

# **Les papillomavirus, “du col à la peau”**

**Gérard Orth**

**Institut Pasteur, Paris**

## Exemples de virus humains susceptibles d'infecter les épithéliums stratifiés de la peau et de muqueuses

### **Virus lytiques** (éruptions, vésicules)

- *ARN*

*Enterovirus*: Coxsackie A et B; *Morbillivirus*: rougeole;  
*Rubivirus*: rubéole

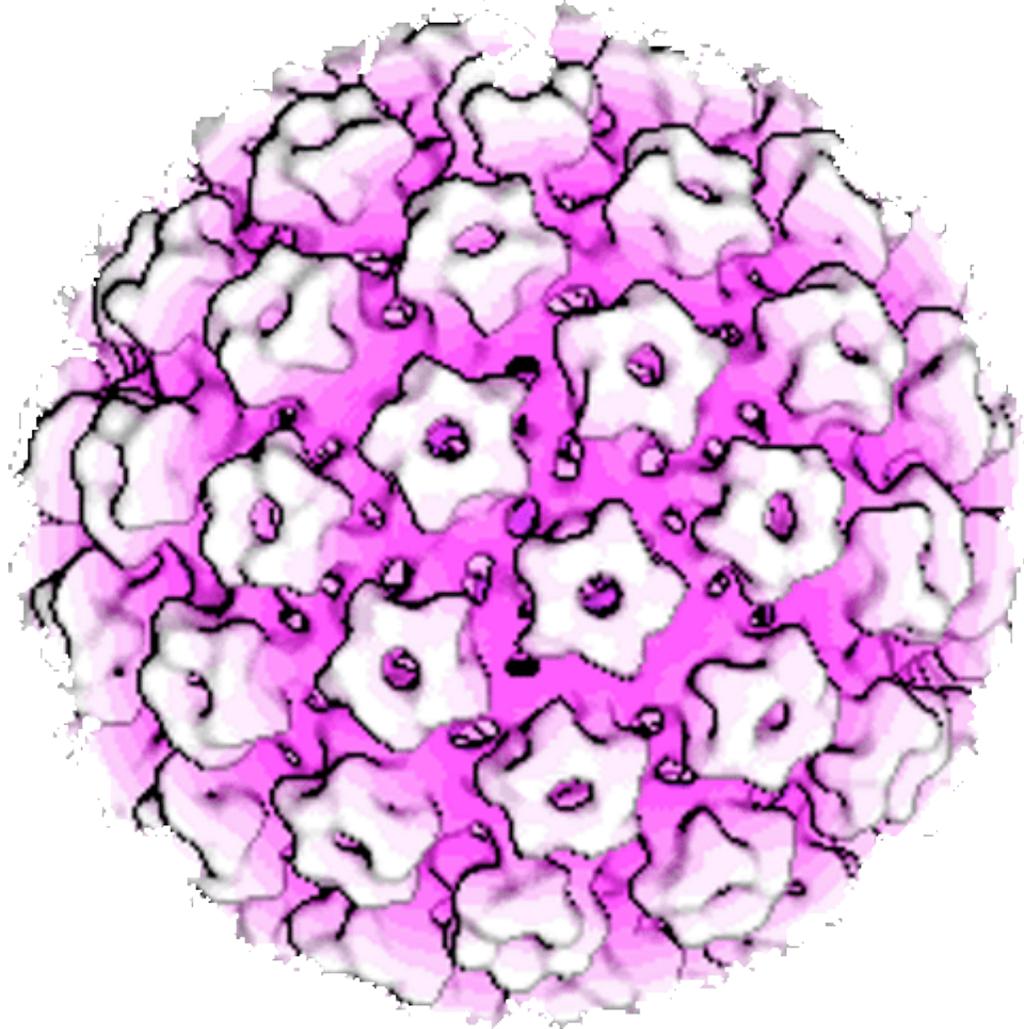
- *ADN*

*Alphaherpesvirus*: herpès simplex, varicelle/zona;  
*Orthopoxvirus*: variole

### **Virus non lytiques** (proliférations)

- *ADN*

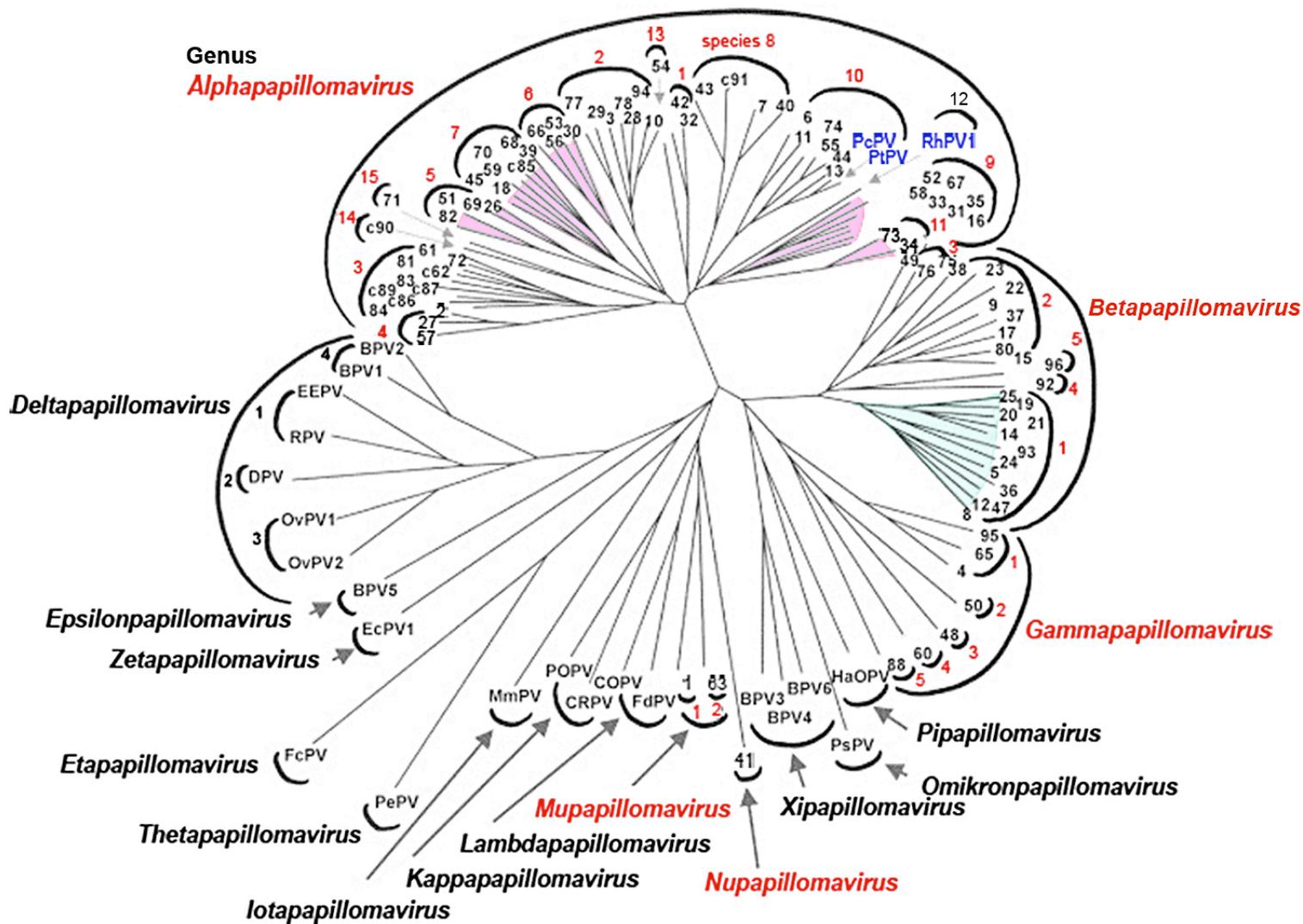
*Molluscipoxvirus*: molluscum contagiosum,  
*Papillomavirus*



# Papillomavirus humains (HPV)

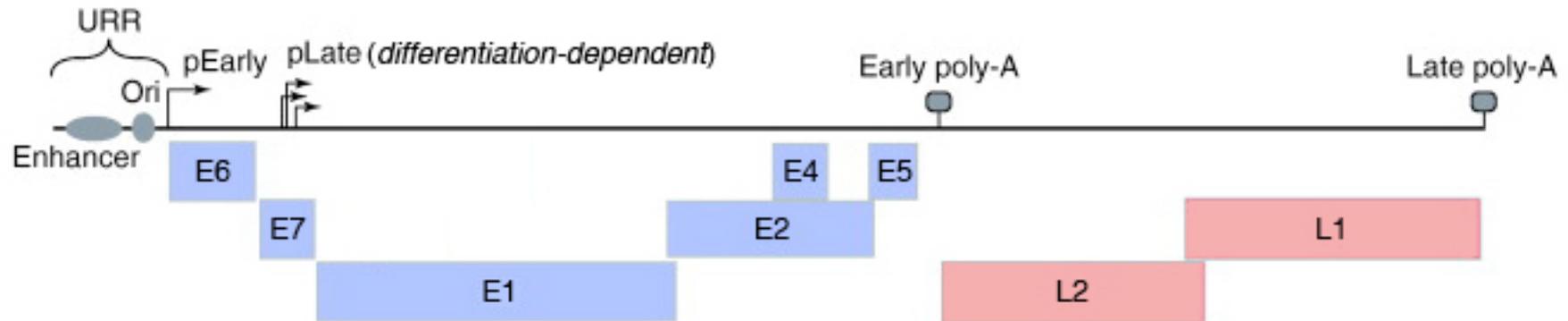
- ADN circulaire; 8000 paires de bases
- 124 types caractérisés (5 genres, nombreuses espèces)
- Organisation génétique similaire
- Strictement épithéiotropes (épithéliums malpighiens)
- Proliférations bénignes des kératinocytes
- Réplication virale couplée à la différenciation des kératinocytes
- Induction de la phase S (cellules au repos ou en différenciation)
- Potentiel oncogène caractérisant certains types

# Arbre phylogénétique de 118 types de papillomavirus



de Villiers et al, *Virology*, 2004, 324: 17-27

## Organisation génétique des *Alphapapillomavirus*



**URR** (*upstream regulatory region*): régulation de la transcription et de la réplication

**E6, E7**: promotion de la phase S, inhibition de l'apoptose, instabilité génétique

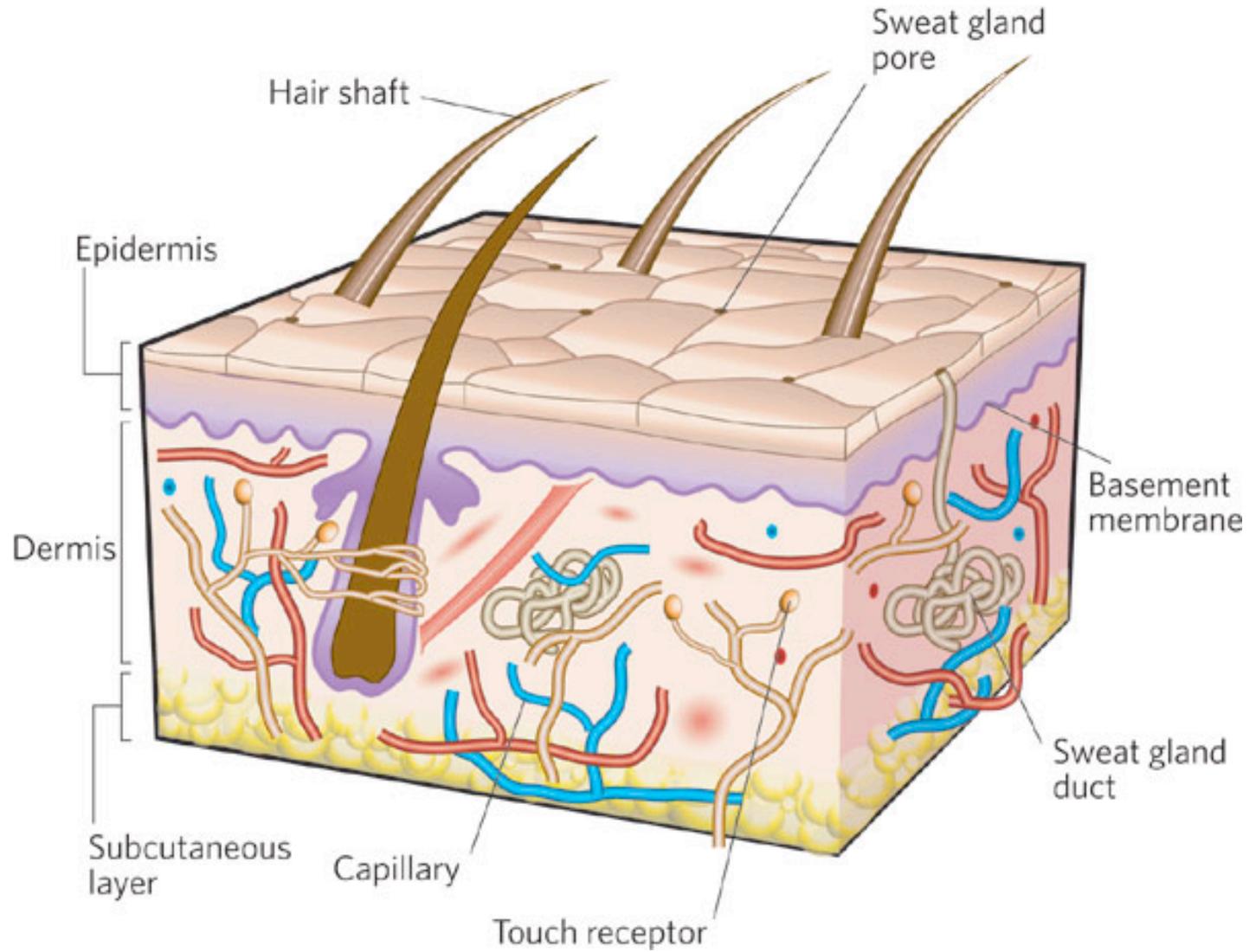
**E1**: réplication; **E2**: régulation de la transcription, réplication et ségrégation de l'ADN;

**E4**: interaction avec le cytosquelette; **E5**: stimulation de la croissance

**L2**: protéine mineure de capside; **L1**: protéine majeure de capside

(From J Bodily, LA Laimins. *Trends Microbiol*, 2011, **19**: 33-39)

# La peau humaine



(S. MacNeil. *Nature*, 2007, **445**: 874-880)

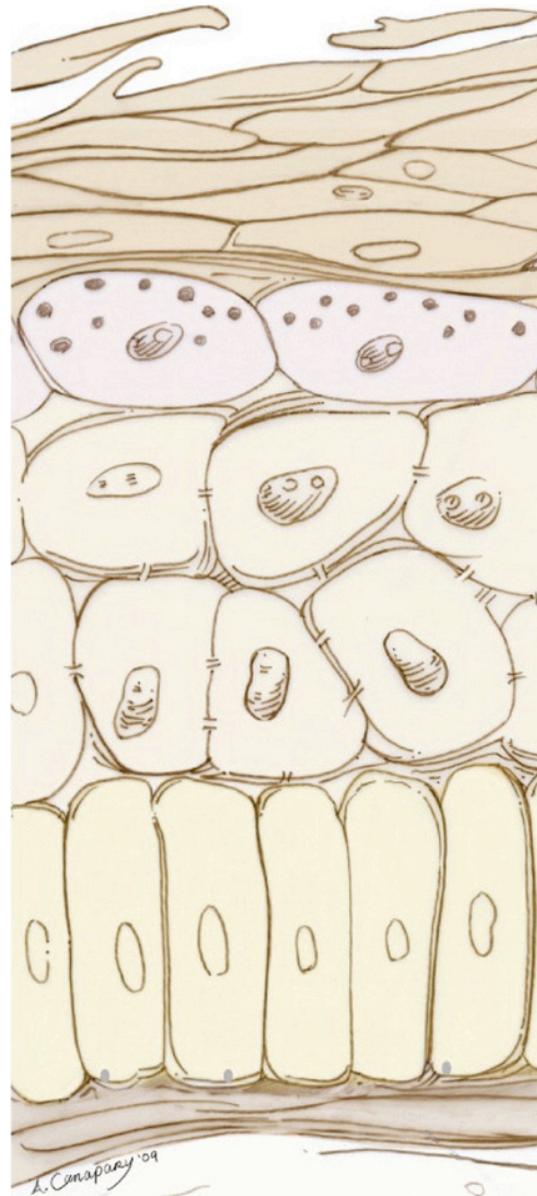
Stratum corneum

Cellules granuleuses

Cellules épineuses

Cellules basales

Membrane basale



Cornéocytes  
Ciment lipidique

Loricrine, transglutaminases,  
corps lamellaires (céramides,  
cholestérol,...), profilaggrine

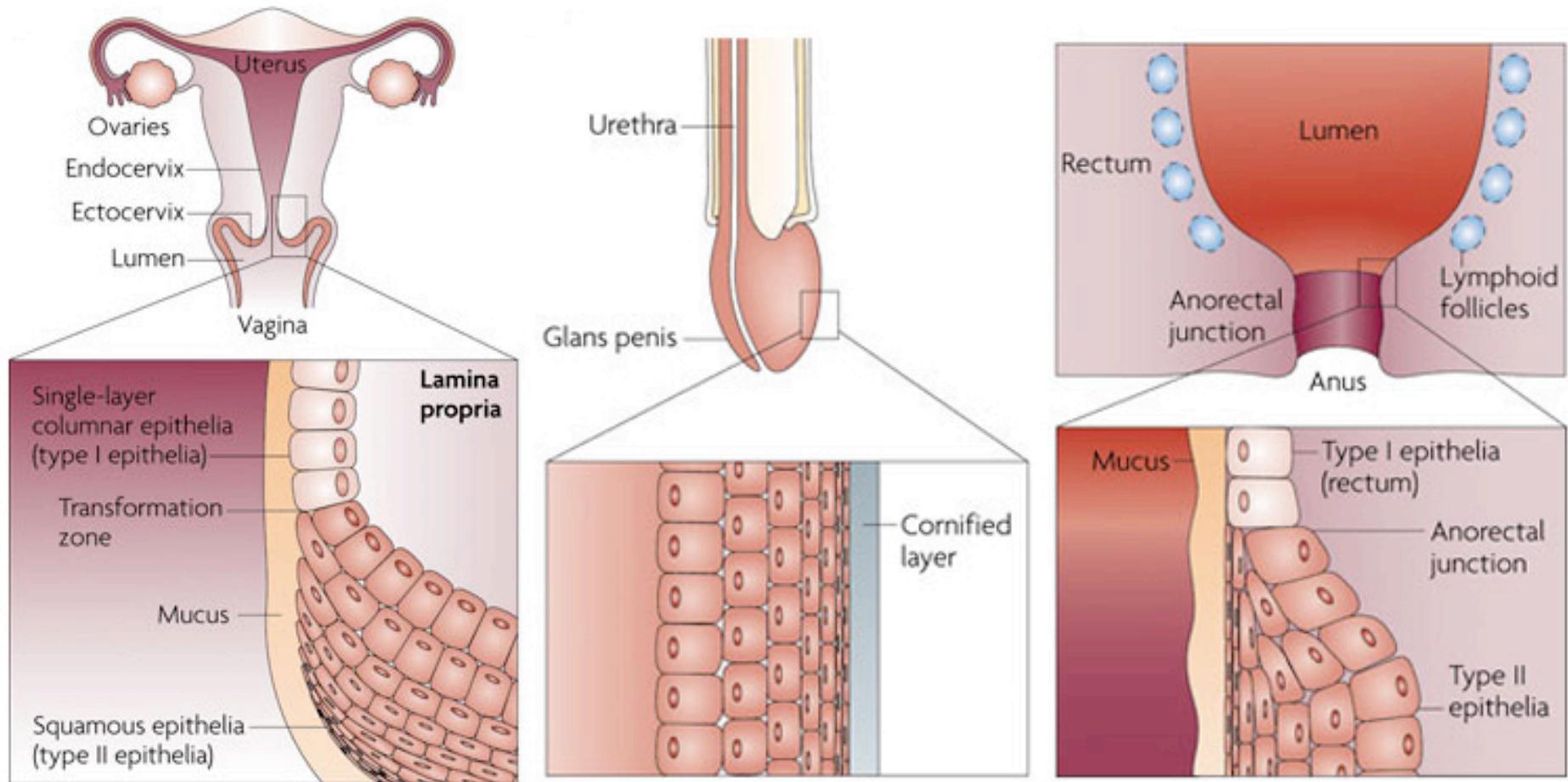
Kératines K1, K10, involucrine  
*Blocage en G0*

Kératines K5, K14  
*Divisions cellulaires*

Laminine, fibronectine, collagène IV,...

(d'après E. Fuchs. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 499-502)

# Anatomie des muqueuses génitales et anorectales



(A. Iwasaki. *Nat Rev Immunol*, 2010, **10**: 699-711)

# Les infections associées aux HPV

- Très ubiquitaires (peau, muqueuses)
- Infections asymptomatiques fréquentes, souvent transitoires
- Manifestations cliniques spécifiques (types, espèces, genres)  
*Verrues* ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ), *épidermodysplasie verruciforme (EV)* ( $\beta$ ),  
*condylomes* ( $\alpha 10$ ), *hyperplasie épithéliale focale orale* ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 10$ ),  
*lésions anogénitales intraépithéliales* ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5-15$ )
- Régression usuelle (immunité à médiation cellulaire)
- Progression vers le cancer, un événement rare  
*Néoplasies intraépithéliales anogénitales* ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ); *EV* ( $\beta 1$ )
  - Infections persistantes, types potentiellement oncogènes,
  - Précurseurs intraépithéliaux, processus par étapes
  - Cofacteurs
- *Grande variabilité interindividuelle de la sensibilité à l'infection*

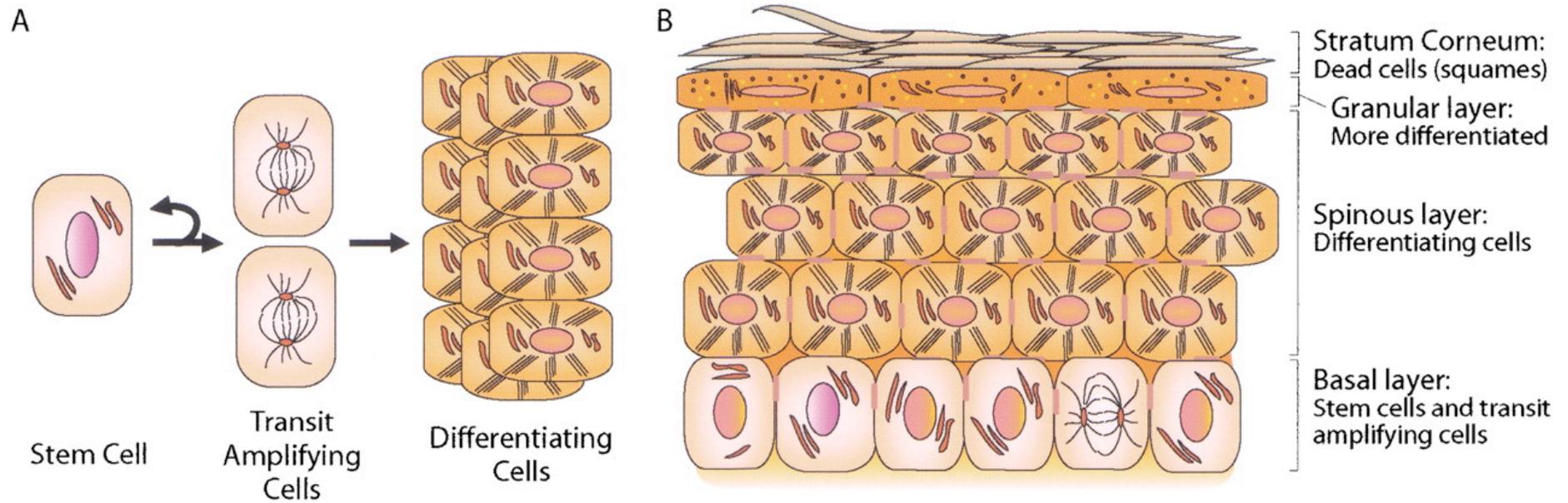
# Les carcinomes associés aux HPV

- Tractus génital et région anale
  - Col de l'utérus: > 95% (HPV-16, 18, 31, 33, 45, ...)
  - Pénis, vulve, anus: > 50% (HPV-16, ...)
- Tête et cou
  - Oropharynx: ~ 25% (HPV-16)
  - Autres localisations: < 5%
- Peau
  - Epidermodysplasie verruciforme: 100% (HPV-5, ...)
  - Population générale, immunodéficience: rôle des HPV (*Betapapillomavirus*) envisagé, mais controversé

# Les kératinocytes, cibles des papillomavirus

- Composants majeurs des épithéliums pluristratifiés (peau, muqueuses malpighiennes)
- Responsables de l'homéostasie, de la cohésion et de la fonction de barrière des épithéliums
- Contribuent au système immunitaire cutané et muqueux en sécrétant, et en répondant à, des cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, peptides antimicrobiens
- Cellules épithéliales souches (homéostasie de l'épithélium):
  - divisions peu fréquentes; auto-renouvellement
  - génération de cellules (*transit amplifying cells*) à potentiel de prolifération limité, destinées à se différencier
  - sous le contrôle du microenvironnement
- *Cellules souches, cibles vraisemblables des papillomavirus*

# Cellules souches de l'épiderme

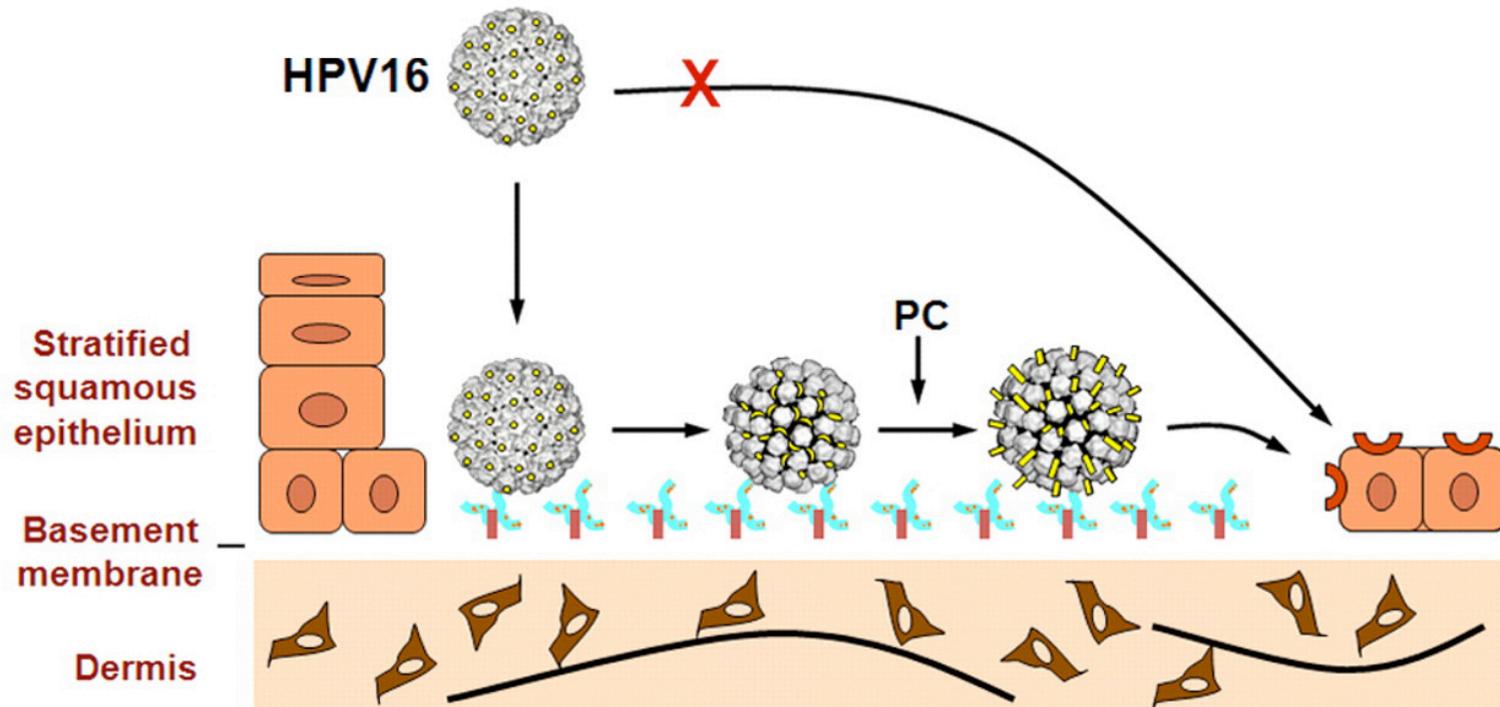


L. Alonso, E. Fuchs. *Genes & Dev*, 2003, **17**: 1189-1200

# Biologie des papillomavirus

- Défis (indépendamment du potentiel oncogène)
  - Infecter une cellule se divisant peu et stimuler sa prolifération
  - Se répliquer dans des cellules en différenciation ne se divisant plus
- Stratégies: interaction de protéines virales (E6, E7, E5/E8) avec des protéines cellulaires pour
  - activer la machinerie de synthèse d'ADN (entrée en phase S)
  - empêcher l'apoptose (synthèse d'ADN non programmée)

## Model for events leading to *in vivo* HPV infection



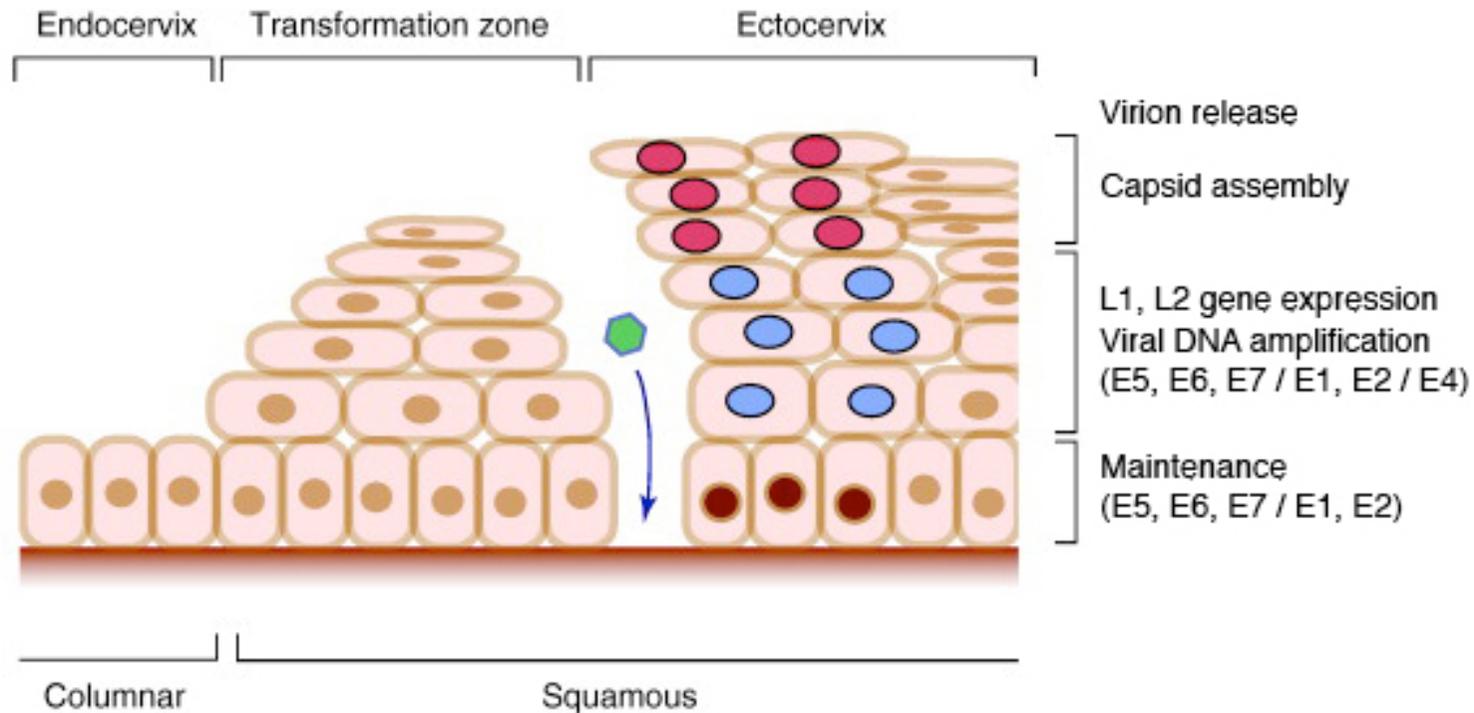
HPV-16 capsid: *L2 protein not exposed*

: *binding to heparan sulfate proteoglycans inducing conformational changes*

PC: *cleavage of the L2 N terminus (furin) > exposure of a cryptic L2 cross-neutralizing epitope > transfer to the epithelial cell surface*

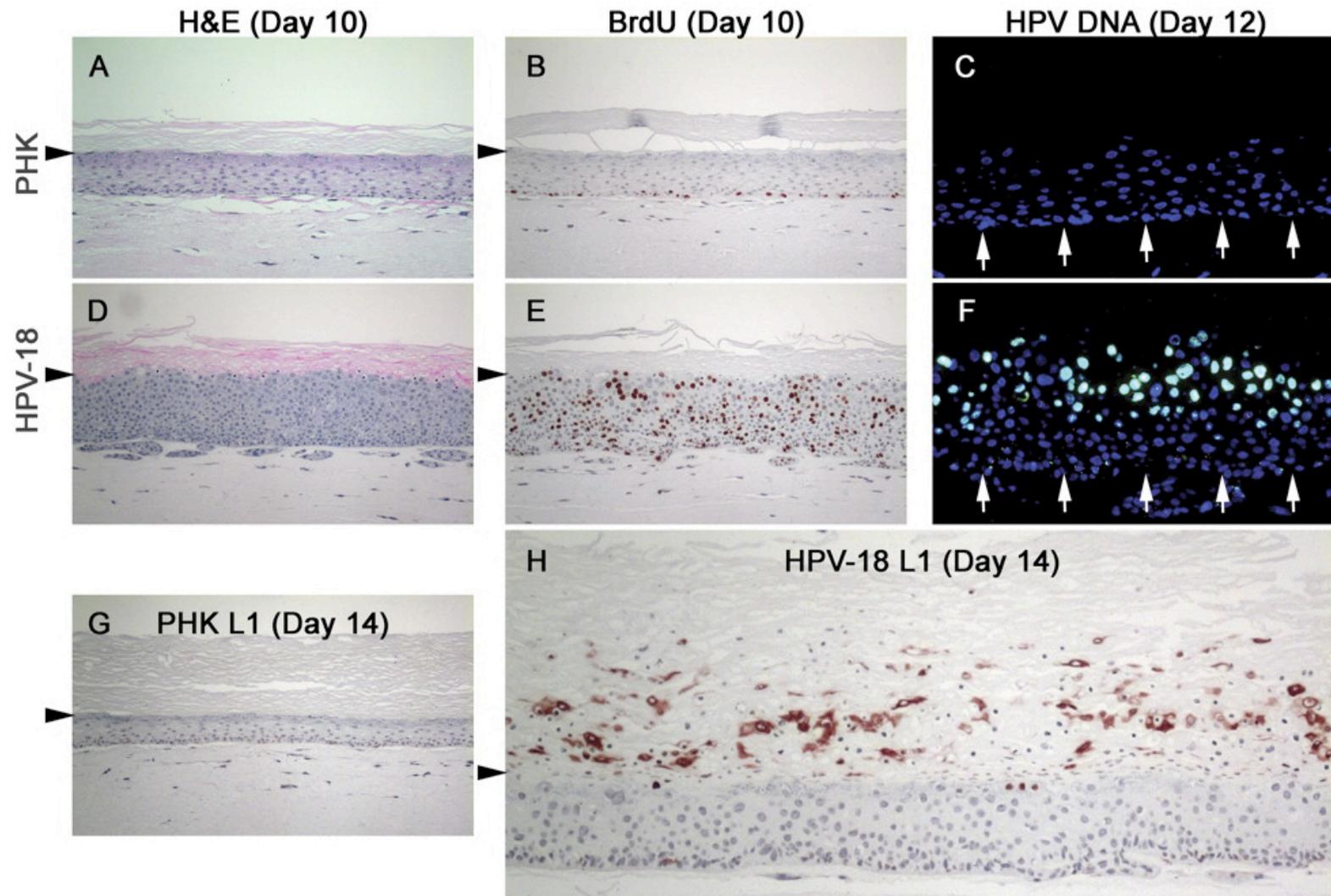
(R Kines, *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**: 20458-63)

## Interaction des *Alphapapillomavirus* avec l'épithélium du col utérin



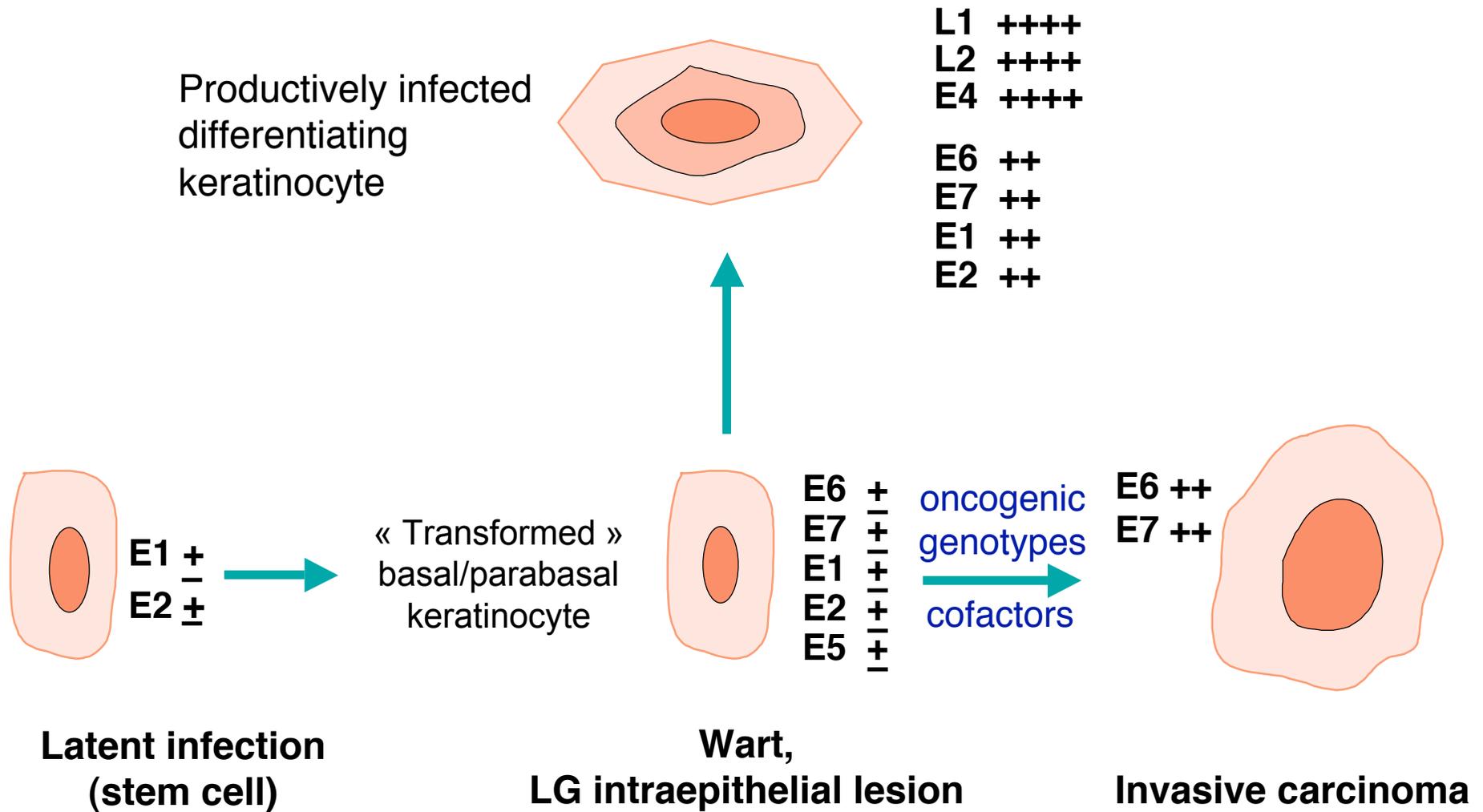
(J Bodily, LA Laimins. *Trends Microbiol*, 2011, **19**: 33-39)

## Réplication du HPV-18 dans des cultures organotypiques de kératinocytes

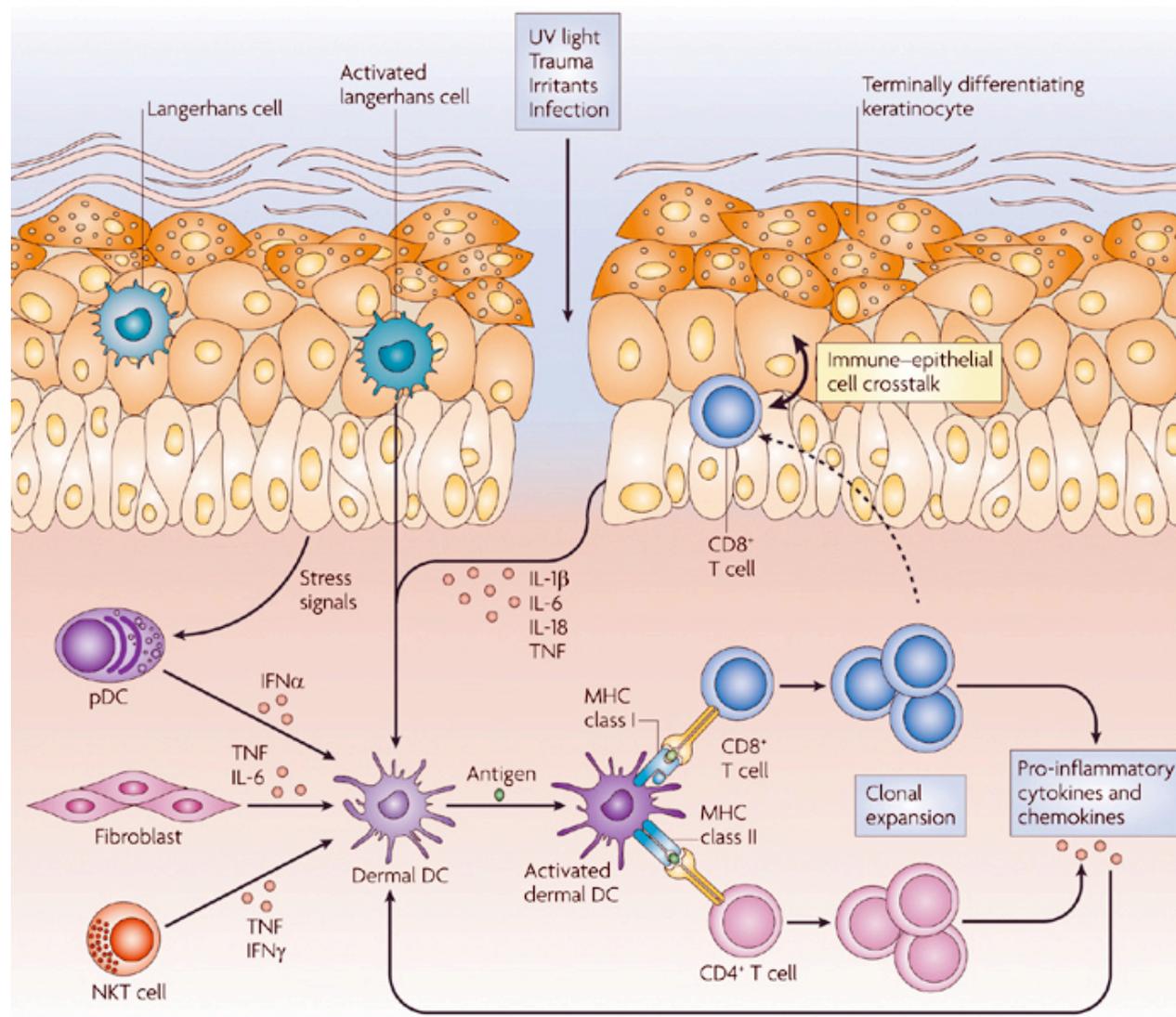


Culture de kératinocytes humains infectés *in vitro* sur un équivalent de derme (fibroblastes inclus dans du collagène), à l'interface milieu-air (« *raft* » culture)

H.K. Wang, A.A. Duffy, T.R. Broker, L.T. Chow. *Genes & Dev*, 2009, **23**: 181-184



## Cellules immunitaires sentinelles résidant dans la peau

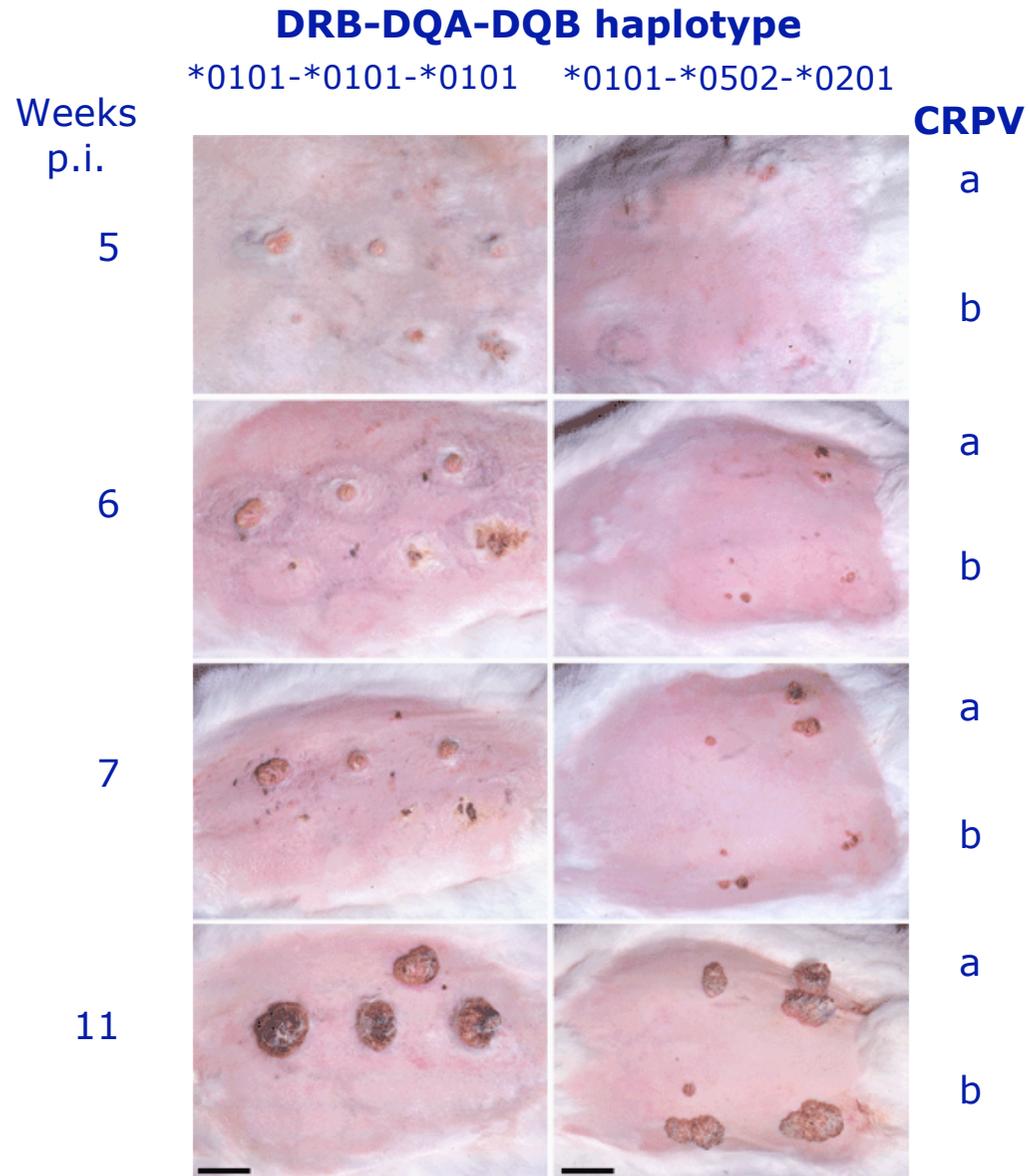


(F Nestle, P Di Meglio, JZ Zhong, B Nickoloff. *Nat Rev Immunol*, 2009, **9**: 679-691)

# Immunobiologie des infections par les HPVs

- Cycle reproductif peu favorable à une réponse immunitaire  
*(épithélium non vascularisé, expression faible des protéines virales dans les cellules basales, virus non lytiques)*
- Réponses humorales inconstantes et faibles aux protéines de capsid L1, L2; réponses tardives aux oncoprotéines E6 et E7 (cancer)
- Réponses à médiation cellulaire innées ou spécifiques encore mal comprises  
*(guérison de l'infection latente, régression des lésions)*
  - acteurs: kératinocytes, cellules de l'immunité innée, différentes sous populations de lymphocytes T
  - cibles: protéines virales précoces, mais aussi agents de subversion (interférons de type I, expression des antigènes du MHC ...)
- Variations interindividuelles
  - Immunodéficits, polymorphismes génétiques, répertoire des cellules T, « trous » dans l'immunité aux différents HPVs, d'origine génétique, ....

**Polymorphisme des gènes du CMH, variation virale et évolution des verrues  
(modèle du papillomavirus du lapin cottontail, CRPV)**

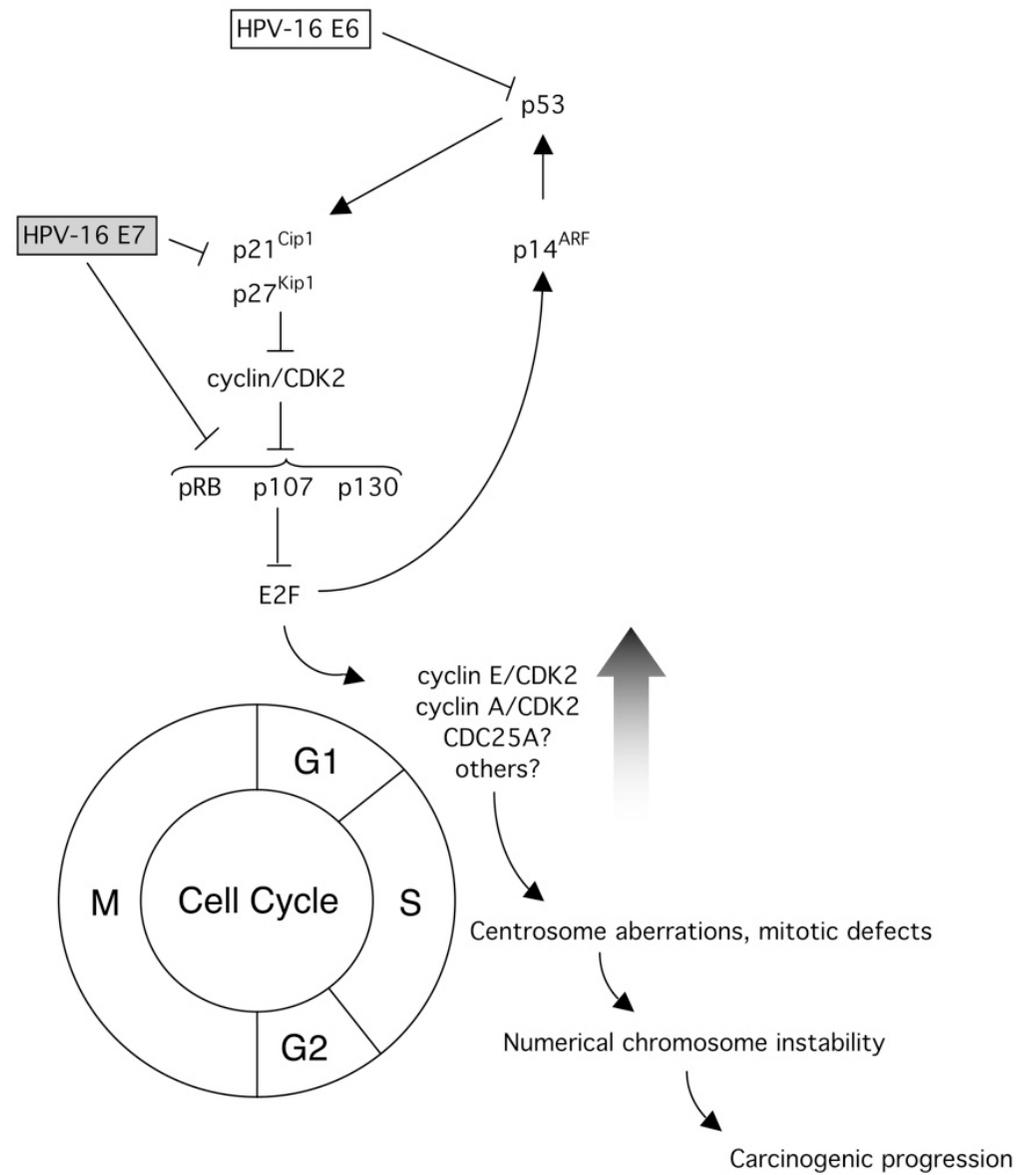


(J. Salmon et al. J Virol, 2000, 74: 10766-77)

# Potentiel oncogène des HPV génitaux

- Propriétés spécifiques des oncoprotéines E6 et E7
  - immortalisation de kératinocytes humains, *ex vivo*
  - interaction avec des cibles cellulaires spécifiques
    - **E6**: p53, E6-AP, Bax, IRF-3, Tyk-2 ...,  
induction transcriptionnelle de la télomérase
    - **E7**: pRb (E2F), p21, cyclines A et E, IRF-9 ...
  - induction de la progression dans le cycle cellulaire, mais aussi d'une instabilité génomique, d'anomalies chromosomiques et d'une subversion de la réponse immunitaire innée
- L'instabilité génétique conduit à l'inactivation ou à l'activation de gènes cellulaires mis en jeu dans la progression tumorale

# Abrogation des régulations négatives du cycle par E6 et E7 (HPV-16)



S. Duensing, K. Münger. (2004) *Int J Cancer* **109**:157-162

# Facteurs génétiques et infections par les HPV (de l'infection asymptomatique au cancer)

## Sensibilité ou résistance aux infections et aux maladies:

- Polymorphisme allélique ou mutation de gènes de l'hôte contrôlant:
  - l'expression ou l'activité des protéines virales E1, E2 vs. E5/E8, E6, E7 (*latence ou maladie*)
  - les réponses immunitaires (*guérison de l'infection, régression des lésions*)
  - la progression tumorale (*immortalisation, transformation, invasion, métastase*)
- Diversité des HPV et variation intratypique

# Facteurs génétiques et risque de cancer du col utérin

- Gènes HLA: association positive ou négative de certains allèles ou haplotypes de gènes de classe I ou II au cancer du col de l'utérus
- Gène TP53 (Arg72Pro): résultats équivoques (Arg72/risque de cancer)
- Gènes candidats de la réponse immunitaire (résultats inconstants)  
(*IL10*, *TNF*, *IL4R*, *CCR2*, *FASLG*, *CD83*)
- Association avec des marqueurs de gènes candidats (réponse immunitaire, réparation réparation de l'ADN, infection virale): études cas-témoins, Costa Rica (Wang et al. 2009, 2010):
  - 49 gènes (92 SNPs):  
*IRF3* et persistance de l'infection; *FANCA* et risque de cancer
  - 305 gènes (7140 SNPs): gènes (ou) régions *OAS3*, *SULF1*, *IFNG*, *DUT*, *DMC1*, *GTF2H4* et progression vers le cancer

## Leçons tirées de maladies mendéliennes

- Syndrome WHIM (*CXCR4*)
- Déficit immunitaire combiné sévère (*IL2RG*, *JAK3*)
- Épidermodysplasie verruciforme (*EVER1*, *EVER2*)
- (Hyperplasie épithéliale focale orale, HPV-13, HPV-32)

# L'épidermodysplasie verruciforme: le phénotype « EV »

## 1 - Clinique

- Génodermatose rare autosomique récessive (MIM 226400)
- Début dans l'enfance; risque élevé de carcinome cutané
- Macules, verrue planes persistantes (patients usuellement bien portants)
- Transformation maligne (sites exposés au soleil), après ~ 20 ans

# L'épidermodysplasie verruciforme: le phénotype « EV »

## 2 - Immunologique

- Pas de phénotype immunologique manifeste
- Pas de prédisposition à d'autres infections
- Anomalies fréquentes de l'immunité cellulaire (secondaires à l'infection?)
  - tests *in vitro* anormaux chez certains patients
  - anergie à des tests cutanés chez la plupart des patients
- Immunité spécifique peu étudiée
  - travaux anciens suggérant une non-réponse des cellules T et NK de patients aux HPV de l'EV

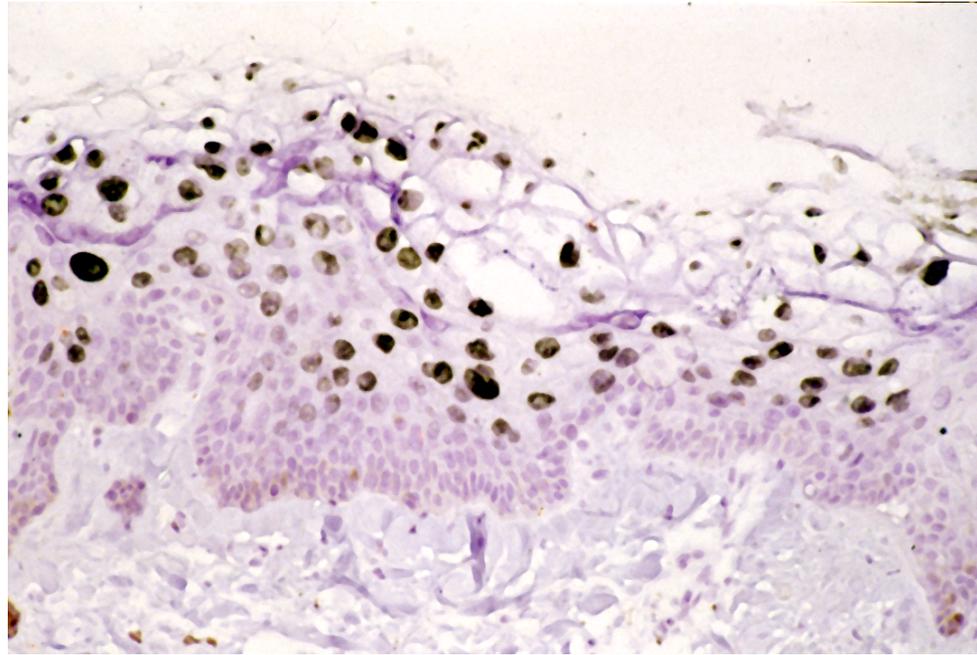
# L'épidermodysplasie verruciforme: le phénotype « EV »

## 3 - Virologique

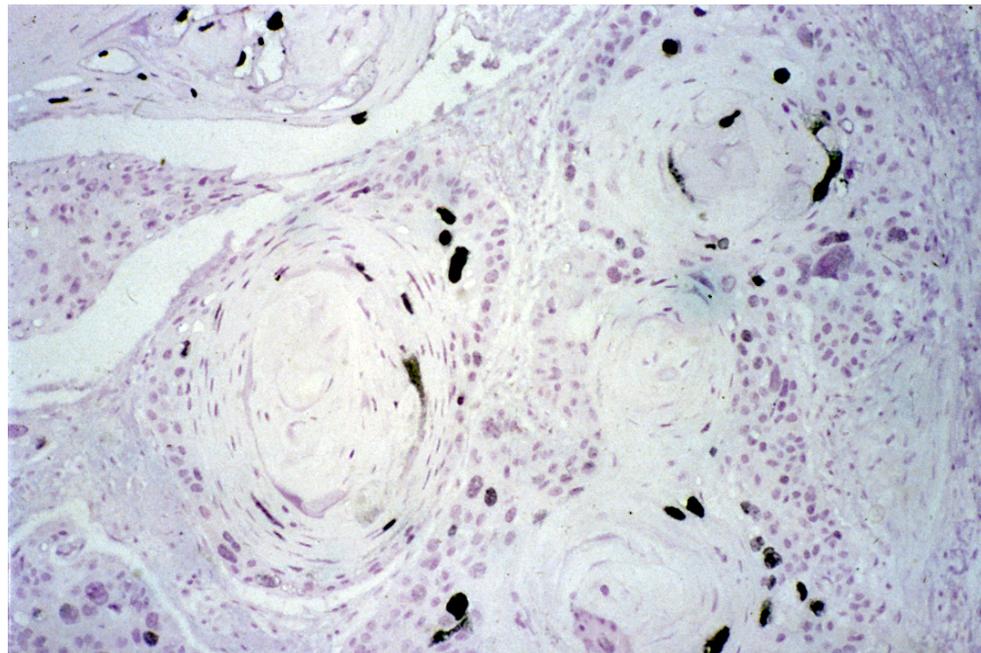
- Predisposition à l'infection par les *Betapapillomavirus* (HPV de l'EV), ubiquitaires, mais en général non pathogènes
- Progression vers le cancer: certains de ces virus ( $\beta 1$ ), dont HPV5
- Haut niveau de réplication virale dans les lésions bénignes
- Nombre élevé de copies épisomiques de l'ADN viral et de transcrits des gènes viraux E6 et E7 dans les cancers
- Anticorps anti E6 et/E7 chez 70% des patients cancéreux
- Mutations de type UV-B (C > T) du gène TP53 :  
*rôle syncarcinogénique du virus et des UV?*

Réplication de l'ADN viral  
(HPV-5): hybridation in situ

Macule d'EV



Cancer



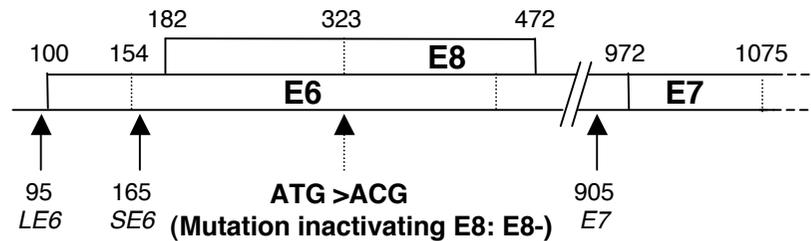
## La restriction à l'infection par les Betapapillomavirus en dehors de l'EV

- 39 types de *Betapapillomavirus* connus; d'autres à caractériser
- Infections asymptomatiques ubiquitaires (PCR), acquises très tôt: *des virus commensaux de la peau humaine ?*
- Innocuité des *Betapapillomavirus*?
  - Rareté des phénotypes d'EV dans l'immunodépression iatrogène ou acquise: *l'immunosuppression, per se, n'est pas suffisante*
  - Rôle des *Betapapillomavirus* dans les précancers et cancers cutanés chez des sujets non atteints d'EV, un sujet controversé: *usuellement << 1 copie d'ADN viral/cellule; pas de type spécifique*
  - Activation des *Betapapillomavirus* latents (anticorps anti-HPV-5) dans des maladies associée à une hyperprolifération de l'épiderme (psoriasis, maladies, bulleuses auto-immunes)
- *Les Betapapillomavirus, des virus défectifs?*

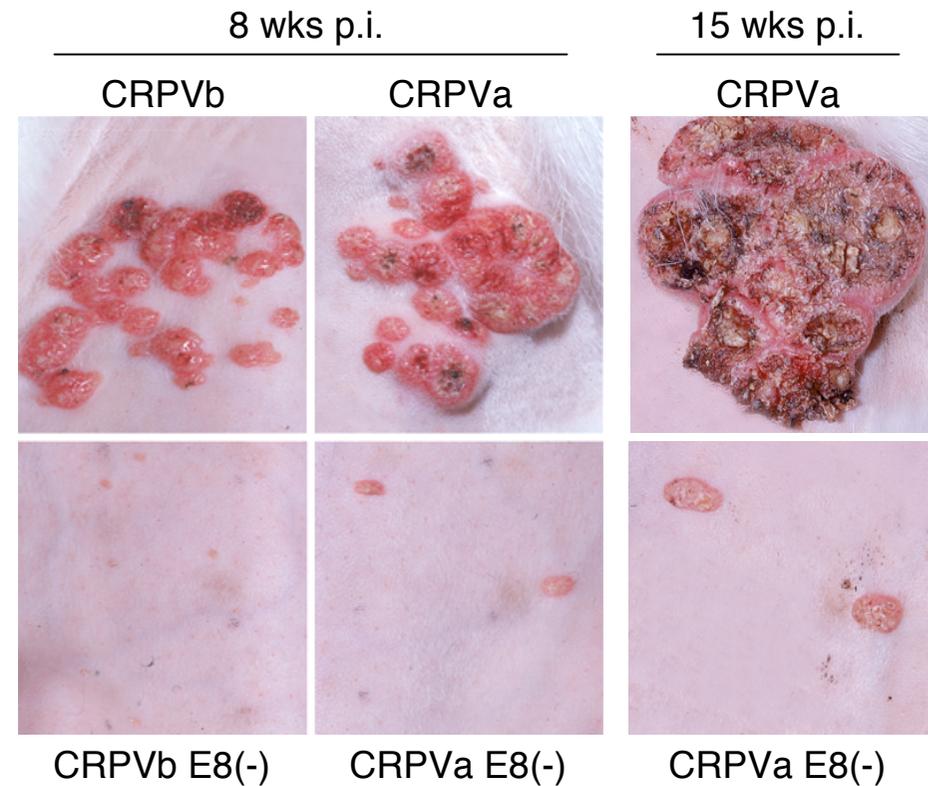
## Les *Betapapillomavirus* sont défectifs pour un gène essentiel (E5/E8)

- Absence d'un gène E5 ou E8 dans le génome des *Betapapillomavirus*
- E5 et E8: petites protéines hydrophobes membranaires (structurellement apparentées)
- E5 du HPV-16:
  - faible pouvoir transformant, *in vitro*
  - stimule la voie de signalisation du récepteur de l'EGF
  - rôle mal compris dans le développement des néoplasies génitales
- Rôle essentiel de la protéine E8 dans la formation d'une verrue dans le modèle du papillomavirus du lapin *cottontail* (CRPV), *in vivo* (M. Nonnenmacher et al. *J Virol*, 2006, 80:4890-4900)

## La protéine E8 du CRPV est essentielle pour la formation d'une verrue (modèle du lapin)



CRPVa MGPAETALYCLVLWIFIVTLLLLLLLLLWRLKRWLVRKYLKAGSCVVQFAEED  
 CRPVb -----I-----K-F-----



(Nonnenmacher *et al.* J. Virol., 2006, **80**:4890-4900)

## Stimulation de la croissance par E8 et homéostasie du zinc

- Le partenaire cellulaire d'E8, le transporteur de zinc ZnT1 (efflux) est une nouvelle cible de la pathogenèse virale, partagée par E5 du HPV-16 (*mécanismes pathogéniques similaires?*)
- E8 du CRPV, comme E5 de l'HPV-16, augmente l'activité du facteur de transcription AP1 (essentiel pour l'activité des PVs)
- L'interaction E8-ZnT1 est requise pour l'activation d'AP-1 par la voie du récepteur de l'EGF
- L'interaction Znt1-E5/E8 pourrait affecter diverses fonctions cellulaires et virales

(M. Nonnenmacher et al. *J Virol*, 2006, 80:4890-900)

# Le zinc, un oligoélément essentiel

- Structure et fonction de nombreuses protéines cellulaires (facteurs de transcription, enzymes, signalisation) ou virales (E6, E7)
- Second messenger
- Concentration intracellulaire et localisation sub-cellulaire du zinc libre ( $Zn^{++}$ ) étroitement régulées par
  - des transporteurs transmembranaires pour l'import (ZIP1-14) et l'efflux (ZnT1-10)
  - des protéines fixant réversiblement le zinc (métallothionéines)
  - un senseur du zinc, le facteur de transcription MTF-1
- Modulation de l'homéostasie du zinc par divers signaux (*PAMPs, cytokines, hormones, antigènes, oxydants, oxyde nitrique, métaux lourds ...*)

Un défaut de l'homéostasie du zinc est-il impliqué  
dans la pathogenèse de l'EV?

Quel gène cellulaire muté pourrait compenser  
l'absence d'E5/E8?

## L'EV, une génodermatose hétérogène

- 1922:** première description de la maladie (Lewandowsky and Lutz)
- 1933:** Transmission récessive (Cockayne)
- 1972:** Transmission autosomique récessive (Rajagopalan *et al.*)
- 1985:** Transmission récessive liée à l'X (une famille) (Androphy *et al.*)
- 2000:** Hétérogénéité allélique de la forme autosomique récessive:  
les loci *EV1* (12q25), *EV2* (2p21-p24) (Ramoz *et al.*)
- 2002:** Les gènes *EVER1* et *EVER2* dans le locus *EV1*, codant pour  
des protéines membranaires (Ramoz *et al.*)
- 2003:** Les gènes *EVER*, membres d'une nouvelle famille de gènes (*TMC*):  
*EVER1/TMC6*, *EVER2/TMC8* (canaux ioniques?, transporteurs?)  
(Kurima *et al.*)

## Mutations des gènes *EVER* dans l'EV

*EVER1* et *EVER2*, deux nouveaux gènes apparentés, adjacents  
(N.Ramoz et al. *Nat Genet*, 2002, **32**: 579-582)

- Mutation homozygote invalidante, dans l'un ou l'autre des gènes, chez 75% (31/41) des cas étudiés à l'Institut Pasteur
- 10 mutations identifiées (hétérogénéité allélique)
- Distribution mondiale (Algérie, Colombie, Japon, Pologne)
- Pénétrance complète dans les familles
- 5 autres mutations d'*EVER1/EVER2* décrites par d'autres groupes

*Pas de mutation chez 25% des patients: hétérogénéité génétique de l'EV*

(G.Orth. *Semin Immunol*, 2006, **18**: 362-74)

## Les protéines EVER et l'homéostasie du zinc

- Protéines apparentées (inconnues en 2002)
- Très conservées
- Localisation dans le réticulum endoplasmique
  
- EVER1 et EVER2 forment un complexe
- Le complexe interagit avec le transporteur de zinc ZnT1
  
- Les protéines EVER et ZnT1 exprimées *ex vivo*
  - affectent la distribution intracellulaire du zinc,
  - répriment l'expression de facteurs de transcription induits par le zinc (MTF-1) ou des cytokines (c-Jun, Elk)
  - l'expression de E5 du HPV-16 lève cette répression

*Les protéines EVER participent à un complexe de transport du zinc, régulant la balance intracellulaire de Zn<sup>++</sup>*

(M Lazarczyk, *et al. J Exp Med*, 2008, **205**: 35-42; *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, **321**:59-83)

# L'EV, une maladie due à un déficit immunitaire primaire

- Expliquer
  - L'abolition de la restriction à l'infection par les *Betapapillomavirus*
  - La persistance des lésions
- Deux hypothèses ne s'excluant pas mutuellement, impliquant l'homéostasie du zinc:
  - Un déficit de l'immunité intrinsèque (première ligne des défenses antivirales)
  - Un déficit de l'immunité innée et de la mise en place de l'immunité spécifique

G.Orth. *Semin Immunol*, 2006, **18**: 362-74

G Orth. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, **321**: 59-83

# L'EV, un déficit primaire de l'immunité intrinsèque

- **Hypothèses**

- Les protéines EVER contribuent au contrôle de la division des cellules souches épidermiques en modulant l'homéostasie du zinc
- Les protéines EVER agissent comme des facteurs de restriction dominants lors de l'infection par les papillomavirus
- Les protéines E5 et E8 lèveraient cette restriction lors de l'infection par d'autres HPV, provoquant la division des cellules souches et permettant le déroulement du cycle viral
- L'inactivation des protéines EVER compenserait l'absence d'E5/E8, permettant le développement d'une lésion (redondant pour HPV-16)

- **Arguments en faveur de l'hypothèse**

- Levée partielle de la restriction associée à une prolifération intensive des kératinocytes (psoriasis, maladies bulleuses, brûlures étendues) ou lors d'une co-infection

## L'EV un déficit primaire de l'immunité innée

- Les gènes *EVER* sont transcrits dans la peau, les lymphocytes B et T, les cellules NK, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, ...
- Des variations de la concentration ou de la localisation de  $Zn^{++}$  sont participant à la réponse de diverses cellules de l'immunité à des stimulations
- Des mutations inactivant les gènes *EVER* pourraient affecter différentes étapes de la réponse immunitaire et conduire à la persistance des lésions
- Les kératinocytes ont vraisemblablement un rôle central dans les réponses innées aux *Bepapillomavirus* et la mise en place de l'immunité spécifique

## Leçons tirées de l'EV, une expérience de la nature

- Nouveaux mécanismes inconnus de défense de la barrière cutanée contre des virus et nouvelles stratégies virales d'échappement:  
***ne pas avoir d'idées préconçues***
- Mécanismes redondants mis en jeu:
  - sensibilité normale des patients atteints d'EV au HPV-16
- Portée générale: polymorphismes d'*EVER* associés à un risque accru
  - de cancer de la peau (*Patel et al.2008*)
  - de progression vers le cancer du col de l'utérus (*Wang et al., 2010*)
- L'hyperplasie épithéliale focale orale (HPV-13,  $\alpha 1$ , HPV-32,  $\alpha 10$ ), ouverture vers la génétique de la sensibilité aux HPV génitaux?
- Leçons restant à tirer des cas d'EV (25%) non associés à l'inactivation d'un gène *EVER*

## *Les patients*

*Institut Pasteur, Paris*

N. Ramoz, O., C.J. Kim, P. Cassonnet, M. Favre  
(*EVER*)

M. Nonnenmacher, J. Salmon, Y. Jacob, F. Breitburd  
(*CRPV E8*)

S. Jablonska, S. Majewski, *Warsaw, Poland*

L.A. Rueda, L.S. Montoya, *Bogota, Colombia*

B. Bouadjar, *Algiers, Algeria*

K. Fukai, *Osaka, Japan*