heat shock protein 20 abrogates its cardioprotective effects. *J Biol Chem*. 2008 Nov 28;283(48):33465-71. doi: 10.1074/jbc.M802307200.

Nishiyama T, Zhang Y, Cui M, Li H, Sanchez-Ortiz E, McAnally JR, Tan W, Kim J, Chen K, Xu L, Bassel-Duby R, Olson EN. Precise genomic editing of pathogenic mutations in RBM20 rescues dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. 2022 Nov 23;14(672):eade1633. doi: 10.1126/scitranslmed.ade1633.

Nivon M, Richet E, Codogno P, Arrigo AP, Kretz-Remy C. Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy*. 2009 Aug;5(6):766-83. doi: 10.4161/auto.8788.

Noll NA, Lal H, Merryman WD. Mouse Models of Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Am J Pathol*. 2020 Aug;190(8):1596-1608. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.04.006.

Norton N, Li D, Rieder MJ, Siegfried JD, Rampersaud E, Züchner S, Mangos S, Gonzalez-Quintana J, Wang L, McGee S, Reiser J, Martin E, Nickerson DA, Hershberger RE. Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2011 Mar 11;88(3):273-82. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.01.016.

P

Pagliuca MG, Lerose R, Cigliano S, Leone A. Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity. *FEBS Lett.* 2003 Apr 24;541(1-3):11-5. doi: 10.1016/s0014-5793(03)00274-6.

Palma FR, Gantner BN, Sakiyama MJ, Kayzuka C, Shukla S, Lacchini R, Cunniff B, Bonini MG. ROS production by mitochondria: function or dysfunction? *Oncogene.* 2024 Jan;43(5):295-303. doi: 10.1038/s41388-023-02907-z.

Pappas CT, Bhattacharya N, Cooper JA, Gregorio CC. Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):1837-47. doi: 10.1091/mbc.e07-07-0690.

Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 20;20(3):460-73. doi: 10.1089/ars.2013.5371.

Patten RD. Models of Gender Differences in Cardiovascular Disease. *Drug Discov Today Dis Models.* 2007;4(4):227-232. doi: 10.1016/j.ddmod.2007.11.002.

Perez-Bermejo JA, Judge LM, Jensen CL. et al. Functional analysis of a common BAG3 allele associated with protection from heart failure. *Nat Cardiovasc Res* 2, 615–628 (2023). doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/s44161-023-00288-w

Pottecher J, Muscle squelettique et ischémie-reperfusion expérimentale des membres : mécanismes impliqués dans la protection ou les effets délétères de la cyclosporine et facteurs limitant les conditionnements pharmacologique et ischémique. 2012 Sep 17

Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:959-91. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.114844.

Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI, Jung S, Jung YK. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* 2013;4:2300. doi: 10.1038/ncomms3300.

Q

Qin L, Guo J, Zheng Q, Zhang H. BAG2 structure, function and involvement in disease. *Cell Mol Biol Lett.* 2016 Sep 20;21:18. doi: 10.1186/s11658-016-0020-2.

Qu HQ, Feldman AM, Hakonarson H. Genetics of BAG3: A Paradigm for Developing Precision Therapies for Dilated Cardiomyopathies. *J Am Heart Assoc.* 2022 Dec 6;11(23):e027373. doi: 10.1161/JAHA.122.027373.

R

Rafiq MA, Chaudhry A, Care M, Spears DA, Morel CF, Hamilton RM. Whole exome sequencing identified 1 base pair novel deletion in BCL-2-associated athanogene 3 (BAG3) gene associated with severe dilated cardiomyopathy (DCM) requiring heart transplant in multiple family members. *Am J Med Genet A.* 2017 Mar;173(3):699-705. doi: 10.1002/ajmg.a.38087.

- Rapino F**, Abhari BA, Jung M, Fulda S. NIK is required for NF- κ B-mediated induction of BAG3 upon inhibition of constitutive protein degradation pathways. *Cell Death Dis.* 2015 Mar 12;6(3):e1692. doi: 10.1038/cddis.2014.584.
- Rapino F**, Jung M, Fulda S. BAG3 induction is required to mitigate proteotoxicity via selective autophagy following inhibition of constitutive protein degradation pathways. *Oncogene.* 2014 Mar 27;33(13):1713-24. doi: 10.1038/onc.2013.110.
- Rauch JN**, Gestwicki JE. Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *J Biol Chem.* 2014 Jan 17;289(3):1402-14. doi: 10.1074/jbc.M113.521997.
- Rauch JN**, Tse E, Freilich R, Mok SA, Makley LN, Southworth DR, Gestwicki JE. BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *J Mol Biol.* 2017 Jan 6;429(1):128-141. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.013.
- Reichart D**, Magnussen C, Zeller T, Blankenberg S. Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J Intern Med.* 2019 Oct;286(4):362-372. doi: 10.1111/joim.12944.
- Reilich P**, Schoser B, Schramm N, Krause S, Schessl J, Kress W, Müller-Höcker J, Walter MC, Lochmuller H. The p.G154S mutation of the alpha-B crystallin gene (CRYAB) causes late-onset distal myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2010 Apr;20(4):255-9. doi: 10.1016/j.nmd.2010.01.012.
- Ren K**, Feng L, Sun S, Zhuang X. Plant Mitophagy in Comparison to Mammals: What Is Still Missing? *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 27;22(3):1236. doi: 10.3390/ijms22031236.
- Renziehausen J**, Hiebel C, Nagel H, Kundu A, Kins S, Kögel D, Behl C, Hajieva P. The cleavage product of amyloid- β protein precursor sA β PP α modulates BAG3-dependent aggresome formation and enhances cellular proteasomal activity. *J Alzheimers Dis.* 2015;44(3):879-96. doi: 10.3233/JAD-140600.
- Richard P**, Ader F, Charron P, Génétique des cardiomyopathies héréditaires, Volume, Issue, /2018, Pages, ISSN 1166-4568, [http://dx.doi.org/10.1016/S1166-4568\(18\)53103-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1166-4568(18)53103-X).
- Rogov V**, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014 Jan 23;53(2):167-78. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014.
- Rosati A**, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell Death Dis.* 2011 Apr 7;2(4):e141. doi: 10.1038/cddis.2011.24.
- Roth GA**, et al. GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
- Rusmini P**, Cristofani R, Tedesco B, Ferrari V, Messi E, Piccolella M, Casarotto E, Chierichetti M, Cicardi ME, Galbiati M, Geroni C, Lombardi P, Crippa V, Poletti A. Enhanced Clearance of Neurotoxic Misfolded Proteins by the Natural Compound Berberine and Its Derivatives. *Int J Mol Sci.* 2020 May 13;21(10):3443. doi: 10.3390/ijms21103443.

S

- Sanbe A**, Marunouchi T, Abe T, Tezuka Y, Okada M, Aoki S, Tsumura H, Yamauchi J, Tanonaka K, Nishigori H, Tanoue A. Phenotype of cardiomyopathy in cardiac-specific heat shock protein B8 K141N transgenic mouse. *J Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):8910-21. doi: 10.1074/jbc.M112.368324.
- Sanbe A**, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 6;101(27):10132-6. doi: 10.1073/pnas.0401900101.
- Sapkota A**, Krebs Cycle: Location, Enzymes, Steps, Products, Diagram. 2023 Sep 16; <https://microbenotes.com/krebs-cycle/>
- Sarparanta J**, Jonson PH, Kawan S, Udd B. Neuromuscular Diseases Due to Chaperone Mutations: A Review and Some New Results. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 19;21(4):1409. doi: 10.3390/ijms21041409.
- Savarese G**, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovasc Res*. 2023 Jan 18;118(17):3272-3287. doi: 10.1093/cvr/cvac013.
- Scellini B**, Piroddi N, Dente M, Vitale G, Pioner JM, Coppini R, Ferrantini C, Poggesi C, Tesi C. Mavacamten has a differential impact on force generation in myofibrils from rabbit psoas and human cardiac muscle. *J Gen Physiol*. 2021 Jul 5;153(7):e202012789. doi: 10.1085/jgp.202012789.
- Schuck S**. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci*. 2020 Sep 9;133(17):jcs246322. doi: 10.1242/jcs.246322.
- Schultheiss HP**, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, Liu PP, Matsumori A, Mazzanti A, McMurray J, Priori SG. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 May 9;5(1):32. doi: 10.1038/s41572-019-0084-1.
- Selcen D**, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, Engel AG. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2009 Jan;65(1):83-9. doi: 10.1002/ana.21553.
- Shah SN**, Umaphathi KK, Oliver TI. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. 2023 Jul 24. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—.
- Singh DP**, Patel H. Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy. 2022 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan—.
- Singh MV**, Dhanabalan K, Verry J, Dokun AO. MicroRNA regulation of BAG3. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022 Apr;247(8):617-623. doi: 10.1177/15353702211066908.
- Singh R**, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab*. 2011 May 4;13(5):495-504. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.004.
- Singh R**, Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:282041. doi: 10.1155/2012/282041.
- Singh R**, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1131-5. doi: 10.1038/nature07976.

Skrzynia C, Berg JS, Willis MS, Jensen BC. Genetics and heart failure: a concise guide for the clinician. *Curr Cardiol Rev.* 2015;11(1):10-7. doi: 10.2174/1573403x09666131117170446. PMID: 24251456; PMCID: PMC4347203.

Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Hohfeld J, Hartl FU, Moarefi I. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science.* 2001 Feb 23;291(5508):1553-7. doi: 10.1126/science.1057268.

Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* 2018 Jul;20(7):745-754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1.

Stark K, Esslinger UB, Reinhard W, Petrov G, Winkler T, Komajda M, Isnard R, Charron P, Villard E, Cambien F, Tiret L, Aumont MC, Dubourg O, Trochu JN, Fauchier L, Degroote P, Richter A, Maisch B, Wichter T, Zollbrecht C, Grassl M, Schunkert H, Linsel-Nitschke P, Erdmann J, Baumert J, Illig T, Klopp N, Wichmann HE, Meisinger C, Koenig W, Lichtner P, Meitinger T, Schillert A, König IR, Hetzer R, Heid IM, Regitz-Zagrosek V, Hengstenberg C. Genetic association study identifies HSPB7 as a risk gene for idiopathic dilated cardiomyopathy. *PLoS Genet.* 2010 Oct 21;6(10):e1001167. doi: 10.1371/journal.pgen.1001167.

Steinhauser ML, Olenchock BA, O'Keefe J, Lun M, Pierce KA, Lee H, Pantano L, Klibanski A, Shulman GI, Clish CB, Fazeli PK. The circulating metabolome of human starvation. *JCI Insight.* 2018 Aug 23;3(16):e121434. doi: 10.1172/jci.insight.121434. PMID: 30135314; PMCID: PMC6141167.

Stillitano F, Turnbull IC, Karakikes I, Nonnenmacher M, Backeris P, Hulot JS, Kranias EG, Hajjar RJ, Costa KD. Genomic correction of familial cardiomyopathy in human engineered cardiac tissues. *Eur Heart J.* 2016 Nov 14;37(43):3282-3284. doi: 10.1093/eurheartj/ehw307.

Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2014 Jun;16(6):495-501. doi: 10.1038/ncb2979.

Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, Goldstein J, Ghosh R, Seifert BA, Sneddon TP, Wright MW, Milko LV, Cherry JM, Giovanni MA, Murray MF, O'Daniel JM, Ramos EM, Santani AB, Scott AF, Plon SE, Rehm HL, Martin CL, Berg JS. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet.* 2017 Jun 1;100(6):895-906. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.04.015.

Stürner E, Behl C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci.* 2017 Jun 21;10:177. doi: 10.3389/fnmol.2017.00177.

Su F, Myers VD, Knezevic T, Wang J, Gao E, Madesh M, Tahrir FG, Gupta MK, Gordon J, Rabinowitz J, Ramsey FV, Tilley DG, Khalili K, Cheung JY, Feldman AM. Bcl-2-associated athanogene 3 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *JCI Insight.* 2016 Nov 17;1(19):e90931. doi: 10.1172/jci.insight.90931.

Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 1999 Nov 29;147(5):913-20. doi: 10.1083/jcb.147.5.913.

T

Tadros R, et al. Shared genetic pathways contribute to risk of hypertrophic and dilated cardiomyopathies with opposite directions of effect. *Nat Genet.* 2021 Feb;53(2):128-134. doi: 10.1038/s41588-020-00762-2.

Taegtmeyer H. Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation.* 2002 Oct 15;106(16):2043-5. doi: 10.1161/01.cir.0000036760.42319.3f.

Tahrir FG, Knezevic T, Gupta MK, Gordon J, Cheung JY, Feldman AM, Khalili K. Evidence for the Role of BAG3 in Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes. *J Cell Physiol.* 2017 Apr;232(4):797-805. doi: 10.1002/jcp.25476.

Takayama S, Reed JC. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol.* 2001 Oct;3(10):E237-41. doi: 10.1038/ncb1001-e237.

Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):279-84. doi: 10.1016/0092-8674(95)90410-7.

Takayama S, Xie Z, Reed JC. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):781-6. doi: 10.1074/jbc.274.2.781.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 2000 Aug 24;406(6798):902-6. doi: 10.1038/35022595.

Tawo R, Pokrzywa W, Kevei É, Akyuz ME, Balaji V, Adrian S, Höhfeld J, Hoppe T. The Ubiquitin Ligase CHIP Integrates Proteostasis and Aging by Regulation of Insulin Receptor Turnover. *Cell.* 2017 Apr 20;169(3):470-482.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.003.

Tayal U, Prasad S, Cook SA. Genetics and genomics of dilated cardiomyopathy and systolic heart failure. *Genome Med.* 2017 Feb 22;9(1):20. doi: 10.1186/s13073-017-0410-8.

Te Rijdt WP, van Tintelen JP, Vink A, van der Wal AC, de Boer RA, van den Berg MP, Suurmeijer AJ. Phospholamban p.Arg14del cardiomyopathy is characterized by phospholamban aggregates, aggresomes, and autophagic degradation. *Histopathology.* 2016 Oct;69(4):542-50. doi: 10.1111/his.12963.

Thibaut TA, Anderson RT, Smith DM. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nat Commun.* 2018 Mar 15;9(1):1097. doi: 10.1038/s41467-018-03509-0.

Tobacman LS. Troponin Revealed: Uncovering the Structure of the Thin Filament On-Off Switch in Striated Muscle. *Biophys J.* 2021 Jan 5;120(1):1-9. doi: 10.1016/j.bpj.2020.11.014.

Tolmacheva ER, Shubina J, Kochetkova TO, Ushakova LV, Bokerija EL, Vasiliev GS, Mikhaylovskaya GV, Atapina EE, Zaretskaya NV, Sukhikh GT, Rebrikov DV, Trofimov DY. CAMK2D De Novo Missense Variant in Patient with Syndromic Neurodevelopmental Disorder: A Case Report. *Genes (Basel).* 2023 May 28;14(6):1177. doi: 10.3390/genes14061177.

Tommaso PD, Floden EW, Magis C, Palumbo E, Notredame C. Nextflow : un outil efficace pour l'amélioration de la stabilité numérique des calculs en analyse génomique [Nextflow, an efficient tool to

improve computation numerical stability in genomic analysis]. *Biol Aujourdhui*. 2017;211(3):233-237. French. doi: 10.1051/jbio/2017029.

Toro R, Pérez-Serra A, Campuzano O, Moncayo-Arlandi J, Allegue C, Iglesias A, Mangas A, Brugada R. Familial Dilated Cardiomyopathy Caused by a Novel Frameshift in the BAG3 Gene. *PLoS One*. 2016 Jul 8;11(7):e0158730. doi: 10.1371/journal.pone.0158730.

Tsikitis M, Galata Z, Mavroidis M, Psarras S, Capetanaki Y. Intermediate filaments in cardiomyopathy. *Biophys Rev*. 2018 Aug;10(4):1007-1031. doi: 10.1007/s12551-018-0443-2.

U

Uhl EW, Warner NJ. Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep*. 2015;3(3):219-223. doi: 10.1007/s40139-015-0086-y.

Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, van der Ven PF, Hampe N, Hersch N, Vakeel P, Stadel D, Haas A, Saftig P, Behrends C, Fürst DO, Volkmer R, Hoffmann B, Kolanus W, Höfeld J. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol*. 2013 Mar 4;23(5):430-5. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.064.

Ulbricht A, Gehlert S, Leciejewski B, Schiffer T, Bloch W, Höfeld J. Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy*. 2015;11(3):538-46. doi: 10.1080/15548627.2015.1017186.

Usman MG, Rafii MY, Martini MY, Yusuff OA, Ismail MR, Miah G. Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2017 Apr;33(1):26-39. doi: 10.1080/02648725.2017.1340546.

V

Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, Youle RJ, Yoshimori T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023 Mar;24(3):167-185. doi: 10.1038/s41580-022-00542-2.

Vas V, Háhner T, Kudlik G, Ernszt D, Kvell K, Kuti D, Kovács KJ, Tóvári J, Trexler M, Merő BL, Szeder B, Koprivanacz K, Buday L. Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. *Cells*. 2019 Aug 5;8(8):831. doi: 10.3390/cells8080831.

Vermeer MC, Bolling MC, Bliley JM, Arevalo Gomez KF, Pavez-Giani MG, Kramer D, Romero-Herrera PH, Westenbrink BD, Diercks GF, van den Berg MP, Feinberg AW, Silljé HHW, van der Meer P. Gain-of-function mutation in ubiquitin-ligase KLHL24 causes desmin degradation and dilatation in hiPSC-derived engineered heart tissues. *J Clin Invest*. 2021 Jul 22;131(17):e140615. doi: 10.1172/JCI140615.

Veselka J, Anavekar NS, Charron P. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1253-1267. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31321-6. Epub 2016 Nov 30. Erratum in: *Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1194. PMID: 27912983.

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prévost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tomé F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*. 1998 Sep;20(1):92-5. doi: 10.1038/1765.

Vignier N, Mougnot N, Bonne G, Muchir A. Effect of genetic background on the cardiac phenotype in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Biochem Biophys Rep.* 2019 Jul 12;19:100664. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100664.

Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun.* 2014 Dec 8;5:5659. doi: 10.1038/ncomms6659.

Villard E, Perret C, Gary F, Proust C, Dilanian G, Hengstenberg C, Ruppert V, Arbustini E, Wichter T, Germain M, Dubourg O, Tavazzi L, Aumont MC, DeGroot P, Fauchier L, Trochu JN, Gibelin P, Aupetit JF, Stark K, Erdmann J, Hetzer R, Roberts AM, Barton PJ, Regitz-Zagrosek V; Cardiogenics Consortium; Aslam U, Duboscq-Bidot L, Meyborg M, Maisch B, Madeira H, Waldenström A, Galve E, Cleland JG, Dorent R, Roizes G, Zeller T, Blankenberg S, Goodall AH, Cook S, Tregouet DA, Tiret L, Isnard R, Komajda M, Charron P, Cambien F. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2011 May;32(9):1065-76. doi: 10.1093/eurheartj/ehr105.

Vos MJ, Kanon B, Kampinga HH. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Aug;1793(8):1343-53. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.05.005.

W

Wan E, Abrams J, Weinberg RL, Katchman AN, Bayne J, Zakharov SI, Yang L, Morrow JP, Garan H, Marx SO. Aberrant sodium influx causes cardiomyopathy and atrial fibrillation in mice. *J Clin Invest.* 2016 Jan;126(1):112-22. doi: 10.1172/JCI84669.

Wang C, Zhang X, Luo L, Luo Y, Wu D, Spilca D, Le Q, Yang X, Alvarez K, Hines WC, Yang XO, Liu M. COX-2 Deficiency Promotes White Adipogenesis via PGE2-Mediated Paracrine Mechanism and Exacerbates Diet-Induced Obesity. *Cells.* 2022 Jun 2;11(11):1819. doi: 10.3390/cells11111819.

Wang J, Tomar D, Martin TG, Dubey S, Dubey PK, Song J, Landesberg G, McCormick MG, Myers VD, Merali S, Merali C, Lemster B, McTiernan CF, Khalili K, Madesh M, Cheung JY, Kirk JA, Feldman AM. Bag3 Regulates Mitochondrial Function and the Inflammasome Through Canonical and Noncanonical Pathways in the Heart. *JACC Basic Transl Sci.* 2023 Apr 19;8(7):820-839. doi: 10.1016/j.jacbts.2022.12.013.

Wang L, Bergkvist L, Kumar R, Winblad B, Pavlov PF. Targeting Chaperone/Co-Chaperone Interactions with Small Molecules: A Novel Approach to Tackle Neurodegenerative Diseases. *Cells.* 2021 Sep 29;10(10):2596. doi: 10.3390/cells10102596.

Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res.* 2003 Nov 14;93(10):998-1005. doi: 10.1161/01.RES.0000102401.77712.ED.

Wang XJ, Yu J, Wong SH, Cheng AS, Chan FK, Ng SS, Cho CH, Sung JJ, Wu WK. A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy.* 2013 Oct;9(10):1500-8. doi: 10.4161/auto.25573.

Wang Z, Grange M, Wagner T, Kho AL, Gautel M, Raunser S. The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Cell.* 2021 Apr 15;184(8):2135-2150.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.047.

Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 2009 Apr 1;122(Pt 7):893-903. doi: 10.1242/jcs.034355.

Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 2011 Apr 28;364(17):1643-56. doi: 10.1056/NEJMra0902923.

Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2017 Jul 22;390(10092):400-414. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31713-5.

Wiethoff I, Sikking M, Evers S, Gabrio A, Henkens M, Michels M, Verdonschot J, Heymans S, Hilgsmann M. Quality of life and societal costs in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes.* 2023 Sep 14:qcad056. doi: 10.1093/ehjqcco/qcad056.

Wilde IB, Brack M, Winget JM, Mayor T. Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Proteome Res.* 2011 Mar 4;10(3):1062-72. doi: 10.1021/pr1008543. Epub 2011 Feb 7. PMID: 21204586.

Wu T, Mu Y, Bogomolovas J, Fang X, Veevers J, Nowak RB, Pappas CT, Gregorio CC, Evans SM, Fowler VM, Chen J. HSPB7 is indispensable for heart development by modulating actin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Nov 7;114(45):11956-11961. doi: 10.1073/pnas.1713763114.

Wu WK, Sakamoto KM, Milani M, Aldana-Masangkay G, Fan D, Wu K, Lee CW, Cho CH, Yu J, Sung JJ. Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2010 Jun;13(3):87-92. doi: 10.1016/j.drug.2010.04.003.

X

Xiao H, Cheng S, Tong R, Lv Z, Ding C, Du C, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. BAG3 regulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* 2014 Mar;94(3):252-61. doi: 10.1038/labinvest.2013.151.

Xu Z, Graham K, Foote M, Liang F, Rizkallah R, Hurt M, Wang Y, Wu Y, Zhou Y. 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes. *J Cell Sci.* 2013 Sep 15;126(Pt 18):4173-86. doi: 10.1242/jcs.126102.

Y

Yang J, Grafton F, Ranjbarvaziri S, Budan A, Farshidfar F, Cho M, Xu E, Ho J, Maddah M, Loewke KE, Medina J, Sperandio D, Patel S, Hoey T, Mandegar MA. Phenotypic screening with deep learning identifies HDAC6 inhibitors as cardioprotective in a BAG3 mouse model of dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med.* 2022 Jul 6;14(652):eabl5654. doi: 10.1126/scitranslmed.abl5654.

Yogasundaram H, Alhumaid W, Dzwiniel T, Christian S, Oudit GY. Cardiomyopathies and Genetic Testing in Heart Failure: Role in Defining Phenotype-Targeted Approaches and Management. *Can J Cardiol.* 2021 Apr;37(4):547-559. doi: 10.1016/j.cjca.2021.01.016.

Youn DY, Lee DH, Lim MH, Yoon JS, Lim JH, Jung SE, Yeum CE, Park CW, Youn HJ, Lee JS, Lee SB, Ikawa M, Okabe M, Tsujimoto Y, Lee JH. Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of spleen and thymus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Dec;295(6):E1349-57. doi: 10.1152/ajpendo.90704.2008.

Yun HH, Jung SY, Park BW, Ko JS, Yoo K, Yeo J, Kim HL, Park HJ, Youn HJ, Lee JH. An Adult Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy Caused by Inducible Cardiac-Specific Bis Deletion. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 29;22(3):1343. doi: 10.3390/ijms22031343.

Z

Zhang H, Amick J, Chakravarti R, Santarriaga S, Schlanger S, McGlone C, Dare M, Nix JC, Scaglione KM, Stuehr DJ, Misra S, Page RC. A bipartite interaction between Hsp70 and CHIP regulates ubiquitination of chaperoned client proteins. *Structure*. 2015 Mar 3;23(3):472-482. doi: 10.1016/j.str.2015.01.003.

Zhang H, Rajasekaran NS, Orosz A, Xiao X, Rechsteiner M, Benjamin IJ. Selective degradation of aggregate-prone CryAB mutants by HSPB1 is mediated by ubiquitin-proteasome pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Dec;49(6):918-30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.004.

Zhang X, Qian SB. Chaperone-mediated hierarchical control in targeting misfolded proteins to aggresomes. *Mol Biol Cell*. 2011 Sep;22(18):3277-88. doi: 10.1091/mbc.E11-05-0388.

Zhang Y, Takemori H, Wang C, Fu J, Xu M, Xiong L, Li N, Wen X. Role of salt inducible kinase 1 in high glucose-induced lipid accumulation in HepG2 cells and metformin intervention. *Life Sci*. 2017 Mar 15;173:107-115. doi: 10.1016/j.lfs.2017.02.001.

Zhao Q, Sun Q, Zhou L, Liu K, Jiao K. Complex Regulation of Mitochondrial Function During Cardiac Development. *J Am Heart Assoc*. 2019 Jul 2;8(13):e012731. doi: 10.1161/JAHA.119.012731.

Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*. 2018 Aug 31;128(9):3716-3726. doi: 10.1172/JCI120849.

Zhu H, He L. Beclin 1 biology and its role in heart disease. *Curr Cardiol Rev*. 2015;11(3):229-37. doi: 10.2174/1573403x10666141106104606.

Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, Le V, Levine B, Rothermel BA, Hill JA. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1782-93. doi: 10.1172/JCI27523.

Ziaieian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Jun;13(6):368-78. doi: 10.1038/nrcardio.2016.25.

Physiopathologie d'un modèle murin knock-in d'une mutation du gène BAG3 responsable d'insuffisance cardiaque humaine

Nous avons généré avec succès un nouveau modèle murin récapitulant le phénotype de cardiomyopathie dilatée, y compris le dimorphisme sexuel observé chez l'homme, sans pour autant reproduire les limitations associées au modèle similaire publié précédemment, la mortalité précoce en particulier. Ce modèle knock-in, exprime la mutation V473M du domaine BAG de Bag3, orthologue de la mutation V468M provoquant une CMD chez l'homme, qui affecte l'interaction avec la chaperonne HSP70, acteur clé des grandes fonctions de la protéostasie cellulaire (système ubiquitine-protéasome (UPS) et macroautophagie). Ce modèle expérimental nous a permis de mettre en évidence certains mécanismes précoces et tardifs impliqués dans le développement de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection abaissée. Les souris mutantes présentent une déficience de la fonction macroautophagique en condition basale, mais pas en condition de carence nutritionnelle induite par un jeûne, indiquant une altération de la macroautophagie spécifique. L'agrèphagie étant l'une de ces fonctions et impliquant Bag3, nous avons coexprimé, par croisement avec la lignée Des-R460W, une desmine mutée protéotoxique pro-agrégante chez les souris Bag3-V473M. La coexpression améliore de manière inattendue la fonction cardiaque comparativement aux deux lignées mères. Chez les hybrides doubles mutants, plutôt qu'une exacerbation du phénotype de desminopathie, on observe une réduction du nombre d'agrégats de desmine. Ceci suggère que Bag3-V473M, par son interaction limitée avec HSP70, limite la prise en charge des agrégats de desmine par la voie macroautophagique. L'augmentation de la desmine ubiquitinylée suggère également une bascule de sa dégradation vers la voie UPS. La fonction normale de Bag3 aggraverait la protéotoxicité associée à la desmine agrégée à travers un blocage de la voie macroautophagique de l'agrèphagie. Les analyses protéomiques et transcriptomiques cardiaques confirment une dérégulation de la protéostasie chez les souris mutantes, mais révèlent également une altération du métabolisme. Nos résultats suggèrent une bascule précoce de l'apport énergétique au niveau cardiaque des acides gras vers le glucose. En conclusion, nos résultats montrent que la mutation V473M du domaine BAG de Bag3 conduit à une altération de la macroautophagie spécifique, entraînant probablement une dérégulation métabolique cardiaque précoce à l'origine de l'insuffisance cardiaque.

Mots clés : BAG3, cardiomyopathie dilatée, modèle murin knock-in, protéostasie, desmine, métabolisme

Physiopathology of a knock-in mouse model carrying a *Bag3* mutation involved in human heart failure

We have successfully generated a new mouse model recapitulating dilated cardiomyopathy phenotype, including gender-dependant severity observed in humans, without the limitations associated with the previous similar model, especially the early lethality. This full knock-in model expresses the hypomorphic V473M mutation of the BAG domain in *Bag3*, orthologous to the V468M mutation causing DCM in humans, thus affecting the interaction between Bag3 and HSP70, a chaperone involved in major proteostasis pathways (ubiquitin-proteasome-system (UPS) and macroautophagy). This model enabled us to study the pathomechanisms involved both in the onset and later stage of HFrEF. The mutant mice were deficient in basal macroautophagy yet showed activation upon starvation-induced stimulation, indicating an alteration of specific rather than bulk macroautophagy. Aggrephagy being a specific macroautophagy pathway and Bag3-dependant, we co-expressed a proteotoxic pro-aggregative mutant desmin in *Bag3*-V473M mice, after breeding our model with a *Des*-R460W line. Unexpectedly, this co-expression improved cardiac function in comparison to both parental lines. Rather than exacerbate the desminopathy phenotype in double mutant mice, reduced amount of desmin-aggregates is observed. This suggests that *Bag3*-V473M, through its limited interaction with HSP70, may be incompetent in desmin aggregates cargo processing. Increased level of ubiquitinated-desmin also suggest a shift toward UPS-dependent degradation. Thus, normal Bag3 function may worsen mutant-desmin associated proteotoxicity through aggrephagic pathway overload. Proteomic and transcriptomic analyses confirmed proteostasis dysregulation in mutant mice but also witness metabolic alterations. Our results are consistent with an early cardiac shift in energy supply from fatty-acids to glucose. To conclude, our results shows that *Bag3*-V473M BAG domain mutation leads to specific macroautophagy impairment, probably resulting in early cardiac metabolic dysregulation and heart failure development.

Keywords : BAG3, dilated cardiomyopathy, knock-in mouse model, proteostasis, desmin, metabolism