



Génotypage des papillomavirus humains par séquençage haut-débit : conséquences dans le dépistage du cancer du col de l'utérus et apport conceptuel au virome cutané

Lucie Molet

► To cite this version:

Lucie Molet. Génotypage des papillomavirus humains par séquençage haut-débit : conséquences dans le dépistage du cancer du col de l'utérus et apport conceptuel au virome cutané. Virologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS231 . tel-02179631

HAL Id: tel-02179631

<https://theses.hal.science/tel-02179631>

Submitted on 11 Jul 2019

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.

Génotypage des papillomavirus humains par séquençage haut-débit : conséquences dans le dépistage du cancer du col de l'utérus et apport conceptuel au virome cutané.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat: Immunologie



Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry le 18 mai 2018, par

Lucie Molet

Composition du Jury :

Antoine Touze PU, Université François Rabelais (UMR ISP)	Président
Jean-David Bouaziz PU-PH, Hôpital St-Louis (UMR 976)	Rapporteur
Patrick Soussan MCU-PH, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (UPMC UMRS CR7)	Rapporteur
Jérôme Bouligand MCU-PH, Hôpital Bicêtre (UMR S1188)	Examineur
Françoise Bachellerie DR, Université Paris-Saclay (UMR S996)	Directeur de thèse
Claire Deback MCU-PH, Hôpital Paul Brousse (UMR S996)	Co-Directeur de thèse

NNT : 2018SACLS231

Thèse de doctorat

Génotypage des papillomavirus humains par séquençage haut-débit : conséquences dans le dépistage du cancer du col de l'utérus et apport conceptuel au virome cutané.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat: Immunologie

université
PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué

Thèse présentée et soutenue à Chatenay-Malabry le 18 mai 2018, par

Lucie Molet

Composition du Jury :

Antoine Touze PU, Université François Rabelais (UMR ISP)	Président
Jean-David Bouaziz PU-PH, Hôpital St-Louis (UMR 976)	Rapporteur
Patrick Soussan MCU-PH, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (UPMC UMRS CR7)	Rapporteur
Jérôme Bouligand MCU-PH, Hôpital Bicêtre (UMR S1188)	Examineur
Françoise Bachelerie DR, Université Paris-Saclay (UMR S996)	Directeur de thèse
Claire Deback MCU-PH, Hôpital Paul Brousse (UMR S996)	Co-Directeur de thèse

NNT : 2018SACLS231

Thèse de doctorat

Remerciements

Je remercie l'ensemble de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je remercie très sincèrement le Pr Bouaziz et le Dr Soussan d'avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie le Pr Touze et le Dr Bouligand d'avoir accepté d'examiner mon travail. Merci au Dr Maillère d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr Deback pour ces trois ans et demi d'encadrement et pour la réalisation de ce travail de thèse. Je remercie également le Dr Françoise Bachelier d'avoir supervisé ce travail et pour ses conseils avisés.

Je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale de m'avoir fait bénéficier d'une bourse pour réaliser mes deuxième et troisième années de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'U996 pour leur accueil chaleureux et les moments passés ensemble. En particulier merci à vous les copains Nagham, Julie, Vincent, Joyce, Matthias et Carmen

Je remercie le Pr Roque de m'avoir recrutée comme Assistante hospitalo-universitaire et m'avoir permis de débiter ma thèse en parallèle de mes fonctions, ainsi que l'ensemble des membres du laboratoire de Virologie de l'Hôpital Paul Brousse, en particulier Elise, Linda, Christelle, Coralie, Corinne et Corinne, Stéphanie, Gwenaëlle, et Cyrielle pour l'amitié et réconfort qu'elles m'ont témoignés

Je remercie Delphine Girlich et Rémy Bonnin de m'avoir aidé à réaliser les projets qui m'ont été confiés, et pour l'amitié et le soutien précieux qu'ils m'ont apporté en toutes occasions.

Je remercie le Dr Bouligand, ainsi que toute l'équipe de génétique et notamment Alexis Proust de m'avoir aidé à apprivoiser le Miseq et pour les milliers de conseils qu'ils m'ont prodigués.

Je remercie Muriel Masson, Gilles Trave et Noella Mukobo pour leur aide précieuse.

Merci à vous tous les copains de toujours et ceux que j'ai rencontrés, tout au long de cette très très longue aventure qui a commencé lors de mon entrée à la fac en 2003, et qui ne s'est jamais arrêtée depuis lors.

Un énorme merci à mes parents pour votre amour, votre soutien et vos nombreux encouragements tout au long de mes longues études.

Merci aussi à mes beaux-parents pour leurs conseils avisés

Enfin merci à mes deux amours. Merci à toi David pour ta confiance sans limite, merci d'avoir trouvé les mots justes pour me rassurer et me faire relativiser dans de nombreuses situations. La thèse est loin d'être un long fleuve tranquille et malgré les tempêtes on s'en est bien sorti. Merci à toi Noah ma petite fille, mon bonheur.

Table des matières

Table des matières.....	1
Introduction	7
I- Diversité de la famille des <i>Papillomaviridae</i>	8
1- Diversité génétique des papillomavirus et classification phylogénétique	8
2- Tropisme épithélial et pouvoir oncogène	10
II- Organisation et expression du génome viral.....	12
1- Organisation génomique.....	12
2- Expression et fonction des protéines virales.....	14
a- Contrôle de l'expression transcriptionnelle	14
b- Fonction des protéines virales.....	15
III- Physiopathologie de l'infection HPV	19
1- Cycle réplcatif	19
a- Généralités sur l'épithélium cutané	19
b- Cycle réplcatif	20
2- HPV et virome cutané	25
a- Les virus constituant le virome cutané.....	25
b- HPV et virome cutané.....	25
c- Réponse de l'hôte aux infections HPV.....	26
3- Manifestations cliniques de l'infection à HPV.....	27
a- Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme muqueux.....	28

b-	Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme cutané.....	32
4-	Mécanismes de la carcinogénèse induite par HPV	34
a-	Carcinogénèse muqueuse	35
b-	Carcinogénèse cutanée associée aux bêta HPV	37
c-	L'immunodépression, facteur favorisant la carcinogénèse.....	40
IV-	Dépistage et prévention des infections génitales à HPV.....	51
1-	Dépistage.....	51
a.	Le frottis cervico-utérin (FCU)	51
b-	FCU anormal : place du test HPV.....	52
2-	Prévention	53
3-	Traitement.....	54
V-	De l'identification de nouveaux HPV au concept de virome : impact de l'évolution des techniques de séquençage	56
1-	Clonage et cartographie des génomes viraux	56
2-	Hybridation directe	56
3-	Réaction en chaîne par polymérase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR) et génotypage par séquençage ou hybridation inverse	58
a.	Réaction de PCR.....	58
b-	Génotypage des HPV amplifiés par PCR.....	61
4-	Réplication circulaire de l'ADN (<i>Rolling-Circle Amplification</i> , RCA)	63
5-	Apport des techniques de séquençage haut débit	64
a-	Métagénomique globale	65

b- Métagénomique ciblée.....	67
c- Séquençage des produits de capture	68
Objectifs des travaux	70
Résultats.....	73
Etude N°1	74
Préambule	75
Exposé des travaux.....	77
Etude N°2	108
Préambule	109
Exposé des travaux.....	112
Discussion et perspectives.....	158
I- Identification des HPV de génotype indéterminé dans les frottis cervico-utérins	159
1- Etat du sujet	159
2- Résumé des travaux	160
3- Mécanismes mis en jeux et conséquences	161
II- Syndrome WHIM : Dynamique du virome HPV au cours d'un traitement par AMD3100.....	162
1- Etat du sujet	162
2- Résumé des travaux	162
3- Mécanismes mis en jeux et conséquences	163
III-Conclusion	164
Références bibliographiques	165

Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des HPV (Doorbar et al, 2015).....	9
Figure 2 : Représentation schématique du génome viral d'un représentant du chacun des genres alpha, bêta, gamma, mu et nu HPV (adapté à partir de viral zone, (https://viralzone.expasy.org/)	13
Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la réplication (Bergvall et al, 2013 ⁵⁵)	16
Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épiderme humain	20
Figure 5 : Organisation du cycle réplcatif des HPV (d'après Doorbar, 2005)	24
Figure 6 : Condylomes acuminés, aspect macroscopique.....	28
Figure 7 : Images colposcolpiques de CIN1, CIN2, CIN3	29
Figure 8 : Verrue vulgaire, aspect macroscopique.....	32
Figure 9 : Verrue plane, aspect macroscopique	33
Figure 10 : Principaux rôles des protéines E5, E6 et E7.....	37
Figure 11: Exemples de mécanismes oncogènes potentiels des bêta-HPV	40
Figure 12 : Modèle proposé pour l'expression des HPV dans les kératinocytes.....	43
Figure 13 : Mutations du gène CXCR4 identifiées dans le syndrome WHIM	46
Figure 14: Hybridation en phase liquide (Hantz et al, 2010).....	57
Figure 15: Principe du test InnoLipa Extra II (Hantz et al, 2010)	62
Figure 16 : NGS (Illumina), étape d'amplification clonale sur un support en verre	66
Figure 17 : Techniques de séquençage haut débit du génome viral (Houlcroft et al, 2017)	69

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des génotypes HPV en fonction de leur potentiel oncogène	11
Tableau 2 : Fonctions des différentes protéines virales.....	18
Tableau 3 : Principales amorces utilisées pour la détection des HPV par PCR	59

Liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

AK Kératose actinique

ARN Acide ribonucléique

ARNm Acide ribonucléique messenger

ASC-H Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL

ASC-US Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance

ATM ataxia telangiectasia-mutated

ATR ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

BCC Carcinome basaloïde (Basal cell carcinoma)

BPV Bovine Papillomavirus

CIN Cervical Intrepithelial Neoplasia

CIRC Centre International de Recherche sur le Cancer

CMH Complexe Majeur d'Histocompatibilité

EBV Epstein-Barr Virus

EGF Epithelial Growth Factor

EGFR Epithelial Growth Factor-Receptor

FCU Frottis cervico-utérin

HAS Haute Autorité de Santé

hDlg human Drosophila discs large tumour suppressor

HHV-8 Herpes Virus Humain 8

HLA Human Leukocyte Antigen

HPV Papillomavirus Humain

HPV BR Papillomavirus humain à bas risque oncogène

HPV HR ..Papillomavirus humain à haut risque oncogène

HSIL High-grade Squamous Intraepithelial Lesion

hTERT human Telomerase Reverse Transcriptase

HTS High Throughput Sequencing

ICC Cancer Cervical Invasif

IFN- β Interféron- β

IRF Interferon Regulatory Factor

LCR Long Control Region

LSIL Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion

MAG Membrane-Associated Guanylate kinase inverted

Mya Milliards d'années

MEC Matrice extracellulaire

NGS Next-Generation Sequencing

NLS Nuclear Localization Signal

NMSC.. Cancer de la peau non mélanome

ORF Open Reading Frame

PDZ Postsynaptic density/Discs large/ Zonula occludens

PKC Protein Kinase C

Rb Rétinoblastome

RCA Rolling circle amplification

SCC Carcinome épidermoïde (Squamous cell carcinoma)

hTERT humanTelomerase Reverse Transcriptase

TNF α Tumor Necrosis Factor α

VLP Virus-Like-Particule

VZV Virus de la Varicelle et du Zona

WGA Whole Genome Amplification

WGS Whole Genome Sequencing

Introduction

I- Diversité de la famille des *Papillomaviridae*

1- Diversité génétique des papillomavirus et classification phylogénétique

Les papillomavirus (PV) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*, large famille laquelle englobe des virus qui infectent les épithéliums de la peau et des muqueuses de l'Homme et de nombreuses espèces animales (mammifères, oiseaux, reptiles)¹, dont certaines sont utilisées comme modèle d'étude à l'instar du lapin d'Amérique ou *cottontail rabbit*. L'évolution du sous-groupe des Papillomavirus Humain (HPV) fait l'objet de nombreuses études, tant sur un plan phylogénétique que fonctionnel, qui concluent à leur origine très ancienne.^{2,3} Ces virus sont apparus il y a plus de 350 millions d'années et ont co-évolué avec leurs hôtes vertébrés dont l'espèce humaine. Les HPV font partie intégrante de l'environnement microbiologique de l'Homme. Les HPV cutanés sont décrits comme des virus commensaux ubiquitaires de l'Homme.⁴ Dans certaines conditions, ces virus commensaux peuvent développer un potentiel pathogène qui se manifeste de la simple lésion bénigne à type de verrue jusqu'à des lésions malignes pouvant évoluer en cancer.⁵

On dénombre actuellement plus de 320 PV dont la séquence génomique est disponible, et parmi ceux-là plus de 170 HPV (PV episteme (PaVE) ; <http://pave.niaid.nih.gov/#home>).⁶ Une classification phylogénétique de ces virus a été fondée sur l'homologie de la séquence du gène *L1* codant la protéine majeure de capside, l'un des deux gènes les plus conservés (avec le gène *E1*) au cours de l'évolution des PV.^{6,7} Un génotype est considéré comme nouveau lorsque la séquence nucléotidique du gène *L1* présente au moins 10% de différence avec un autre PV.⁷ On dénombre à ce jour 38 genres de PV, les virus étant regroupés au sein de chaque genre sur la base d'une homologie de séquence des gènes *L1* d'au moins 60%.⁷ Les HPV sont répartis en 5 genres alpha, bêta, gamma, mu et nu (Figure 1). Les genres mu et nu sont largement minoritaires puisqu'ils ne comptent que 4

Les HPV sont classés en 5 genres ; les genres alpha et bêta-gamma représentent les genres les plus importants. Les HPV appartenant au genre alpha sont souvent classés selon la nature des épithéliums qu'ils infectent et le risque oncogène qu'ils représentent : en gris les alpha-HPV cutanés à bas-risque oncogène, en jaune les alpha-HPV muqueux à bas-risque oncogène et en rose les alpha-HPV muqueux à haut-risque oncogène.

2- Tropisme épithélial et pouvoir oncogène

Les HPV sont également différenciés en fonction de leur tropisme préférentiel pour les kératinocytes de la peau ou des muqueuses et de leur potentiel pathogène.^{6,7,9}

Le genre alpha-HPV comprend des génotypes infectant les muqueuses génitales et oropharyngées^{10,11}, mais aussi des HPV à tropisme cutané responsables du développement de verrues¹². Les alpha-HPV muqueux se différencient en 2 groupes en fonction de leur potentiel oncogène : les alpha-HPV à bas-risque oncogène (HPV BR) comme HPV6 et 11 qui sont associés à des condylomes génitaux et à des papillomes laryngés, tandis que les alpha-HPV à haut-risque oncogène (HPV HR) comme HPV16 et 18 sont associés aux cancers anogénitaux et oropharyngés.¹³ Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a répertorié 13 alpha-HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) comme des agents à potentiel carcinogènes pour l'Homme¹⁰ (Tableau 1).

Les genres bêta, gamma, mu et nu regroupent des HPV à tropisme cutané. Ces virus sont détectés sur la peau des individus sains en l'absence de toute manifestation clinique.¹⁴⁻¹⁸ Ils peuvent aussi être responsables de verrues. Certains bêta-HPV représentent un risque oncogène puisqu'ils sont incriminés dans le développement de carcinomes cutanés non mélaniques (NMSC) chez les patients immunodéprimés,^{19,20} mais aussi potentiellement dans la population générale en association avec l'exposition aux rayonnements UV²¹⁻²⁴ (développé dans le chapitre IV). Les bêta-HPV5 et 8 sont directement impliqués dans le développement de cancers cutanés chez les patients souffrant d'épidermodysplasie verruciforme, une génodermatose congénitale rare caractérisée par une

susceptibilité spécifique au développement de la pathogénie associée aux infections à bêta-HPV.^{10,25}
(Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des géotypes HPV en fonction de leur potentiel oncogène (Centre International de Recherche sur le Cancer, CIRC, Lyon, France)

Group	HPV types	Comments
Alpha HPV types		
1	16	Most potent HPV type, known to cause cancer at several sites
1	18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Sufficient evidence for cervical cancer
2A	68	Limited evidence in humans and strong mechanistic evidence for cervical cancer
2B	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	Limited evidence in humans for cervical cancer
2B	30, 34, 69, 85, 97	Classified by phylogenetic analogy to HPV types with sufficient or limited evidence in humans
3	6, 11	..
Beta HPV types		
2B	5 and 8	Limited evidence for skin cancer in patients with epidermodysplasia verruciformis
3	Other beta and gamma types	..

II- Organisation et expression du génome viral

Les HPV à l'instar des autres membres de la famille des *Papillomaviridae* sont de petits virus nus d'environ 60 nm de diamètre.

Les premiers HPV ont été identifiés dans les années 1970.²⁶ Cependant, l'absence de système de culture cellulaire simple permettant d'isoler et de caractériser ces virus a freiné l'étude de leur cycle réplcatif et l'établissement d'une taxonomie fondée sur leurs propriétés biologiques. Le cycle viral des HPV dépend étroitement de la différenciation cellulaire. De nouveaux systèmes de cultures organotypiques apparus ces dernières années constituent les seuls modèles d'étude du cycle viral.²⁷

1- Organisation génomique

Le génome des HPV est un ADN double-brin circulaire d'environ 8kb qui contient 7 à 8 cadres de lecture selon les génotypes. L'alpha-HPV16 impliqué dans 55% des cas du cancer du col de l'utérus (<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/cancer-du-col-uterus-papillomavirus>) a été le plus étudié. Le génome des HPV s'organise en trois régions différentes (Figure 2). Une première région contient les gènes précoces (E=Early) *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* et *E7*, codant les protéines impliquées dans les premières étapes du cycle viral. Une deuxième région contient les gènes tardifs (L=Late) *L1* et *L2* codant respectivement les protéines majeure et mineure de la capside virale (le rôle de chacune de ces protéines sera détaillé dans le chapitre suivant). Enfin, une troisième région appelée LCR (*Long Control Region*) située entre les gènes *L1* et *E6* contient l'origine de réplcation, ainsi que les éléments de régulation de réplcation et de transcription virale.²⁸

Malgré une grande homogénéité d'organisation du génome des HPV, certaines caractéristiques sont spécifiques à chaque genre. Chez les alpha-HPV HR 16, 18 et 31, il existe un gène additionnel *E8* situé

dans la région codant le gène *E1*, à l'origine d'un transcrit d'épissage $E8^{\wedge}E2C$, régulateur de la transcription virale.²⁹⁻³¹

Le génome des bêta-HPV est plus court que celui des alpha-HPV et mesure 7,4 à 7,7kb. En effet, la région LCR des bêta-HPV mesure seulement 400 pb contre 650 à 900 pb chez les alpha-HPV. De plus les bêta-HPV, à l'exception d'HPV14, sont dépourvus du gène précoce *E5*. On trouve par contre l'expression du transcrit d'épissage $E8^{\wedge}E2C$, réprimant l'expression des gènes *E6* et *E7*.³² Comme les bêta-HPV, le génome des gamma-HPV est dépourvu du gène *E5*. De découverte récente, les HPV101, HPV103 et HPV108 diffèrent des autres gamma-HPV par l'absence du gène *E6* dans leur génome^{33,34}.

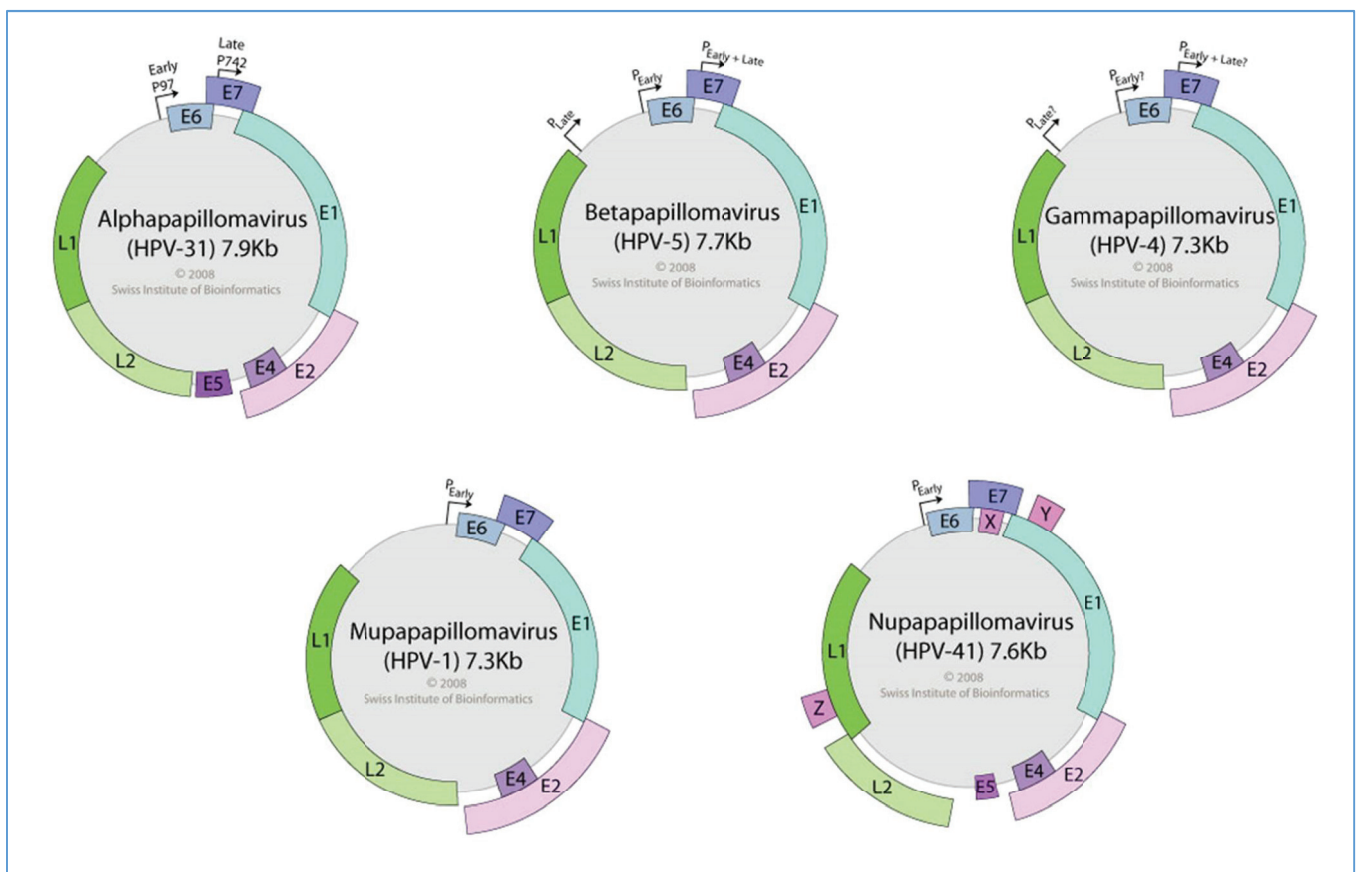


Figure 2 : Représentation schématique du génome viral d'un représentant de chacun des genres alpha, bêta, gamma, mu et nu HPV (adapté à partir de viral zone, (<https://viralzone.expasy.org/>))

Une désorganisation génomique liée à l'intégration du génome viral dans le matériel chromosomique de la cellule infectée peut être observée dans les cancers invasifs liés aux HPV HR, en particulier HPV16 et 18.³⁵ Ceci implique la linéarisation du génome par rupture des ORF E1/E2 et réarrangement du génome viral. L'intégration du génome viral s'accompagne d'une perte du LCR qui contrôle l'expression des gènes *E6* et *E7*.^{36,37} Cette intégration contribue ainsi à la dérégulation de l'expression de E6 et E7 et donc des fonctions des partenaires cellulaires de ces deux protéines virales.³⁸⁻⁴⁰

2- Expression et fonction des protéines virales

a- Contrôle de l'expression transcriptionnelle

La transcription du génome circulaire est effectuée à partir d'un seul brin d'ADN. Elle est initiée par plusieurs promoteurs et permet d'obtenir un ARN polycistronique à l'origine de plusieurs ARNm contenant divers cadres de lecture.

Chez les alpha-HPV, deux promoteurs ont été caractérisés ; le promoteur précoce (P97 pour HPV16 et HPV31, et P105 pour HPV18) dans la région LCR qui semble actif tout au long du cycle viral ;⁴¹⁻⁴⁴ et le promoteur tardif régulé en fonction de la différenciation cellulaire situé dans le cadre de lecture de E7 (P670 pour HPV16, P742 pour HPV31).⁴⁵

Le promoteur P97 d'HPV16 est le mieux caractérisé. Celui-ci est contrôlé par E2 mais aussi par plusieurs facteurs de transcription.⁴⁶ Il existe quatre sites de liaison à E2 sur le promoteur. Tout au long du cycle viral, l'activité transcriptionnelle du promoteur P97 est réprimée par E2 afin de conserver des niveaux faibles d'expression des protéines E6 et E7. La répression du promoteur P97 semble due à un mécanisme d'encombrement stérique du à E2 empêchant des protéines cellulaires de se lier à la TATA box ; ainsi qu'à l'attachement de protéines cellulaires activant la transcription (comme Sp1) à la région

LCR du virus. Le promoteur tardif contrôle l'expression des transcrits codant les protéines virales tardives, ces transcrits étant retrouvés en quantité élevée uniquement dans les kératinocytes différenciés.^{45,47,48} Le promoteur tardif régule aussi certains gènes comme *E1*, *E2*, *E1^E4* et *E5* impliqués dans l'amplification du génome viral. Ainsi le promoteur tardif en stimulant l'expression des gènes *E1* et *E2* induit la synthèse des protéines de capsid au niveau des couches différenciées de l'épithélium et la réplication du génome viral.⁴⁹⁻⁵² Les facteurs cellulaires responsables de l'activité intense du promoteur tardif au cours de la différenciation cellulaire ne sont pas bien déterminés mais des études suggèrent un remodelage de la chromatine autour de la région du promoteur tardif qui pourrait intervenir durant la différenciation des kératinocytes et rendre ainsi cette région plus accessible aux facteurs de transcription.⁵³

De nombreuses modifications épigénétiques interviennent aussi dans la régulation de la transcription virale,⁵⁴ mais ne seront pas développées ici.

b- Fonction des protéines virales

Les protéines d'HPV ont de nombreuses fonctions qui interviennent à différentes étapes du cycle viral (Tableau 2). Le rôle de ces protéines a été étudié essentiellement à partir des alpha-HPV muqueux HR, permettant de définir un modèle général extrapolable sous réserve à tous les HPV. On distingue les protéines précoces (E=early) *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* et *E7*, agissant sur la régulation du cycle viral, des protéines tardives (L=Late) *L1* et *L2* constituants de la capsid virale.

La protéine *E1* est une hélicase ATP-dépendante. Il s'agit de la seule enzyme codée par le génome des HPV. C'est aussi la protéine la plus conservée parmi les HPV.⁵⁵ *E1* est impliquée dans la réplication du génome viral.⁵⁶⁻⁵⁸ Pour cela, la protéine *E1* s'assemble en double-hexamère au niveau de l'origine virale de réplication, initie la fourche de réplication et interagit avec les facteurs cellulaires de réplication de l'ADN comme l'ADN polymérase α -primase⁵⁹⁻⁶¹, la topoisomérase I^{62,63}, et la protéine de réplication A⁶⁴ (Figure 3).

La protéine E2 est indispensable au déroulement du cycle viral. Elle intervient dans la régulation de la transcription virale ; en particulier la protéine E2 est responsable de la répression de la transcription des oncogènes E6 et E7 par un mécanisme d'encombrement stérique au niveau du LCR⁶⁵⁻⁷⁰. La protéine E2 participe à l'initiation de la réplication du génome viral *via* le recrutement de la protéine E1 au niveau de l'origine de réplication^{71,72} (Figure 3). Enfin la protéine E2 stabilise la ségrégation des épisomes viraux au cours de la mitose⁷³.

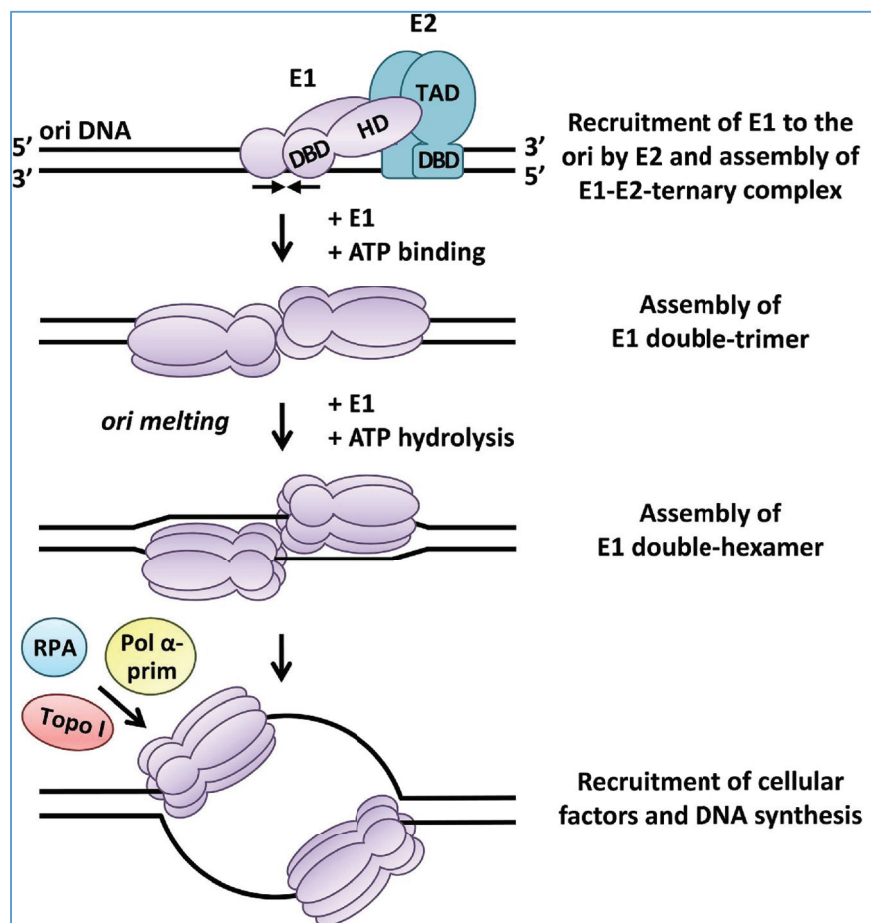


Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la réplication (Bergvall et al, 2013⁵⁵)

Pol α-prim= α -primase, *Topo I*= topoisomérase I, *RPA*=protéine de réplication A, *ATP*=adénosine triphosphate,, *TAD*=Transactivation domain, *DBD*= DNA Binding domain, *HD*=hélicase domaine, *ori*=origine of DNA replication

Le gène codant la protéine E4 est situé dans la séquence du gène *E2*. La protéine E4 est le produit d'un épissage alternatif dont le transcrit majoritaire appelé E1^{E4} est constitué du codon d'initiation du gène *E1* fusionné avec la phase ouverte de lecture du gène *E4*.^{42,74-77} Au cours du cycle viral le produit du transcrit E1^{E4} est détecté lors des dernières étapes du cycle végétatif, juste avant l'expression des protéines tardives de capsid L1 et L2.⁷⁸ E4 contribue à l'amplification du génome viral,⁷⁹⁻⁸¹ ainsi qu'à la synthèse et à la libération des virions néo-formés.^{52,82,83} La protéine E4 est particulièrement exprimée dans les lésions cutanées induites par HPV. Cette caractéristique permet d'utiliser la protéine E4 comme cible de marquage immunohistochimique afin de mettre en évidence une infection active à HPV.⁸⁴⁻⁸⁶

Les protéines E5, E6 et E7 assurent un environnement propice à la réalisation du cycle viral en stimulant la prolifération et la survie des cellules des couches profondes de l'épithélium. Ces propriétés confèrent à ces protéines leur potentiel oncogène (d'où le terme oncoprotéines). Les fonctions de ces trois protéines ont principalement été étudiées chez les alpha-HPV HR qui ont la capacité d'immortaliser les cellules. On constate cependant une certaine hétérogénéité d'expression et de fonction des trois protéines selon les génotypes HPV étudiés. En effet, les bêta-HPV à l'exception d'HPV14, sont dépourvus du gène précoce *E5*. De plus, seules les protéines E6 et E7 des HPV HR sont capables d'induire la dégradation de certaines protéines cellulaires impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome cellulaire telles que pRb (protéine du rétinoblastome) régulant négativement le déroulement du cycle cellulaire ; et p53 facteur de transcription contrôlant l'apoptose des cellules maintenues en cycle cellulaire. Les fonctions de ces trois oncoprotéines seront développées dans le chapitre III.

Les protéines L1 et L2 sont les constituants de la capsid des HPV. Cette capsid est icosaoédrique de symétrie T=7 et comprend 72 capsomères pentamériques composés de la protéine majeure de capsid L1.^{87,88} Les protéines L1 sont capables de s'auto-assembler pour former avec la protéine L2 des particules virales vides appelées VLP (*Virus Like Particules*).⁸⁹ La capsid virale contient

aussi une quantité variable de protéines mineures de capsid L2 associées à la protéine L1.^{88,90-93} L1 et L2 sont indispensables pour les étapes d'entrée dans la cellule⁹⁴⁻⁹⁸ et d'assemblage des particules virales.^{93,99,100} L'expression de ces protéines est exclusivement détectée dans le noyau des cellules les plus différenciées des couches supérieures des épithéliums lors des infections productives.¹⁰¹

Tableau 2 : Fonctions des différentes protéines virales

Protéine virale	Fonctions et caractéristiques
E1	permet le maintien d'un nombre constant d'épisomes dans les couches basales de l'épiderme. forme un hétérodimère s'associant à la protéine E2 et contrôle la réplication virale
E2	régule le promoteur des gènes précoces et s'associe à la protéine E1 pour contrôler la réplication virale responsable de la répression de la transcription des oncogènes E6 et E7
E4	participe à la synthèse et à la libération des particules virales néoformées par interaction avec le réseau de cytokératine
E5	module les signaux des facteurs de croissance et stimule la mitose
E6	constitue avec E7 les oncoprotéines majeures et interagit/dérégule de nombreuses protéines cellulaires
E7	constitue avec E6 les oncoprotéines majeures et interagit/dérégule de nombreuses protéines cellulaires
L1	correspond à la protéine majeure de capsid et est utilisée comme constituant majoritaire du vaccin prophylactique
L2	correspond à la protéine mineure de capsid

III- Physiopathologie de l'infection HPV

1- Cycle réplcatif

a- Généralités sur l'épithélium cutané

Pour revues : Blanpain et Fuchs, 2009 ; Eckhart et al, 2013^{102,103}

L'épiderme est un épithélium squameux stratifié kératinisé organisé en plusieurs couches (Figure 4). Il est composé de kératinocytes, population majoritaire représentant 90 à 95% des cellules épidermiques, de mélanocytes, de cellules de Langerhans et de cellules de Merkel. L'épiderme se régénère continuellement à partir des cellules souches de la couche basale, couche la plus profonde de l'épithélium. Après quelques cycles de division horizontale, les cellules souches de la couche basale entament un processus de différenciation ; elles se différencient progressivement en cornéocytes au cours de leur migration vers la couche extérieure de l'épiderme.

L'épiderme est constitué de quatre à cinq strates cellulaires de l'intérieur vers l'extérieur (Figure 8).

-* la couche basale (stratum basale) ou couche germinative est composée d'une seule couche de cellules, dont les cellules souches épidermiques précurseurs des kératinocytes. Les cellules basales sont situées à la jonction dermo-épidermique qui sépare l'épiderme du derme.

-* la couche épineuse (stratum spinosum) est composée de cinq à quinze couches de cellules polygonales. On observe une modification de l'expression des gènes de la famille des kératines lors de la transition de la couche basale (K5, K14, K15) vers la couche épineuse (K1 et K10), ainsi que la production d'involucrine, un marqueur précoce de la différenciation,

-* la couche granuleuse (stratum granulosum) est composée de une à trois couches de cellules granuleuses aplaties qui contiennent des grains de kératohyaline et des granules lamellaires. La couche

granuleuse est caractérisée par l'expression de marqueurs tardifs de différenciation, la loricrine et la filaggrine.

-* la **couche cornée** (stratum corneum) composée de cinq à quinze couches de cellules. C'est la couche la plus externe de l'épiderme en contact avec l'environnement extérieur. Elle forme une couche protectrice semi-perméable et maintient l'hydratation de la peau. La couche cornée est composée des cornéocytes ayant perdu leur noyau et leurs organites intracellulaires. Les cornéocytes sont éliminés au niveau des couches les plus superficielles par desquamation.

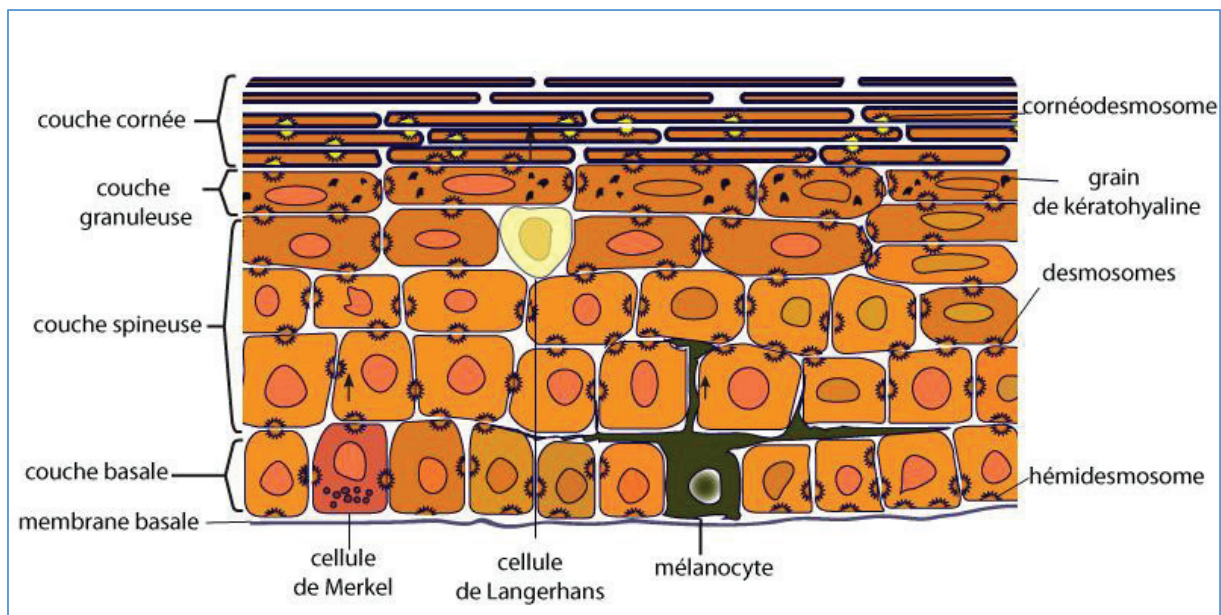


Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe transversale de l'épiderme humain (<https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article10>)

b- Cycle réplcatif

Le cycle réplcatif des HPV est étroitement lié au processus de différenciation des kératinocytes qui s'inscrit dans le processus de renouvellement de l'épithélium (4 à 6 semaines) (Figure 5).¹⁰⁴

La majorité des données sur le cycle réplcatif des HPV a été obtenue à partir de l'analyse des HPV muqueux HR en particulier HPV16, 1^{er} agent mis en cause dans les cancers du col de l'utérus.¹⁰⁵ ; compte tenu de leur capacité à immortaliser les cellules et à persister dans des cultures cellulaires contrairement aux HPV cutanés et muqueux BR pour lesquels ces données sont extrapolées. Les cultures organotypiques épithéliales tridimensionnelles (rafts) constituent le seul modèle *in vitro* permettant d'étudier le cycle réplcatif des HPV-HR. Cette technique permet de créer un épithélium pluristratifié à partir de kératinocytes non différenciés.¹⁰⁶

i- Zones de jonction, sites privilégiés de l'infection à HPV

On considère que l'infection à HPV nécessite l'accès des virus aux cellules des couches basales de l'épithélium, en particulier les cellules souches épithéliales de la couche basale *via* un microtraumatisme.¹⁰⁷ Certaines zones de jonction squamo-cylindriques sont particulièrement vulnérables à l'infection virale, comme la zone de transition entre l'épithélium malpighien et l'épithélium glandulaire de l'endocol.¹⁰⁸ Cette zone de transition est très fine, et les cellules qui la constituent présentent une expression diminuée de kératine et de molécules d'adhérence, facilitant l'accès des HPV aux cellules basales.^{109,110} Une sous-population de cellules épithéliales cuboïdes distincte de celle des cellules épidermoïdes et cylindriques glandulaires a été découverte récemment comme étant particulièrement vulnérable à la carcinogénèse associée à l'infection persistante par HPV.^{111,112}

De telles populations cellulaires ont aussi été décrites dans les zones de jonction gastro-œsophagienne et ano-rectale.^{113,114} Au niveau de la peau, les follicules pileux riches en cellules souches épithéliales semblent constituer un point d'entrée pour les HPV appartenant à l'espèce $\beta 1$ du genre bêta.^{115 107}

ii- Entrée du virus

Bien que le processus d'entrée des HPV reste mal connu en raison de l'absence de système cellulaire mimant l'infection naturelle du virus, des données ont été obtenues à partir de modèles de pseudoinfection basés sur l'entrée de VLP ou *Virus-like Particles* générées par l'assemblage des protéines L1 et L2. Il a été ainsi montré que les protéines de capsid L1 et L2 interagissent avec les molécules d'héparane sulfate, composants du glycosaminoglycane de surface,^{96,116,117} et avec la laminine.¹¹⁸ Cette première étape est suivie d'une longue période d'immobilisation du virus à la surface de la cellule pendant laquelle le virus subit des modifications structurales nécessaires à son entrée dans la cellule.¹¹⁹⁻¹²² Le récepteur cellulaire des HPV n'est pas connu mais il a été montré que l'entrée du virus dans la cellule implique des interactions avec plusieurs protéines membranaires dont les fonctions restent mal déterminées. Il s'agirait notamment de l'intégrine alpha6,^{123,124} de la tétraspanine CD151¹²⁵ ou de l'annexine A2.^{126,127} La particule virale entre dans la cellule par des mécanismes d'endocytose variant en fonction du génotype étudié.^{94,119,128-130} Une fois internalisées, les particules virales sont incluses dans les endosomes et décapsidées. L'ADN viral est libéré dans le milieu intracellulaire tandis que la protéine L1 est retenue dans l'endosome puis dégradée par voie lysosomale.^{98,119} Enfin, l'ADN viral est transféré dans le noyau au cours de la mitose suite à la perforation de l'enveloppe nucléaire en interphase et à l'association de l'ADN viral et de la protéine L2 avec les chromosomes métaphasiques.¹³¹

iii- Maintien du génome viral

Dans les cellules basales, le génome viral est amplifié de façon limitée, et on observe un nombre de copies épisomales moyen d'environ 200 copies par cellule dans le noyau, mais extrêmement variable s'échelonnant de quelques copies à plusieurs milliers de copies par cellules.^{132,133} Dans ces cellules, le génome viral est répliqué durant la phase S du cycle cellulaire en

même temps que le génome de l'hôte. Les protéines virales E1 et E2, de par leur rôle dans l'initiation de la réplication virale sont essentielles pour cette première phase d'amplification virale. De plus, la protéine E2, par sa capacité à interagir avec le génome viral et à s'associer aux chromosomes mitotiques contribue au processus de ségrégation et au maintien d'une répartition équitable des épisomes dans les cellules filles.^{134,135}

iv- Amplification du génome viral

Comme mentionné précédemment, les kératinocytes immatures entament un processus de différenciation lors de leur migration vers les couches externes de l'épithélium. Ce processus s'accompagne de la perte du caractère prolifératif des cellules. Il a été montré que les HPV HR apparentés à HPV16 remédient à cette limitation en faisant à nouveau entrer les cellules des couches spineuses et granuleuses en phase S du cycle cellulaire par l'expression des protéines virales E6 et E7.

La protéine E7 interagit avec la protéine pRB, régulateur négatif du cycle cellulaire, et avec d'autres protéines impliquées dans la prolifération cellulaire maintenant ainsi l'entrée des cellules en phase S.^{136,137 138,139} La protéine E6 complémente le rôle de la protéine E7 en empêchant l'entrée en apoptose des cellules maintenues en phase S par la protéine E7^{47,140,141} Ces mécanismes seront détaillés dans le chapitre III.4. Pendant cette phase d'amplification du génome viral, les protéines E1 et E2 directement impliquées dans la réplication du génome viral sont produites en abondance grâce à la stimulation du promoteur tardif.¹⁴²

v- Assemblage et libération des particules virales

La dernière étape du cycle viral consiste en l'assemblage des nouveaux virions et leur libération dans le milieu extracellulaire. Les HPV codent deux protéines structurales L1 et L2 exprimées dans les couches supérieures de l'épithélium ; les protéines L2 s'accumulent dans des structures subnucléaires

et recrutent les protéines L1.^{143,144} La particule virale s'assemble en une capside constituée de 360 protéines L1 et environ 12 protéines L2, contenant le génome viral.¹⁴⁵ La libération des virions néoformés se fait par la desquamation naturelle des kératinocytes de la couche cornée de l'épithélium et n'est donc pas lytique pour la cellule infectée. La protéine E4 contribue à la libération des virions en perturbant l'organisation du réseau de kératine^{146,147} et en altérant la formation de la couche cornée.^{148,149}

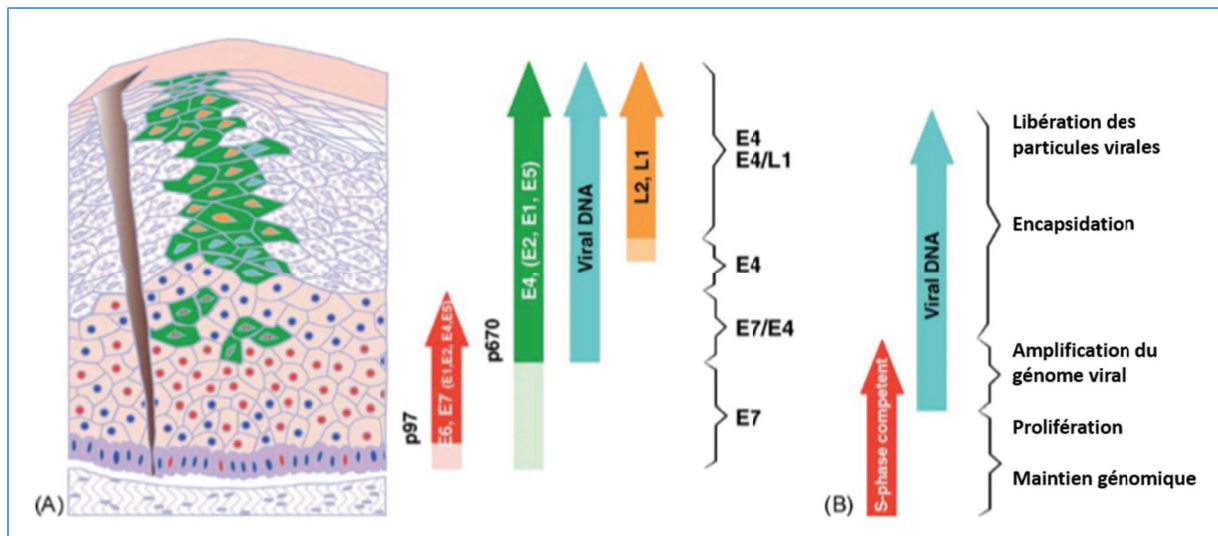


Figure 5 : Organisation du cycle réplcatif des HPV (d'après Doorbar, 2005)

(A) Représentation schématique de l'épithélium et du profil d'expression des gènes viraux. Après infection des kératinocytes de la couche basale (représentés en violet), le génome viral est maintenu sous la forme d'une faible quantité d'épisomes. Lors de la différenciation épithéliale, le promoteur précoce (p97 pour HPV16) promeut l'expression des gènes *E6* et *E7* nécessaire à l'entrée des cellules en phase S (rouge). Le promoteur tardif (p670) est stimulé au niveau des couches les plus externes de l'épithélium et les protéines *E1*, *E2*, *E4* et *E5* augmentent en quantité (vert), facilitant l'amplification du génome viral (bleu). Des modifications de l'épissage de l'ARNm permettent l'expression de la protéine *E4* au niveau des couches externes où l'on retrouve les protéines de la capside virale (jaune). (B) Les cellules des couches basales de l'épithélium sont en phase S. L'amplification du génome viral débute dans ces cellules et s'arrête dans les cellules les plus différenciées.

2- HPV et virome cutané

Le virome humain représente l'ensemble des séquences virales détectables à la surface et à l'intérieur du corps humain même en l'absence de manifestation clinique apparente d'une infection. Le virome inclue les virus responsables d'infections aiguës et persistantes (latentes ou chroniques). Il comprend au total les virus des cellules eucaryotes, des bactériophages, ainsi que les éléments endogènes viraux intégrés dans les chromosomes humains.¹⁵⁰

a- Les virus constituant le virome cutané

La peau de l'Homme héberge un écosystème microbiologique complexe. Depuis quelques années, les études sur le microbiote ont révélé qu'à l'instar des bactéries, levures et champignons présents à l'état commensal, les virus en sont une composante fondamentale, et paradoxalement méconnue.¹⁵¹ Sur la peau sans lésion apparente, le virome des individus décrits comme en bonne santé est composé d'une grande quantité de virus très divers, les plus prévalents appartenant principalement aux bactériophages, puis des HPV, et des virus appartenant aux familles des *Polyomaviridae*, *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, et *Circoviridae*.^{17,151,152}

b- HPV et virome cutané

Des analyses NGS du virome HPV cutané ont mis en évidence de nombreux génotypes, appartenant principalement aux genres bêta et gamma,, ainsi que des séquences putatives d'HPV à ce jour encore non classifiés.^{153,154} Virus ubiquitaires, les HPV cutanés sont probablement transmis précocément dans l'enfance *via* les contacts intrafamiliaux.^{155,156} Des études récentes de métagénomique ont montré une grande variabilité interindividuelle du virome de la peau, suggérant

l'existence d'un virome propre à chaque individu.^{17,152} La distribution ou l'expression des HPV varient en fonction des sites anatomiques.¹⁵¹ En effet, l'analyse de prélèvements cutanés montre que les séquences HPV étaient très abondantes au niveau de la paume de la main, du front, du sillon rétro-auriculaire et de l'occiput. Ces variations pourraient résulter d'une différence d'exposition à des agents physiques et biologiques tels que les UV, la température, l'humidité ou la production de sébum.^{153,154} Il semblerait la composition du virome HPV soit d'abord intrinsèque à chaque individu puis soumise aux paramètres propres à chaque site anatomique.¹⁵⁰ Des interactions interindividuelles proches, comme les interactions intrafamiliales semblent influencer aussi sur la composition du virome HPV d'un individu.²⁰⁴ De plus, les génotypes HPV pourraient être distribués en fonction de la provenance géographique des individus.^{151,157} Le rôle biologique du virome HPV présent à la surface de la peau de tout individu n'est pas déterminé à ce jour. S'agit-il d'une symbiose mutualiste entre les HPV-et son hôte ; ou de commensalisme où seuls les HPV profiteraient de cette interaction sans pour autant nuire à leur hôte ? Ces questions restent encore en suspens.

c- Réponse de l'hôte aux infections HPV

Plusieurs caractéristiques des HPV et de leur cycle naturel font que ces virus le plus souvent asymptomatiques ne seraient pas détectés par le système immunitaire : 1/ le cycle réplicatif des HPV est exclusivement intra-épithélial et sans virémie associée ; 2/ les protéines virales précoces sont très faiblement exprimées au niveau des couches basales ; et les protéines de capsid, malgré le fait qu'elles soient très immunogènes (comme le montre la réponse immune aux pseudovirions utilisés dans les vaccins anti-HPV) sont exprimées uniquement dans les couches supérieures de l'épithélium, à distance des cellules immunitaires contenues dans le derme ; 3/ les HPV sont des virus non lytiques, qui sont formés dans les couches externes de l'épithélium constituées de kératinocytes différenciés et sont éliminés au cours du processus de desquamation naturel de ces couches supérieures.

De plus, les HPV ont développé des stratégies d'interférence avec les réponses de l'hôte qui se situent à la fois au niveau local (i.e. épithéliale) et systémique (i.e. immunitaire). Les protéines E6 et E7 bloqueraient ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes, qui pourraient contribuer à la fonction effectrice de cellules de la réponse immune innée (e.g. cellules de Langerhans présentatrices de l'antigène au sein de l'épithélium et recrutement de lymphocytes T et de cellules dendritiques ¹⁵⁸⁻¹⁶¹) au site de l'infection. Elles interagissent respectivement avec les facteurs 1 et 2 régulateurs de l'interféron (IRF-1 et IRF-2), empêchant la transcription de l'IFN- β .^{162,163} La protéine E6 se lie également à la tyrosine kinase 2 (Tyk2) et empêche celle-ci d'interagir avec l'IFN- α responsable de l'activation de la voie JAK-STAT.^{164,165} Enfin les protéines E5 et E7 diminuent l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules présentatrices de l'antigène, réduisant ainsi le processus de présentation des antigènes viraux et le recrutement lymphocytaire T.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

Ces caractéristiques associées à l'absence de modèle d'étude du cycle naturel des HPV *in vivo*, incluant le portage asymptomatique du virus qu'il s'agisse de latence ou de persistance virale, freinent la compréhension des réponses mises en place par l'hôte au niveau épithélial et immunitaire afin de contrôler l'infection mais aussi des stratégies d'échappement du virus. Lorsque la réponse immunitaire échoue à éliminer l'infection à HPV, une infection persistante peut s'installer et conduire à des manifestations cliniques dont le large spectre est développé dans le chapitre suivant.

3- Manifestations cliniques de l'infection à HPV

Les manifestations pathologiques des infections HPV s'échelonnent de lésions bénignes, telles que les verrues (i.e. lésions cutanées) ou les condylomes (i.e. lésions des muqueuses), à cancéreuses. Les HPV sont ainsi responsables de près de 5 % des cancers humains dont le cancer du col de l'utérus (2ème cancer de la femme par ordre de fréquence à l'échelon mondial) mais aussi de cancers anogénitaux et de l'oropharynx ; ainsi que certains cancers non mélanocytaires de la peau.

a- Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme muqueux

i- Manifestations génitales

L'ADN d'HPV à tropisme muqueux est détecté dans les prélèvements cervicaux en absence de toute manifestation clinique chez 11-12% des femmes sur tous les continents. Ces infections asymptomatiques sont en majorité inapparentes et les infections multiples sont fréquentes, avec notamment la présence d'HPV16 (3,2%), HPV18 (1,4%), HPV31 (0,8%) et HPV58 (0,7%) qui sont les génotypes les plus prévalents même lorsque les cytologies de dépistage sont normales.¹⁷⁰

- Condylomes acuminés

Les condylomes acuminés sont des manifestations fréquentes de l'infection à HPV au niveau des muqueuses anales et génitales (organes génitaux externes et col chez la femme et testicules et pénis chez l'homme)¹⁷¹ qui se présentent sous forme de papules, nodules et excroissances pédonculées, dites en « crête de coq » (Figure 6). Les HPV les plus fréquemment mis en cause sont les génotypes 6 et 11, et plus rarement les génotypes 2, 16, 18, 30-33, 35, 39, 41-45, 51-56, et 59.^{172,173}

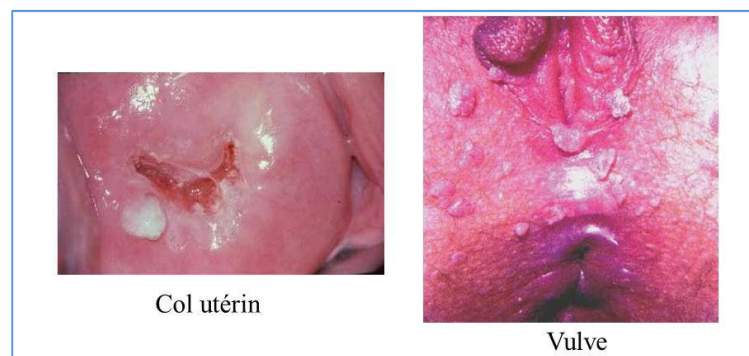


Figure 6 : Condylomes acuminés, aspect macroscopique (Vanderbos F & Michiels JF, <http://slideplayer.fr/slide/10631418/>)

- Néoplasies et cancers cervicaux

Les lésions précancéreuses du col de l'utérus sont classées en trois groupes histologiques : les CIN1 correspondant à des néoplasies de bas-grade, et les CIN2 et CIN3 correspondant à des néoplasies de haut-grade (Figure 7). La sévérité de la néoplasie reflète l'importance de l'extension des cellules basales vers la surface épithéliale et l'importance des divisions cellulaires au niveau de la zone supra-basale. En histologie, les lésions de bas-grade présentent des signes d'infection productive avec présence de koïlocytes au niveau des couches supra-basales.

Le cancer cervical invasif (ICC) correspond au stade le plus sévère de l'infection à HPV HR. Les deux formes histologiques majeures sont les carcinomes épidermoïdes (80 à 90%) et les adénocarcinomes (10 à 20%) (http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=3243).

L'ADN d'HPV16 est détecté dans 20 à 28% des FCU présentant une cytologie normale ou des lésions de bas-grade LSIL/CIN1, dans 40/47% des CIN2/HSIL et dans 58/63% des CIN3/ICC.¹⁷⁴

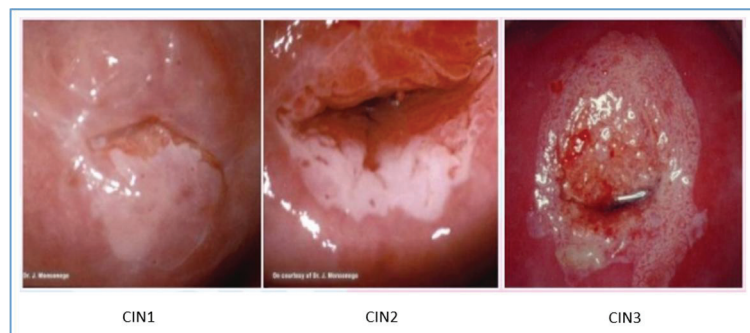


Figure 7 : Images colposcopiques de CIN1, CIN2, CIN3 (Dr Njue, <https://www.slideshare.net/osbornenyandiva/cervical-cancer-its-prevention>)

- **Autres cancers anogénitaux**

La majorité des cancers vulvaires correspondent à des carcinomes épidermoïdes kératinisant. La prévalence de l'infection à HPV est de 90% dans les néoplasies intraépithéliales vulvaires, les carcinomes basaloïdes ou les cancers condylomateux, mais de seulement 6% dans les cancers épidermoïdes kératinisant.^{175,176} HPV16 est le génotype le plus fréquemment retrouvé dans les cancers vulvaires, avec les génotypes 18, 21, 31, 33, et 34 à une moindre fréquence. Les HPV sont responsables de 85% des cancers vaginaux, et HPV16 est retrouvé dans 60% des tumeurs invasives. Dans les cancers invasifs du pénis, HPV16 est le génotype le plus prévalent (40-70%), suivi par HPV6 (22%), HPV52 (15%) et HPV11 (4%),¹⁷⁷. Les HPV sont présents dans 80 à 96% des cancers anaux, HPV16 étant le plus fréquemment détecté.¹⁷⁸

ii-Autres manifestations

- **Hyperplasie focale de l'épithélium**

Il s'agit d'une manifestation rare des infections à HPV associée à la muqueuse orale, plus fréquemment rencontrée chez les femmes et les enfants. Les lésions sont localisées au niveau de la lèvre inférieure et peuvent aussi affecter la lèvre supérieure, la langue, la cavité orale, l'oropharynx, le palais et le plancher buccal. Les HPV13 et HPV32 sont les plus fréquemment retrouvés.¹⁷⁹

- **Papillomatoses laryngées**

La papillomatose laryngée juvénile est la tumeur bénigne la plus fréquente du larynx de l'enfant. Bien que bénigne, sa prise en charge est particulièrement difficile, du fait de son évolutivité imprévisible et de sa tendance à la récurrence et à l'extension sur l'ensemble des voies respiratoires.

La papillomatose laryngée survient dans deux contextes distincts : l'un concerne l'enfant et l'autre l'adulte. La forme juvénile se manifeste généralement avant l'âge de 5 ans, alors que la forme adulte débute typiquement entre 20 et 40 ans. Plus l'enfant est jeune, plus la forme clinique paraît sévère. On estime actuellement l'incidence dans la population des enfants de 1,4 à 4,3 pour 100 000 enfants. Les HPV impliqués dans la papillomatose laryngée juvénile sont le plus souvent de type 6 ou de type 11 ; l'HPV 11 semble être associé à des formes plus sévères, avec un risque accru d'obstruction des voies aériennes.¹⁸⁰ Les cordes vocales constituent le siège prédominant des lésions, la dysphonie avec raucité particulière et le stridor lié à l'obstruction des voies aériennes sont les principaux symptômes. Des rémissions spontanées sont décrites, de même que des périodes de stabilité et des périodes où la maladie est particulièrement active. Dans ces derniers cas, la répétition des traitements chirurgicaux d'exérèse des papillomes peut être nécessaire et répétée dans des délais rapprochés de quelques semaines.^{181,182}

- **Cancers oropharyngés**

Bien que l'incidence des cancers des voies aéro-digestives diminue (650 555 cas par an dans le monde), une méta-analyse récente a montré une augmentation de la fréquence des cancers oropharyngés (OPC) (50 000 cas par an).¹⁸³ Beaucoup associent ce phénomène à l'augmentation de l'incidence des infections à HPV associés aux OPC, estimée à 41% en 2000 et à 72% en 2004.¹⁸⁴ Les cancers oropharyngés associés à HPV présentent des caractéristiques cliniques et moléculaires différentes des autres carcinomes oropharyngés non viro-induits. Ils sont de meilleur pronostic ; les patients présentent une amélioration de 50% du taux de survie globale à 5 ans. La recherche d'une infection à HPV fait partie du bilan diagnostique, permettant d'estimer le pronostic du cancer. HPV16 est majoritairement retrouvé dans les cancers oropharyngés, mais aussi HPV18, 31, 33 et 35.¹⁸⁴

b- Manifestations cliniques associées aux HPV à tropisme cutané

i- Verrues vulgaires

Les verrues vulgaires peuvent être isolées ou multiples et de taille variable. Elles surviennent à des localisations diverses, majoritairement au niveau du dos de la main ou des genoux chez les enfants (Figure 8). La prévalence des verrues vulgaires s'échelonne de 3,5%¹² chez l'adulte à plus de 30% chez l'enfant.¹⁸⁵ L'incidence augmente chez les patients immunodéprimés (développé dans le chapitre IV.4.b), et les lésions sont plus nombreuses et plus récalcitrantes au traitement. Les génotypes 1, 2, 4, 27 et 57¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ sont les plus prévalents. Le génotype 7 est retrouvé dans les verrues vulgaires chez les individus dont les mains sont chroniquement exposées à l'humidité et au froid.¹⁸⁹



Figure 8 : Verrue vulgaire, aspect macroscopique

(Mayo Foundation for medical education and research)

ii- Verrues plantaires

Les verrues plantaires sont des lésions bénignes qui surviennent au niveau de la plante des pieds, en particulier chez les enfants. Les génotypes 1 et 4 sont fréquemment mis en cause.¹⁹⁰ HPV1 induit des lésions souvent douloureuses appelées myrmécies prenant la forme de bouchons

kératosiques, avec un épiderme rugueux piqueté de points noirs. HPV4 est mis en cause dans des verrues mosaïques, correspondant à un ensemble de lésions plus superficielles et moins douloureuses pouvant se situer au niveau des orteils.⁵ Les génotypes 57, 60, 63, 65, et 66 sont aussi impliqués dans le développement de verrues plantaires.

iii- Autres types de verrues

Les verrues planes sont de petites lésions légèrement surélevées pouvant être pigmentées et siégeant fréquemment sur la face ou le dos de la main (Figure 9). Elles sont communément attribuées aux génotypes 3 et 10.⁵ Les verrues filiformes ou pédiculées correspondent à des lésions se développant perpendiculairement à la surface de la peau. Elles s'arrachent facilement et se propagent assez vite sur le visage, le cou ou les lèvres.⁵ Les verrues pigmentées présentent une gamme de couleurs allant du gris au brun foncé, et sont localisées au niveau palmo-plantaire, ou sur la face latérale des mains, des doigts, et des pieds.¹⁹¹



Figure 9 : Verrue plane, aspect macroscopique

(Mayo Foundation for medical education and research)

iv- Cancers cutanés

La maladie de Bowen est un cancer intraépidermique *in situ*. Dans 3 à 5% des cas, il évolue vers un carcinome invasif pouvant être associé à des métastases. Des HPV muqueux ont été détectés dans ces lésions carcinomateuses extra-génitales, spécialement dans la région péri-unguéale. D'autres HPV ont été occasionnellement détectés tels HPV2, 6, 11, 54, 58, 61, 62 et 73.¹⁹²

Une association entre l'infection à HPV et les cancers cutanés épithéliaux a été suspectée dans la population générale sur des arguments épidémiologiques.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Des HPV muqueux, en particulier HPV16, sont parfois détectés dans les carcinomes épidermoïdes (SCC) et les carcinomes basaloïdes (BCC), et plus rarement les génotypes 2, 31, 34, 35, 58, 61 et 73.^{193,194} D'autre part un lien entre HPV et les cancers cutanés épithéliaux a été mis en évidence chez les patients immunodéprimés et au cours de certains déficits immunitaires congénitaux. L'analyse moléculaire des bêta-HPV et les données sérologiques suggèrent un rôle de certains bêta-HPV dont HPV8, 20 et 38 dans le développement des cancers cutanés chez les patients immunodéprimés (développé dans le chapitre IV.4.c). Le lien entre HPV et cancer cutané est moins clair chez les sujets immunocompétents. HPV16 mais aussi HPV2, 31, 34, 35, 58, 61 et 73 sont parfois détectés dans les BCC et SCC.¹⁹³⁻¹⁹⁵

4- Mécanismes de la carcinogénèse induite par HPV

L'expression ordonnée des différentes protéines virales aboutissant à la production de particules virale (cycle viral productif) est interrompue lors des processus néoplasiques associés à HPV. Les mécanismes intrinsèques à ce processus néoplasique seront abordés dans ce chapitre.

a- Carcinogenèse muqueuse

Les mécanismes de carcinogenèse induite par les HPV HR muqueux ont été beaucoup étudiés dans le cas du cancer du col de l'utérus, associé à une infection à HPV16 ou 18 dans plus de 80% des cas. Le délai entre l'infection par HPV et le développement du cancer est très long, pouvant atteindre plusieurs décennies. En effet, le pic d'incidence d'infections à HPV HR se situe entre 20 et 25 ans chez les femmes jeunes et sexuellement actives, mais l'incidence du cancer du col de l'utérus est maximale chez les femmes âgées de plus de 35 ans.¹⁹⁶ Les carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus sont précédés de dysplasies intraépithéliales de sévérité croissante témoignant d'une infection multi étape des cancers induits par HPV.¹⁹⁷ Dans les cellules infectées, trois protéines E5, E6 et E7 des HPV HR ont comme propriétés de stimuler la prolifération et la survie cellulaire.

i - Dérégulation du cycle cellulaire et immortalisation

La protéine E7 interagit avec les membres de la famille du rétinoblastome pRb, p107 et p130 et induit leur dégradation par le protéasome.¹³⁶ La protéine pRb est un régulateur négatif du cycle cellulaire qui maintient les cellules en état de quiescence en phase G0/G1 du cycle cellulaire en séquestrant le facteur de transcription E2F. En s'associant à pRb, E7 déplace E2F, permettant ainsi l'expression des protéines nécessaires à la réplication cellulaire et induisant l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. E7 s'associe aussi avec d'autres protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire telles les histones désacétylases,¹³⁷ les composants du complexe de transcription AP1¹³⁸ et les inhibiteurs cycline-dépendants p21 et p27.¹³⁹ De plus la protéine E7 active de manière constitutionnelle la protéine ATM (ataxia telangiectasia-mutated) impliquée dans la réparation des cassures des doubles brins d'ADN. Cette activation semble nécessaire à la réplication du génome viral dans les cellules différenciées.^{198,199}

La protéine E6 complète le rôle de E7 en prévenant l'apoptose des cellules maintenues en phase S du cycle cellulaire par E7. En effet la protéine E6 est capable de dégrader la protéine suppresseur de tumeur p53.²⁰⁰ La protéine p53 est un facteur de transcription activé en cas de stress qui entraîne la mort cellulaire par apoptose. La protéine E6, en formant un complexe avec l'ubiquitine ligase E6AP a la capacité de se lier à p53, entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. E6 peut aussi dégrader d'autres protéines pro-apoptotiques comme Bak et Bax.^{140,141} La protéine E5 participe aussi à l'inhibition de l'apoptose via la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bax²⁰¹ et *via* la diminution de l'expression du récepteur de surface Fas.^{202,203}

Enfin, par son association avec le facteur de transcription E6AP, la protéine E6 promeut la dégradation du répresseur transcriptionnel NF1-91, entraînant l'activation du gène hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), et donc une augmentation de l'activité télomérase conduisant à l'immortalisation de la cellule.²⁰⁴

ii- Transformation cellulaire

Les protéines E6 et E7 contribuent toutes deux à la transformation cellulaire (Figure 10). La protéine E6 via son domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ peut interagir avec les protéines MAG (*Membrane-Associated Guanylate kinase inverted*) 1, 2 et 3, et hDlg (*human Drosophila discs large tumour suppressor*) impliquées respectivement dans la formation des jonctions serrées et adhérentes ; et induire leur dégradation.²⁰⁵⁻²⁰⁷ La protéine E7 via des interactions avec les cyclines/CDK2 agit sur les centrosomes et induit la formation de faisceaux mitotiques aberrants à l'origine d'aneuploidies.^{208,209} Les deux protéines entraînent donc une perte de la polarité cellulaire et une rupture des jonctions des cellules épithéliales. De plus la protéine E6 peut déstabiliser MGMT (O(6)-méthylguanine méthyl transférase) ainsi que XRCC1 (X-ray-repair-cross-complementing-protein) deux enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, et favoriser ainsi l'instabilité génique.²¹⁰ Enfin

la protéine E5 est impliquée dans le processus de prolifération cellulaire en modulant l'expression du récepteur à l'EGF (Epithelial Growth Factor-Receptor).²¹¹⁻²¹⁵

Les protéines E5, E6 et E7 sont responsables d'une dérégulation du cycle cellulaire avec accumulation de mutations du génome cellulaire et une progression vers la transformation cellulaire.

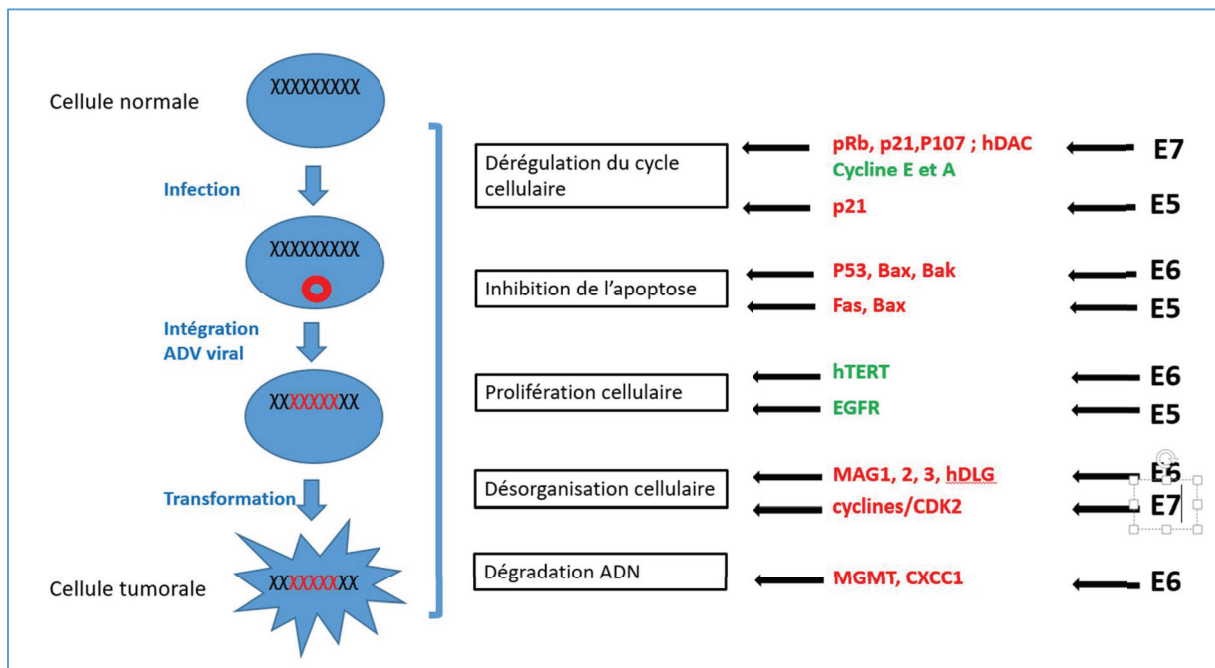


Figure 10 : Principaux rôles des protéines E5, E6 et E7
Vert : protéines cellulaires activées ; rouge : protéines cellulaires inhibées

b- Carcinogenèse cutanée associée aux bêta HPV

i- Le carcinome cutané non mélanome

Les carcinomes de la peau non-mélanocytaires (NMSC) représentent les cancers les plus fréquents pour la population caucasienne.^{216,217} Des données biologiques et épidémiologiques étayent l'hypothèse d'une coopérativité entre l'exposition aux UV et les bêta-HPV dans la carcinogenèse.²¹⁷ Un rôle des bêta-HPV a initialement été suspecté chez les patients atteints d'épidermodysplasie

verruciforme.²¹⁸ Cette association bêta-HPV/NMSC a aussi été documentée chez des patients immunodéprimés tels que les greffés d'organes solides et les patients infectés par le VIH.^{219–221} Le risque augmenté de cancer chez ces deux populations immunodéprimées renforce l'idée d'une association avec un agent infectieux comme HPV.

Le rôle des bêta-HPV est aussi suspecté dans le développement de NMSC chez les individus immunocompétents.²²² L'ADN de bêta-HPV a été retrouvé dans plus de 65% des SCC^{223,224} et plus de 50% des BCC.²²⁵ Une association positive a été mise en évidence entre la présence de bêta-HPV au niveau des sourcils et des antécédents de SCC.²²⁶ Par contre cette association n'a pas été retrouvée pour les BCC.²²⁷ Plusieurs études ont montré que le risque de développer un SCC augmente avec le nombre de génotypes bêta-HPV retrouvés dans les sourcils ;^{223,228} et comme attendu ce nombre est plus élevé en cas de SCC qu'en cas de BCC.²²² Enfin la prévalence des bêta-HPV dans les sourcils est plus élevée en cas de kératose actinique (AK) une lésion précancéreuse comparé au carcinome épidermoïde.²²⁸ De manière concordante, les charges virales tissulaires HPV diminuent au cours de la carcinogénèse, étant plus importantes dans les AK que dans les SCC,²²⁹ et suggère un rôle précoce du virus dans le développement de la carcinogénèse.

Finalement, la présence d'anticorps dirigés contre les HPV cutanés a été associée avec le SCC,^{227,230} le risque de SCC augmentant avec le titre d'anticorps spécifiques de bêta-HPV.^{231,232,233,234,235,236,237,238,239,240} Cette association semble spécifique des bêta-HPV, en particulier des espèces 1 et 2.^{230–233}

ii- Mécanismes moléculaires

Les mécanismes moléculaires par lesquels les bêta-HPV participent à la carcinogénèse cutanée restent mal compris (Figure 11). Il est suggéré que les protéines E6 et E7 seraient impliquées dans l'inhibition des mécanismes physiologiques de réparation de l'ADN et d'apoptose induits par l'exposition aux UV.^{24,234–236} Les activités des oncogènes E6 et E7 qui paraissent différentes d'un

génotype de bêta-HPV à l'autre sont détaillées dans une revue récente publiée par Massimo Tommasino en 2017.²³⁷ A la différence des oncoprotéines E6 et E7 des alpha-HPV HR, celles des bêta-HPV n'induisent pas la dégradation des protéines p53 et pRB. Elles semblent utiliser d'autres voies de signalisation pour immortaliser les cellules infectées (Figure 12). Ainsi la protéine E6 d'HPV23 interagit avec HIPK2, une kinase cellulaire qui inhibe la phosphorylation de p53 entraînant ainsi son inactivation.²³⁴ De plus, les bêta-HPV agissent sur les voies ATM/ATR permettant la réparation de l'ADN endommagé par les UV. La protéine E6 des HPV5 et 8 induit la dégradation de la protéine p300, coactivateur transcriptionnel de p53. La dégradation de p300 entraîne une diminution de la quantité des protéines ATR ayant pour conséquence une augmentation des dimères de thymine et des cassures double-brin de l'ADN induites par les UVB, ainsi que l'accumulation d'anomalies chromosomiques.^{238,239}

Les protéines E6 d'HPV5 et 8 sont aussi capables de dégrader la protéine pro apoptotique Bak, l'intégrité mitochondriale est donc maintenue, il n'y a pas libération de facteurs mitochondriaux pro apoptotiques, et l'apoptose est ainsi inhibée.²³⁶ De plus, la protéine E7 induit l'accumulation de la protéine ΔNp73, antagoniste des protéines pro apoptotiques p53 et p73,^{240,241} et pourrait ainsi engendrer l'immortalisation des cellules.

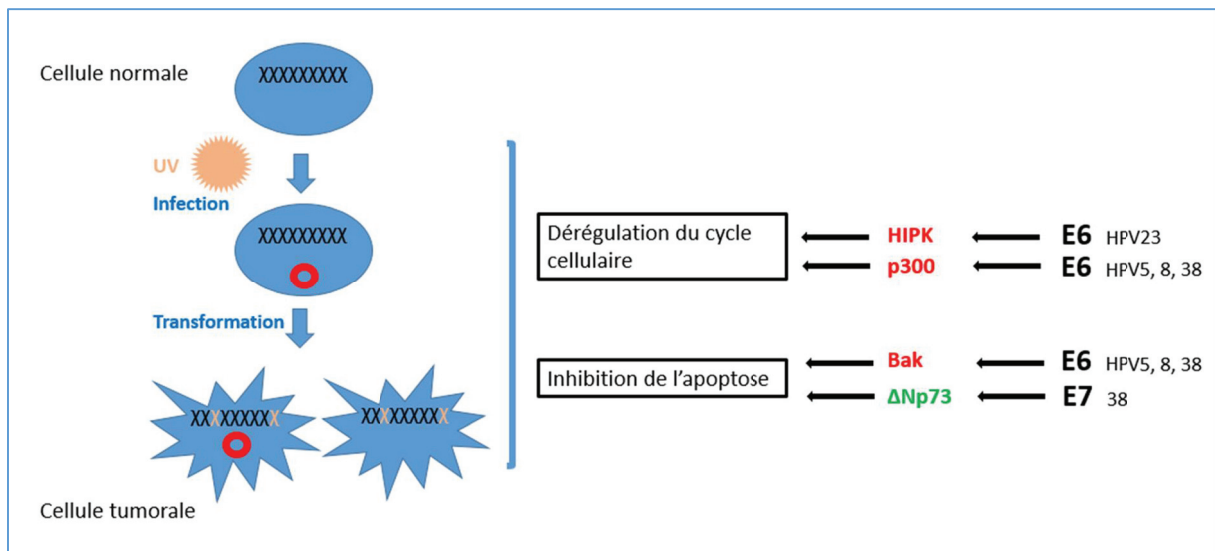


Figure 11: Exemples de mécanismes oncogènes potentiels des bêta-HPV

c- L'immunosuppression, facteur favorisant la carcinogénèse

Comme nous l'avons vu précédemment, les infections par les HPV sont le plus souvent asymptomatiques. Certaines infections à HPV peuvent s'avérer très sévères chez les patients immunodéprimés, et notamment chez des patients présentant des immunodéficits primaires. Les lésions (verruques et condylomes) sont invasives, récurrentes et résistantes aux traitements pharmacologiques ou chirurgicaux, et peuvent évoluer vers le cancer dans certains types d'immunodéficits.^{242,243} La majorité des patients atteints de ces déficits congénitaux présentent aussi une susceptibilité à d'autres infections virales, comme les infections à Herpesvirus (virus Herpes simplex, virus d'Epstein-barr, virus de la varicelle et du zona, cytomégalovirus) et par les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C.

Cependant parmi ces déficits immunitaires congénitaux, trois d'entre eux sont caractérisés par une susceptibilité sélective aux infections par HPV. Il s'agit de l'Epidermodysplasie verruciforme, le syndrome WHIM et le déficit en facteur GATA2 qui seront développés dans les paragraphes suivants.

Cette susceptibilité sélective souligne l'existence de facteurs génétiques dérégulés favorisant l'infection par HPV, au-delà de l'immunodéficit lui-même.

i- Patients présentant des immunodéficits congénitaux

- *Epidermodysplasie verruciforme*

L'épidermodystrophie verruciforme (EV) est une dermatose génétique rare caractérisée par une susceptibilité spécifique aux infections à bêta-HPV. La maladie a été décrite pour la première fois par Lewandowsky and Lutz en 1922. L'EV se manifeste dès l'enfance et peut adopter deux présentations cliniques.²⁵ La première est une dermatose bénigne, avec des lésions situées au niveau du tronc, du cou et des extrémités prenant l'apparence de verrues planes, de papules hypo ou hyperpigmentées, pouvant se réunir sous forme de plaques. La deuxième présentation clinique prend la forme de lésions verruqueuses ou de kératose séborrhéique siégeant au niveau des zones exposées aux UV, et se caractérise par un potentiel élevé de transformation maligne. Un tiers des patients développent des cancers de la peau à l'âge adulte, les plus fréquents étant les carcinomes cutanés et la maladie de Bowen. Les lésions rencontrées lors de l'EV sont réfractaires aux traitements conventionnels.

Les génotypes retrouvés sont identifiés sous le terme « EV-HPV ». Il s'agit des bêta-HPV 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19 à 25, 28, 29, 36, 46, 47, 49, et 50.^{244,245} Retrouvés de manière incidente chez 20% de la population générale, leur pouvoir pathogène semble restreint aux patients souffrant d'EV.²⁴² Les génotypes 5 et 8 sont les plus fréquemment associés aux transformations malignes observées chez ces patients.¹⁰

Les patients souffrant de cette immunodéficiencia ont un immunophénotypage anormal et présentent une diminution du nombre total de lymphocytes T et par conséquent une diminution de

l'immunité cellulaire.^{246–253} La réponse cytotoxique des cellules NK est augmentée, en particulier chez les patients présentant des lésions précancéreuses ou cancéreuses.^{246,254,255} Enfin, on observe une diminution de la production d'IL10, une cytokine pro-inflammatoire dont la diminution contribue à la persistance de l'infection HPV en inhibant le recrutement des cellules de Langerhans au niveau de l'épithélium.²⁵⁶ L'EV est un immunodéficit immunitaire congénital transmis de manière autosomique récessive.²⁵ Des mutations homozygotes sur les gènes *EVER1* et *EVER2* ont été mises en évidence chez environ 75% des patients atteints d'EV.²⁴⁴ On décrit aussi de rares formes liées au chromosome X²⁵⁷ ou transmises de manière autosomique dominante.²⁵⁸ Les gènes *EVER1* et *EVER2* codent des protéines transmembranaires très conservées, exprimées à la surface des lymphocytes T et B, des cellules NK, des cellules endothéliales, myéloïdes et dendritiques.²⁵⁹ Elles sont impliquées dans l'homéostasie du zinc dans les kératinocytes et jouent un rôle de facteur de restriction de l'infection HPV. La perte de l'homéostasie du zinc liée aux protéines EVER mutées entraîne une augmentation de l'expression des gènes viraux, en particulier des oncogènes E6 et E7 et contribuent à la carcinogenèse médiée par HPV (figure 14).²¹⁸

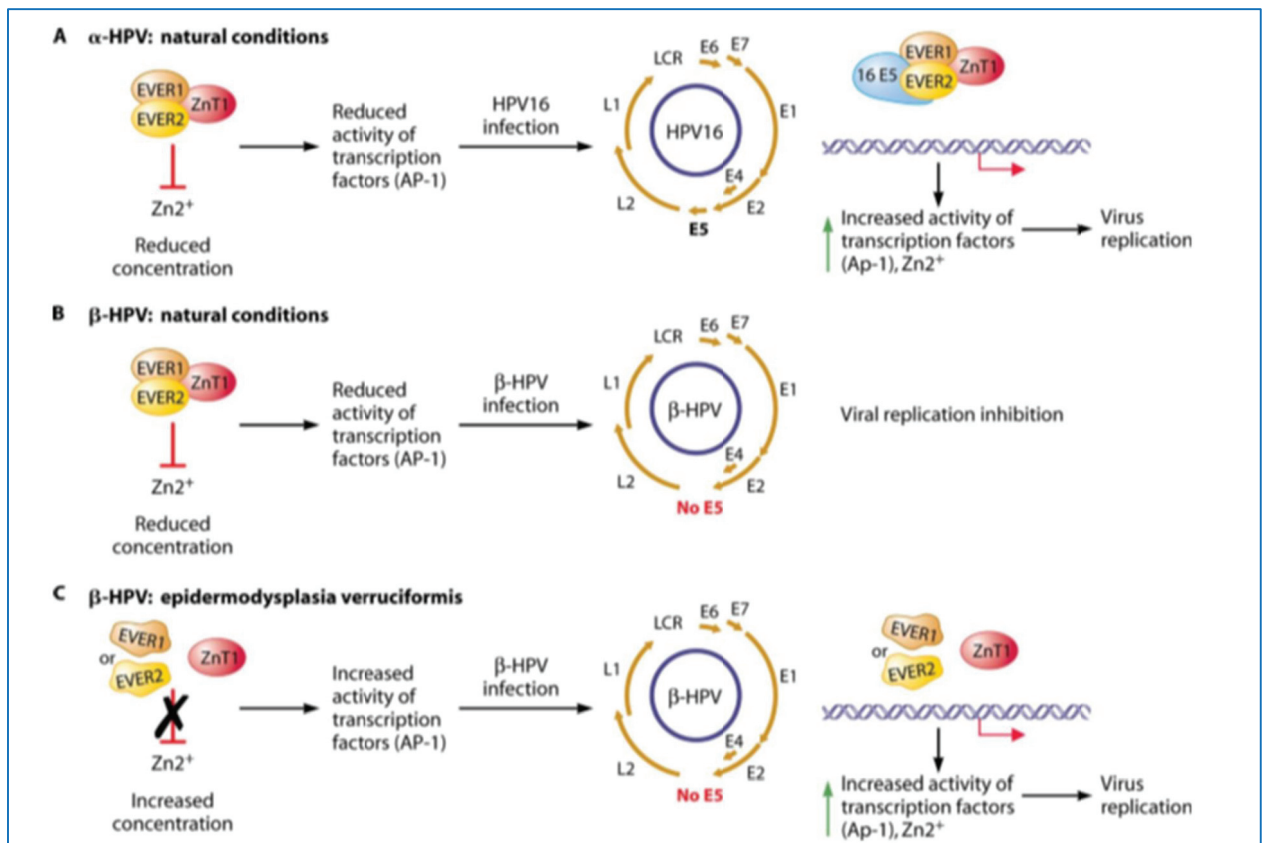


Figure 12 : Modèle proposé pour l'expression des HPV dans les kératinocytes (Lazarczyk et al, 2009)

(A) Dans les kératinocytes normaux, l'activité du facteur de transcription AP-1 est contrecarrée par le complexe EVER1/EVER2/ZnT-1. L'infection des kératinocytes par HPV16 entraîne la production de la protéine virale E5 qui annule l'inhibition induite par le complexe EVER1/EVER2/ZnT-1 et facilite l'expression des facteurs de transcription nécessaire pour l'expression et la réplication du génome viral. (B) L'absence de gène codant la protéine E5 chez les bêta-HPV ne permet pas la réplication végétative de ces virus. (C) Au cours de L'EV des mutations dans les gènes EVER1 ou EVER2 bloquent la formation du complexe EVER1/EVER2/ZnT-1 permettant ainsi l'expression du facteur de transcription AP-1 et la réplication virale.

- *Syndrome WHIM*

- *Physiopathologie*

Le syndrome WHIM est un déficit congénital rare qui a été décrit en 1964 par Zuelzer et Krill.^{260,261} L'acronyme signifie « Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis » et résume les principales caractéristiques cliniques du syndrome WHIM.²⁶² Les patients présentent une

abondance de verrues cutanées et de condylomes ano-génitaux dus à des infections persistantes par les HPV. Une panleucopénie profonde caractérise les patients et affecte les lymphocytes B, T, NK, et les cellules myéloïdes incluant les neutrophiles. La neutropénie est accompagnée d'une hypercellularité de la moelle osseuse associée à une accumulation de neutrophiles sénescents spécifiques de la myélodysplasie.²⁶³⁻²⁶⁵ Comme conséquence de la panleucopénie, le syndrome WHIM est caractérisé par des infections bactériennes apparaissant dès l'enfance, principalement au niveau pulmonaire et oro-pharyngé. Elles sont causées par des bactéries extracellulaires communautaires généralement sensibles aux traitements antibiotiques classiques.²⁶² On rapporte aussi quelques rares cas d'infections récurrentes orales et génitales à virus herpes simplex, des infections par le virus de la varicelle et du zona et des lymphoproliférations liées au virus Epstein-Barr.²⁶² Malgré la neutropénie sévère, les patients ne développent pas de sepsis, sûrement grâce à la libération transitoire de polynucléaires neutrophiles fonctionnels lors des épisodes de stress.²⁵

- *Epidémiologie*

Le syndrome WHIM est une maladie rare. On dénombre 65 cas publiés (source Orphanet, juillet 2015) aux Etats-Unis,²⁶⁶ Japon,²⁶⁷ et en Europe.^{262,268} La prévalence du syndrome WHIM est estimée à 0.23 cas par million de naissances.²⁶²

- *Susceptibilité spécifique aux HPV*

Les patients WHIM présentent des papillomatoses extensives, persistantes et réfractaires aux traitements. La quantité, la distribution, l'âge d'apparition et la résistance au traitement des verrues sont très variables d'un patient à l'autre.²⁶⁸ Cependant, une majorité de patients souffrent d'infections graves à HPV.^{262,264} Typiquement, les verrues cutanées (verrues vulgaires et verrues planes)

apparaissent dès l'enfance et sont localisées principalement sur les mains et les pieds. Les verrues génitales et condylomes apparaissent plus tard chez le jeune adulte sexuellement actif. Contrairement aux verrues cutanées, les verrues du tractus génital et oro-pharyngé peuvent progresser vers la cancérisation.^{262,265,269–271} Les géotypes HPV impliqués n'ont pas été beaucoup étudiés. On rapporte la détection d'HPV HR 16, 18, 31, 33, 45, 52, and 58 ; et d'HPV BR 6, 11.²⁶² Les HPV2, 5, et 23 ont été identifiés dans des lésions cutanées et un HPV6 a été identifié dans un carcinome vulvaire.²⁶²

Il est difficile d'évaluer si la sévérité des infections à HPV rapportées dans le syndrome WHIM sont dues à l'action directe du récepteur CXCR4 muté ou à l'immunodéficience induite par la leucopénie. Considérant l'axe de signalisation, l'expression de la chimiokine CXCL12 a été rapportée dans les kératinocytes infectés par HPV qu'ils proviennent d'un patient atteint de syndrome WHIM ou non. CXCL12 n'est pas exprimée dans les kératinocytes non infectés d'individus sains ou atteints d'autres pathologies dermatologiques.²⁷² De plus, les oncogènes *E6* et *E7* sont capables d'induire l'expression de CXCL12 mais aussi de CXCR4 dans des kératinocytes immortalisés par HPV18.⁷⁴ Une étude récente a montré une stabilisation des oncogènes *E6* et *E7* d'HPV18 aux dépens de la réplication virale dans des kératinocytes primaires (NIKS) différenciés exprimant un récepteur CXCR4 comportant une mutation gain de fonction (CXCR4^{Whim}).²⁷³ Les dysfonctions de l'axe CXCR4/CXCL12 agissent comme des facteurs intrinsèques de la carcinogenèse associée aux HPV. *A contrario*, bloquer le gain de fonction de CXCR4 muté dans un modèle de culture 3D en utilisant un antagoniste (AMD3100) inverse ce processus de transformation et rétablit l'expression séquentielle des protéines virales du cycle végétatif.²⁷³

- *Etiologie*

Le syndrome WHIM se transmet sur un mode autosomique dominant et atteint aussi bien les femmes que les hommes. La maladie est due dans la majorité des cas (98%) à une mutation entraînant

un gain de fonction du récepteur CXCR4. CXCR4 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Neuf mutations de *CXCR4* ont été rapportées qui affectent toutes le domaine intracellulaire C-terminal de la protéine : quatre mutations tronquantes, quatre mutations décalant le cadre de lecture et une substitution (Figure 13).²⁷⁴ Ces mutations entraînent un gain de fonction du récepteur et une altération du processus de désensibilisation lié normalement à l'inactivation des protéines G et l'internalisation du récepteur.

	320	330	340	350	360
WT CXCR4					
WT CXCR4	--VSRGSSLKILSKGKRGHSSVSTESESSSFHSS				
G323fs343X	--VSRGVQPDPLQKARWTFICFH				
L329fs341X	--VSRGSSLKIQRKARWTFICFH				
R334X	--VSRGSSLKILSKGKR				
G336X	--VSRGSSLKILSKGKRG				
S338X	--VSRGSSLKILSKGKRGH				
S339fs342X	--VSRGSSLKILSKGKRGHSCFH				
S341fs365X	--VSRGSSLKILSKGKRGHSSVPLSLQLVFTPANTDVKDFFLYDK				
E343K	--VSRGSSLKILSKGKRGHSSVSTRSESSSFHSS				
E343X	--VSRGSSLKILSKGKRGHSSVST				

Figure 13 : Mutations du gène *CXCR4* identifiées dans le syndrome WHIM (Heusinkveld et al. 2017²⁷⁴)

Chez deux patients présentant un tableau typique de syndrome WHIM, on a relevé l'absence de mutation de *CXCR4* malgré le gain de fonction de CXCR4. Le mécanisme impliqué semblerait provenir d'une déficience de la protéine GRK3 (G protein-coupled receptor kinase 3) associée au récepteur CXCR4, malgré une absence de mutation du gène codant ladite protéine.²⁷⁵ En cas de déficit fonctionnel la protéine GRK3 n'effectue pas la phosphorylation des sérine et thréonine de l'extrémité C-terminal du récepteur CXCR4 préalable à sa désensibilisation via β arrestin-2 et son internalisation dans les endosomes ; et induit de ce fait une amplification prolongée de l'activation de la voie de signalisation en aval du récepteur CXCR4 activé.

- *Traitement*

La prise en charge médicale des patients atteint de syndrome WHIM n'est pas standardisée mais comprend généralement l'administration au long cours de G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) et d'immunoglobulines intraveineuses, et d'antibiotiques à large spectre. A ce jour, il n'y a pas de molécules antivirales (cidofovir, interféron) ou immunomodulatrices (Imiquimod) ayant démontré une efficacité probante dans le traitement des verrues chez ces patients. Seules l'exérèse chirurgicale et les cryothérapies itératives apportent un bénéfice transitoire.²⁷⁴

Des traitements basés sur l'utilisation d'antagonistes de CXCR4 ont été utilisés récemment au cours d'essais cliniques. Le plérixafor (AMD3100) a été utilisé chez trois à six patients atteint de syndrome WHIM^{276,277} et a démontré son efficacité pour corriger la leucopénie. Une autre étude visant à administrer le plérixafor en deux administrations quotidiennes pendant 6 mois chez trois patients atteints de syndrome WHIM a montré une amélioration des lésions dermatologiques induites par HPV en association avec l'Imiquimod.²⁷⁷ L'AMD3100 est un antagoniste spécifique de CXCR4 ; son utilisation chez les patients atteints de syndrome WHIM est pertinente puisqu'il cible de manière spécifique l'axe CXCR4 et a des retentissements aussi bien sur les symptômes immuno-hématologiques que sur les symptômes dermatologiques associés à HPV.²⁷³

- *Déficit en facteur GATA2*

Le déficit en facteur GATA2, un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse et le maintien du compartiment de cellules souches,²⁷⁸ entraîne un syndrome caractérisé par des infections opportunistes, des myélodysplasies et leucémies.^{279–281} On observe plusieurs présentations cliniques : syndromes myélodysplasiques (SMD) et leucémies aiguës myéloïdes (LAM) familiales,²⁸⁰ monocytopénie et infections complexes à *Mycobacterium avium* (MonoMac),²⁸¹ lymphœdèmes

(syndrome d'Emberger),²⁸² déficit des lignées lymphoïdes (DCML).²⁷⁹ Des mutations ponctuelles non-sens ou nulles ont été rapportées pour les quatre phénotypes.^{280,283-285} Le déficit en facteur GATA2 apparaît typiquement chez le grand enfant ou chez l'adulte et se caractérise par une cytopénie profonde (monocytes, cellules NK, lymphocytes B et cellules dendritiques),^{279,281} des infections bactériennes et fongiques à mycobactéries non tuberculeuses, *Histoplasma*, *Cryptococcus* et *Aspergillus*, des infections virales à HPV (75% des cas) et à *Herpesviridae* (HSV, VZV, EBV).²⁵

L'infection à HPV est souvent la première manifestation de la maladie et des papillomatoses généralisées surviennent fréquemment pouvant évoluer vers la dysplasie ou la néoplasie. Les verrues apparaissent à la fin de l'adolescence ou chez le jeune adulte et se présentent sous forme de verrues planes ou vulgaires au niveau de la face et des extrémités. Les patients présentent aussi des condylomes génitaux.²⁸¹

ii- Patients présentant des immunodéficits acquis

- *Patients transplantés d'organes solides*

De par les traitements immunosuppresseurs qui leur sont administrés, les patients transplantés d'organes solides présentent un terrain favorable aux infections. L'infection à HPV survient chez 24% à 53% des patients concernés, et apparaît dès les premiers mois suivant la transplantation. La prévalence des verrues augmente avec la durée du traitement immunosuppresseur.²⁸⁶ Cinq ans après la greffe, 85% des patients transplantés de rein présentent des verrues se présentant le plus souvent sous forme de papillomatoses extensives.²⁸⁷ Ces verrues sont majoritairement présentes au niveau de zones exposées au soleil, suggérant le rôle des rayonnements UV dans le développement des lésions.²⁴² Les cancers de la peau autres que les mélanomes sont les manifestations malignes les plus fréquentes chez les patients transplantés et le génome HPV est

détecté dans plus de 90% des biopsies réalisées.²⁸⁶ Chez 62% des patients receveurs d'organes, les verrues analysées montrent la présence de multiples génotypes HPV.²⁸⁸⁻²⁹¹ Le risque de transformation chez le patient transplanté de rein est de 14% dans les 10 premières années suivant la greffe, et de 40% dans les 20 ans post-greffe.^{292,293}

Des verrues de la cavité buccale sont aussi fréquemment décrites chez les patients transplantés d'organe solides. Contrairement aux verrues buccales du sujet immunocompétent, chez les patients transplantés les verrues buccales ne régressent pas spontanément et sont souvent réfractaires aux traitements conventionnels.²⁹⁴

Un large spectre d'HPV est trouvé dans les lésions présentées chez les transplantés d'organes solides ; des EV-HPV mais aussi d'autres génotypes cutanés comme HPV2, 3, 10, 27, 28, 29 et 58, ainsi que de nombreux génotypes nouvellement identifiés.²⁹¹

- **Patients infectés par le VIH**

L'infection à VIH a touché plus de 59 millions de personnes depuis le début de la pandémie en 1981. Des papillomatoses disséminées à HPV peuvent être observées chez les patients infectés par le VIH à différents stades d'affaiblissement de l'immunité cellulaire.²⁴² Les atteintes anogénitales, plus particulièrement le cancer du canal anal sont les manifestations les plus courantes de l'infection à HPV.^{295,296} Sur le plan cutané, les lésions sont semblables à celles observées au cours de l'EV, et se présentent souvent sous forme de papules hyper ou hypo-pigmentées, se propageant sur le cuir chevelu, la face, le tronc et les extrémités.²⁹⁷

Les papillomatoses disséminées peuvent être associées au syndrome de restauration immunitaire, terme utilisé pour décrire la dérégulation immune qui survient dans 15 à 25% des patients recevant une thérapie antirétrovirale hautement active (HAART, *Highly Active Antiretroviral Therapy*).²⁹⁸ Le syndrome de restauration immunitaire apparaît généralement dans les trois mois

suivant l'initiation de l'HAART, et est plus fréquent chez les patients ayant un taux de lymphocytes T CD4+ inférieur à 200, ou présentant une réponse rapide aux antirétroviraux.²⁹⁹ Des manifestations cutanées sont rapportées chez 52 à 78% des patients.²⁹⁸⁻³⁰⁰ Des cas d'infections cutanéomuqueuses à HPV ont été décrits dans les quelques mois suivant l'initiation de l'HAART.³⁰⁰⁻³⁰²

Différents EV-like-HPV ont été identifiés chez les patients infectés par le VIH et présentant des épidermodysplasies acquises, dont HPV5 et HPV8 majoritairement, mais aussi HPV14, 19, 20, 21 et 37.²⁴² L'infection par EV-HPV ne semble pas directement associée à un taux faible de lymphocytes T CD4+, puisque des lésions sont décrites chez des individus présentant des niveaux d'immunodépression différents.^{242,299,303}

IV- Dépistage et prévention des infections génitales à HPV

De toutes les manifestations cliniques provoquées par les l'infections à HPV, le cancer du col de l'utérus est le seul à bénéficier d'un dépistage organisé, avec une recherche de l'ADN HPV suivant des modalités différentes selon les pays et les organisations de santé publique.

Le cancer du col de l'utérus est le 10ème cancer le plus fréquent chez la femme en France, et est associé dans 90 à 100% des cas à la présence d'HPV HR. Chaque année en France, près de 3 000 cas de cancers invasifs sont diagnostiqués et 1 100 patientes en meurent.

1- Dépistage

a. Le frottis cervico-utérin (FCU)

Le cancer de l'utérus est une maladie d'évolution lente. En effet il existe une période de 15 ans en moyenne entre le stade de dysplasie légère causée par l'infection à HPV et le développement du carcinome génital. C'est donc cette période qu'il faut cibler pour organiser le dépistage et prendre les mesures adaptées en cas de dysplasie. En France, l'examen cytologique des cellules recueillies lors d'un frottis cervico-utérin (FCU) constitue le test de dépistage de référence permettant de détecter toute anomalie de la muqueuse génitale, quel que soit le stade d'avancement ; dysplasie, néoplasie ou cancer. Cet examen consiste à prélever des cellules superficielles du col de l'utérus au niveau de la zone de jonction pavimento-cylindrique qui sépare l'épithélium exocervical (partie externe du col ou épithélium malpighien) de l'épithélium endocervical (partie interne du col ou épithélium glandulaire).

En France, la pratique du dépistage par FCU depuis une soixantaine d'années a permis de faire passer le cancer du col de l'utérus à la 10^{ème} place des cancers affectant les femmes et à la 12^{ème} place des cancers meurtriers ([http ://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-](http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-)

[precoce/Depistage-du-cancer-du-col-de-l-uterus/Le-depistage-par-frottis-cervico-uterin](#)). En France le taux de couverture du dépistage du cancer du col utérin est d'environ 60 %, et 31 000 lésions précancéreuses ou cancéreuses sont dépistées sur 235 000 frottis anormaux. On estime que 90 % des cancers du cancer du col de l'utérus pourraient être évités grâce au dépistage par frottis. La Haute Autorité de Santé (HAS) conseille d'effectuer un dépistage chez toutes les femmes âgées de 25 à 65 ans. Le FCU doit être réalisé tous les trois ans, après deux frottis consécutifs normaux réalisés à un an d'intervalle. Cette recommandation est aussi valable pour les femmes vaccinées, ménopausées ou n'ayant pas eu de rapport sexuel récent.

Trois catégories de patientes doivent cependant suivre un dépistage plus intense en réalisant un FCU par an. Il s'agit des femmes infectées par le VIH, des femmes sous traitement immunosuppresseur et des femmes ayant été exposées *in utero* au distilbène qui présentent un risque de dysplasie cervicale élevé.

b- FCU anormal : place du test HPV

Le frottis cervico-utérin permet de détecter toute anomalie; dysplasie, néoplasie ou cancer. Les frottis ASC-US (ou ASCUS) et ASC-H correspondent à des dysplasies et selon la terminologie du système Bethesda, ASC signifie « Atypies des cellules malpighiennes » (*Atypical squamous cells*), ASC-US signifie « Atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée » (*Atypical squamous cells of undetermined significance*) et ASC-H signifie « Atypies des cellules malpighiennes ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut-grade » (*Atypical squamous cells cannot exclude HSIL*).

Les recommandations sur la conduite à tenir devant une femme présentant une cytologie cervico-utérine anormale ont été actualisées en janvier 2017 par l'Institut National du Cancer (INCA). Le test

HPV est recommandé : (i) en test réflexe ou lors d'un second prélèvement devant toute cytologie cervicale de type ASC-US, (ii) un an après une cytologie de type ASC-US, ou ASC-H suivie d'une colposcopie satisfaisante et normale (iii) un an après une cytologie de type LSIL (*low-grade squamous intraepithelial lesion-lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas-grade*) suivie d'une colposcopie satisfaisante et normale ([http ://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Recommandations-et-outils-d-aide-a-la-pratique/Cancers-gynecologiques](http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Recommandations-et-outils-d-aide-a-la-pratique/Cancers-gynecologiques), mise en ligne janvier 2017)).

Pour être conforme aux exigences de la norme CE-IVD, le test HPV doit pouvoir détecter la présence ou l'absence d'ADN viral d'HPV HR³⁰⁴. Le test HPV réflexe peut être réalisé à partir du frottis initial en milieu liquide ; ou sur un second prélèvement si le frottis initial était fixé sur lame. Si le test HPV est négatif, une cytologie est recommandée tous les 3 ans. Si le test HPV est positif, ce qui signifie qu'un HPV HR a été détecté, une colposcopie est recommandée, avec un prélèvement biopsique si une anomalie est identifiée. Une exérèse chirurgicale des lésions par conisation pourra être envisagée en fonction du stade de dysplasie observé (CIN3).

De plus dans certains cas les tests de génotypage échouent à identifier l'HPV détecté ainsi que sa nature HR ou BR.^{305,306} L'HPV détecté de génotype indéterminé est alors surnommé HPV-X. Dans ce cas il est difficile pour le clinicien d'adopter un suivi adapté pour la patiente. L'identification des HPV-X est un problème à résoudre pour améliorer la prise en charge des patientes infectées par un HPV de génotype indéterminé.

2- Prévention

Actuellement, la mesure de prévention la plus efficace contre le cancer du col de l'utérus est la vaccination anti-HPV. En France, la vaccination contre les infections à HPV est recommandée par le

Haut Conseil de Santé Publique (HCSP) chez les jeunes filles entre 11 et 14 ans (<http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=454>), ainsi que chez les patients immunodéprimés comme les patients transplantés d'organes solides et les patients infectés par le VIH (<http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=552>). En effet les défenses immunitaires sont amoindries chez ces patients et les HPV appartenant au virome cutané ou de nouveaux HPV provenant de l'environnement peuvent alors échapper aux systèmes de contrôle de l'infection et devenir pathogènes. Les deux vaccins actuellement disponibles en France protègent contre 70% des virus oncogènes, à savoir HPV16 et HPV18. Le vaccin Cervarix®, est bivalent et protège contre les HPV16 et 18, et le vaccin Gardasil® est quadrivalent et protège contre les HPV16, 18, 6, et 11 (HPV6 et 11 étant à l'origine du développement des condylomes génitaux). Un troisième vaccin nonavalent Gardasil 9® incluant les HPV16, 18, 6 et 11, ainsi que 5 autres génotypes HPV à haut risque oncogène (HPV31, 33, 45, 52, 58) a été mis sur le marché en France au cours de l'année 2017.³⁰⁷ Cependant le taux de couverture vaccinale en France est de 17%. Un taux si faible ne permet pas d'obtenir une réelle efficacité de prévention du cancer du col de l'utérus contrairement à ce qui a été observé dans d'autres pays (80% au Royaume-Uni) (<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Facteurs-de-risque-et-de-protection/Agents-infectieux/Prevenir-le-cancer-du-col-de-l-uterus>).

3- Traitement

Concernant HPV cutanés, une large variété de traitements a été explorée pour traiter les lésions occasionnées, en particulier les papillomatoses invasives. Cependant nombre de ces traitements doivent être réitérés fréquemment pour une efficacité médiocre.

Les traitements invasifs sont en général utilisés en première ligne de traitement comme la cautérisation, le curetage, l'excision chirurgicale et la cryothérapie. Des traitements au laser peuvent être envisagés pour les verrues récalcitrantes aux traitements classiques.³⁰⁸ Ces thérapies sont

efficaces chez les individus immunocompétents et immunodéprimés. Cependant les récurrences sont fréquentes.³⁰⁹ Des traitements moins invasifs par des topiques sont aussi utilisés comme l'acide salicylique.³¹⁰

D'autres traitements conventionnels comme les traitements topiques par le 5-fluorouracil,³¹¹ le 5% imiquimod,³¹² le tacalcitol,³¹³ les rétinoïdes systémiques associés à l'interféron alpha,³¹⁴ la cimetidine³¹⁵ et l'acide 5-aminolevulinique topique en thérapie photodynamique³¹⁶ peuvent être utilisés.

Au stade cancer (cutané, oro-pharyngé ou ano-génital) les traitements sont décidés en réunion de concertation multidisciplinaire et un traitement chirurgical, de la radiothérapie et de la chimiothérapie sont mis en place en fonction du stade d'évolution du cancer au moment de sa découverte.

V- De l'identification de nouveaux HPV au concept de virome : impact de l'évolution des techniques de séquençage

1- Clonage et cartographie des génomes viraux

Les premières études comparatives des génomes des HPV ont été réalisées à partir d'ADN provenant de particules virales contenues dans des verrues. Une digestion de cet ADN par des enzymes de restriction permettait ainsi de dresser une carte physique des fragments génomiques générés, spécifiques du génome étudié.³¹⁷⁻³²⁰ Dans les années 80, le développement des techniques de clonage et de séquençage capillaire Sanger a permis d'obtenir la première séquence nucléotidique complète d'HPV1.³²¹⁻³²³ De nombreux génotypes d'intérêt clinique comme HPV2, 5, 6, 8, 11, 16, 18 et 27 ont ainsi été identifiés au cours des années 1980-1990.^{6,9}

La découverte d'un nouveau génotype HPV est confirmée lorsque le génome viral complet a été séquencé et cloné dans un vecteur bactérien. Le clone est alors déposé au centre international de référence des HPV (*International Human Papillomavirus Reference Center*) situé à l'institut Karolinska en Suède, en charge de vérifier la séquence et d'attribuer son identité au nouveau génotype découvert^{6,324} qui est numéroté en fonction de la date de dépôt de la séquence.

2- Hybridation directe

Les techniques d'hybridation directe permettent de détecter la présence d'un ou de plusieurs HPV HR. Il n'y a pas d'identification plus précise du génotype incriminé ou de la présence potentielle d'infections multiples. Leur principe repose sur l'utilisation d'un ensemble de sondes spécifiques des

génotypes HR les plus fréquemment retrouvés en association avec un cancer du col de l'utérus (Figure 14). C'est le principe de la trousse ADN Hybrid Capture® 2 HPV-haut risque (HC2) (Qiagen).

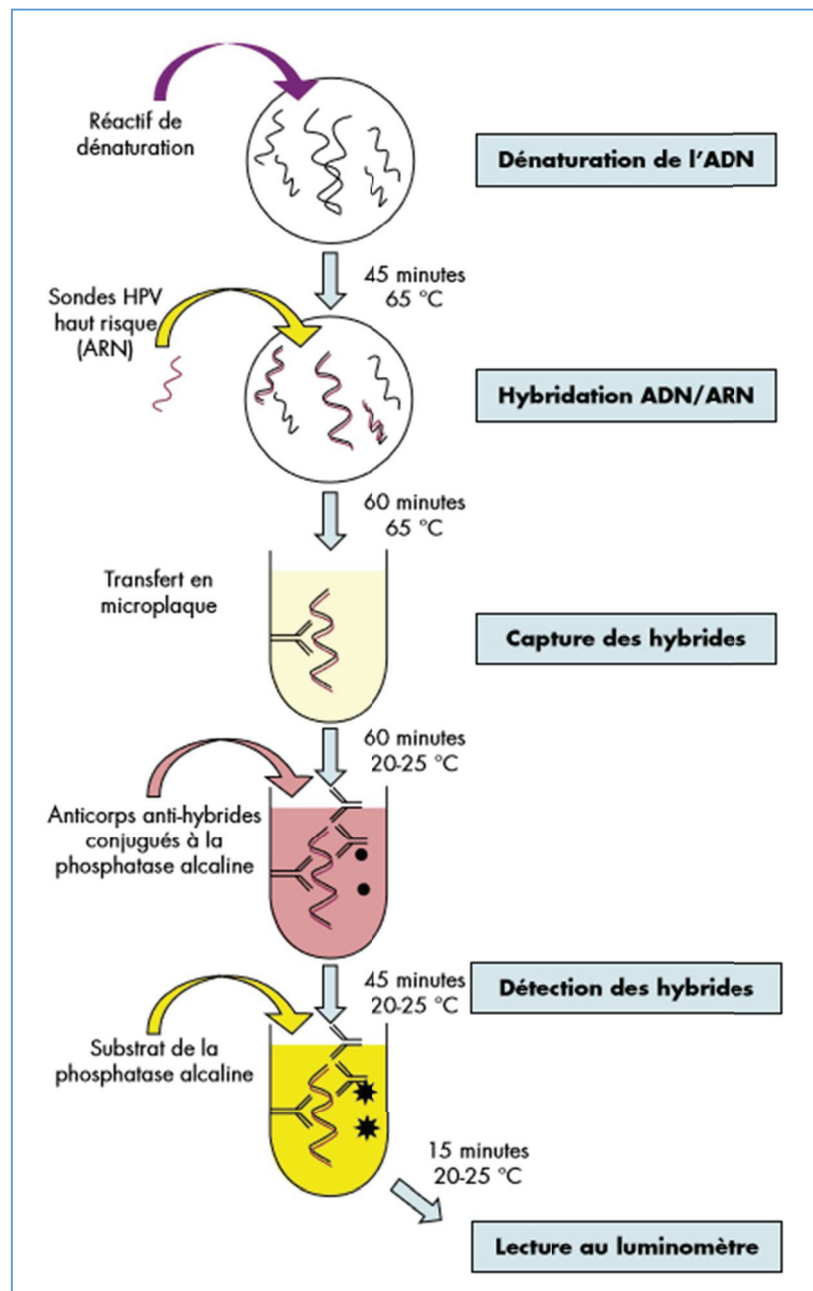


Figure 14: Hybridation en phase liquide (Hantz et al, 2010)

Le principe repose sur l'utilisation de sondes spécifiques des génotypes HPV HR les plus fréquemment retrouvés dans le cancer du col de l'utérus, qui s'hybrident directement à l'ADN HPV dénaturé présent dans l'échantillon clinique en phase liquide.

3- Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) et génotypage par séquençage ou hybridation inverse

a. Réaction de PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est aujourd'hui la technique la plus fréquemment utilisée pour la détection des HPV et autres composants du microbiote. La PCR permet l'amplification d'une séquence subgénomique spécifique de l'espèce étudiée directement à partir de l'ADN extrait d'un échantillon. Dans le cas des HPV, on utilise un couple d'amorces ciblant spécifiquement la séquence subgénomique du génotype que l'on souhaite analyser.

Des systèmes multiplex ont été développés, pour lesquels plusieurs couples d'amorces, chacun spécifique d'un génotype sont réunis au sein d'un même mélange réactionnel. Ces systèmes multiplex permettent d'analyser la présence de plusieurs génotypes en une seule réaction de PCR.^{325,326}

Une autre méthode consiste à utiliser des amorces consensuelles ou dégénérées ciblant plusieurs génotypes HPV. Les génotypes ciblés appartiennent au même genre alpha ou bêta et partagent une homologie de séquence au sein du fragment subgénomique amplifié.^{325,326} Ces amorces consensuelles ou dégénérées sont élaborées à partir d'alignements multiples de séquences nucléotidiques ou protéiques conservées (gènes *L1* ou *E1*) d'un nombre important de génotypes à tropisme muqueux ou à tropisme cutané. Certaines permettent de détecter des HPV à tropisme muqueux comme les systèmes MY09/11³²⁷, GP5/GP6³²⁸, SPF10³⁰⁵; et d'autres des HPV à tropisme cutané comme FAP59/64³²⁹, CUT³³⁰, CPI/CPIIg³³¹, CN1/CN3³³², BGC-PCR³³³. Elles sont modifiées conjointement à la découverte de nouveaux HPV afin d'élargir leur spectre de détection. Ainsi, les amorces PGMY³³⁴ ont été remaniées à partir des amorces MY09/11, les amorces GP5+/GP6+³³⁵, BSGP5+/6+³³⁶ et MGP³³⁷ à partir des amorces GP5/GP6, et les amorces FAP6085/6319³³⁸ à partir des amorces FAP59/64 (Tableau 3).

Tableau 3 : Principales amorces utilisées pour la détection des HPV par PCR

Amorces consensuelles utilisées pour la détection des HPV muqueux		
Amorces	Séquence 5'-3'	Références
GP5/GP6	F : TTTGTTACTGTGGTAGATAC R : GAAAAATAACTGTAACT	Snijders et al, 1990
MY09/11	F : CGTCCMARRGGAWACTGATC R : GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	Manos et al, 1989
GP5+/GP6+	F : TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC R : GAAAAATAACTGTAACTTATTC F(1A) : GCiCAGGGiCACAATAATGG F(1B) : GCiCAGGGiCATAACAATGG	De Roda Husman et al, 1995
SPF	F(1C) : GCiCAGGGiCATAATAATGG F(1D) : GCiCAAGGiCATAATAATGG R(2B) : GTiGTATCiACAACAGTAACAAA R(2D) : GTiGTATCiACTACAGTAACAAA F(A) : ACGTTGGATGTTTGTACTGTGGTGGATACTAC F(B) : ACGTTGGATGTTTGTACCGTTGTTGATACTAC F(C) : ACGTTGGATGTTTGTACTAAGTAGATACCACTC F(D) : ACGTTGGATGTTTGTACTGTTGTGGATACAAC	Kleter et al, 1998
MGP	F(31) : ACGTTGGATGTTTGTACTATGGTAGATACCACAC R(G) : ACGTTGGATGGAAAAATAAACTGTAAATCATATTCCT R(H) : ACGTTGGATGGAAAAATAAATTGTAAATCATACTC R(I) : ACGTTGGATGGAAATATAAATTGTAAATCAAATTC R(J) : ACGTTGGATGGAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	Soderlund-Strand et al, 2009
SPF10	Not published	EP 1838881 A2 patent

Amorces consensuelles utilisées pour la détection des HPV cutanés		
Amorces	Séquence 5'-3'	Références
CPI/CPII	F(I) : ATGGTACARTGGGCATWTGATAA R(IIG) : ATGTTAATWSAGCCWCCAAAATT R(IIS) : ATATTGTCTGAGCCTCCWAARTT	Tieben et al, 1993
CP62/CP69	F : GTWAATGAAAYTTGYAANTATCC	Berkhout et al, 1995
CP65/CP68	R : GWTAGATCWACATTCCARAA	
CN1	F(1) : AATARGTTWGATGATGCWGA R(1) : AKRTARTCWGGATATTTGCA	Harwood et al, 1999
CN2	F(2) : GGGGATATGGTTGAAACAGGT R(2) : CAGAGGACACCATAGAGCCA	
CN3	F(3) : AACTCTAAYATWGCACATG R(3) : CAVGTRCSYTGCCAAATATC	Harwood et al, 1999
C4	F(4) : GGAGATACAGAAAATCCT R(4) : SHATCTCCATAGATATCTTT	
EN1	F(1) : TATTTCCCWACHGTHAGTGGCTC R(1) : TCATAYTCYTCTACATGTCT	
EN2	F(2) : CTGTCAGTGGCTCATTGGT R(2) : CATWGCATTAATTTGAGCTA	
EN3	F(3) : ATGKCWAATGATGTHATGG R(3) : TGRTRYCCAYAAAATRCCATT	Forslund et al, 1999
FAP59/FAP64	F : TAACWGTIGGICAYCCWTATT R : CCWATATCWVHCATITCICCATC	
FAP60/FAP63	F : CCWGATCCHAATMRRTTTCG R : ACATTTGIAITTTDGGRTCAA	Forslund et al, 2005
BGC	available under request	Brink et al, 2005
CUT	F(1) : TRCCiGAYCCiAATAARTTTG F(1A) : TRCCiGAYCCiAACAGRTTTG F(1B) : TRCCiGAYCCiAATAGRTTTG F(1C) : TRCCiGAYCCiACAARTTTG R(1B) : TCiACCATRTCiCCRTCYT	Chouhy et al, 2010

Le test Amplicor HPV® (Roche Diagnostics) est le seul test de dépistage des HPV HR basé sur une technique de PCR et marqué CE-IVD. Ce test permet de détecter 13 génotypes d'HPV HR, identiques à ceux du test HC2 : HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68. Tous les autres tests sont suivis d'une étape de génotypage permettant d'identifier l'HPV mis en cause.

b- Génotypage des HPV amplifiés par PCR

i- Séquençage capillaire

En séquençage capillaire la séquence de l'ADN cible amplifié est comparée à l'ensemble des séquences génomiques disponibles dans la banque de données GenBank à l'aide du logiciel BlastN. La technique a pour principal inconvénient d'être limitée à la détection de la population majoritaire HPV présente et ne peut pas être utilisée en cas d'infection multiple.

ii- Génotypage par hybridation inverse

Cette technologie utilise des sondes oligonucléotidiques fixées sur des bandelettes.³³⁹ Le test INNO-LiPA HPV GenotypingExtra II® (Fujirebio) est une technique d'hybridation inverse type LiPA (line probe assay), marquée CE-IVD, permettant la détection spécifique de trente-deux types d'HPV dont treize types d'HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, et 68), six potentiellement à haut risque (26, 53, 66, 70, 73, et 82), neuf types à bas risque (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, et 81) et quatre types non classés (62, 67, 83, et 89). Le test repose sur l'amplification par PCR d'un fragment de 65 pb au sein de la région L1 du génome d'HPV en utilisant les amorces consensus SPF10 biotinylées (Figure 15). Les amplimères biotinylés sont ensuite hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de type d'HPV. Les étapes d'hybridation sont réalisées sur système d'automatisation. La lecture de la position des bandes permet de définir quels types d'HPV sont présents.^{305,340,341}

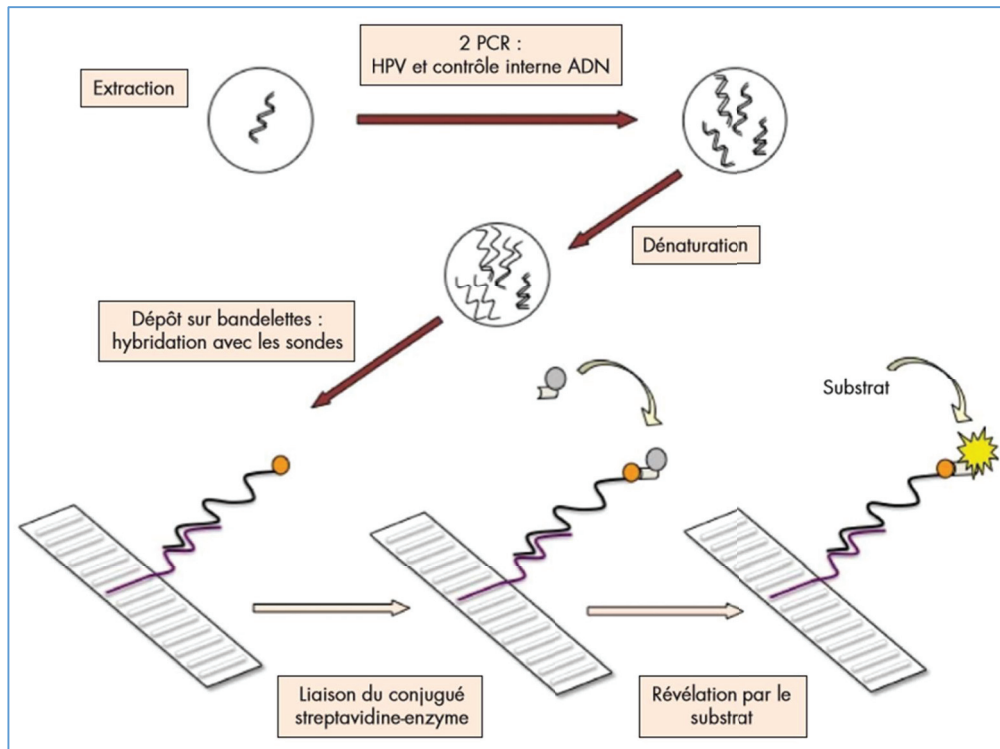


Figure 15: Principe du test InnoLipa Extra II (Hantz et al, 2010)

Les sondes spécifiques de type d'HPV sont immobilisées en lignes parallèles sur des bandelettes de nitrocellulose. Après hybridation et lavage stringent, le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline est ajouté et se lie à tout hybride biotinylé formé. L'incubation avec le chromogène BCIP/ NBT forme un précipité violet au niveau des lignes réactionnelles.

Il existe deux autres tests : le test Linear Array HPV Genotyping test® (Roche Diagnostics) et le test Digene HPV Genotyping RH Test® (Qiagen) de génotypage par hybridation inverse, l'amplification préalable étant réalisée respectivement avec les amorces PGMY09/11 et les amorces GP5+/GP6+. Ces tests sont très efficaces en pratique clinique mais sont limités par le panel de détection des sondes HPV-spécifiques insérées dans chaque kit.

iii- Génotypage par puce à ADN

Le principe des puces à ADN est proche de celui de l'hybridation inverse sur bandelettes mais le support de l'hybridation, sur lequel sont fixées les sondes sous forme de spots bien distincts, est plus

varié, de type lame en verre ou en plastique, type fond de tube tronqué et de taille différente (macro- ou microarrays).^{342,343} La révélation peut être soit colorimétrique *via* la biotine, soit fluorimétrique *via* un fluorochrome selon le marquage des amorces utilisées pour la PCR. Les tests PapilloCheck® (Greiner Bio-One) et CLART HPV 2® (Genomica) s'appuient sur ce principe.

iv- Génotypage par technologie d'array en suspension (xMAP) ou Luminex

Le principe repose sur l'utilisation de microbilles de polystyrène colorées par un fluorophore et couplées à des sondes spécifiques pour chaque type HPV.³⁴⁴ L'amplicon est marqué par un autre fluorophore. L'analyse est effectuée par cytométrie de flux à 2 lasers permettant de détecter simultanément des réactions multiples dans un même tube. Le test Digene HPV Genotyping LQ Test® (Qiagen) amplifie le gène L1 à partir des amorces GP5+/GP6+ et s'appuie sur ce principe.

4- Réplication circulaire de l'ADN (Rolling-Circle Amplification, RCA)

La *Rolling-Circle Amplification* ou RCA pour «réplication circulaire de l'ADN » est une technique d'amplification isotherme de l'ADN circulaire double brin ou simple brin, qui utilise l'ADN polymérase du bactériophage phi29 et des amorces hexamériques aléatoires³⁴⁵. Cette technique permet l'amplification des génomes viraux circulaires sans connaissance préalable de la séquence nucléotidique. L'analyse des produits de RCA est ensuite réalisée par clonage et séquençage Sanger, ou par séquençage haut débit^{346,347}. Cette méthodologie a permis de découvrir de nombreux nouveaux génotypes d'HPV appartenant principalement aux genres bêta et gamma, ainsi que des PV animaux appartenant à d'autres genres. La RCA permet aussi mais dans une moindre mesure l'amplification des génomes linéaires^{347,348}, et elle est utilisée pour amplifier la totalité du génome humain. On la désigne

alors sous le terme « amplification du génome total » (*Whole Genome Amplification*, WGA). On utilise également des systèmes d'enrichissement, comme l'électrophorèse sur gel ou la centrifugation par gradient de densité³⁴⁷, permettant la séparation des génomes circulaires des génomes linéaires avant d'amplifier par RCA.

5- Apport des techniques de séquençage haut débit

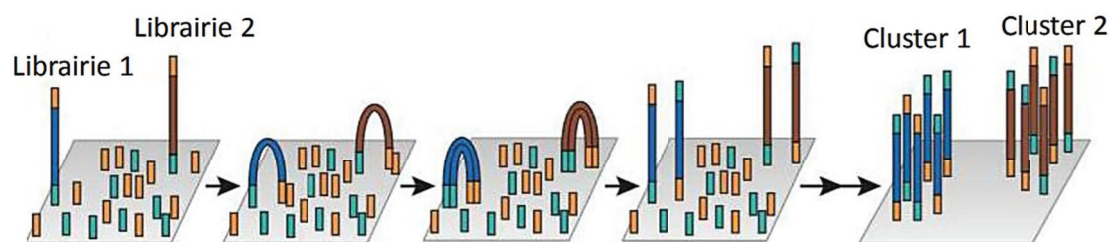
Le séquençage haut débit (*High Throughput Sequencing*, HTS) ou séquençage nouvelle génération (*Next generation sequencing*, NGS) désigne un ensemble de technologies plus récentes permettant le séquençage de centaines de milliers de fragments d'ADN ou d'ARN simultanément en un temps très court. Le NGS permet ainsi d'analyser des bibliothèques de séquençage correspondant soit à des produits d'amplification obtenus par PCR ou RCA, soit au contenu génomique total d'un échantillon ; les séquences analysées ayant été dissociées en courts fragments génomiques via des méthodes de nébulisation ou de sonication. Les principales plateformes de séquençage haut-débit sont Illumina (Solexa), 454 Life Sciences (Roche), Ion Torrent Proton / PGM (ThermoFischer) et SOLiD System (Applied Biosystems)³⁴⁹, ainsi que PacBio SMRT ou Oxford Nanopore Technology MinIon, développées spécifiquement pour le séquençage haut débit de fragments nucléotidiques très longs. Le NGS permet une analyse fine de la diversité des populations virales présentes, mettant en évidence les variants nucléotidiques ou les haplotypes faiblement représentés. Cette spécificité a été mise à profit pour détecter les infections mixtes où plusieurs génotypes sont présents au sein d'un même échantillon. En effet la sensibilité et le pouvoir discriminant du NGS sont très supérieurs à ceux du séquençage capillaire Sanger ; le NGS permet de détecter des variants minoritaires représentant moins de 5% de la population cible comme cela a été démontré lors de l'étude de l'ADN mitochondrial humain³⁵⁰.

a- Métagénomique globale

La métagénomique globale (*Whole Genome Sequencing*, WGS) a été abondamment utilisée pour caractériser la diversité microbiologique au sein d'échantillons biologiques ou environnementaux et a permis la découverte de nouveaux agents pathogènes.^{17,151,152} Elle consiste à préparer une librairie de séquençage à partir de l'ADN et/ou de l'ARN total extrait d'un échantillon et fractionné de manière aléatoire en de nombreux fragments. Ces fragments seront ensuite amplifiés de manière clonale par contiguïté des séquences sur la cellule de séquençage (Figure 16). Les séquenceurs lisent des fragments de plusieurs dizaines de bases, appelés *reads*, la longueur des reads varie en fonction des technologies utilisées. Une séquence continue s'obtient ensuite par assemblage des *reads* à l'aide de différents programmes informatiques. La présence d'acides nucléiques provenant du génome de l'hôte ou d'autres microorganismes commensaux peut diminuer la sensibilité de la lecture spécifique des génomes viraux. Une soustraction préalable de ces *reads* est nécessaire lors du traitement bioinformatique des données associées aux génomes viraux.

Stratégie d'amplification

Support solide



Flow Cell: support en verre et lieu de l'amplification clonale (formation des clusters) et du séquençage

Cluster: 1000 fragments de librairies

Figure 16 : NGS (Illumina), étape d'amplification clonale sur un support en verre
(http://www.canceropole-gso.org/download/fichiers/3606/NGS+Canceropole+GSO+mai+2016+AGros_DIFF.pdf)

Les adaptateurs Illumina sont présents à la fois sur le support de verre et à la fois sur chacun des fragments appartenant à la librairie. Chaque fragment d'ADN inclus dans la librairie se fixe *via* la séquence adaptateur sur le support de verre, puis va être amplifié de manière clonale par contiguïté (formation de ponts), pour former un cluster, c'est-à-dire un groupement clonal du fragment d'origine.

Cette approche a été utilisée pour déterminer la séquence génomique partielle de nouveaux virus isolés chez l'humain mais aussi chez l'animal.^{17,347,351-355} Jusqu'à présent aucune de ces nouvelles séquences putatives de PV n'a été complètement séquencée ni clonée. De ce fait, celles-ci ne sont donc pas référencées par le Centre International de Référence des Papillomavirus. On peut néanmoins avoir accès à plusieurs de ces séquences sub-génomiques dans GenBank (NCBI).

Les techniques de métagénomique globale génèrent un nombre important de données et ont permis la mise en évidence de l'existence d'un virome sur la peau d'individus sains, composant le microbiote cutané au même titre que les bactéries commensales, présentes sur la peau en l'absence de toute manifestation clinique. Ce virome peut avoir un rôle symbiotique, c'est-à-dire mutuellement bénéfique à la fois pour le virome et pour l'hôte ; ou commensal où seul le virome tire profit de l'interaction avec

l'hôte sans pour autant lui nuire. Le virome cutané est composé d'une multitude de virus dont des HPV.^{151–153} Enfin les techniques de métagénomique globale permettent l'étude de l'intégration du génome viral dans le génome humain.³⁵⁶

b- Métagénomique ciblée

Une alternative à la métagénomique globale est d'enrichir le(s) génome(s) HPV ciblé(s) avant séquençage (Figure 7). Cette stratégie a été utilisée pour analyser les produits de PCR obtenus en utilisant des amorces consensuelles à large spectre décrites plus haut.^{357–361} La technique s'avère plus efficace que la métagénomique globale pour étudier des échantillons avec de faibles charges virales. Le NGS a aussi permis d'analyser les produits d'amplification par RCA^{347,351,352,362–367}. La technique de séquençage des produits de RCA présente un avantage certain pour la découverte de nouveaux génotypes HPV. En effet le génome viral circulaire est amplifié sans avoir recours à l'utilisation d'amorces spécifiques. Des séquences partielles correspondant à de nouveaux génotypes HPV putatifs ont ainsi été identifiées, notamment dans des échantillons précédemment détectés comme faussement négatifs soit par séquençage des produits de PCR consensuelles^{363,364}, soit par les tests commerciaux destinés au dépistage des HPV HR³⁶⁵. *A contrario*, le séquençage des produits de RCA ne permet pas toujours de détecter les séquences HPV mises en évidence par séquençage des produits de PCR.³⁴⁷ Ainsi dans une étude récente, le séquençage haut débit des produits d'amplification obtenus avec les amorces FAP59/64 à partir d'échantillons cutanés a permis de détecter 352 séquences HPV (ou putatives), tandis que les mêmes échantillons analysés par séquençage haut débit des produits de RCA a permis de détecter seulement 26 séquences HPV (ou putatives). Parmi ces 26 séquences, 11 correspondaient à des séquences non détectées par la première méthode de séquençage haut débit des produits de PCR^{347,368}. Il semble donc que le séquençage haut débit des produits de PCR soit plus sensible que le séquençage des produits de RCA. Cependant la technique de RCA, ne nécessitant pas

une connaissance préalable de la séquence recherchée, permet la détection potentielle de nouveaux HPV.³⁶⁹

c- Séquençage des produits de capture

Le séquençage des produits de capture (*Target enrichment sequencing / Pull-down capture sequencing / Specific enrichment capture*) est une technique d'enrichissement permettant de séquencer directement le génome viral étudié à partir de l'extrait d'ADN, sans amplification enzymatique préalable (Figure 17). Cette technique a été utilisée pour séquencer le génome entier de grands virus à ADN tels que le virus de la varicelle et du zona (VZV), le virus Epstein-Barr (EBV) ou l'herpesvirus humain type 8 (HHV-8) directement au sein d'échantillons biologiques.³⁷⁰ La technique repose sur l'utilisation des sondes d'ARN ou d'ADN dont les séquences sont complémentaires à celles du génome étudié. Pour un génome entier, la capture peut s'effectuer dans un unique tube contenant un mélange de sondes biotinylées complémentaires chevauchantes recouvrant la totalité de la séquence génomique. Lors d'une réaction d'hybridation, les sondes marquées accrochées à un support solide (par exemple des billes magnétiques recouvertes de streptavidine) capturent les séquences complémentaires à partir des acides nucléiques totaux présents dans l'échantillon (Figure 7). La capture est suivie par une étape de ligation d'adaptateurs spécifiques du séquenceur utilisé, puis d'une étape de PCR, avec un nombre de cycles d'amplification restreint, destinée à enrichir les fragments nucléiques capturés par les sondes. Le succès de la méthode dépend de la disponibilité en séquences de référence du virus étudié et augmente lorsqu'un large panel de séquences de référence est utilisé pour concevoir les sondes³⁷¹. En utilisant un mélange de sondes HPV élaborées à partir de la séquence totale de tous les génotypes alpha, bêta, gamma, mu et nu référencés par le Centre National de Référence des HPV, la technique a été utilisée avec succès pour identifier les génotypes HPV impliqués dans les cancers cervicaux ainsi que les sites d'intégration du génome des HPV HR dans le génome humain.^{372–374} Cependant le séquençage des produits de capture requiert une quantité importante d'ADN, ce qui s'avère limitant lorsque l'on travaille à partir d'échantillons cutanés.

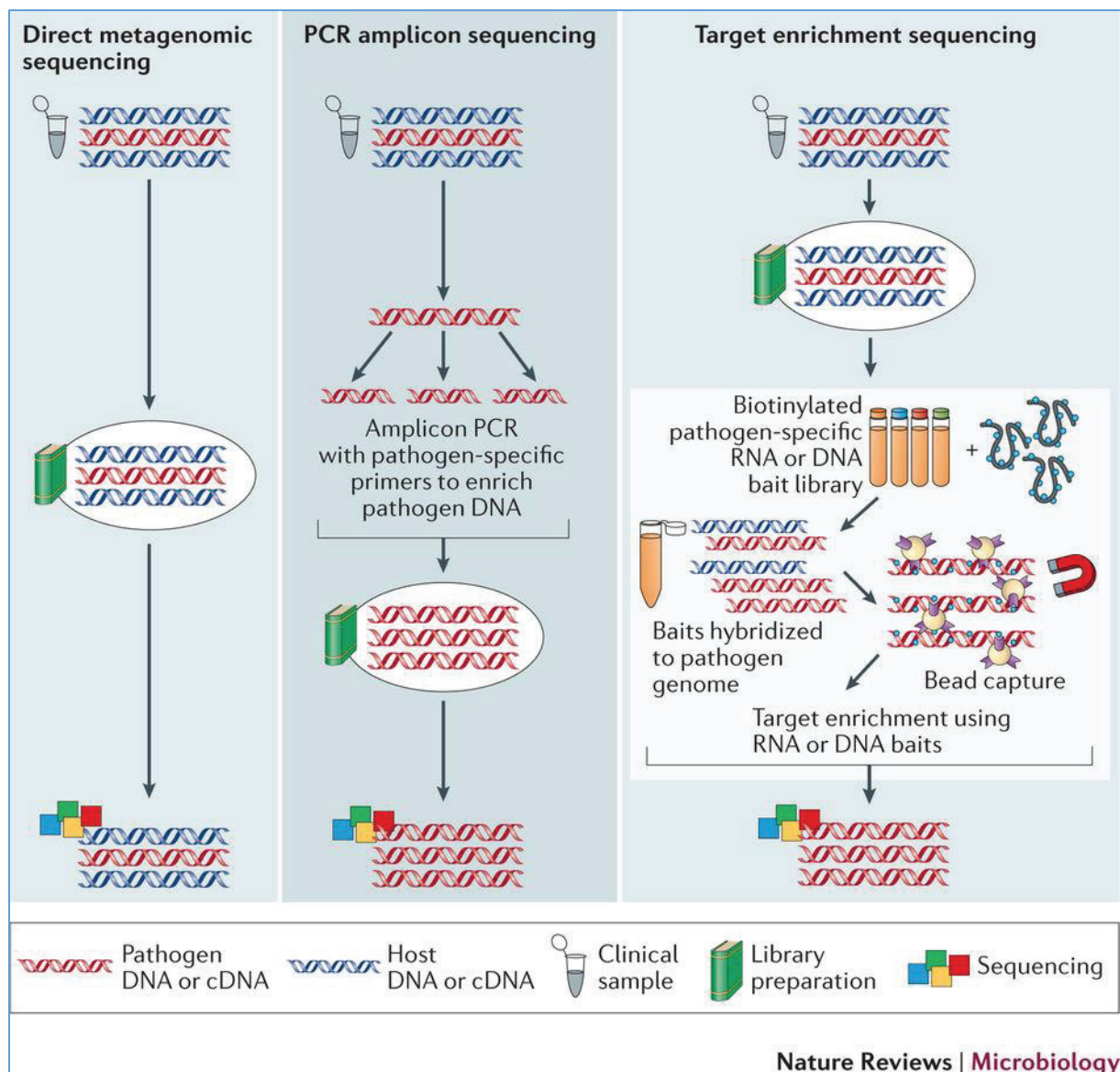


Figure 17 : Techniques de séquençage haut débit du génome viral (Houlcroft et al, 2017)

Chaque échantillon contient un mélange de séquences d'ADN appartenant aux différents pathogènes (en rouge) ou à l'hôte (en bleu). A gauche, le séquençage génomique total permet d'obtenir une représentation précise des séquences présentes dans l'échantillon. Au centre, le séquençage d'amplicons nécessite des étapes d'amplification par PCR en amont et permet ainsi d'enrichir la quantité de fragments sub-génomiques. A droite, la capture est un procédé d'enrichissement réalisé avant séquençage à l'aide de sondes nucléotidiques biotinylées spécifiques du virus recherché.

Objectifs des travaux

Les papillomavirus humains (HPV) sont de petits virus à ADN ayant un tropisme électif pour les kératinocytes de la peau et des muqueuses. Les HPV forment l'une des familles de virus les plus diversifiées sur le plan génétique. En effet, on compte désormais plus de 200 génotypes. De plus des variants intra-types ont été décrits très récemment. Les HPV représentent une composante importante du virome cutané de tout individu dès sa naissance. Ubiquitaires et en général asymptomatiques, certains génotypes peuvent néanmoins induire des pathologies plus ou moins sévères. Les HPV à tropisme muqueux à haut risque oncogène (HPV16, HPV18 et apparentés) sont impliqués dans 99% des cancers du col de l'utérus. Les HPV à tropisme cutanés sont responsables de pathologies souvent bénignes de la peau (verrues) mais peuvent être associés à des cancers de la peau chez les patients immunodéprimés.

Notre objectif principal fût de mettre au point une technique de génotypage pan-HPV par séquençage haut-débit (HTS) afin de détecter et de caractériser au mieux les génotypes viraux qui peuvent potentiellement co-infecter la peau et les muqueuses humaines et rendre compte des pathogénies associées à HPV.

Plus spécifiquement, au cours de la première partie de ma thèse, mon objectif fût à visée clinique visant à identifier dans des frottis de col de l'utérus présentant des dysplasies de type ASCUS les HPV dont les génotypes restaient indéterminés par la technique Inno-LiPA HPV Genotyping Extra II[®] (Fujirebio). Cette technique fait partie des "tests HPV" utilisés en pratique clinique pour identifier les génotypes HPV dans les FCU. Le génotypage repose sur l'amplification du génome HPV par PCR, couplée à une hybridation inverse permettant l'identification d'un panel restreint de séquences HPV. La diversité des génotypes HPV, la découverte constante de nouvelles séquences HPV, ainsi que l'existence de sous-types et variants intra-types mettent à mal l'efficacité de ces tests.

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai appliqué cette méthode à la caractérisation des génotypes HPV cutanés avec pour objectif d'analyser la dynamique du virome HPV cutané d'un patient atteint

d'une immunodéficience rare (Syndrome WHIM) caractérisée par une susceptibilité au développement de pathologies associées à HPV. Les échantillons consistant en des écouvillonnages de peau réalisés sur une période de 18 mois ont été analysés par HTS afin d'identifier les génotypes viraux dont les charges ont ensuite été quantifiées par PCR génotype-spécifique puis d'analyser à l'aide d'outils statistiques ad hoc des modifications éventuelles de la composition du virome HPV (qualitative ou quantitative) au cours du temps d'étude et leur corrélation possible avec le potentiel pathogène des génotypes HPV incriminés.

Résultats

ETUDE N°1 : Identification by high-throughput sequencing of HPV variants and quasispecies that are untypeable by linear reverse blotting assay in cervical specimens

ETUDE N°2 : Identification des papillomavirus humains impliqués dans les papillomatoses diffuses d'un patient atteint de syndrome WHIM au cours d'un traitement par AMD3100 un antagoniste de CXCR4

Etude N°1

Identification by high-throughput sequencing of HPV variants and quasispecies
that are untypeable by linear reverse blotting assay in cervical specimens

Lucie Molet, Delphine Girlich*, Rémy A Bonnin*, Proust Alexis, Bouligand Jérôme, Bachelerie
Françoise, Hantz Sébastien, Deback Claire

*Delphine Girlich et Rémy Bonnin ont contribué de manière équivalente à ce travail

(Soumission en cours à *Clinical Microbiology and Infection*)

Préambule

Les Papillomavirus humains (HPV) sont de petits virus à ADN qui infectent les épithéliums cutanés et muqueux. Les HPV sont aujourd'hui reconnus comme agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. En effet 13 alpha-HPV muqueux sont considérés comme agents carcinogènes pour l'Homme, les deux principaux étant HPV16 et HPV18.

Le cancer cervical invasif (ICC) est un problème de santé publique grave puisqu'il se place au 12^{ème} rang des cancers meurtriers de la femme en France (<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Depistage-du-cancer-du-col-de-l-uterus/Le-depistage-par-frottis-cervico-uterin>). Il correspond au stade le plus sévère de l'infection à HPV-HR. Le cancer de l'utérus est une maladie d'évolution lente. En effet il existe une période de 15 ans en moyenne entre le stade de dysplasie légère causée par l'infection à HPV et le développement du carcinome génital. C'est donc cette période qu'il faut cibler pour organiser le dépistage et prendre les mesures adaptées en cas de dysplasie. En France, l'examen cytologique des cellules recueillies lors d'un frottis cervico-utérin (FCU) constitue le test de dépistage de référence permettant de détecter toute anomalie de la muqueuse génitale. La Haute Autorité de Santé (HAS) conseille d'effectuer un dépistage tous les trois ans chez toutes les femmes âgées de 25 à 65 ans (<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Recommandations-et-outils-d-aide-a-la-pratique/Cancers-gynecologiques>, mise en ligne janvier 2017).

En principe pour être conforme aux exigences de la norme CE-IVD, le test HPV consiste à détecter la présence ou l'absence d'ADN viral d'HPV HR en précisant ou non le génotype de l'HPV détecté.³⁵⁰ En pratique les tests de dépistage utilisés incluent aussi le génotypage des 32 HPV-HR et BR les plus prévalents grâce à des tests commerciaux basés sur l'amplification par PCR de l'ADN HPV et l'identification du génotype par hybridation à des sondes d'ADN spécifiques du génotype recherché. Le test INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* (Fujirebio[®]) fait partie de ces tests de génotypage HPV et

utilise les amorces SPF10 pour l'étape préalable d'amplification du génome viral. Le test a été validé pour le génotypage HPV et présente des performances équivalentes aux autres tests utilisés pour le diagnostic. Cependant plusieurs études rapportent environ 1% d'échec de génotypage malgré une amplification de l'ADN correcte dans les prélèvements cervicaux. Ces HPV de génotype indéterminé sont dénommés HPVX, et semblent correspondre à des (sous)-types ou variants HPV non-typables par la technique d'hybridation inverse utilisée

Le séquençage haut-débit a prouvé son efficacité pour le génotypage des HPV, en particulier lors d'infections multiples ou lorsque les charges virales dans l'échantillon clinique sont faibles. L'objectif de ce travail a été d'identifier par séquençage haut-débit les (sous)-types ou variants présents dans les prélèvements cervicaux de femmes présentant des dysplasies légères ; non typables par le test INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*. Un ensemble de 58 échantillons a été analysé par séquençage haut-débit des amplimères amplifiés avec les amorces GP5+/6+. Les reads obtenus pour chacun des échantillons analysés ont ensuite été regroupés en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) et la séquence représentative de chaque OTU soumise à une analyse phylogénétique et à un alignement multiple.

Cette approche nous a permis d'identifier de nombreuses infections multiples mettant en jeu des HPV BR et d'identifier la présence de variants minoritaires des HPV-BR comme cela a déjà été observé pour HPV16. La présence de ces quasi-espèces dans la séquence du gène *L1* peut expliquer pourquoi les tests de génotypage par hybridation inverse échouent à identifier les génotypes HPV présents, lorsqu'un variant entre en compétition avec l'HPV recherché, ou lorsque ce variant présente une séquence non complémentaire des sondes d'hybridations utilisées dans le test.

Exposé des travaux

Identification by high-throughput sequencing of HPV variants and quasispecies that are untypeable by linear reverse blotting assay in cervical specimens

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Molet, Lucie; INSERM UMR 996, Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie Girlich, Delphine; Université Paris-Sud, Bacteriology Bonnin, Remy; Université Paris-Sud, Bacteriology Proust, Alexis; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), , Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction Bouligand, Jérôme; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), , Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction; INSERM U1185, UMR-1185 « Signalisation hormonale, Physiopathologie endocrinienne et métabolique » Françoise, Bachelier; INSERM UMR 996, Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie Hantz, Sébastien; Hopital Dupuytren, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène; INSERM 1092, Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques Deback, Claire; Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Virology; INSERM UMR 996, Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie
Key Words:	human papillomavirus, cervical cancer, genotyping, high-throughput sequencing, viral quasispecies
Abstract:	<p>Objectives: The aim of this study was to elucidate by high-throughput sequencing (HTS) the (sub)types and/or variants of human papillomavirus (HPV) in cervical samples in which the viruses remained untypeable by the linear reverse blotting assay INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II.</p> <p>Methods: DNA of 54 samples from women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and HPV-positive detection with undetermined genotypes was amplified by modified GP5+/GP6+; the L1 region was sequenced using Illumina MiSeq. The reads were clustered into operational taxonomic units (OTU) and quantified for relative abundance (RA) (OTU reads/total reads per sample).</p> <p>Results: Multiple infections with 2 to 7 HPV types were detected in 22/54 (40.7%) samples. Fourteen low-risk (LR) HPV types were detected (HPV6, 30, 42, 62, 67, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89, 90 and 114). One high-risk (HR) HPV35 and two possibly (p)HR-HPV73 were also detected. Twenty-two specimens contained variants characterised by 2 to 10 changes. The presence of L1 variants with diverse RA differed in types among the</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	<p>samples. In one sample, minority variants of HPV30 reached the maximal number of 17 OTU with RA inferior or equal to 2.7%.</p> <p>Conclusions: HTS indicates that multiple infections and minority variants are not uncommon in ASC-US samples. The presence of L1 quasispecies can explain why genotyping by linear reverse blotting assays failed when variants compete or do not match the specific hybridisation probes. Further studies are needed to increase our understanding of L1 quasispecies dynamics and their role in the early stages of infection.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

**Identification by high-throughput sequencing of HPV variants and quasispecies that are untypeable
by linear reverse blotting assay in cervical specimens**

**Lucie Molet^{1,2}, Delphine Girlich³§, Rémy A Bonnin³ §, Alexis Proust⁴, Jérôme Bouligand^{4,5}, Françoise
Bachelier², Sébastien Hantz⁶, Claire Deback^{1,2*}**

¹ Laboratoire de Virologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpitaux Universitaires
Paris Sud, Villejuif, France

² UMR-996 "Inflammation, Chimioquinas et Immunopathologies", Université Paris Sud, Université Paris
Saclay, LabEx Lermite, Faculté de Médecine, Clamart, France

³ EA7361 "Structure, dynamics, function and expression of broad-spectrum β -lactamases", Université
Paris Sud, Université Paris Saclay, LabEx Lermite, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre France

⁴ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital de Bicêtre, Service d'Endocrinologie et des
Maladies de la Reproduction, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁵ UMR-1185 « Signalisation hormonale, Physiopathologie endocrinienne et métabolique », Université
Paris Sud, Université Paris Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France

⁶ Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Inserm UMR 1092, CHU Dupuytren, Limoges, France

§: Both authors contributed equally to this work

***Corresponding author:**

Dr Claire Deback
Service de Virologie, Hôpital Paul Brousse
12, avenue Paul-Vaillant-Couturier
94804 Villejuif cedex
Phone: +33 1 45 59 33 28
Fax: + 33 1 45 59 37 24
Email: claire.deback@aphp.fr

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Number of words: 2495

Keywords: human papillomavirus, cervical cancer, genotyping, high-throughput sequencing, viral
quasispecies

For Peer Review

Abstract: 250 words

Objectives: The aim of this study was to elucidate by high-throughput sequencing (HTS) the (sub)types and/or variants of human papillomavirus (HPV) in cervical samples in which the viruses remained untypeable by the linear reverse blotting assay INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

Methods: DNA of 54 samples from women with atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and HPV-positive detection with undetermined genotypes was amplified by modified GP5+/GP6+; the *L1* region was sequenced using Illumina MiSeq. The reads were clustered into operational taxonomic units (OTU) and quantified for relative abundance (RA) (OTU reads/total reads per sample).

Results: Multiple infections with 2 to 7 HPV types were detected in 22/54 (40.7%) samples. Fourteen low-risk (LR) HPV types were detected (HPV6, 30, 42, 62, 67, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89, 90 and 114). One high-risk (HR) HPV35 and two possibly (p)HR-HPV73 were also detected. Twenty-two specimens contained variants characterised by 2 to 10 changes. The presence of *L1* variants with diverse RA differed in types among the samples. In one sample, minority variants of HPV30 reached the maximal number of 17 OTU with RA inferior or equal to 2.7%.

Conclusions: HTS indicates that multiple infections and minority variants are not uncommon in ASC-US samples. The presence of *L1* quasispecies can explain why genotyping by linear reverse blotting assays failed when variants compete or do not match the specific hybridisation probes. Further studies are needed to increase our understanding of *L1* quasispecies dynamics and their role in the early stages of infection.

Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are DNA viruses that infect cutaneous and mucosal epithelia. The HPV genome is a double-stranded circular DNA ~8,000 base pairs (bp) in length. The prototypical HPV genome encodes 6 early genes (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* and *E7*) and 2 late genes (*L1* and *L2*). More than 200 HPV types have been characterised based on sequence information collected by the International HPV Reference Centre [1]. Classification of HPV is based on the nucleotide sequence of the *L1* gene, which encodes the major capsid protein. HPV belongs to 49 species in five major genera: alpha, beta, gamma, mu and nu [2]. Specific HPV types display less than 90% similarity to other HPV types [3]. HPV types can be further classified into lineage variants or subtypes; these variants possess genome sequences that empirically diverge by 1 to 10% or sublineage variants with genomes that are 0.5% to 1% divergent [4].

The 51 mucosal HPV types belonging to the alpha genus can be divided into four groups based on their epidemiological association with cancer. (i) Group 1, which include HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59 that are carcinogenic to humans. (ii) The group 2A which include HPV68 that is probably carcinogenic to humans. (iii) The group 2B, which include HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73 and 82 are possibly carcinogenic to humans. The HPV types 30, 34, 69, 85 and 97 in group 2B are possibly carcinogenic to humans based on their phylogenetic similarity to HPV types for which there is sufficient or limited evidence of carcinogenicity in humans. (iv) There is no epidemiological evidence that other HPV types in the alpha genus included in the group 3 (HPV6, 7, 11, 13, 30, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 69, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 87, 89, 90, 91, 97, 102, 106 and 114) are carcinogenic to humans; they cause skin or genital warts, minor cytological atypia and often no apparent disease [5].

Testing for infection with high-risk (HR) HPV is an invaluable part of the clinical guidelines for cervical carcinoma screening, management and treatment. Despite a similar overall level of accuracy in detecting high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN), commercial HPV assays do not detect

the same infections in women undergoing primary screening [6]. Their concordance in positive results varies between 48% and 69% [7-8]. Most of these assays use sets of consensus primers or mixtures of primers to amplify a subgenomic region of *L1* or *E6/E7* [7]. Among the PCR-based methods, the GP5+/6+ (GP) primer set, which targets conserved sequences within the *L1* region flanking highly variable type-specific sequences is commonly used [9]. Full HPV genotyping is based on the visualisation of amplicons generated by consensus primers using secondary probe hybridisation on solid supports or sequencing.

The INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* (Fujirebio®) assay is a line probe assay that is licensed for *in vitro* diagnostic use and was designed for the qualitative detection and identification of genotypes of HPV. It is based on PCR using SPF10 primers. Biotinylated amplicons are hybridised to 32 specific oligonucleotide probes immobilised as parallel lines on membrane strips. The assay detects 13 HR-HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68), 6 possibly (p)-HR-HPV genotypes (26, 53, 66, 70, 73, and 82), 9 low-risk (LR) HPV genotypes (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, and 81) and 4 genotypes with unknown significance (62, 67, 83, and 89) [10-11]. INNO-LiPA HPV assays have been proven to be valid methods for HPV genotyping that offer performance comparable to that of other methods and are suitable for clinical and epidemiological studies [12-13]. However, the finding in several studies that ~1% of cervical samples showed a positive signal in HPV lines but failed to display a positive signal in subsequent typing assays and were designated as containing HPV-X may indicate that certain (sub)types and/or variants were not available on the respective typing blots [10, 14].

High-throughput sequencing (HTS) has been efficiently used in HPV genotyping and has enabled the identification of multiple infections and the precise identification of sequences even in specimens with weak viral loads [15-17]. The aim of this study was to identify by HTS the (sub)types and/or variants of HPV present in cervical samples that were untypeable (HPV-X) using the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* system.

Materials and methods

Specimens and controls

A selection of 252 HPV DNA-positive cervical samples with squamous cells of undetermined significance (ASC-US) was obtained from women attending the Dupuytren Hospital (Limoges, France) and the Bicêtre Hospital (Kremlin-Bicêtre, France) for cervical cancer screening. All samples were positive for HPV with indeterminate genotype (HPV-X) according to the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* (Fujirebio®) assay. HPV16 DNA extracted from a cervical cytology specimen (sample S53) and a purified plasmid encompassing the full-length genome of HPV16 (GenBank access number K02718; ATCC® 45113D™) were used as positive controls.

Protocol for DNA sample library preparation and HPV typing by Illumina® MiSeq HTS

The DNA in the samples was amplified by PCR using modified GP5+/GP6+ primer pairs extended with overhang adapter sequences required to bind the Illumina® indexes and sequencing adapters [9]. PCR was performed in 50-µL reaction mixtures containing 1X High-Fidelity Platinum buffer, 3.5 mM MgCl₂, 0.6 µM forward and reverse primers and 1 U of proofreading *Taq* polymerase (Platinum™ *Taq* DNA Polymerase, Thermo Fisher). The cycling protocol consisted of an activation step (15 min at 95°C), 21 cycles (1 min at 94°C and 2 min at 50°C, decreased by 0.5°C per cycle to 40°C and 1.5 min at 72°C), 24 cycles (1 min at 94°C, 2 min at 40°C, 1.5 min at 72°C), and a final elongation step (4 min at 72°C) [18].

Each PCR product was dual-indexed using the KAPA HiFi HotStart Uracil + ReadyMix® (Roche Diagnostics). The Agencourt Ampure XP beads system (Beckman Coulter®) was used to purify the DNA libraries. The concentrations of the DNA libraries were normalised prior to pooling and sequencing to ensure equal representation of each sample. A PhiX Control (Illumina®) spike-in at 5% was used as an internal control to monitor sequencing quality. The combined library and the PhiX

controls were loaded at 8 pM final concentration on MiSeq using the v3 reagent kit and sequenced by Illumina MiSeq 2 x 300-bp paired-end sequencing.

Analysis of HTS data

FastQC were processed using CLC Genomics Workbench software V10.0.1 (Qiagen Bioinformatics). The reads were submitted to quality control and discarded if the quality score was less than 0.05 (QC30) and/or if more than 2 ambiguous nucleotides were detected. Reads with lengths of less than 100 nucleotides were removed for further analysis. The Qiagen GS reference mapper (CLC HTS Core Tools, Qiagen) was used to identify HPV reads by aligning the trimmed reads to the *L1* region of 184 alpha-HPV reference sequences downloaded from the HPV episteme database (PaVE) (<https://pave.niaid.nih.gov/>, accessed on 01-11-2017). To be assigned to an HPV type, each read was required to align with at least 90% identity among 90% typing guidelines. The reads were clustered into operational taxonomic units (OTU) at 99% similarity (CLC Genomics Workbench (Qiagen Bioinformatics)). OTU containing at least 200 reads were analysed, and representative sequences for each OTU were thus extracted.

Phylogenetic analysis and detection of variants

Phylogenetic analysis was performed using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model using Mega 7 software, allowing the classification of OTU sequences into HPV type clusters [19]. To detect intratype variants, multiple alignments were performed for the OTU sequences that had been grouped in the same HPV cluster using ClustalW2 and BioEdit v7.2.5 [20-21].

Results

HPV amplification and Illumina sequencing

The modified GP5+/GP6+ fusion primers amplified 58 (23.0%) of 252 selected samples. A total of 32,881,974 reads were obtained (Fig. 1). After trimming, 14,490,484 reads remained for analysis, and 10,987,925 (75.8%) of the trimmed reads mapped to references. The median length of HPV reads was 139.3 bp and ranged from 138.6 to 147.4 bp. Four samples (S33, S35, S40 and S41) failed to generate more than 5,000 reads and thus did not meet the criteria to be considered as positive samples; they were excluded from the study (Supplementary Table S1).

Identification of HPV genotypes

Among our 54 HPV-X samples, 16 different types were detected (Fig. 2). HPV83 (21/54) and HPV42 (20/54) were the most frequently detected, followed by HPV81, HPV67, HPV90, HPV74 and HPV87. Seven HPV types (HPV30, 72, 74, 84, 87, 90, and 114) cannot be detected by the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* assay because the corresponding probes are not included in the strips. All of these are unclassifiable as to carcinogenicity in humans (group 3) except for the high-risk (HR) HPV35 found in one sample (S59) and a possible HR (pHR) HPV73 in co-infection with HPV90 or with multiple genotypes in S17 and S18, respectively (Supplementary Table S2). Multiple infections were detected in 22/54 (40.7%) samples; the number of types present in multiple infections ranged from 2 to 7 (Table 1).

HPV divergent sequences and variants

Reads clustering in OTU were compared to their respective HPV reference sequences; variants were detected in 22/54 (40%) specimens (Supplementary Table S2). Sequencing of the *L1* region of the positive plasmid control (HPV16; K02718) showed only one kind of OTU with a relative abundance (OTU reads/total reads per sample) of 100%, suggesting that the variants observed in clinical samples are not due to random sequencing errors. Phylogenetic analysis allowed a classification of all OTU

1
2
3 sequences into 16 clusters; the two positive controls (K02718) and S53 were localised in the HPV16
4 cluster (Fig. 3). Multiple alignments of OTU showing different homologies of sequences according to
5 the HPV types considered and the specimens are presented in Supplementary Fig. S1. Among the
6 variants, changes ranged from 2 to 10 nucleotides; in sample S19, two OTU sequences (S19-V3 and
7 S19-V14) presented the maximum of 10 changes out of 91 nucleotides). The numbers of reported
8 variants in some samples were very high, reaching 15 for the divergent sequences clustering with
9 HPV83 in sample (S01) and 17 for the divergent sequences (S19-V3 to S19-V19) clustering with
10 HPV30 in sample (S19), as shown in Fig. 4A. In S19, the 17 variants have weak relative abundance
11 values ranging from 2.7% to 0.3%. On the other hand, clusters such as HPV42 are characterised by
12 low numbers of variants. Among the OTUs found in 20 specimens clustering with HPV42, all 21
13 amplicons except S49-V2 were highly conserved; these amplicons displayed sequences that were
14 100% similar to the reference sequence (Fig. 4B).

Discussion

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35 In this study, we used HTS to identify HPV that were untypeable (HPV-X) by the INNO-LiPA HPV
36 Genotyping *Extra II*® assay in cervical specimens. Using this technique, we were able to identify HPV
37 genotypes in 54 of the 252 pre-selected specimens. We found multiple infections in 40.7% of the
38 specimens, consistent with data reported in the literature. Indeed, 20 to 40% of HPV-positive women
39 harbour in their cervixes at least two HPV types [22]. In our study, seven LR types detected by HTS
40 (HPV30, 72, 74, 84, 87, 90 and 114) are not included in the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*®
41 system. Furthermore, although the LiPA method amplified the viral DNA, the specific probes
42 employed in that system led to the misidentification of 9 types that were included in the LiPA strips:
43 HR-HPV35 (group 1), pHR-HPV73 (group 2) and LR HPV6, 42, 62, 67, 81, 83 and 89. Our HTS results
44 illustrate that the limitations in HPV LiPA typing are linked to the presence of mixed HPV types or to

the presence of variants; these are sometimes present in samples with weak viral loads that probably do not match the specific hybridisation probes of the blotting assays.

PCR systems using the GP5+/GP6+ primer pair, which allows the amplification of a broad range of mucosal HPV types in a single reaction, are very common. However, the performance of these PCR systems can be improved by the addition of eight forward broad-spectrum primers and two backward broad-spectrum primers (BSGP5+ and BSGP6+); this has led to more homogeneous analytical sensitivity in the detection of genital HPV types [22]. Moreover, wide variations in sensitivities across mixed HPV types or variants are a known concern in consensus-primer-based PCR assays and can result in missed or inconsistent HPV type-specific data reporting [23-24]. GP5+/GP6+ primers cannot amplify beta and gamma HPV species. The sum of these technical limitations may partially explain why some HPV-X still remained untypeable in our study, which was based on the deep sequencing of GP5+/GP6+ amplicons.

HTS sequencing is an accurate method for the identification of HPV types, the metagenomic detection of novel putative HPV types and the analysis of minor HPV variants [25-26]. HTS permits the characterisation of viral quasispecies as a whole; rather than focusing on dominant viral haplotypes (e.g., sequences shared by a significant proportion of the population) or a consensus sequence, it is far more informative to study dynamic and viral adaptation. The concept of quasispecies consisting of numerous variants has already been proposed for HPV16. It is based on observations of the presence of multiple variants in individuals with similar levels of observed genetic variation in RNA viruses; the existence of such variants in individuals is difficult to understand based on the high fidelity of the host DNA replication machinery and the general low evolutionary rate of nucleotide substitutions in HPV, which is estimated to be 2×10^{-8} per site per year [27]. The apolipoprotein B (APOBEC) 3A and APOBEC3B mRNAs, which encode proteins that convert cytosine to uracil and induce DNA degradation or mutation if the conversion is not repaired during persistent viral infection, are known to be involved in the hypermutation of the HPV16 long control region *E2*

[28]. Selective hypermutations have been proposed to be involved in the evolution of the HPV16 genome and in rapid escape of the virus from the adaptive immune response. Our results suggest that the concept of quasispecies could be extended to the *L1* sequences of numerous alpha-HPV species members, although it appeared to be inconstant in our study of the genotypes in ASCUS samples. *L1* hypermutation may alter the specific loop structure of the capsid that contains type-specific immunodominant epitopes [29]. It will be of particular interest to explore how natural *L1* quasispecies acquisition may result in the generation of neutralising antibodies with different binding affinities and how it may be involved in individual viral immune evasion and in the persistence of HPV in basal keratinocytes.

In conclusion, this study identified frequent multiple infections with LR HPV in ASC-US cervical samples and revealed that minority variants in LR alpha HPV clusters are not uncommon. The presence of *L1* quasispecies in cervical samples can explain why genotyping by linear reverse blotting assays fails when variants compete with or do not match the specific hybridisation probes. The role played by the *L1* quasispecies in the individual modulation of host immune response should be explored.

Disclosure: The authors have no conflicts of interest to declare.

No external funding was received for this study. Lucie Molet received a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- [1] D. Bzhalava, C. Eklund, J. Dillner, Virology 476 (2015) 341-4.
- [2] H.U. Bernard, R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, E.M. de Villiers, Virology 401(1) (2010) 70-9.

- [3] E.M. de Villiers, C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, H. zur Hausen, *Virology* 324(1) (2004) 17-27.
- [4] R.D. Burk, A. Harari, Z. Chen, *Virology* 445(1-2) (2013) 232-43.
- [5] I.A.f.R.o. Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Part B Biological agents., Lyon, France, 2012.
- [6] M. Poljak, J. Cuzick, B.J. Kocjan, T. Iftner, J. Dillner, M. Arbyn, *Vaccine* 30 Suppl 5 (2012) F100-6.
- [7] L. de Thurah, J. Bonde, J.U.H. Lam, M. Rebolj, *Clin Microbiol Infect* 24(1) (2018) 29-36.
- [8] M. Rebolj, S. Preisler, D.M. Ejegod, C. Rygaard, E. Lynge, J. Bonde, *PLoS One* 9(1) (2014) e86835.
- [9] A.M. de Roda Husman, J.M. Walboomers, A.J. van den Brule, C.J. Meijer, P.J. Snijders, *J Gen Virol* 76 (Pt 4) (1995) 1057-62.
- [10] B. Kleter, L.J. van Doorn, J. ter Schegget, L. Schrauwen, K. van Krimpen, M. Burger, B. ter Harmsel, W. Quint, *Am J Pathol* 153(6) (1998) 1731-9.
- [11] N. Munoz, F.X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K.V. Shah, P.J. Snijders, C.J. Meijer, *N Engl J Med* 348(6) (2003) 518-27.
- [12] M.N. Didelot-Rousseau, V. Courgnaud, N. Nagot, A. Ouedraogo, I. Konate, P. Mayaud, H. Weiss, P. Van de Perre, M. Segondy, *J Virol Methods* 135(2) (2006) 181-5.
- [13] F. Galan-Sanchez, M. Hernandez-Menendez, M.A. De Los Rios Hernandez, M. Rodriguez-Iglesias, *Acta Cytol* 55(4) (2011) 341-3.
- [14] A.T. Hesselink, M.A. van Ham, D.A. Heideman, Z.M. Groothuismink, L. Rozendaal, J. Berkhof, F.J. van Kemenade, L.A. Massuger, W.J. Melchers, C.J. Meijer, P.J. Snijders, *J Clin Microbiol* 46(10) (2008) 3215-21.
- [15] L. Yin, J. Yao, K. Chang, B.P. Gardner, F. Yu, A.R. Giuliano, M.M. Goodenow, *Viruses* 8(2) (2016).
- [16] M.G. Flores-Miramontes, L.A. Torres-Reyes, L. Alvarado-Ruiz, S.A. Romero-Martinez, V. Ramirez-Rodriguez, L.M. Balderas-Pena, V. Vallejo-Ruiz, P. Pina-Sanchez, E.I. Cortes-Gutierrez, L.F. Jave-Suarez, A. Aguilar-Lemarroy, *Virol J* 12 (2015) 161.
- [17] R.G. Nowak, N.P. Ambulos, L.M. Schumaker, T.J. Mathias, R.A. White, J. Troyer, D. Wells, M.E. Charurat, S.M. Bentzen, K.J. Cullen, *Virol J* 14(1) (2017) 112.
- [18] M.F. Evans, C.S. Adamson, L. Simmons-Arnold, K. Cooper, *BMC Clin Pathol* 5 (2005) 10.
- [19] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, *Mol Biol Evol* 33(7) (2016) 1870-4.
- [20] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, *Bioinformatics* 23(21) (2007) 2947-8.
- [21] T. Hall, *GERF Bulletin of Biosciences* (2011) 60-61.
- [22] M. Schmitt, B. Dondog, T. Waterboer, M. Pawlita, M. Tommasino, T. Gheit, *J Clin Microbiol* 48(1) (2010) 143-9.

- [23] E.A. Else, R. Swoyer, Y. Zhang, F.J. Taddeo, J.T. Bryan, J. Lawson, I. Van Hyfte, C.C. Roberts, *J Clin Microbiol* 49(5) (2011) 1907-12.
- [24] S. Mori, S. Nakao, I. Kukimoto, R. Kusumoto-Matsuo, K. Kondo, T. Kanda, *Cancer Sci* 102(6) (2011) 1223-7.
- [25] T.L. Meiring, A.T. Salimo, B. Coetzee, H.J. Maree, J. Moodley, Hitzeroth, II, M.J. Freeborough, E.P. Rybicki, A.L. Williamson, *Virology* 440(1) (2013) 1-7.
- [26] H. Johansson, D. Bzhalava, J. Ekstrom, E. Hultin, J. Dillner, O. Forslund, *Virology* 440(1) (2013) 1-7.
- [27] I. Kukimoto, T. Maehama, T. Sekizuka, Y. Ogasawara, K. Kondo, R. Kusumoto-Matsuo, S. Mori, Y. Ishii, T. Takeuchi, T. Yamaji, F. Takeuchi, K. Hanada, M. Kuroda, *PLoS One* 8(11) (2013) e80583.
- [28] C.J. Warren, J.A. Westrich, K.V. Doorslaer, D. Pyeon, *Viruses* 9(8) (2017).
- [29] R. Yang, C.M. Wheeler, X. Chen, S. Uematsu, K. Takeda, S. Akira, D.V. Pastrana, R.P. Viscidi, R.B. Roden, *J Virol* 79(11) (2005) 6741-50.

Table 1. Identification of HPV types by Illumina HTS sequencing in HPV DNA-positive cervical samples that are untypeable by the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* system

HPV type identified ^{a,b}	Number of detections among 54 specimens
35	1
42	4
67	3
74	1
81	2
83	15
87	3
89	1
90	1
114	1
6, 42	1
42, 74	1
42, 81	1
42, 83	3
42, 84	2
42, 90	1
62, 67	1
62, 81	1
62, 89	1
73, 90	1
87, 90	1
30, 42, 67	1
42, 67, 81	1
42, 74, 83	1
42, 74, 87	1
42, 81, 83	1
74, 81, 83	1
42, 67, 72, 89, 90	1
42, 67, 73, 74, 81, 84, 90	1

^a Numbers in bold indicate HPV types that are carcinogenic to humans (group 1).

^b Numbers in bold and italic indicate HPV types that are possibly carcinogenic to humans (group 2B).

Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
--

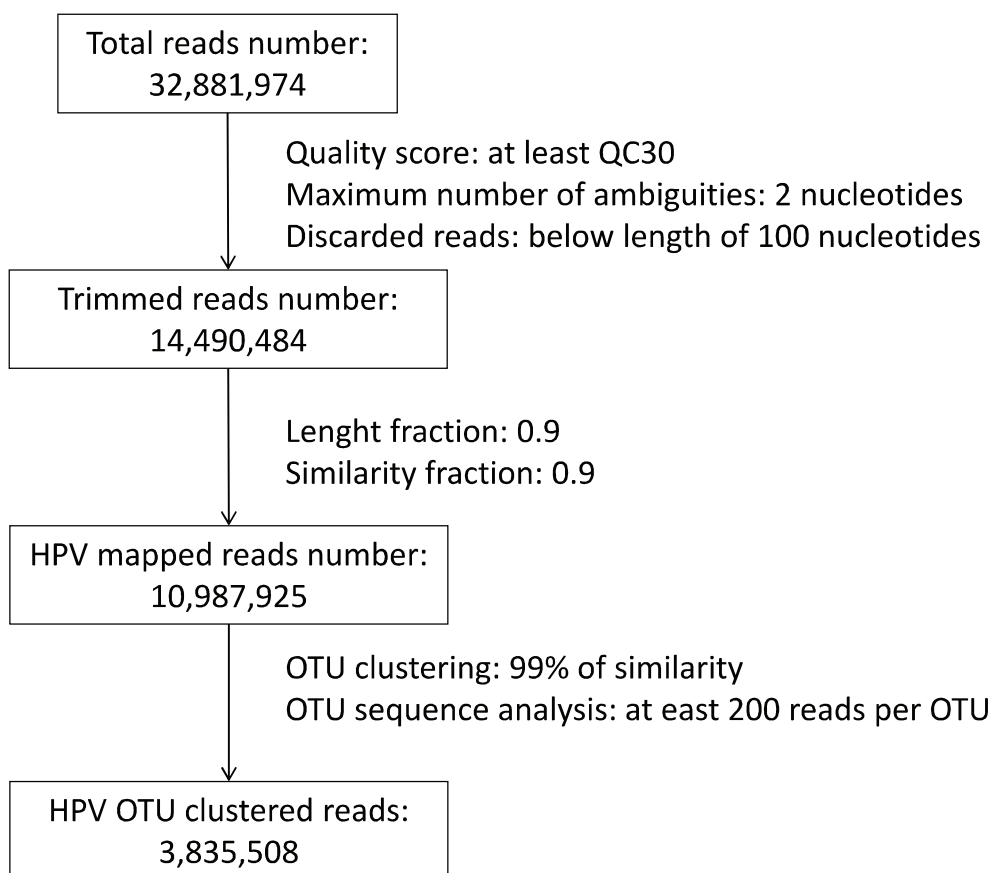


Figure 2

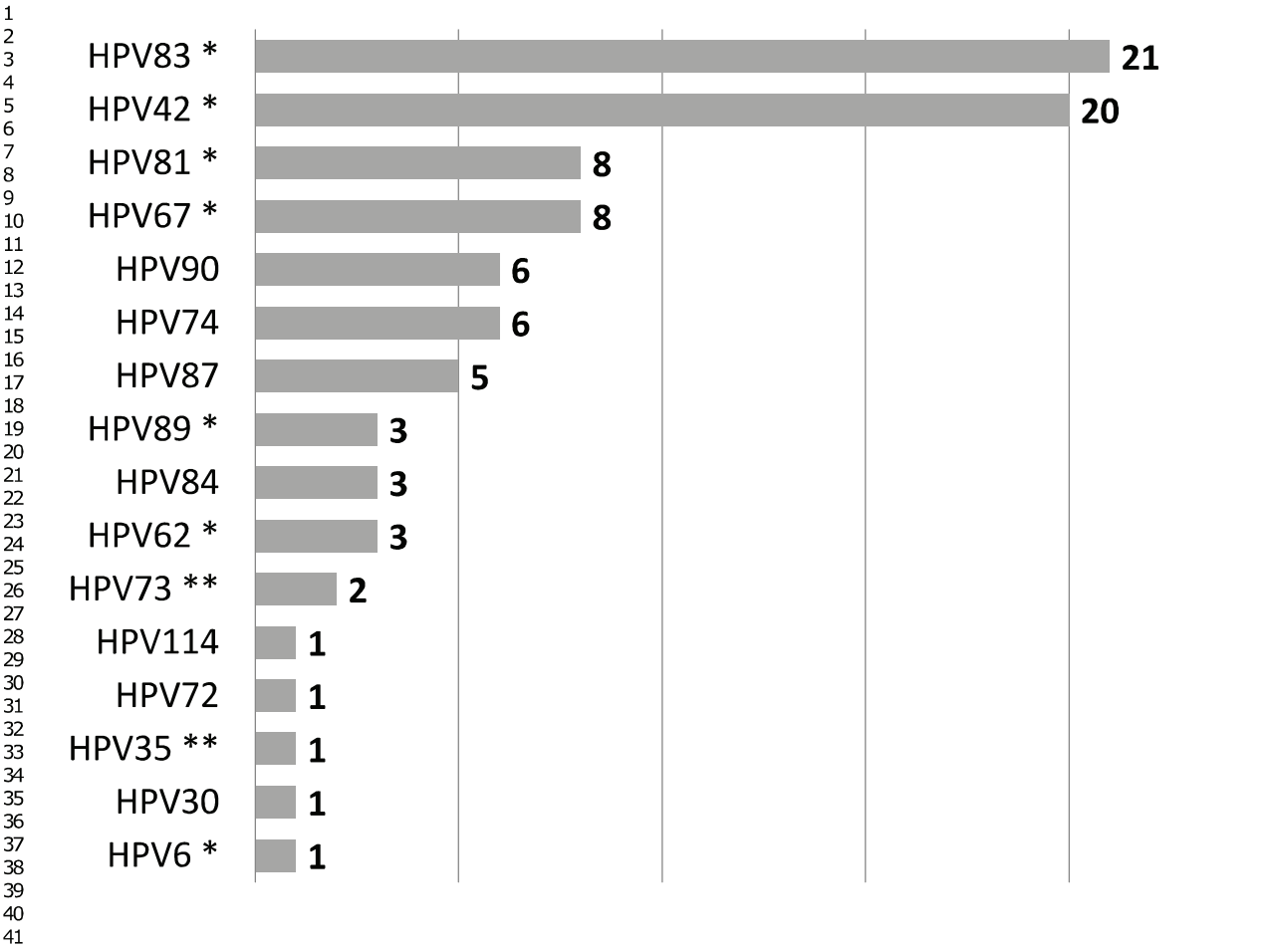


Figure 3

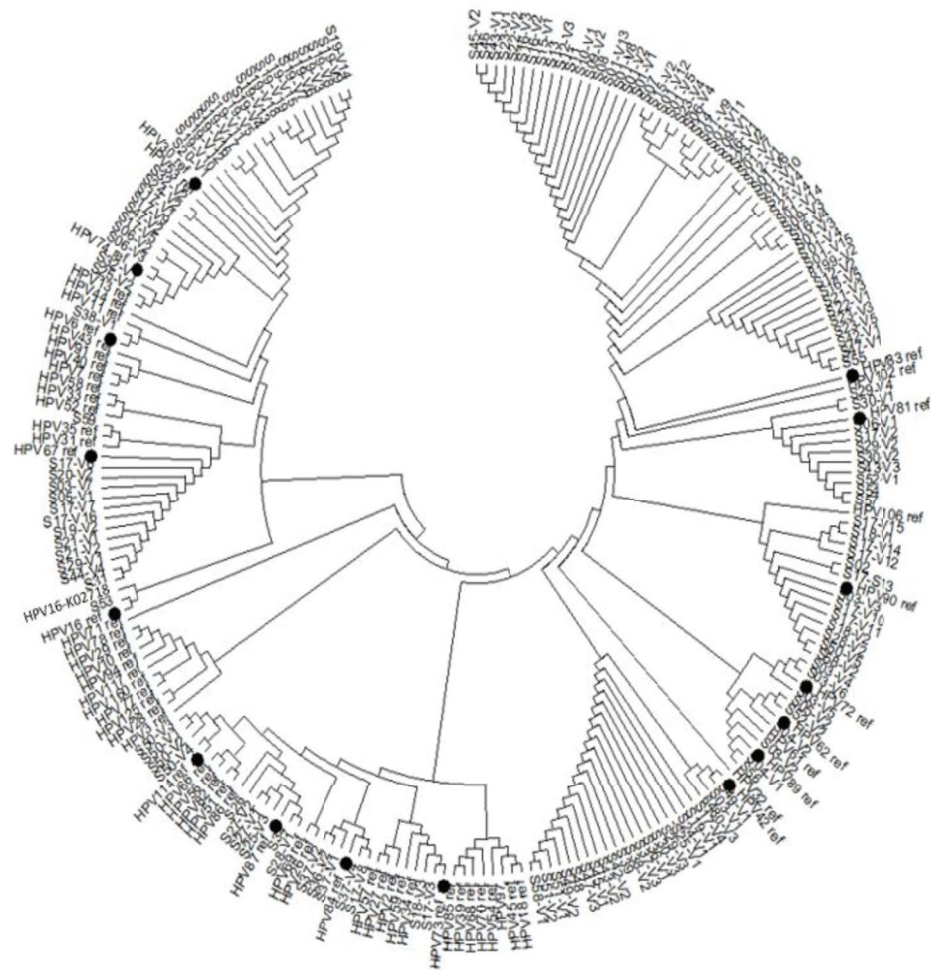


Figure 4

A

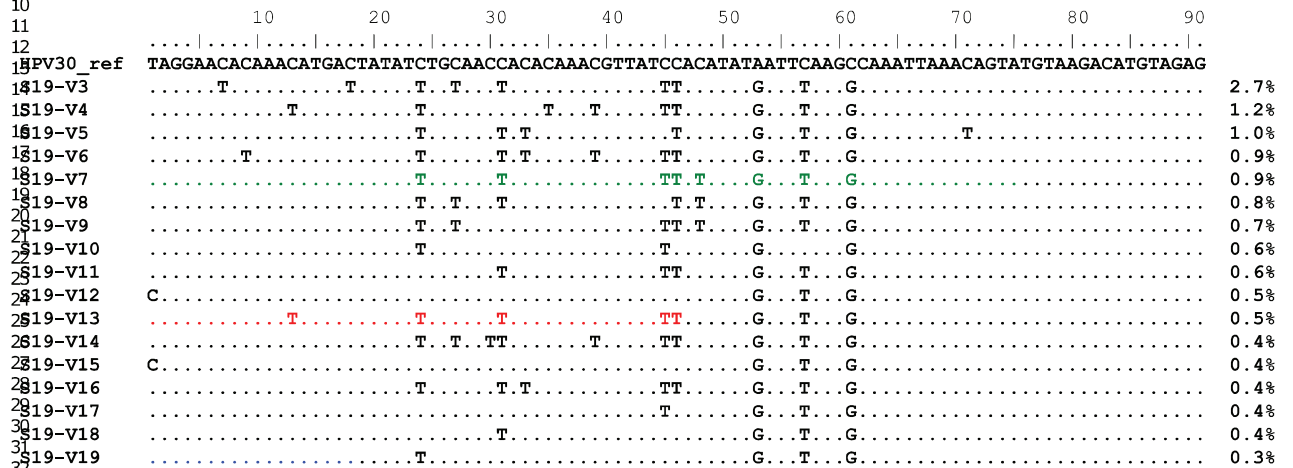


Figure 4

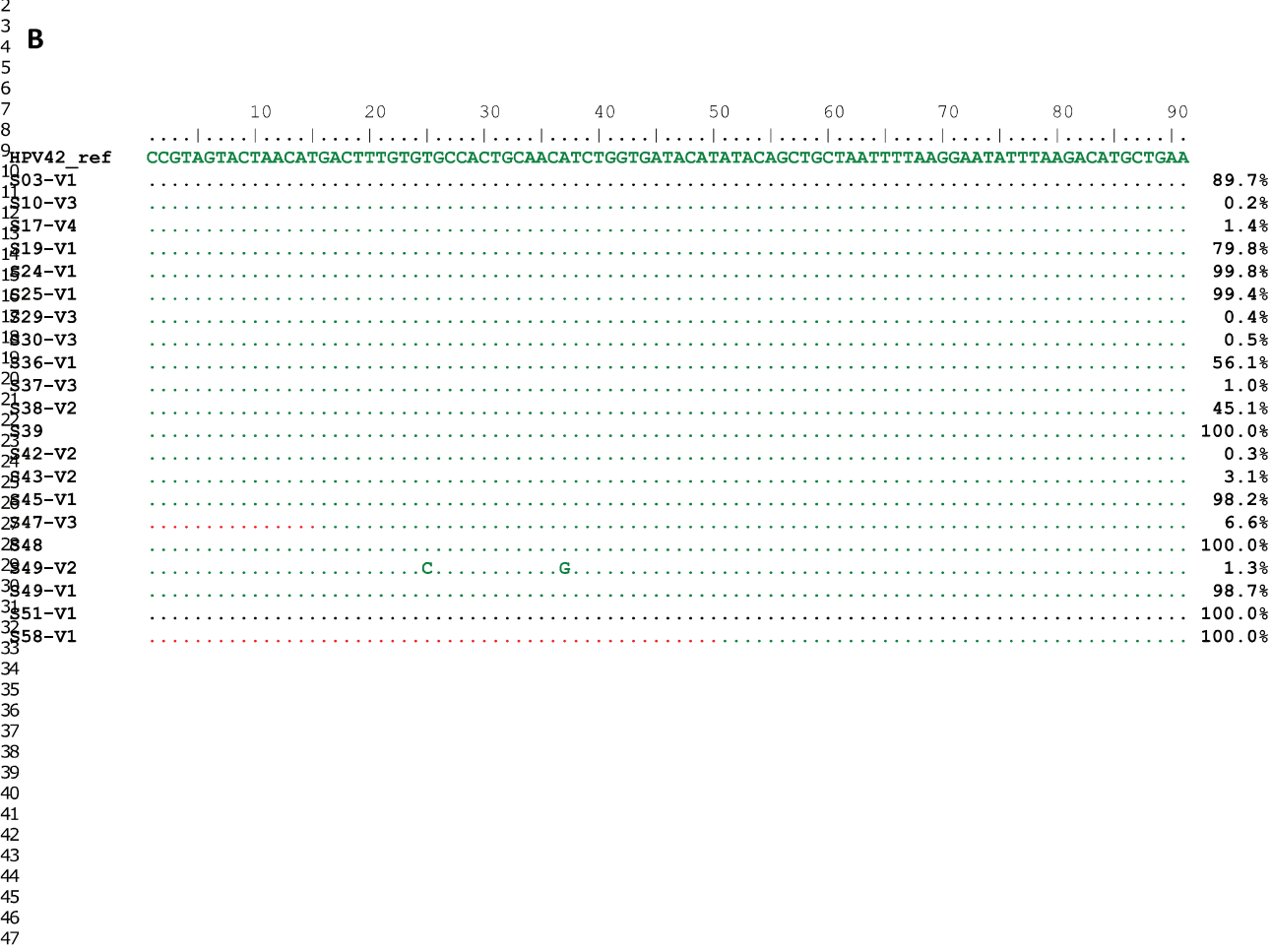


Figure 1. Flowchart of the NGS data analysis procedure

Figure 2. HPV types detected in the clinical samples

HPV types are classified according to the number of detections among 54 cervical samples.

*HPV probes included in the INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* strips

**HR-HPV or pHR-HPV

Figure 3. Phylogenetic analysis of L1 variants

Phylogenetic analysis was performed using the maximum likelihood method based on the Tamura-

Nei model, which allows the classification of each OTU sequence in the HPV type clusters. ref:

reference sequence of each distinct cluster downloaded from the HPV episteme database (PaVE)

(<https://pave.niaid.nih.gov/>, accessed on 01-11-2017)

Figure 4. Multiple alignment of L1 variant sequences

(A) A total of 17 OTUs (HPV30-V3 to HPV30-V19) clustering with the HPV30 reference sequence

(HPV30_ref) were isolated by HTS in sample S19.

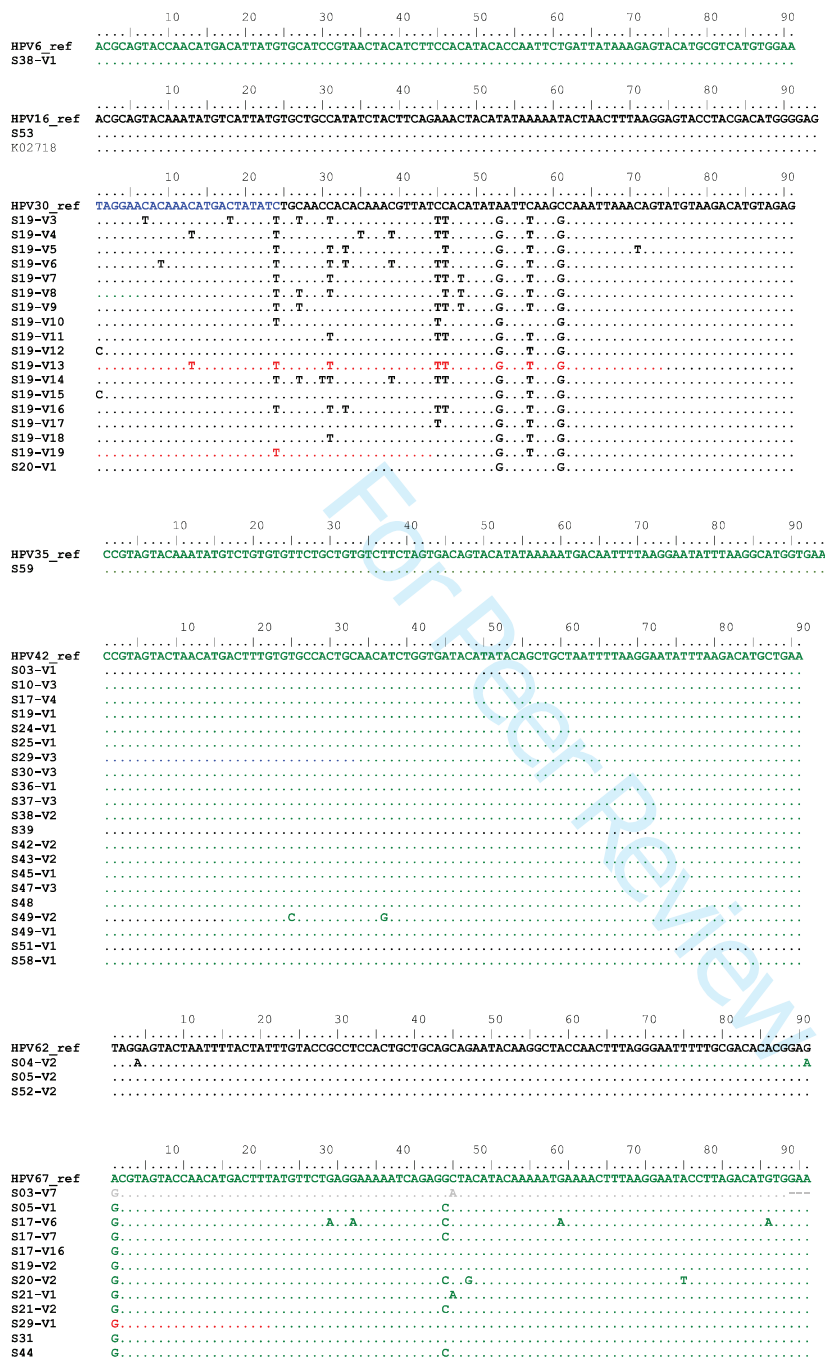
(B) Twenty-one OTUs clustering with the HPV42 reference sequence (HPV42_ref) were isolated in a

total of 20 different specimens. Sample 49 (S49) contains one minority variant (S42-V2) that accounts

for 1.3% of the total reads.

The percentages to the right of each line correspond to the respective relative abundances of individual OTUs.

Figure S1. Alignment of individual OTU sequences to the HPV cluster reference genome



1		10	20	30	40	50	60	70	80	90
2	HPV72_ref	TCGCAGTACTAATGTAACATTTGTACTGGCCACAGGTCCTCTGTATCAGAATATACAGCTTCTAATTTTCGTAGATATCTTCCACACTGAG								
3	S03-V4
4	S03-V5	C.....
5	S03-V6
6		10	20	30	40	50	60	70	80	90
7	HPV73_ref	TAGAAGCACTAATTTTCTGTATGTGTAGGTACACAGGCTAGTAGCTCTACTACAACGTATGCCAATCTAATTTTAAGGAATATTTAAGACATGCAGAA								
8	S17-V3
9	S18-V3
10		10	20	30	40	50	60	70	80	90
11	HPV74_ref	ACGTAGTACTAATGACAGTGTGTGCGCTACACAAATCCCTCTGCTGCTACATATAGTACAGACTACAACAATACATGAGACATGTTGGAG								
12	S06-V2
13	S06-V3
14	S17-V1	C.....
15	S17-V5
16	S17-V9	C.....
17	S24-V2	C.....
18	S25-V2
19	S32-V1
20	S32-V2	C.....
21	S47-V2
22		10	20	30	40	50	60	70	80	90
23	HPV81_ref	CAGAAGCACAATTTTACTATTTCACAGCTACATCTGCTGCTGAGAATACAGGCTCTAATTTTAAGGAATTTCTGCGCCATACAGAG								
24	S06-V1
25	S17-V2
26	S29-V2
27	S29-V5
28	S30-V1
29	S30-V2
30	S43-V3
31	S52-V1
32	S54
33	S57
34		10	20	30	40	50	60	70	80	90
35	HPV83_ref	COGCAGTACCAATATTACTATTTCAGCTGCTGCTACACAGGCTAATGAATACACAGCCCTTAACTTTAAGGAATACCTCGCCACACAGAG								
36	S01-V1
37	S01-V2
38	S01-V3
39	S01-V4
40	S01-V5
41	S01-V6
42	S01-V7
43	S01-V8
44	S01-V9
45	S01-V10
46	S01-V11
47	S01-V12
48	S01-V13
49	S01-V14
50	S01-V15
51	S06-V4
52	S07
53	S08
54	S09-V1
55	S09-V2
56	S09-V3
57	S10-V1
58	S10-V2
59	S11
60	S12-V1
61	S12-V2
62	S12-V3
63	S12-V4
64	S13
65	S14
66	S15-V1
67	S15-V2
68	S16-V1
69	S16-V2
70	S16-V3
71	S16-V4
72	S16-V5
73	S21-V3
74	S21-V4
75	S22-V1
76	S22-V2
77	S23-V1
78	S23-V2
79	S23-V3
80	S23-V4
81	S23-V5
82	S42-V1
83	S43-V1
84	S45-V2
85	S46
86	S47-V1
87	S55

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HPV84_ref	CCGCAGCACCAATTTTACTATTAGTGTGCTACCAACACCGAATCAGAATATAAACCTACCAATTTTAAGGAATACCTAAGACATGTGGAG								
S17-V8C.....								
S36-V2C.....G.....T.....								
S37-V1G.....C.....G.....								
S37-V2C.....T.....T.....								
S37-V4C.....								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HPV87_ref	TCGCAGTACCAATTTTACTATTAGTGTGCCACTCAAACAACCACTGAATATGACCCCAAAAGTTTAAGGAATATTTAAGGCATGTGGAG								
S25-V3	C.....C.....G.....								
S26	C.....C.....G.....								
S27-V1	C.....G.....C.....								
S27-V2	C.....C.....G.....								
S28-V1C.....								
S34C.....								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HPV89_ref	CCGTAGTACCAACCTTACCATTGTGTGCTTCCAGCTGTGGCAGAGATACAGTTCTACAGCTTTAAGGAATATTTAAGACACACTGAG								
S03-V2C.....								
S04-V1								
S56C.....								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HPV90_ref	ACGTAGCACCAATATGACTATTTGTGCCACACAACCCCTCTGACACATACAAGGCTTCCAATTTTAAGAGTACATGCCCATGGCGAG								
S02G.....G.....								
S03-V3G.....								
S17-V10A.....								
S17-V11G.....								
S17-V12	C.....G.....								
S17-V13G.....G.....G.....								
S17-V14	C.....G.....G.....								
S17-V15	C.....G.....								
S18-V1	C.....G.....								
S18-V2								
S28-V2								
S50-V5								
S58-V2								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
HPV114_ref	TAGAAGTACCAATTTTACTATTAGTGTGCTGCTACCCAGGCCTCCGCTACCCAGGCCTCCACGGAATATAAGTCTACTAATTTTAAGGAATATCTTAGGCATGTGGAG								
S50-V1A.A.....A.....								
S50-V2A.A.....A.....								
S50-V3A.A.....A.....								
S50-V4A.A.....A.....								

Table S1: Trimming of Illumina reads

The four samples S33, S35, S40 and S41 highlighted in grey correspond to negative samples for which HTS failed to generate more than 5,000 reads

Sample	Total reads	Total reads average length (bp)	Trimmed reads	HPV mapped reads	Percentage of mapped reads	Mapped reads average length (bp)
S1	655868	117.6	447904	341414	76.22	138.9
S2	870388	98.6	387776	290256	74.85	138.9
S3	621530	98.4	268846	176161	65.52	138.9
S4	507536	91.6	154924	97757	63.10	147.4
S5	368466	135.9	348656	303157	86.95	138.9
S6	448526	134.9	411616	375752	91.29	138.8
S7	573944	126.2	465538	419585	90.13	138.9
S8	815426	87.6	235144	128631	54.70	138.9
S9	534040	125.6	106512	353333	331.73	142.0
S10	932288	97.5	390186	294346	75.44	138.9
S11	590438	84.8	129102	73724	57.11	138.9
S12	487602	115.5	305942	199245	65.13	144.7
S13	672160	104.4	337720	252990	74.91	138.9
S14	185764	118.3	128808	105807	82.14	138.9
S15	558918	96.7	220492	172081	78.04	138.9
S16	617794	100	266506	156990	58.91	142.8
S17	717756	117.3	488824	381931	78.13	138.9
S18	715088	129.4	612904	555693	90.67	138.8
S19	628878	103.5	306528	215958	70.45	138.8
S20	583176	88	161874	86423	53.39	139
S21	489614	138	476798	412078	86.43	138.9
S22	527166	101.6	239918	192677	80.31	138.9
S23	558500	138.7	551176	506672	91.93	138.9
S24	441930	135.1	412924	370630	89.76	138.9
S25	427300	138.8	422246	387194	91.70	138.9
S26	570842	124.9	453712	398152	87.75	138.9
S27	839846	77.8	93102	5911	6.35	138.6
S28	517046	138.1	505126	448701	88.83	138.9
S29	615340	99.3	261444	212668	81.34	138.9
S30	595092	98.9	225290	163727	72.67	146.3
S31	797186	78.2	116528	49413	42.40	138.9
S32	505132	92.5	152958	102272	66.86	147.6
S33	891674	77.6	112870	2468	2.19	140
S34	670644	83.7	137418	72371	52.66	138.9
S35	767094	77.2	94860	3634	3.83	140.5
S36	697698	83.5	136416	89512	65.62	138.9
S37	875662	83.2	151794	70738	46.60	149.9
S38	588424	84.7	137250	71625	52.19	138.9
S39	592124	97.4	231920	179317	77.32	138.9
S40	562448	78.4	73560	2986	4.06	137.5
S41	771424	77.2	103832	4276	4.12	139.6

1							
2							
3	S42	658762	125.5	522252	449063	85.99	138.9
4	S43	608384	83.9	120682	59663	49.44	138.9
5	S44	412622	79.6	59284	24636	41.56	138.9
6	S45	590746	84.1	139982	44830	32.03	139
7	S46	486456	83.5	95510	34549	36.17	138.9
8	S47	269672	134	236088	124862	52.89	139.2
9	S48	808594	85.1	175434	112936	64.38	138.9
10	S49	866546	82.6	190468	85538	44.91	138.9
11	S50	480482	126.6	390810	350593	89.71	138.9
12	S51	797458	97.4	312046	183633	58.85	138.9
13	S52	71 940	146.9	70 360	67 051	93.3	139.53
14	S53	72 740	147.2	72 020	68912	95.68	139.59
15	S54	66 374	147.6	65234	62008	95.05	39.28
16	S55	129 998	126.8	86690	80309	92.64	139.85
17	S56	70 086	147	69342	66237	95.52	139.33
18	S57	46 824	150.7	45950	43717	95.14	142.75
19	S58	52 253	132.7	41378	38519	93.54	139.36
20	S59	59 343	152.8	59022	55212	91.62	142.9
21	S60	338 296	143	329966	302302	91.62	142.4
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							
57							
58							
59							
60							

Table S2: Percentage of each OTU read per sample

Sample	OTU	HPV Cluster	Relative abundance (OTU reads/total reads per sample)	Nucleotide divergence per 100pb (%)
S01	S01-V1	83	87.1%	3.3%
S01	S01-V2	83	4.6%	2.2%
S01	S01-V3	83	1.5%	3.3%
S01	S01-V4	83	1.1%	3.3%
S01	S01-V5	83	0.8%	3.3%
S01	S01-V6	83	0.8%	3.3%
S01	S01-V7	83	0.6%	3.3%
S01	S01-V8	83	0.6%	3.3%
S01	S01-V9	83	0.5%	3.3%
S01	S01-V10	83	0.5%	3.3%
S01	S01-V11	83	0.5%	3.3%
S01	S01-V12	83	0.4%	3.3%
S01	S01-V13	83	0.4%	3.3%
S01	S01-V14	83	0.3%	3.3%
S01	S01-V15	83	0.3%	1.1%
S02	S02	90	100%	2.2%
S03	S03-V1	42	89.7%	0.0%
S03	S03-V2	89	3.4%	1.1%
S03	S03-V3	90	2.0%	0.0%
S03	S03-V4	72	1.8%	1.1%
S03	S03-V5	72	1.7%	3.2%
S03	S03-V6	72	0.9%	1.1%
S03	S03-V7	67	0.6%	2.2%
S04	S04-V1	89	97.9%	0.0%
S04	S04-V2	62	2.1%	2.2%
S05	S05-V1	67	87.2%	2.2%
S05	S05-V2	62	12.8%	0.0%
S06	S06-V1	81	84.6%	0.0%
S06	S06-V2	74	14.6%	5.0%
S06	S06-V3	74	0.7%	0.0%
S06	S06-V4	83	0.2%	3.3%
S07	S07	83	100%	3.3%
S08	S08	83	100%	3.3%
S09	S09-V1	83	99.6%	3.3%
S09	S09-V2	83	0.2%	3.3%
S09	S09-V3	83	0.2%	3.3%
S10	S10-V1	83	99.5%	2.2%
S10	S10-V2	83	0.3%	1.1%
S10	S10-V3	42	0.2%	0.0%
S11	S11	83	100%	3.3%
S12	S12-V1	83	98.7%	3.3%
S12	S12-V2	83	0.7%	3.3%
S12	S12-V3	83	0.3%	2.2%
S12	S12-V4	83	0.3%	3.3%
S13	S13	83	100%	3.3%
S14	S14	83	100%	3.3%
S15	S15-V1	83	99.1%	2.2%
S15	S15-V2	83	0.9%	3.3%
S16	S16-V1	83	62.6%	3.3%
S16	S16-V2	83	31.8%	3.3%
S16	S16-V3	83	4.2%	2.2%
S16	S16-V4	83	0.7%	3.3%

1					
2					
3	S16	S16-V5	83	0.6%	1.1%
4	S17	S17-V1	74	86.8%	6.0%
5	S17	S17-V2	81	3.2%	0.0%
6	S17	S17-V3	73	1.5%	0.0%
7	S17	S17-V4	42	1.4%	0.0%
8	S17	S17-V5	74	1.6%	5.0%
9	S17	S17-V6	67	0.7%	6.6%
10	S17	S17-V7	67	0.7%	2.2%
11	S17	S17-V8	84	0.5%	1.1%
12	S17	S17-V9	74	0.5%	6.0%
13	S17	S17-V10	90	0.7%	0.0%
14	S17	S17-V11	90	0.4%	2.2%
15	S17	S17-V12	90	0.4%	2.2%
16	S17	S17-V13	90	0.6%	2.2%
17	S17	S17-V14	90	0.3%	2.2%
18	S17	S17-V15	90	0.5%	2.2%
19	S17	S17-V16	67	0.2%	1.1%
20	S18	S18-V1	90	99.7%	2.2%
21	S18	S18-V2	90	0.2%	0.0%
22	S18	S18-V3	73	0.1%	2.0%
23	S19	S19-V1	42	79.8%	0.0%
24	S19	S19-V2	67	7.7%	1.1%
25	S19	S19-V3	30	2.7%	11.0%
26	S19	S19-V4	30	1.2%	9.9%
27	S19	S19-V5	30	1.0%	8.8%
28	S19	S19-V6	30	0.9%	11.0%
29	S19	S19-V7	30	0.9%	8.8%
30	S19	S19-V8	30	0.8%	8.8%
31	S19	S19-V9	30	0.7%	8.8%
32	S19	S19-V10	30	0.6%	4.4%
33	S19	S19-V11	30	0.6%	6.6%
34	S19	S19-V12	30	0.5%	4.4%
35	S19	S19-V13	30	0.5%	8.8%
36	S19	S19-V14	30	0.4%	11.0%
37	S19	S19-V15	30	0.4%	4.4%
38	S19	S19-V16	30	0.4%	8.8%
39	S19	S19-V17	30	0.4%	4.4%
40	S19	S19-V18	30	0.4%	4.4%
41	S19	S19-V19	30	0.3%	4.4%
42	S20	S20-V1	67	96.6%	2.2%
43	S20	S20-V2	67	3.4%	4.4%
44	S21	S21-V1	83	99.0%	2.2%
45	S21	S21-V2	83	0.4%	2.2%
46	S21	S21-V3	83	0.3%	3.3%
47	S21	S21-V4	83	0.2%	2.2%
48	S22	S22-V1	83	99.7%	3.3%
49	S22	S22-V2	83	0.3%	3.3%
50	S23	S23-V1	83	94.6%	2.2%
51	S23	S23-V2	83	0.5%	3.3%
52	S23	S23-V4	83	0.1%	3.3%
53	S23	S23-V5	83	0.1%	3.3%
54	S23	S23-V6	83	0.1%	2.2%
55	S24	S24-V1	42	99.8%	0.0%
56	S24	S24-V2	74	0.2%	2.0%
57	S25	S25-V1	42	99.4%	0.0%
58	S25	S25-V2	74	0.5%	0.0%
59	S25	S25-V3	87	0.2%	3.3%
60	S26	S26	87	99.4%	3.3%
	S27	S27-V1	87	0.3%	3.3%

1					
2					
3	S27	S27-V2	87	0.3%	3.3%
4	S28	S28-V1	87	99.7%	1.1%
5	S28	S28-V2	90	0.3%	0.0%
6	S29	S29-V1	67	98.5%	1.1%
7	S29	S29-V2	81	0.8%	0.0%
8	S29	S29-V3	42	0.4%	0.0%
9	S29	S29-V4	81	0.3%	0.0%
10	S30	S30-V1	81	85.1%	2.2%
11	S30	S30-V2	81	14.3%	0.0%
12	S30	S30-V3	42	0.5%	0.0%
13	S31	S31	67	100%	1.1%
14	S32	S32-V1	74	97.4%	1.0%
15	S32	S32-V2	74	2.6%	2.0%
16	S34	S34	87	100%	1.1%
17	S36	S36-V1	42	56.1%	0.0%
18	S36	S36-V2	84	43.9%	3.3%
19	S37	S37-V1	84	56.3%	3.3%
20	S37	S37-V2	84	3.5%	3.3%
21	S37	S37-V3	42	1.0%	0.0%
22	S37	S37-V4	84	0.7%	1.1%
23	S38	S38-V1	6	54.9%	0.0%
24	S38	S38-V2	42	45.1%	0.0%
25	S39	S39	42	100%	0.0%
26	S42	S42-V1	83	99.7%	2.2%
27	S42	S42-V2	42	0.3%	0.0%
28	S43	S43-V1	83	95.0%	2.2%
29	S43	S43-V2	42	3.1%	0.0%
30	S43	S43-V3	81	1.9%	0.0%
31	S44	S44	67	100%	2.2%
32	S45	S45-V1	42	98.2%	0.0%
33	S45	S45-V2	83	1.8%	2.2%
34	S46	S46	83	100%	2.2%
35	S47	S47-V1	83	86.3%	1.1%
36	S47	S47-V2	74	7.1%	5.0%
37	S47	S47-V3	42	6.6%	0.0%
38	S48	S48	42	100%	0.0%
39	S49	S49-V1	42	98.7%	0.0%
40	S49	S49-V2	42	1.3%	2.2%
41	S50	S50-V1	114	98.5%	2.8%
42	S50	S50-V2	114	0.8%	1.9%
43	S50	S50-V3	114	0.3%	4.7%
44	S50	S50-V4	114	0.2%	0.0%
45	S50	S50-V5	114	0.2%	0.0%
46	S51	S51	42	100.0%	0.0%
47	S52	S52-V1	81	97.9%	0.0%
48	S52	S52-V2	62	2.1%	0.0%
49	S53	S53	16	100%	0.0%
50	S54	S54	81	100%	0.0%
51	S55	S55	83	100%	1.1%
52	S56	S56	89	100%	1.1%
53	S57	S57	81	100%	0.0%
54	S58	S58-V1	42	89.6%	0.0%
55	S58	S58-V2	90	10.4%	0.0%
56	S59	S59	35	100%	0.0%
57	HPV16-K02718	HPV16-K02718	16	100%	0.0%
58					
59					
60					

Etude N°2

Identification des papillomavirus humains impliqués dans les papillomatoses
diffuses d'un patient atteint de syndrome WHIM au cours d'un traitement par
AMD3100 un antagoniste de CXCR4

Lucie Molet, Delphine Girlich, Rémy A Bonnin, Carmen Gallego, Proust Alexis, Bouligand Jérôme,
Bachelerie Françoise, Deback Claire

(Ce travail fera l'objet d'une prochaine soumission, en association avec les études immuno-hématologiques réalisées dans notre laboratoire chez le patient au cours du traitement par AMD310)

Préambule

Il existe une prévalence importante et sélective d'infections persistantes à HPV et des cancers associés chez les patients souffrant de certaines immunodéficiences. Cette spécificité souligne l'existence de facteurs spécifiques présents au niveau de la cellule hôte (i.e. kératinocytes, cellules souches, cellules de jonction..), favorisant l'infection par HPV, au-delà de l'immunodéficit lui-même. Cette sensibilité particulière aux infections par HPV est retrouvée dans des immunodéficits congénitaux tels que l'Epidermodysplasie verruciforme ou le syndrome WHIM.

Le syndrome WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis) est un déficit congénital rare dont l'incidence a été estimée à 0.23 cas par million de naissance. Une panleucopénie profonde caractérise les patients et affecte les lymphocytes B, T, NK, et les cellules myéloïdes incluant les neutrophiles. La neutropénie est accompagnée d'une hypercellularité de la moelle osseuse associée à une accumulation de neutrophiles sénescents spécifique de la myelokathexie. Comme conséquence de la panleucopénie, le syndrome WHIM est caractérisé par des infections bactériennes communautaires apparaissant dès l'enfance, principalement au niveau pulmonaire et oro-pharyngé. Une majorité de patients souffrent d'infections graves HPV. Typiquement les verrues cutanées (verrues vulgaires et verrues planes) apparaissent dès l'enfance et sont localisées principalement sur les mains et les pieds. Les verrues génitales et condylomes apparaissent plus tard chez le jeune adulte sexuellement actif. Contrairement aux verrues cutanées, les verrues du tractus génital et oro-pharyngé peuvent progresser vers la cancérisation.

La prise en charge médicale des patients atteints de syndrome WHIM n'est pas standardisée mais comprend généralement l'administration au long cours de G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) et d'immunoglobulines intraveineuses, des antibiotiques à large spectre. Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de molécules antivirales (cidofovir, interféron) ou immunomodulatrices (Imiquimod) ayant démontré une efficacité probante dans le traitement des verrues chez ces patients. Seules l'exérèse

chirurgicale et les cryothérapies itératives apportent un bénéfice transitoire. Le plérixafor (AMD3100) a été utilisé chez un patient atteint de syndrome WHIM afin de corriger la leucopénie et réduire les lésions dermatologiques. Dans un modèle de culture 3D, l'AMD3100 en bloquant le gain de fonction a permis d'inverser le processus de transformation et de rétablir l'expression séquentielle des protéines virales du cycle lytique. Un effet thérapeutique potentiel de l'AMD3100 sur le développement des verrues cutanées est supposé lorsque la molécule est associée à l'imiquimod. En considérant que l'interaction entre le déroulement du cycle viral HPV et l'axe CXCL12/CXCR4 dans les kératinocytes est l'élément médiateur direct des symptômes observés dans le syndrome WHIM, l'effet bénéfique de l'AMD3100 doit intervenir sur les autres composantes contrôlées par l'axe CXCL12/CXCR4 et notamment la prolifération des kératinocytes infectés au niveau de la peau.

Ce travail s'inscrit dans une étude globale des modifications virologiques et immuno-hématologiques d'un patient atteint de syndrome WHIM au cours d'un essai thérapeutique par l'AMD3100.

Au niveau virologique, les objectifs majeurs de cette étude étaient les suivants: (1) utiliser une technique de séquençage haut débit pour identifier les génotypes HPV retrouvés à la surface de la peau et composant le virome cutané, (2) quantifier les génotypes HPV identifiés par qPCR afin de caractériser les modifications éventuelles du virome au cours du traitement par AMD3100.

Pour cette étude nous avons mis au point une méthodologie originale consistant en l'amplification de la région *L1* à l'aide d'amorces dédiées à la détection d'HPV muqueux (MY09/08) et cutanés (FAP60/64) puis le séquençage des amplimères sur Illumina Miseq®.

Le séquençage haut débit nous a permis d'identifier les génotypes HPV présents à la surface de la peau et dans les biopsies profondes de lésions cutanées, et constituant le virome HPV du patient. Les PCR en temps réel nous ont ensuite permis de quantifier les différents génotypes identifiés dans les prélèvements. Nous n'avons pas observé de modification qualitative du virome HPV sous AMD3100 mais des modifications dans les proportions relatives de ces génomes viraux suggérant la sélection de

certain types viraux. L'étude du virome au cours de l'administration d'ADM3100 a permis d'observer des modifications de la dynamique des HPV cutanés et d'identifier la sélection d'un variant pathologique.

Identification des papillomavirus humains impliqués dans les papillomatoses diffuses d'un patient atteint de syndrome WHIM au cours d'un traitement par AMD3100 un antagoniste de CXCR4

Introduction

Les papillomavirus humains (HPV) comptent à ce jour plus de 200 génotypes répertoriés en cinq genres alpha-, bêta-, gamma-, mu- et nu-HPV.^{1,2} Leur génome circulaire d'environ 8 kpb dont la structure et l'organisation sont conservés parmi les HPV comprend une région régulatrice LCR (*long control région*), six gènes codant les protéines non-structurales E1, E2, E4, E5, E6 et E7 impliquées dans la réplication virale et deux gènes *L1* et *L2*, codant respectivement les protéines majeure et mineure de la capside. La taxonomie des HPV est fondée sur la phylogénie construite à partir de la séquence génétique de *L1*. Les HPV sont doués d'un tropisme sélectif pour les kératinocytes. Selon le schéma admis, les HPV infectent les kératinocytes de la couche basale de l'épithélium malpighien de la peau ou des muqueuses. Le cycle réplicatif viral est lié au programme de différenciation cellulaire.³ Celui-ci s'effectue lors de la migration des kératinocytes vers la surface de l'épiderme jusqu'à la desquamation de la couche cornée.⁴ Considérés à la fois comme symbiotes et pathobiotes, la complexité de la pathogénie liée aux HPV, strictement humains, reste difficile à explorer dans un contexte de relation hôte-pathogène très ancienne dont l'équilibre s'est constitué au fil de l'évolution des hominidés.⁵ Les HPV appartenant principalement aux genres bêta et gamma constituent une part significative du virome normal, persistant et silencieux, de la peau et des muqueuses.^{6,7} En pratique médicale, les HPV à bas risque (BR) oncogènes sont connus pour être responsables d'infections le plus souvent bénignes

de la peau et des muqueuses, parmi lesquelles des verrues cutanées - impliquant en majorité des bêta- ou des gamma-HPV - et des condylomes impliquant des alpha-BR-HPV. A l'opposé, les alpha-HPV16, alpha-HPV18 et apparentés à haut-risque (HR) oncogène sont à l'origine de cancers ano-génitaux et des voies aéro-digestives supérieures et certains bêta-HPV (HPV5, HPV8, HPV20, HPV17 et HPV38) sont désormais classés parmi les agents possiblement carcinogènes pour l'homme, responsables en association avec l'exposition aux ultra-violets, et ce plus volontiers au cours de déficit du système immunitaire cellulaire, de kératoses actiniques et de certains carcinomes épidermoïdes de la peau.^{4,8,9}

Le syndrome WHIM est un immunodéficit primaire rare défini par son acronyme : verrues (Warts) hypogammaglobulinémie, infections bactériennes récurrentes, et myélodysplasie - une forme de neutropénie rare où les polynucléaires neutrophiles sénescents sont retenus dans la moelle osseuse. Depuis sa description pour la première fois par Zuelzer en 1964, 90 cas de WHIM ont été rapportés dans le monde.¹⁰ En 2003, ce syndrome a été associé à des mutations autosomiques dominantes du récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*), récepteur de la chimiokine CXCL12, un récepteur couplé aux protéines G.¹¹ Les mutations décrites au cours du syndrome WHIM entraînent un gain de fonction par altération du processus normal de désensibilisation du récepteur après la liaison avec son ligand.¹² Un modèle murin de syndrome WHIM a apporté la démonstration du rôle étiologique des dysfonctions de CXCR4 dans la pan-leucopénie caractéristique de la maladie, lesquelles provoquent des anomalies de développement, de localisation et de migration des cellules lymphoïdes et myéloïdes.¹³ Un rôle de ces cellules dans le contrôle de l'infection à HPV a été également étayé par l'observation en 2015 de la rémission spontanée d'une patiente atteinte de WHIM suite une chromothripsis - un accident rare de délétion génique massive - dans une lignée myéloïde, la délétion d'une grande portion du chromosome 2 ayant emporté le gène CXCR4 muté parmi 163 autres gènes avoisinant.¹⁴

L'expression de CXCL12 et de son récepteur CXCR4 n'est pas restreinte aux cellules hématopoïétiques et participe à la régulation de l'adhérence, la chimiotaxie, la survie et la prolifération

de nombreux types cellulaires, y compris les kératinocytes.¹⁵ Environ 70 % des patients atteints de syndrome WHIM connaissent le développement de verrues cutanées étendues et de papillomes anogénitaux qui évoluent en cancer.¹⁶ Cette susceptibilité sélective aux infections par HPV a fait suspecter un lien entre l'axe CXCR4/CXCL12 et la pathogénie virale au sein même des kératinocytes, ce qu'ont confirmé les travaux menés par l'équipe de F. Bachelier en démontrant que CXCL12 et ses récepteurs étaient surexprimés sous la dépendance de l'expression des oncoprotéines E6 et E7 exerçant une activation autocrine de l'axe de signalisation dans des kératinocytes immortalisés par.¹⁷ Dans le contexte du WHIM, l'expression d'un récepteur CXCR4 portant une mutation gain de fonction favorise dans des kératinocytes différenciés la stabilisation des oncoprotéines E6 et E7 d'HPV18, et ce aux dépens de la réplication virale végétative, aboutissant à une altération de la prolifération des kératinocytes et de la mort cellulaire indicatifs d'un processus actif de carcinogenèse. L'ensemble de ces travaux montre que l'axe CXCL12/CXCR4 en régulant la prolifération des kératinocytes laquelle est étroitement liée à la réplication virale participe ainsi au contrôle intrinsèque du cycle biologique des HPV-HR et fonctionne dans les kératinocytes comme un pivot dans l'équilibre entre oncogenèse viro-induite et différenciation processive des cellules infectées.¹⁸

Il n'existe pas de traitement standardisé pour le syndrome WHIM, la prise en charge symptomatique des patients reposant sur une couverture par antibiotiques à large spectre et l'utilisation empirique d'immunoglobulines polyvalentes et de facteur de croissance de la lignée granulocytaire (G-CSF et GM-CSF) au long cours.^{16,19} Les traitements par interféron alpha ou bêta, cidofovir, imiquimod topique- un agoniste de Toll-Like récepteur (TLR)^{7,20}- sont globalement inefficaces sur le développement des verrues chez les patients WHIM ; seule l'exérèse chirurgicale apporte un effet suspensif mais transitoire.¹⁶ Au regard des études fonctionnelles, bloquer le gain de fonction du récepteur muté, notamment en utilisant un antagoniste sélectif de CXCR4, comme l'AMD3100, est apparu comme une stratégie rationnelle pour limiter les symptômes du syndrome WHIM.²¹ Parmi eux, l'AMD3100 - connu aussi sous le nom de plerixafor ou Mozobil® (Genzyme, France)

identifié dès 1997 parmi les inhibiteurs possibles de CXCR4 en tant que co-récepteur pour l'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4 a reçu grâce à la découverte de ses propriétés hématologiques une autorisation de mise sur le marché pour la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique avant leur collecte en vue d'une autogreffe chez les patients adultes atteints de lymphome ou de myélome multiple.²²⁻²⁴ Après injection, l'AMD3100 a pour effet significatif une augmentation du titre des lymphocytes mais aussi des polynucléaires neutrophiles et des monocytes dans le sang périphérique.^{25,26}

Au-delà de ses propriétés hématologiques, l'AMD3100 impacte aussi la pathogénie associée à HPV au sein des kératinocytes. En effet, Meuris et al. montre dans ses travaux menés dans le laboratoire que lors de la différenciation de kératinocytes dans des cultures organotypiques en trois dimensions, l'AMD3100 réduit l'expression des oncogènes E6 et E7 et promeut l'expression de E4 et L1 indicatifs d'une inversion du processus pro-oncogénique vers un cycle viral végétatif.¹⁸ Dans les modèles murins, l'administration d'AMD3100 permet de réduire le volume des tumeurs développées par xénogreffe de cellules HPV16 issues d'un cancer du col de l'utérus ou dans le contexte du WHIM par injection sous-cutanée de kératinocytes HK18-HR-HPV18 exprimant un récepteur CXCR4 porteur d'une mutation gain de fonction.¹⁷ Dans une étude pré-clinique sur son effet anti-HPV, Meuris et al. confirme que, chez la souris transgénique K14-HPV16, l'AMD3100 réduit la sévérité des lésions et le processus pro-inflammatoire adjacent.²⁷ Enfin, chez l'homme cette fois, dans un essai de phase I incluant trois patients WHIM, l'injection d'AMD3100 pendant 6 mois s'accompagne de l'amélioration des paramètres hématologiques et pour deux d'entre eux, avec l'application topique d'imiquimod, de la guérison de certaines verrues cutanées.²⁵

Les objectifs de cette étude étaient : (1) mettre au point une technique de séquençage à haut débit afin d'identifier les génotypes HPV à la surface de la peau saine et des verrues d'un patient atteint de syndrome WHIM, (2) par une approche quantitative de mesurer les éventuelles modifications

dynamiques des HPV impliqués dans la papillomatose au cours d'un essai de traitement par AMD3100 administré durant 7 mois.

Matériels et méthodes

1- Patient et histoire de la maladie

Le patient ayant participé à cette étude avec son consentement éclairé est un homme âgé de 28 ans. Il est le 4^{ème} enfant d'une famille de 4 enfants, sans antécédents familiaux d'infections ou d'immunodépression en particulier. Le diagnostic de la maladie a été porté sur un ensemble de symptômes apparus à l'âge de 5 ans, avec des verrues, des rhino-pharyngites à répétition et plusieurs infections bactériennes à type de mastoïdites. Sur le plan biologique, son tableau associe une neutropénie, une lymphopénie et une hypogammaglobulinémie. Un syndrome WHIM a été évoqué sur les arguments suivants : une myélokathexie sur la moelle osseuse,²⁸ des tests fonctionnels de l'axe CXCR4/CXCL12 montrant un profil compatible avec un syndrome WHIM, avec un gain de fonction de l'axe (travaux de K. Balabanian);^{12,29} sur le plan génétique, il ne présente cependant pas de mutation de *CXCR4* ni des gènes impliqués dans les neutropénies congénitales différentielles *GATA2*, *STK4/MST1*.¹⁶ L'AMD3100 (Laboratoire Sanofi Genzyme) obtenu à titre compassionnel a été administré par voie intraveineuse sous surveillance médicale (Dr J. Donnadieu, Service d'hématologie-immuno-oncologie pédiatrique; CHU Paris Est - Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau). La durée de traitement a été de 7 mois.

2- Recueil et préparation des échantillons cutanés

La surface des verrues et de la peau saine - à distance d'une lésion - a été écouvillonnée avec un geste appuyé à l'aide d'écouvillons stériles. Les écouvillons ont été déchargés sous agitation mécanique dans 300µL de milieu de transport pour virus (Virocult®). Trois biopsies profondes de verrues ont été réalisées en 2013 dans le cadre du soin (Dr Cuny, service de dermatologie, Nancy) à l'aide d'un punch à biopsie sous anesthésie locale et placées chacune dans un tube en polypropylène stérile avant d'être acheminées au laboratoire. Les biopsies et les suspensions ont été conservées à -80°C avant analyse. Les acides nucléiques totaux ont été extraits des différents échantillons à l'aide d'une plateforme *NucliSENS® easyMAG™* (bioMérieux®) au laboratoire de virologie de l'hôpital Paul Brousse (Villejuif), selon les recommandations du fournisseur. Les extraits ont été conservés à -20°C avant analyse.

3- Analyse qualitative du virome HPV : préparation des librairies et séquençage haut débit

a- Amplification du gène *L1*

Le gène *L1* des HPV a été amplifié à partir des d'acides nucléiques extraits des échantillons par PCR en utilisant les amorces FAP6085/64 (FAP6084 5'-CCW GAT CCH AAT MRR TTT GC-3' et FAP64 5'-CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC-3') et MY09/11 (MY09 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' et MY11 5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3' modifiées en 5' par une séquence-adaptateur nécessaire à la ligation des index et des adaptateurs Illumina® (séquence adaptateur sens: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-[amorce sens]-3' et séquence adaptateur anti-sens: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-[amorce anti-sens]-3'). Les amplifications ont été réalisées à l'aide de l'enzyme Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (ThermoFischer Scientific™). Le mélange réactionnel comprenait 0,5 µM ou 0,6 µM de chacune des amorces illuMY09/11 ou illuFAP6085/64 respectivement, 0,2 mM de chaque dNTP, 6mM de MgSO4 et 1U de Taq polymérase. Le protocole de

thermocyclage comprenait une étape d'activation à 95°C pendant 15 secondes, 40 cycles d'amplification à 94°C pendant 1 minute, 49°C ou 55°C pour les systèmes illuMY09/11 ou illuFAP6085/64 respectivement pendant 1 minute et 72°C pendant 1 minute, suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

b- Préparation des librairies

Une seconde PCR de 8 cycles d'amplification a ensuite été réalisée afin d'ajouter les adaptateurs de séquençage ainsi que les deux index Illumina aux extrémités des amplimères précédemment obtenus. Cette réaction de PCR a été réalisée à l'aide de l'enzyme Kappa KAPA HiFi HotStart Ur + ReadyMix (Roche diagnostics®). Les purifications des produits de PCR et des produits de PCR indexés ont été réalisées à l'aide du kit Agencourt Ampure XP beads (Beckman®). La qualité des amplimères indexés a été vérifiée avec sur le système 4200 Agilent TapeStation, puis ils ont été normalisés pour être mélangés à la même concentration avant séquençage sur Illumina MiSeq (Dr Bouligand J., Laboratoire de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpital Bicêtre). La librairie dénaturée (20pM) a été mélangée avec 5% de PhiX dénaturé correspondant à une librairie contrôle (Illumina). L'ensemble de la suspension a été ajusté à une concentration finale de 8pM à l'aide du réactif HT1 compris dans le kit Miseq v3 ; et séquencée à l'aide d'une cartouche Illumina Miseq 2 x 300 bp paired-end sequencing.

c- Analyse bio-informatique

Les données générées par le séquenceur Miseq ont été analysées à l'aide du logiciel *CLC Genomics Workbench software V10.0.1* (Qiagen). La qualité des *reads* (ou fragments de plusieurs bases) obtenus à partir des échantillons analysés a été contrôlée sur CLC et les *reads* présentant un score de qualité (QC) inférieur à 30 ou plus de deux nucléotides ambigus détectés ont été éliminés. Les

reads ont été regroupés en unités taxonomiques opérationnelles présentant 90% de similarité. La séquence représentative de chaque OTU a ensuite été identifiée par analyse Blast (BLASTN, NCBI). Enfin, les *reads* ont été réalignés par rapport aux séquences génomiques des HPV identifiées dans le but de déterminer le nombre de *reads* assimilé à chaque génotype.

4- Analyse quantitative du virome

Afin de confirmer la présence des génotypes et séquences putatives d'HPV détectés par NGS, des PCR en temps réel spécifiques de chaque génotype identifié ont été réalisées. Les amorces et les sondes ciblant des séquences situées dans le gène *L1* ou dans le gène *E6* ont été dessinées à l'aide du logiciel *Primer 3* web version 4.0.0 (Table 1). La réaction de PCR a été réalisée dans un volume total de 25µL de mélange réactionnel *Quantitect probe PCR master mix* (Qiagen), comprenant 0,2 µM de chaque amorce sens et anti-sens, 0,1 µM de sonde et 5µL d'extrait. Les PCR ont été réalisées selon les conditions suivantes : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 15 minutes, puis 50 cycles à 95°C pendant 15 seconds et 60°C pendant 1 minute. Les charges virales ont été déterminées pour chaque génotype à l'aide de gammes standard des plasmides de référence analysé mis à disposition par le Centre International de Référence des HPV (don de Dr Carina Eklund, Karolinska Institutet, Suède) ou à l'aide de fragments subgénomiques synthétisés de novo (Eurofins Genomics). Les charges virales ont été normalisées par rapport à la quantification par temps réel du gène humain *HPRT1* codant l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1, et les résultats exprimées en nombre de copies d'un type donné par cellule. Pour contrôler la spécificité des différentes PCR en temps réel mis au point, 10⁵ copies de chaque génotype ont été utilisés à la place de la séquence HPV ciblée. Ces essais n'ont pas permis d'obtenir de signal d'amplification génique au-delà du bruit de fond observé pour le témoin négatif.

Table 4 : Séquences et position des amorces et sondes utilisées pour réaliser les PCR en temps réel

HPV	GenBank	Nom*	Séquence (5'-3')	Position L1 (nt)
HPV15	X74468.1	L1_15_F	TCAGGTATTTTAGAAGACTGGCA	6921-6943
		L1_15_R	AGGACATTTAGTTGCCTTAGAGT	7022-7000
		L1_15_P	TTCCTACACCAGACAACGCT	6955-6974
HPV17	X74469.1	L1_17_F	AGGCTGTGTACCTTGATTGGA	6200-6221
		L1_17_R	TCACCATCTTCGATAACAGTGT	6322-6301
		L1_17_P	ATCAAACAGGCCTGTGTCCA	6265-6284
HPV23	U31781.1	L1_23_F	GGCCGAGGTCTTAACACAAA	6829-6848
		L1_23_R	GTGGCCTTTGAAGCCAAATA	6954-6935
		L1_23_P	TGGCAGTTAGGGTTTGTTC	6881-6900
HPV25	X74471.1	L1_25bis_F	GGTAGACAACACGCAACA	6926-6945
		L1_25bis_R	TCTGCCTTCAACGGTACTTT	7096-7077
		L1_25bis_P	TGGAACAGATGTTTCCAAATCAC	6974-6997
HPV38	U31787.1	L1_38b_F	GGCTTTGTACCYACCCAGA	6903-6922
		L1_38b_R	CACGTGTCTGTCTGTTTGT	7131-7112
		L1_38b_P	AAATGTCCAGATGCAGTGCC	6969-6988
HPV57	X55965.1	E6_57_F	TTCCCTTATGGAGCATGTGA	273-292
		E6_57_R	CTCCTTCTCCTCCCAACACA	449-430
		E6_57_P	GACCGAGACAGGAATACCCA	368-387
HPV107	EF422221.1	E6_107_F	AGGCCAAGGACAATCGTACA	301-320
		E6_107_R	ATGGTTGTTGTTGCAGCTGT	477-458
		E6_107_P	CCAGTGGAAGACTTACTGGT	343-362
HPV110	EU410348.1	L1_110_F	TGGTTGTGTGCCCTGTATGG	6152-6171
		L1_110_R	GGACATAAACCTAACTGATTACCTGCTT	6235-6208
		L1_110_P	AGCATTGGGACAAAGCTCCTGTTGTGAA	6175-6203
HPV111	EU410349.1	L1_111_F	GCAAGTCAAAATGTTTATAATAGGATGTG	6077-6105
		L1_111_R	GCTGGTTTCCTGCATCATCA	6165-6146
		L1_111_P	TATGGGAGAATACTGGGACAAAGCAAAACCT	6113-6144
HPV120	GQ845442.1	L1_120_F	CAAATCAATGCAATGAACTCTGA	6579-6601
		L1_120_R	GTGGCCTTTGAGGCTAAATA	6688-6669
		L1_120_P	TAGAGAATTGGCAATTGGGC	6607-6626
HPV124	GQ845446.1	L1_124_F	CAACACGCTGTCCAGAAAAA	6895-6914
		L1_124_R	CCTCTGGACACTGCACAAGA	7090-7071
		L1_124_P	TTTTTGTTTCAAGCAGGGCT	7023-7042
HPV134	GU117634.1	L1_134_F	TAGGTCCTCAGTGCCACTTG	5884-5903
		L1_134_R	TGCCTGAGTACCTTGACCAG	6109-6090
		L1_134_P	ACCAGAAATGGGGTTGTAGGT	6020-6040
		L1_151_F	ATTAGAAAATTGGCAATTGGGGT	6891-6913

HPV151	FN677756.1	L1_151_R	TGCATCAGGACATTTTGTAGCT	6990-6969
		L1_151_P	TGCTGTGCACGATACCTACA	6933-6952
FA32	AF217677.1	L1_FA32_F	TGCTTTGGTAGACACTGCTT	107-126
		L1_FA32_R	CTCAGCACCATCTCCAGGA	281-263
		L1_FA32_P	ATGGAAATAGGACGTGGGGG	171-190
FA89	AY081196.1	L1_FA89_F	CTACGAGTCACACTGCCAGA	69-88
		L1_FA89_R1	TAATGGGTTGCCAGTCGTTG	218-199
		L1_FA89_P	GTTGCGTGGTATGGAAGTGC	155-173
FA150	DQ418466.1	L1_FA150_F	GAGGTTCCAAAGGTTTCTGCT	411-391
		L1_FA150_R	CCTGTGCTGCCTACTCCTAA	236-255
		L1_FA150_P	GTCTTGATGGCGGTTGCAA	302-283

*F= amorce sens, R= amorce antisens, P= sonde marquée 3'-5'(FAM-TAMRA)

5- Amplification et séquençage des gènes *E6*, *E7* et *L1* d'HPV23

L'amplification et le séquençage des gènes *E6*, *E7* et *L1* d'HPV23 isolé à partir d'une biopsie profonde de verrue (S1.1) réalisé en 2013 et des prélèvements par écouvillonnage de verrues (S3.3 et S4.3) de juillet 2016 et novembre 2016 ont été réalisés en utilisant respectivement les amorces E6-HPV23-F 5'-3' AGCCAATAATACATGCAACCG et E6-HPV23-R 5'-3' CAATGCAGGTCAATGGGCTG ; E7-HPV23-F CATTGGAAGGGAAGGTGCAG et E7-HPV23-R AGCACCAAGTACTACAGCCT ; l'amplification du gène *L1* a été réalisée à l'aide de quatre couples d'amorces ciblant des séquences chevauchantes : L1-HPV23-F1 TTTCCCTTACCTAGTGCCCC, L1-HPV23-R1 TGTACTGCCGACCCCTAAAG, L1-HPV23-F2 CTGCGCAGGACTTGAAATCG, L1-HPV23-R2 CTACTACACCGCCTCGAACA, L1-HPV23-F3TTGTGCCCCGAAGAGAGCAAT, L1-HPV23-R3 TGTGTTAAGACCTCGGCCTT, L1-HPV23-F4 CAGTGTTACCAATGACAGCAGTT et L1-HPV23-R4 TGCTGGTGTGACTTGTTG. Les amplifications ont été réalisées dans 25µL de mélange réactionnel contenant 0,5U de Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific), 4 mM de MgSO₄, 0,2 mM de chaque dNTP, 1 µM d'amorces sens et anti-sens. Le programme d'amplification était le suivant : 95°C 15 min, puis 45 cycles à 50 secondes à

94°C, 50 secondes à 49°C and 50 secondes à 72°C, et finalement 7 minutes d'élongation finale à 72°C. La séquence des amplicons a été obtenue par séquençage Sanger (Eurofins®).

6- Alignements et arbre phylogénétique

L'alignement des séquences de *L1*, *E6* ou *E7* des différents génotypes identifiés par séquençage haut débit ou par séquençage Sanger a été réalisé en utilisant le programme ClustalW2. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel MEGA, (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 software).

7- Analyses statistiques

Les résultats des PCR quantitatives ont été analysés à l'aide du programme MetaboAnalyst® (<http://www.metaboanalyst.ca>). Des méthodes de regroupement par analyse en composante principale (PCA, Principal Component Analysis) ont été utilisées. Les charges virales spécifiques de type exprimées en nombre de copies par cellule ont été normalisées par transformation en logarithme décimale et centrées selon le principe de Pareto. Les résultats ont été exprimés sous forme de médiane +/- écart-type ; et vérifiés à l'aide d'une procédure de validation croisée (*Leave-one-out cross-validation*, LOOCV). Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les charges virales entre les différents groupes ; l'hypothèse nulle a été rejetée pour les valeurs de *p* inférieures à 0,05.

Résultats

1- Evaluation du traitement par AM3100 sur les paramètres biologiques et les lésions associées à HPV

Le patient présentait au début de l'étude de nombreuses verrues cutanées disséminées avec des caractéristiques séméiologiques différentes selon la localisation anatomique (Figure 1A) : des verrues planes, des verrues planes dyschromiques d'allure pityriasique, des verrues vulgaires (Figure 1B) et des myrmécies géantes. Il présente au niveau de la peau en région péri-anale une lésion ulcérée décrite histologiquement comme un carcinome épidermoïde micro-invasif se développant sur une papulose bowénoïde. Au cours des 7 mois de traitement par AMD3100, dont la séquence est présentée dans la figure 2, lequel fut bien toléré et sans effet secondaire, il n'est pas noté de modification macroscopique ni de l'aspect ni du nombre de verrues. En revanche, la lésion cutanée péri-anale a complètement disparu à l'issue du schéma thérapeutique par AMD3100 associé à l'application d'imiquimod (Figure 2).

Sur le plan hématologique, le patient présentait à l'inclusion une lymphopénie sévère (80/mm³). Le monitoring des paramètres hématologiques et immunophénotypes a été consigné parallèlement à cette étude virologique. Les résultats ne seront pas présentés de manière exhaustive au cours de ce travail de thèse. Brièvement, au cours du traitement, les polynucléaires neutrophiles (entre 3300 et 7330/mm³) et monocytes (entre 410 et 450/mm³) de ce patient restent dans des valeurs normales et les lymphocytes (entre 250 et 580/mm³) augmentent sans atteindre de valeur normale, avec un titre maximal de 580/mm³ au 30^{ème} jour de traitement ; le titre des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), lymphocytes B naïfs, monocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+ et lymphocytes T

NK est augmenté dans le sang circulant de 58,2, 10,2, 3,7, 3,0, 2,3 et 1,1 fois respectivement par rapport aux valeurs de référence avant traitement.

2- Identification des HPV associés aux verrues cutanées par séquençage haut débit : analyse qualitative du virome HPV

L'analyse virologique a porté sur un écouvillon de peau saine et un set de 12 écouvillons de verrues de différents types séméiologiques et différentes localisations anatomiques, prélevés un mois avant le traitement (M-1), au premier mois (M1) et 6^{ème} mois (M6) de traitement. Un contrôle à distance du traitement seize mois après le traitement (M16) a été effectué à partir de 6 nouveaux prélèvements de verrues (Figure 2). Une biopsie de la lésion péri-anale réalisée en cours de traitement est en cours d'investigation ; son étude histologique et virologique complète ne sera pas présentée dans ce travail de thèse.

Les 19 écouvillons ont été analysés pour la présence d'ADN d'HPV par deux systèmes de PCR (i.e. FAP6085/64 et MY09/11) avant analyse des amplicons par séquençage haut débit sur Illumina MiSeq®, générant 4 857 718 *reads* de taille comprise entre 290 et 299 nucléotides (Tables S1 et S2 en annexe). L'analyse bio-informatique permet d'isoler au sein des échantillons, 16 génotypes répartis dans 4 espèces : alpha-4 (HPV57), bêta-1 (HPV25 et HPV124), bêta-2 (HPV15, HPV17, HPV23, HPV38, HPV107, HPV110, HPV111, HPV120 et HPV151), gamma-7 (HPV134), et enfin trois séquences correspondant à des HPV non classés (FA32, FA89 et FA150) (Figure 3). Chaque écouvillon comporte un mélange de 6 à 10 génotypes (Figure 4). HPV23 est le génotype majoritaire détecté dans les 19 (100%) échantillons. FA89 est le génotype le plus rare détecté dans 2/19 échantillons (Figure 4). L'écouvillon de peau saine réalisée un mois avant le traitement montrait la présence des HPV15, HPV23, HPV38, HPV110, HPV111 et FA32. Tous les HPV identifiés connus pour avoir un tropisme cutané constituent le virome HPV du patient. Les caractéristiques biologiques bibliographiques (*in vivo* ou *in*

vitro) connues de ces génotypes sont résumées dans la table 2. Les bêta-1 HPV25 et HPV124 ne sont pas communément associés à des processus oncogènes. Les bêta-2 HPV15, HPV17, HPV38 et HPV111 ont été associés à des carcinomes épidermoïdes (Table 2). Des propriétés transformantes de leurs oncoprotéines E6 et E7 ont été démontrées *in vitro* pour les HPV17, HPV23 et HPV38.³⁰ Les propriétés des autres bêta-2 HPV107, HPV110, 120 et 151 identifiés chez ce patient et génétiquement proches des bêta-2 HPV précités ne sont pas connues. Au total, l'analyse par séquençage haut débit permet d'identifier chez ce patient, un virome HPV constitué de 16 génotypes, majoritairement des bêta-2 HPV dominé par un HPV23 détecté dans 100% des échantillons, incluant cinq types associés dans la littérature à des processus carcinogènes.

3- Analyse quantitative des génomes viraux par PCR en temps réel spécifiques de type au cours du traitement par AMD3100

Afin de confirmer d'une part les résultats de l'analyse virologique par séquençage au débit et d'autre part de mettre en évidence d'éventuelles modifications du virome au cours du traitement par AMD3100, des quantifications spécifiques de types ont été réalisées par PCR en temps réel. Pour comparer les résultats de quantification à partir des écouvillons de verrues, les résultats de charge virale ont été normalisés par rapport à la quantification d'un gène cellulaire; les résultats sont exprimés en nombre de copies/cellule. Les résultats sont présentés dans la table 3. Les charges virales sont variables selon le génotype et la localisation observés entre plusieurs millions à moins de 10 copies/cellule (Table 3). Les charges virales les plus élevées sont remarquablement observées pour HPV23 au cours du traitement par AMD3100 dans des échantillons de verrues planes en regard du tronc (S3.2 et S4.4) de 2,49 et 2,56 millions de copies/cellule respectivement et HPV124 dans une autre verrue plane au niveau de l'abdomen (S4.6) de 1,81 millions de copies/cellule (Figure 5).

Une analyse matricielle de l'ensemble des résultats a été réalisée dans l'objectif de mettre en évidence d'éventuelles corrélations entre les données de charges virales relevées aux différents temps de traitement (M1 et M6) et à distance du traitement par AMD3100 (M16). Pour cela une analyse multivariée des composantes principales (ACP) a été réalisée à partir du jeu de données présenté dans la table 3. L'ACP montre une ségrégation des données en trois groupes correspondant aux temps de prélèvements M1 et M6 pendant le traitement et M16 à distance du traitement. Les groupes de données à M1 et M6 sont superposées (Figure 6). Cette représentation du jeu de données de 17 écouvillons met en évidence des modifications relatives dans les quantifications des constituants du virome HPV au cours du temps, avec une ségrégation vectorielle des valeurs obtenues pendant le traitement et à distance du traitement par AMD3100. De la même façon, la représentation en heatmap met en évidence des corrélations positives entre les charges virales élevées en présence du traitement par AMD3100 à M1 et M6 par rapport à M16 (Figure 7). Les charges virales de FA32, HPV38, HPV17, HPV124, HPV57 et HPV134 étaient les variables les plus représentatives dans les calculs des modifications observées : leurs charges virales sont significativement plus élevées au cours du traitement à M1 et M6 par rapport à M16 (test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Figure 8).

4- Etude de la stabilité du virome au cours du temps : analyse rétrospective de trois biopsies profondes de verrues

Afin de confirmer la stabilité qualitative du virome HPV au cours du temps, une analyse virologique a été menée rétrospectivement sur trois biopsies profondes de verrues conservées à -80°C depuis 2013. Le génotypage des HPV par séquençage haut débit, en utilisant le même mode opératoire, met en évidence un ensemble de génotypes identiques. HPV23 est le génotype prédominant (99% de *reads*) dans une biopsie profonde de verrue plane d'allure pityriasique (S1.1), un HPV25 (99% de *reads*) dans une seconde verrue plane (S1.2) et un mélange de 6 génotypes (HPV15,

HPV23, HPV38b, HPV57, HPV110 et HPV124 (le plus prévalents étant HPV23 et HPV124 , avec 31% à 36% des *reads* respectivement) dans une verrue vulgaire (S1.3) (Tables S1 et S2 en annexe).

L'ensemble des 16 génotypes composant le virome de ce patient a été spécifiquement recherché par les PCR spécifiques de type précédemment décrites, lesquelles confirment la présence d'HPV23 dominant (9937 copies/cellule) dans la verrue plane d'allure pityriasique (S1.1) associé à un faible nombre de copies de FA89 (329 copies/cellule), et la co-détection d'un HPV25 (5 copies/cellule) associé à HPV23 (4 copies/cellule) dans la une seconde verrue plane (S1.2). Les 14 autres génotypes connus sont détectables en proportion plus faible dans l'ensemble des échantillons (Table 4).

Au total, les 16 génotypes sont détectables au sein du virome HPV trois auparavant dans des biopsies profondes de verrues. Ceci permet de confirmer, d'une part que l'AMD3100 n'a pas modifié qualitativement le virome HPV cutané de ce patient, stable dans sa composition dans un intervalle de quatre ans (2013-2017) et d'autre part, l'observation quasi exclusive, en dehors d'un faible titre de FA89 associé, du génotype HPV23 dans la biopsie profonde de la verrue plane d'allure pityriasique étaye l'hypothèse d'une sélection virale spécifique de type à l'origine du lésionnel.

5- Caractérisation de *L1* et des oncogènes *E6* et *E7* d'HPV23_{whim}

HPV23 étant le génotype le plus représenté chez le patient et isolé dans une biopsie profonde de verrue, une caractérisation des oncogènes de ce virus nommé HPV23_{whim} a été réalisé par séquençage de *E6* et *E7* et analyse génétique comparative par rapport à la séquence HPV23 de référence ([U31781.1](#)) (Figures 9A et 9B). Le séquençage complet du gène *L1* d'HPV23_{whim} effectué en parallèle confirme l'espèce HPV23. Les séquences d'*E6*, *E7* et *L1* d'HPV23_{whim} sont identiques et conservés dans tous les échantillons de 2013, 2016 et 2017, dans les écouvillons et la biopsie profonde, attestant de la stabilité génétique HPV23_{whim} au sein du virome de ce patient. Par rapport à la séquence

de référence, le gène *L1* d'HPV23_{whim} est caractérisé par une seule substitution 863A>G modifiant l'acide aminé Q288R. Le gène *E6* d'HPV23_{whim} porte une substitution synonyme 81 A>G et six substitutions modifiant les acides aminés H4R, T12N, S18N, T19P, H61N et C133S. Ces mutations sont situées en dehors des quatre motifs CXXC et motifs homologues capables de former deux doigts de zinc très conservés parmi les protéines E6 des HPV (Figure 9A). Le gène *E7* d'HPV23_{whim} porte quatre substitutions synonymes et deux substitutions modifiant les codons Q57K et D67E, en dehors du domaine LXCXE (acides aminés 22 -26) et du motif CXXC conservés parmi les HPV

Discussion

Cette étude représente la première analyse par séquençage haut débit du virome HPV d'un individu atteint de syndrome WHIM et de ses modifications lors d'un traitement par AMD3100 un antagoniste de CXCR4. L'analyse par séquençage haut débit permet d'identifier un virome HPV constitué de 16 génotypes répartis dans 4 espèces : alpha-4 (HPV57), bêta-1 (HPV25 et HPV124), bêta-2 (HPV15, HPV17, HPV23, HPV38, HPV107, HPV110, HPV111, HPV120 et HPV151), gamma-7 (HPV134), et enfin trois séquences correspondant à des HPV non classés (FA32, FA89 et FA150). Chez ce patient, HPV23 est le génotype majoritaire détecté dans 100% des échantillons cutanés, lequel présente des charges virales particulièrement élevées pendant le traitement par AMD3100 (supérieure à 2 millions de copies/cellule) à la surface de deux verrues planes du tronc.

Il existe plus de 50 types de bêta-HPV plus de 70 types de gamma-HPV.³¹ A la surface de la peau saine, les HPV les plus abondants appartiennent aux genres bêta- et gamma-HPV détectés chez

plus de 75% des individus. Il a été montré que ces HPV cutanés infectent les êtres humains à leur naissance ; 75% des génotypes détectés chez des enfants de moins de un an le sont aussi chez leurs parents.^{32,33} Réalisant des infections multiples persistantes, ils constituent un virome silencieux. Chaque individu peut être ainsi porteur simultanément de un jusqu'à 17 génotypes différents à un instant donné.^{34,35} L'histoire naturelle et la physiopathologie des bêta- et gamma-HPV cutanés sont imparfaitement connues. Ces virus qui sont apparus il y a plus de 350 millions d'années et qui ont co-évolué avec les vertébrés, dont l'espèce humaine, ont été parfois décrits comme des commensaux défectifs.³⁶ En définitive, il semble que la pathogénie de ces HPV est à prendre en considération en tenant compte à la fois du terrain, du site d'infection et du microenvironnement cutané dans lesquels ils se répliquent et s'expriment. Leur expression clinique, que l'on peut qualifier aujourd'hui de dysbiose, se traduit habituellement par des verrues vulgaires, des verrues planes ou des myrmécies. Peu sévères chez les immunocompétents, les papillomatoses cutanées sont plus fréquentes et volontiers plus agressives chez les patients immunodéprimés.

Certains bêta-HPV sont en outre suspectés d'être en association avec l'exposition aux ultraviolets à l'origine de cancers non mélanocytaires de la peau.³⁷ Comme tous les bêta-HPV n'ont pas été étudiés, leur catégorisation stricte en HR-bêta-HPV et BR-bêta-HPV est encore impossible. Leur biologie variable tient probablement compte des propriétés biochimiques polymorphes de leurs oncoprotéines E6 et E7 respectives – les bêta-HPV ne possèdent pas de gène *E5* –, sur la régulation des mécanismes de réparation de l'ADN, du cycle cellulaire et de l'apoptose. Leurs propriétés de transformation des cellules infectées ne sont pas aussi bien documentées que pour les alpha HR-HPV, mais comme pour ces derniers, les E6 et E7 des bêta-HPV interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires en ayant une affinité particulière pour les suppresseurs de tumeurs p53 et protéine du rétinoblastome (pRB) respectivement. Chez les alpha-HR-HPV, la conséquence dramatique de ces interactions conduit à la dégradation médiée principalement par l'ubiquitine-ligase E6AP de ces cibles cellulaires par le protéasome.^{38,39} Comme les alpha-HPV, les protéines E6 des bêta-HPV d'environ 150

acides aminés des bêta-HPV possèdent deux paires de motifs conservés CXXC formant deux doigts de zinc dans les régions N- et C-terminal nécessaires à leur structure et leurs fonctions. En revanche, elles ne possèdent pas de domaine PDZ-binding d'environ 90 acides aminés en C-terminal propre aux alpha-HPV.⁴⁰ Les études de protéomique ont montré que la protéine E6 de bêta-HPV (comme HPV17, HPV38 ou HPV92) a la capacité d'interagir avec p53 ou d'en modifier son expression, et même pour HPV49 - l'exception parmi les bêta-HPV- d'en provoquer via E6AP sa dégradation par le protéasome.^{41,42} D'autres mécanismes de transformation sont également décrits chez les bêta-HPV. Les protéines E6 des bêta-HPV5, HPV8 et HPV38 inactivent p300 un co-facteur de p53, avec pour conséquence des modifications de la différenciation cellulaire et une altération de la réparation des dimères de thymidine et des cassures double brin de l'ADN cellulaire causées par les rayons ultra-violet à l'origine de processus de transformation.⁴³⁻⁴⁵ Les protéines E7 des bêta-HPV d'environ 100 acides aminés possèdent comme chez les alpha-HPV trois domaines conservés CR1-3, dont le domaine CR2 porteur du motif conservé LXCXE essentiel pour son interaction avec pRB et en CR3 deux motifs conservés CXXC formant une structure en doigts de zinc nécessaire à l'homo-di/tétramérisation et la stabilisation de la protéine.^{38,46,47} Les protéines E7 des bêta-HPV5, HPV8, HPV14, HPV24, HPV23, HPV38 et HPV49 ont des affinités positives diverses démontrées pour pRB dont ils altèrent la stabilité et à des degrés divers le contrôle du cycle cellulaire.^{3,48,49} Ces dernières années, la découverte grâce au séquençage à haut débit, de nouveaux bêta- et gamma-HPV, dont le nombre ne cesse d'augmenter, apporte des connaissances supplémentaires sur la complexité de la biologie de cette famille de virus. Par exemple, les HPV101, HPV103, et HPV108 diffèrent de leurs congénères par l'absence de séquence *E6* au sein de leur génome, l'HPV108 comportant cependant un gène *E7* capable d'induire des dysplasies cytologiques dans des cultures organotypiques de kératinocytes. Ou encore, la séquence *E6* de l'alpha-HPV117 découvert en 2010, responsable de verrues cutanées persistantes d'évolution maligne chez des patients greffés d'organe solide, présente la singularité de ne pas comporter le deuxième domaine en doigt de zinc habituellement conservé, car la séquence est altérée par une substitution de l'acide aminé en position 105 (C105Y).⁵⁰⁻⁵³

Au cours de cette étude, le polymorphisme génétique de *E6*, *E7* et *L1* d'HPV23^{whim} illustre un niveau de complexité supplémentaire dans la biologie de connaissance encore ténue de ces virus. Il n'existe en effet que deux séquences génomiques complètes d'HPV23 dans les banques données, dont un variant d'HPV23, nommé HPV-23/Lancaster/2015, isolé chez des volontaires sains.⁵⁴ Le séquençage d'*E6* d'HPV23^{whim} met ici en évidence plusieurs mutations par rapport à la séquence de référence d'HPV23 ([U31781.1](#)). Ces mutations affectent des résidus du bras N-terminal de la protéine qui sont non essentiels à son repliement et la double substitution ST>LP en position 19-20 est un motif observé chez plusieurs bêta2-HPV comme HPV38, 110 et 145. La mutation S133C est également conservatrice, bien qu'en position externe dans la structure, ce résidu puisse éventuellement moduler certaines interactions. Enfin, la mutation H61N également présente chez d'autres bêta-2 comme HPV38, située entre les domaines E6N et E6C et proche du motif de liaison aux peptides LXXLL –comme par exemple le motif LQELL de E6AP- étaye l'hypothèse que cette mutation puisse influencer la reconnaissance des protéines cibles de E6, et par la même l'activité biologique de ce variant d'HPV23.^{55,56} Ainsi, dans la continuité de ces travaux, l'affinité d'E6 d' HPV23^{whim} pour la protéine anti-apoptotique p53 et l'ubiquitine-ligase E6AP, ainsi que d'autres peptides cibles à motif LXXLL comme IRF3, *interferon regulatory factor 3* sera mesurée par rapport aux protéines E6 d'HPVs de référence, et ce par des tests de complémentation protéique de la *Gaussia princeps* luciférase. Ces tests sont en cours d'investigation à l'Institut de Recherche de l'Ecole de Biotechnologies à Strasbourg – (Dr Murielle Masson).^{38,57,58}

Chez notre patient, HPV23^{whim} mais aussi FA32, HPV38, HPV17, HPV124, HPV57 et HPV134 ont vu leurs charges virales significativement augmentées pendant le traitement par AMD3100, au point de modifier leur proportion relative dans le virome HPV de ce patient. L'augmentation globale des charges virales de ces virus étaye l'hypothèse d'un effet de l'AMD3100 sur l'expression de ces génotypes en particulier associés sélectivement à la papillomatose de ce patient. Ces HPV s'expriment par des verrues (i.e. des dysplasies de bas grade) dans le micro-environnement d'un gain de fonction

de CXCR4. Si cette observation est confirmée pour d'autres patients, ce résultat serait aussi le corollaire des effets de l'ADM3100 observés dans les études pré-cliniques sur la réplication des HR-HPV16 et HR-HPV18. En effet, dans les modèles murins et *in vitro*, l'AMD3100 a un impact processif positif sur le cycle réplcatif de ces alpha-HPV dans les kératinocytes.^{27,27} Ainsi, on pourrait considérer ici, en l'absence de modèle expérimental validé pour les bêta-HPV, que l'axe CXCL12/CXCR4 jouerait un rôle chez l'homme de régulateur du cycle viral lié à la différenciation des kératinocytes aussi pour les bêta-HPV cutané. Enfin, grâce au séquençage à haut débit et à notre quantification multivariée des composants viraux, nous montrons qu'il est désormais possible de mesurer les modifications dynamiques du virome HPV en fonction d'éléments inducteurs du cycle de réplication de ces virus. Les applications en pratique médicale et dans les études épidémiologiques sont nombreuses ; cette stratégie pourrait apporter des éléments prédictifs chez les patients à risque de développer des papillomatoses sévères ou cancers de la peau, en distinguant au sein du virome leur dynamique symbiotique sinon pathologique.

En conclusion, nous montrons dans cette étude qu'une analyse quantitative des constituants du virome HPV identifié par séquençage haut débit d'un patient atteint de syndrome WHIM atteste de modifications en proportion relative des génomes viraux suggérant un effet du traitement par AMD3100, un antagoniste de CXCR4, sur l'expression de certains types pouvant être associés sélectivement à la papillomatose. A cet égard, un HPV23_{whim} composant du virome cutané du patient qui se trouve être un des deux seuls types présents dans une biopsie profonde de verrue, étaye l'hypothèse d'une sélection dans le processus lésionnel. Les oncoprotéines E6 et E7 d'HPV23_{whim} présentent des mutations dont les conséquences biologiques sont en cours d'investigation. Enfin, notre approche peut être étendue à l'identification de génotypes singuliers et de variants intra-typiques au sein du virome HPV cutané, dont il est possible aujourd'hui d'étudier la dynamique en regard des processus physiologiques, lésionnels ou carcinogènes.

Références bibliographiques

1. Bernard, H.-U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79 (2010).
2. de Villiers, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**, 2–10 (2013).
3. Tommasino, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **26**, 13–21 (2014).
4. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev. Med. Virol.* **25**, 2–23 (2015).
5. Bravo, I. G. & Félez-Sánchez, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol. Med. Public Health* **2015**, 32–51 (2015).
6. de Koning, M. N. C. *et al.* Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J. Gen. Virol.* **88**, 1489–1495 (2007).
7. Hannigan, G. D. *et al.* The Human Skin Double-Stranded DNA Virome: Topographical and Temporal Diversity, Genetic Enrichment, and Dynamic Associations with the Host Microbiome. *mBio* **6**, e01578-15 (2015).
8. Chahoud, J. *et al.* Association Between β -Genus Human Papillomavirus and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Immunocompetent Individuals—A Meta-analysis. *JAMA Dermatol.* **152**, 1354 (2016).
9. Ganzenmueller, T. *et al.* Next-generation sequencing fails to identify human virus sequences in cutaneous squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **131**, E1173–E1179 (2012).
10. Zuelzer, W. W. 'MYELOKATHEXIS'--A NEW FORM OF CHRONIC GRANULOCYTOPENIA. REPORT OF A CASE. *N. Engl. J. Med.* **270**, 699–704 (1964).
11. Hernandez, P. A. *et al.* Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* **34**, 70–74 (2003).
12. Balabanian, K. *et al.* WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* **105**, 2449–2457 (2005).
13. Balabanian, K. *et al.* Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood* **119**, 5722–5730 (2012).
14. McDermott, D. H., Gao, J.-L. & Murphy, P. M. Chromothriptic cure of WHIM syndrome: Implications for bone marrow transplantation. *Rare Dis.* **3**, e1073430 (2015).

15. Bachelierie, F. *et al.* International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* **66**, 1–79 (2013).
16. Beaussant Cohen, S. *et al.* Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 71 (2012).
17. Chow, K. Y. C. *et al.* A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe* **8**, 523–533 (2010).
18. Meuris, F. *et al.* The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. *PLOS Pathog.* **12**, e1006039 (2016).
19. Heusinkveld, L. E. *et al.* Pathogenesis, diagnosis and therapeutic strategies in WHIM syndrome immunodeficiency. *Expert Opin. Orphan Drugs* **5**, 813–825 (2017).
20. Hemmi, H. *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88–dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **3**, 196–200 (2002).
21. De Clercq, E. The bicyclam AMD3100 story. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 581–587 (2003).
22. Hendrix, C. W. *et al.* Pharmacokinetics and Safety of AMD-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1667–1673 (2000).
23. DiPersio, J. F. *et al.* Phase III Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Plerixafor Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Compared With Placebo Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Autologous Stem-Cell Mobilization and Transplantation for Patients With Non-Hodgkin’s Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4767–4773 (2009).
24. Liles, W. C. *et al.* Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* **102**, 2728–2730 (2003).
25. McDermott, D. H. *et al.* The CXCR4 antagonist plerixafor corrects panleukopenia in patients with WHIM syndrome. *Blood* **118**, 4957–4962 (2011).
26. Dale, D. C. *et al.* The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelokathexis, WHIM syndrome. *Blood* **118**, 4963–4966 (2011).
27. Meuris, F. *et al.* Symptomatic Improvement in Human Papillomavirus-Induced Epithelial Neoplasia by Specific Targeting of the CXCR4 Chemokine Receptor. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 473–480 (2016).
28. Latger-Cannard, V., Bensoussan, D. & Bordigoni, P. The WHIM syndrome shows a peculiar dysgranulopoiesis: myelokathexis. *Br. J. Haematol.* **132**, 669 (2006).

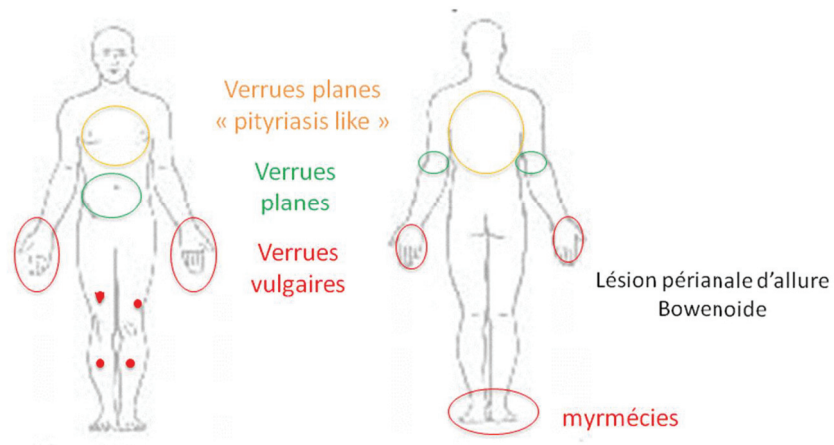
29. Balabanian, K. *et al.* Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J. Clin. Invest.* **118**, 1074–1084 (2008).
30. Tommasino, M. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res.* **231**, 128–138 (2017).
31. Ekström, J. *et al.* Diversity of human papillomaviruses in skin lesions. *Virology* **447**, 300–311 (2013).
32. Weissenborn, S. J., De Koning, M. N. C., Wieland, U., Quint, W. G. V. & Pfister, H. J. Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses. *J. Virol.* **83**, 811–816 (2009).
33. Hsu, J. Y.-C., Chen, A. C.-H., Keleher, A., McMillan, N. A. J. & Antonsson, A. Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *J. Med. Virol.* **81**, 1444–1449 (2009).
34. Hazard, K. *et al.* Cutaneous Human Papillomaviruses Persist on Healthy Skin. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 116–119 (2007).
35. de Koning, M. N. C. *et al.* Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Gen. Virol.* **90**, 1611–1621 (2009).
36. Lazarczyk, M. & Favre, M. [Are oncogenic cutaneous HPVs defective commensals?]. *Med. Sci. MS* **24**, 454–456 (2008).
37. Preston, D. S. & Stern, R. S. Nonmelanoma cancers of the skin. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1649–1662 (1992).
38. Poirson, J. *et al.* Mapping the interactome of HPV E6 and E7 oncoproteins with the ubiquitin-proteasome system. *FEBS J.* **284**, 3171–3201 (2017).
39. Matsumoto, Y. *et al.* Involvement of a cellular ubiquitin-protein ligase E6AP in the ubiquitin-mediated degradation of extensive substrates of high-risk human papillomavirus E6. *J. Med. Virol.* **78**, 501–507 (2006).
40. White, E. A. *et al.* Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. *J. Virol.* **86**, 13174–13186 (2012).
41. White, E. A., Walther, J., Javanbakht, H. & Howley, P. M. Genus Beta Human Papillomavirus E6 Proteins Vary in Their Effects on the Transactivation of p53 Target Genes. *J. Virol.* **88**, 8201–8212 (2014).
42. Cornet, I. *et al.* Comparative analysis of transforming properties of E6 and E7 from different beta human papillomavirus types. *J. Virol.* **86**, 2366–2370 (2012).

43. Howie, H. L. *et al.* Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog.* **7**, e1002211 (2011).
44. Muench, P. *et al.* Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res.* **70**, 6913–6924 (2010).
45. Wallace, N. A., Robinson, K., Howie, H. L. & Galloway, D. A. β -HPV 5 and 8 E6 Disrupt Homology Dependent Double Strand Break Repair by Attenuating BRCA1 and BRCA2 Expression and Foci Formation. *PLOS Pathog.* **11**, e1004687 (2015).
46. Barbosa, M. S. *et al.* The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**, 153–160 (1990).
47. Firzlaff, J. M., Galloway, D. A., Eisenman, R. N & Lüscher, B. The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biologist* 44-53. (1989).
48. Caldeira, S., de Villiers, E. M. & Tommasino, M. Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* **19**, 821–826 (2000).
49. Caldeira, S. *et al.* The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J. Virol.* **77**, 2195–2206 (2003).
50. Kohler, A. *et al.* Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J. Gen. Virol.* **92**, 1585–1594 (2011).
51. Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J. & Clifford, G. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* **445**, 224–231 (2013).
52. Nobre, R. J. *et al.* E7 Oncoprotein of Novel Human Papillomavirus Type 108 Lacking the E6 Gene Induces Dysplasia in Organotypic Keratinocyte Cultures. *J. Virol.* **83**, 2907–2916 (2009).
53. Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R. & Burk, R. D. Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology* **360**, 447–453 (2007).
54. Atkinson, K. V. *et al.* Genome Sequence of Human Papillomavirus 23 Strain HPV-23/Lancaster/2015. *Genome Announc.* **5**, e00257-17 (2017).
55. Martinez-Zapien, D. *et al.* Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* **529**, 541–545 (2016).
56. Cooper, B. *et al.* Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. *Virology* **306**, 87–99 (2003).

57. Cassonnet, P. *et al.* Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. *Nat. Methods* **8**, 990–992 (2011).
58. Fu, L. *et al.* Degradation of p53 by Human Alphapapillomavirus E6 Proteins Shows a Stronger Correlation with Phylogeny than Oncogenicity. *PLoS ONE* **5**, e12816 (2010).

Figures

A



B



Figure 1 : Description des verrues cutanées du patient WHIM

A. Répartition anatomique des différents types de lésions induites par HPV.

B. Photographie de la main droite présentant de nombreuses verrues vulgaires

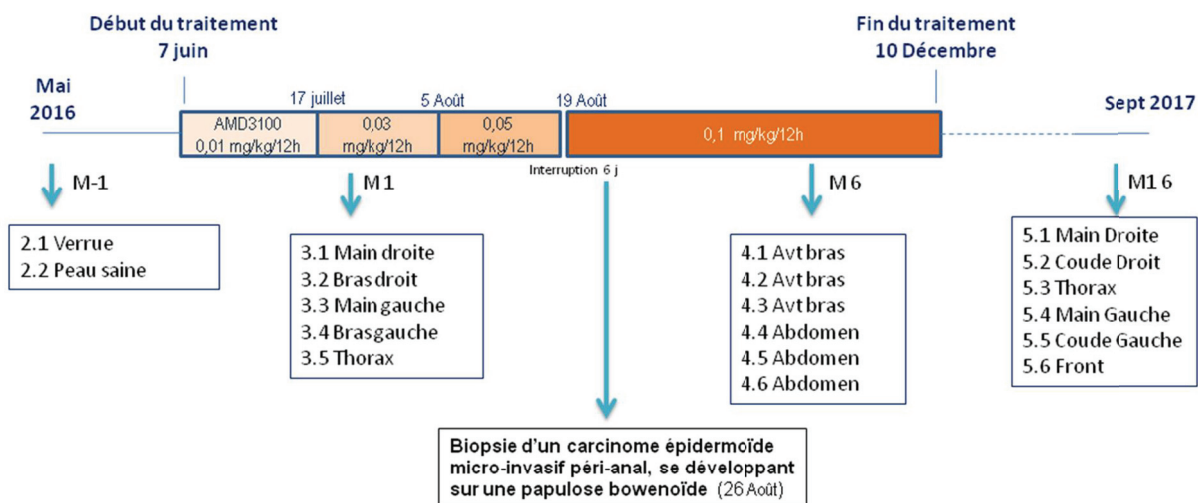


Figure 2 : Chronologie du traitement par AMD3100 et recueil des échantillons

Les prélèvements de verrues ont été recueillis par écouvillonnage un mois avant (M-1) le début du traitement, à deux reprises à M1 et M6 au cours du traitement et à M16, soit 9 mois après l'arrêt du traitement. Une biopsie de la lésion péri-anale correspondant histologiquement à un carcinome épidermoïde micro-invasif qui évolue sur une lésion existant avant l'introduction du traitement a été réalisée à M3.

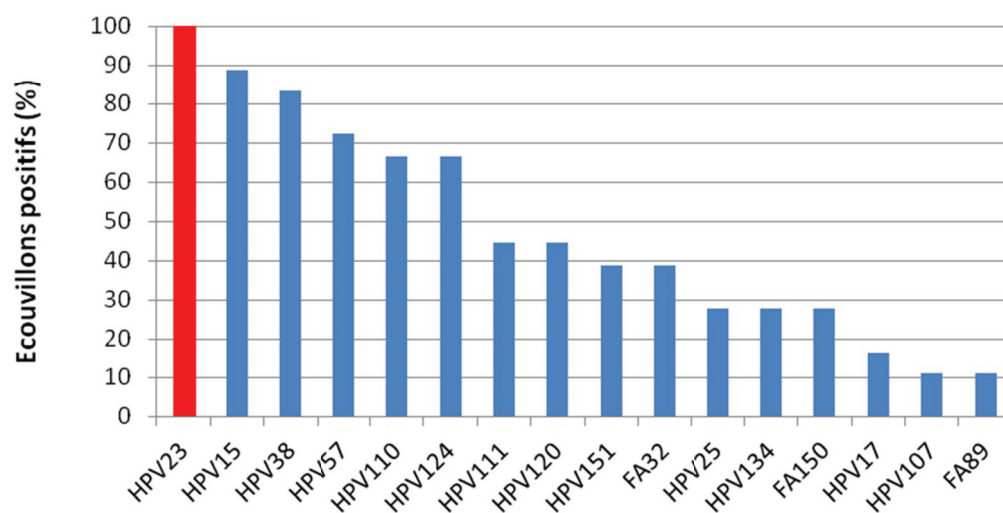


Figure 4 : Graphique présentant le pourcentage d'échantillons positifs par génotype HPV détecté par séquençage haut débit. HPV23 est le génotype majoritaire détecté dans les 19 (100%) échantillons. FA89 est le génotype le plus rare détecté dans 2/19 échantillons.

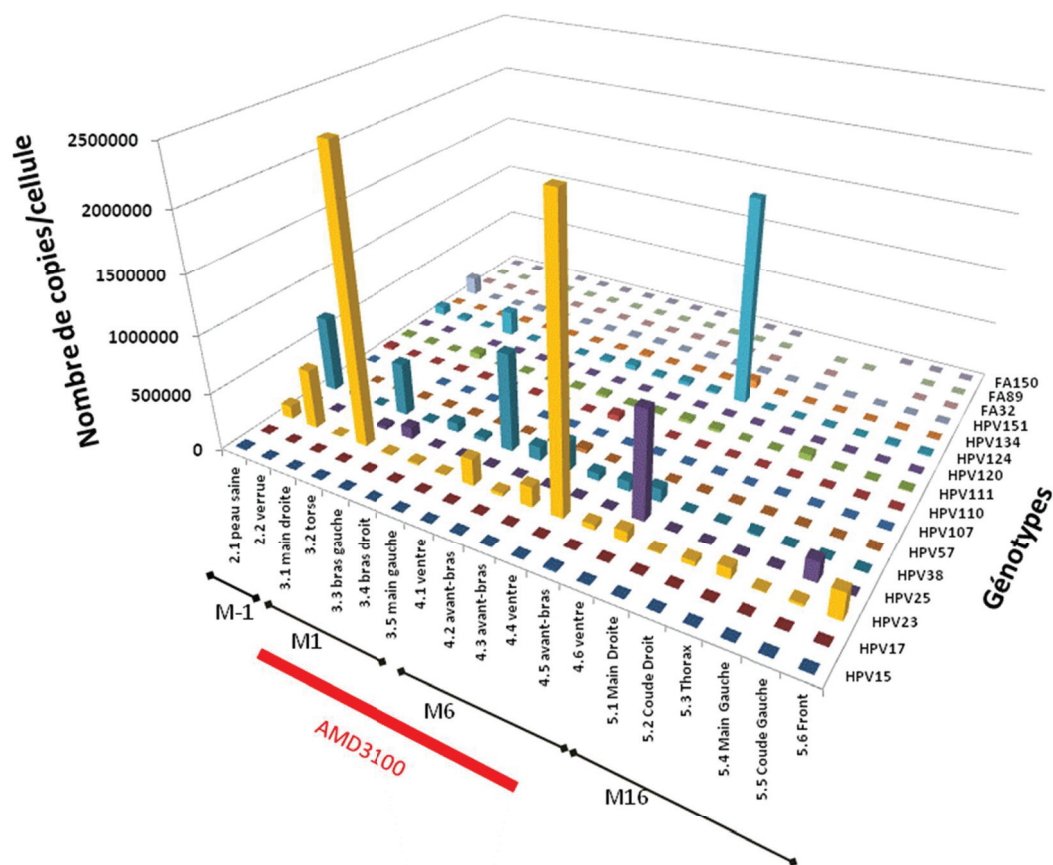


Figure 5 : Représentation graphique de la quantification génomique de chacun des génotypes HPV dans les 19 écouvillons analysés avant et au cours du traitement par AMD3100 (M1 et M6) et à distance du traitement (M16). Les résultats sont exprimés en nombre de copies/cellule. Ce graphe permet de mettre en évidence les charges virales les plus élevées d'HPV23 (en jaune) au cours du traitement à la surface de verrues planes en regard du torse (3.2) et ventre (4.4) de 2,49 et 2,56 millions de copies/cellule respectivement ; d'HPV124 (en bleu clair) à la surface d'une autre verrue plane de l'abdomen (4.6) de 1,81 millions de copies/cellule.

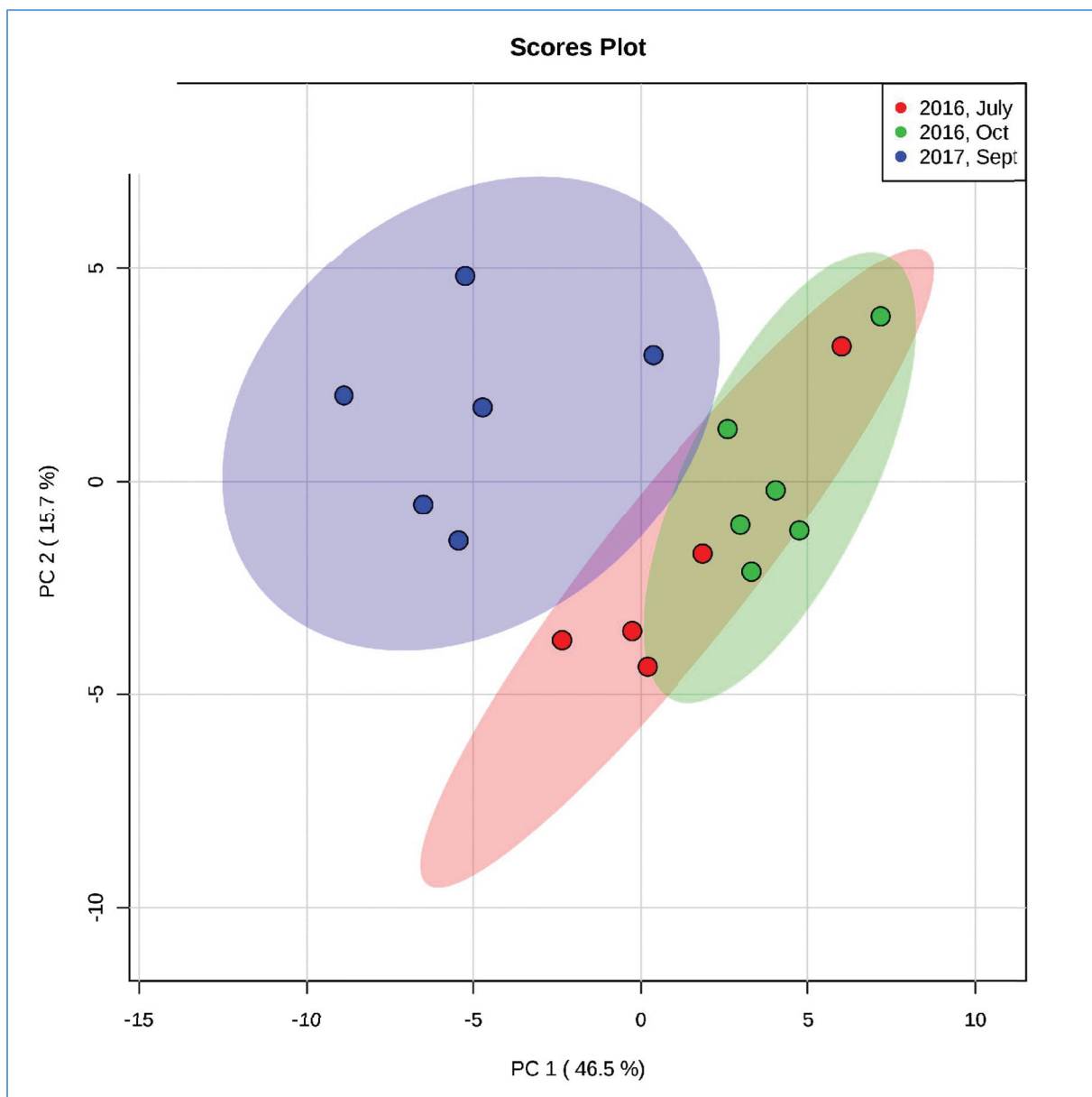


Figure 6 : Analyse en composantes principales montrant la répartition des échantillons en fonction des trois temps de prélèvements : M1 « July 2016 » (groupe rouge), M6 « Oct 2016 » (groupe vert) et M16 « Sept 2017 » (groupe bleu).

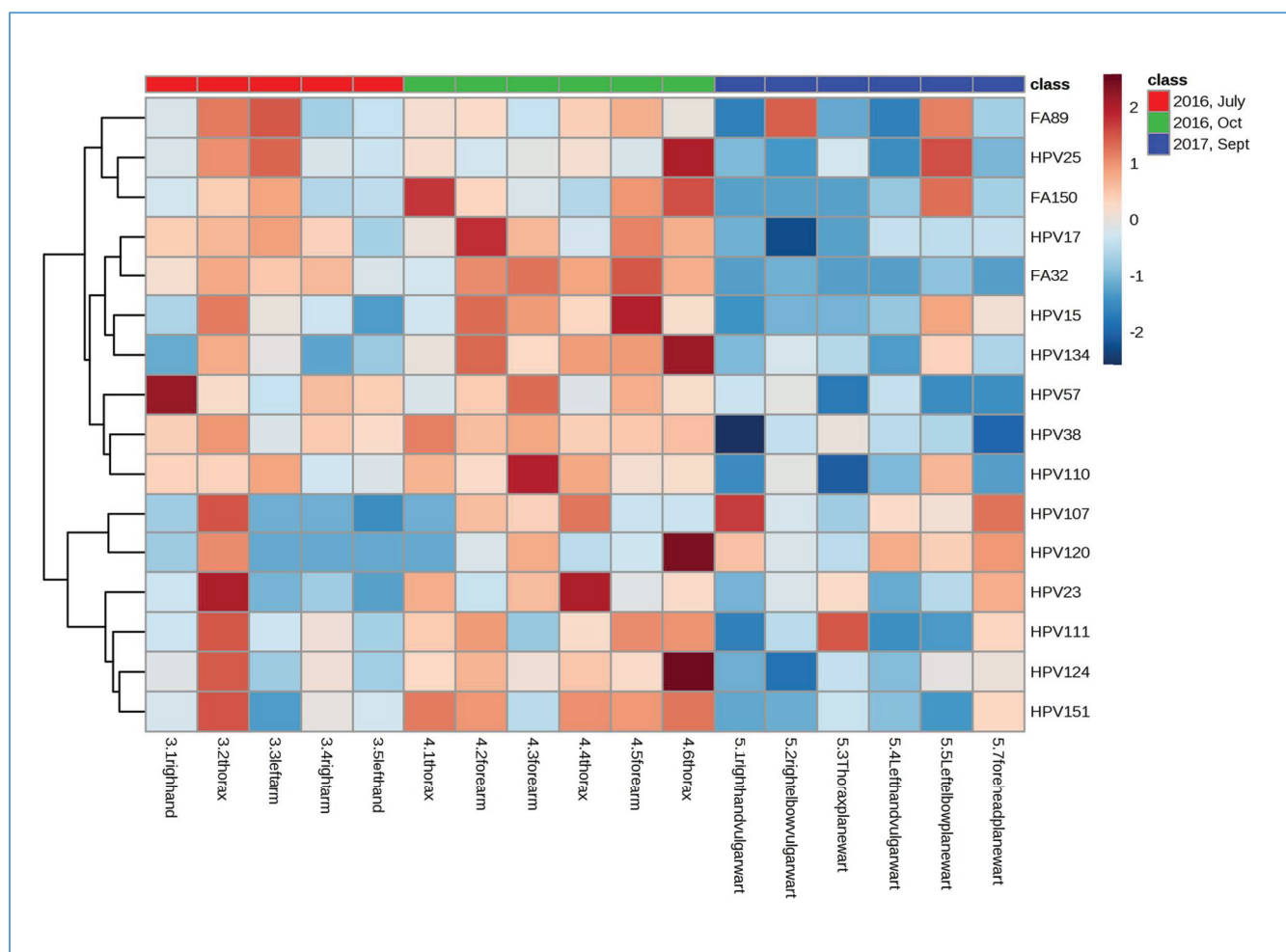


Figure 7 : Heatmap des quantifications génomiques des 16 génotypes HPV dans les 17 écouvillons analysés. M1 « July 2016 » (groupe rouge) et M6 « Oct 2016 » (groupe vert) par rapport à M16 « Sept 2017 » (groupe bleu).

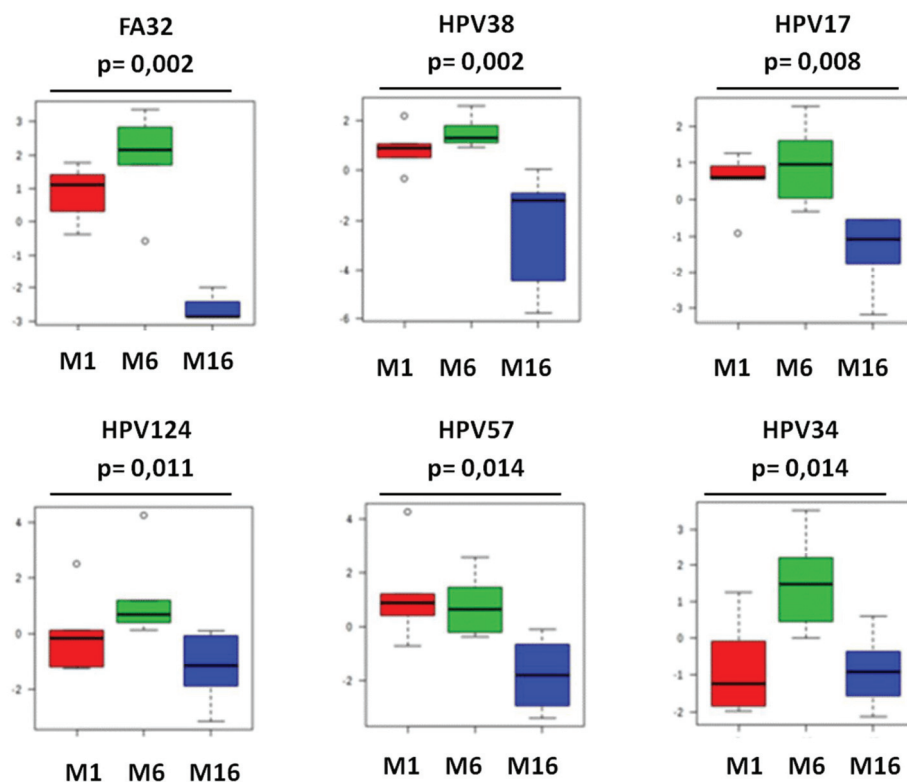


Figure 8 Différences relatives des charges virales au cours des trois temps de prélèvements. Les charges virales des FA32, HPV38, HPV17, HPV124, HPV57 et HPV134 sont significativement plus élevées pendant le traitement par AMD 3100 à M1 et/ou M6 par rapport à M16. Les valeurs ont été centrées et réduites après transformation logarithmique selon la méthode de Pareto. Les boîtes représentent l'écart interquartile autour de la médiane. Les valeurs atypiques dépassant de 1,5 fois l'écart interquartile sont représentées par un cercle (o). Les différences entre les trois groupes de valeurs sont significatives ($p < 0,05$; test non-paramétrique de Kruskal-Wallis).

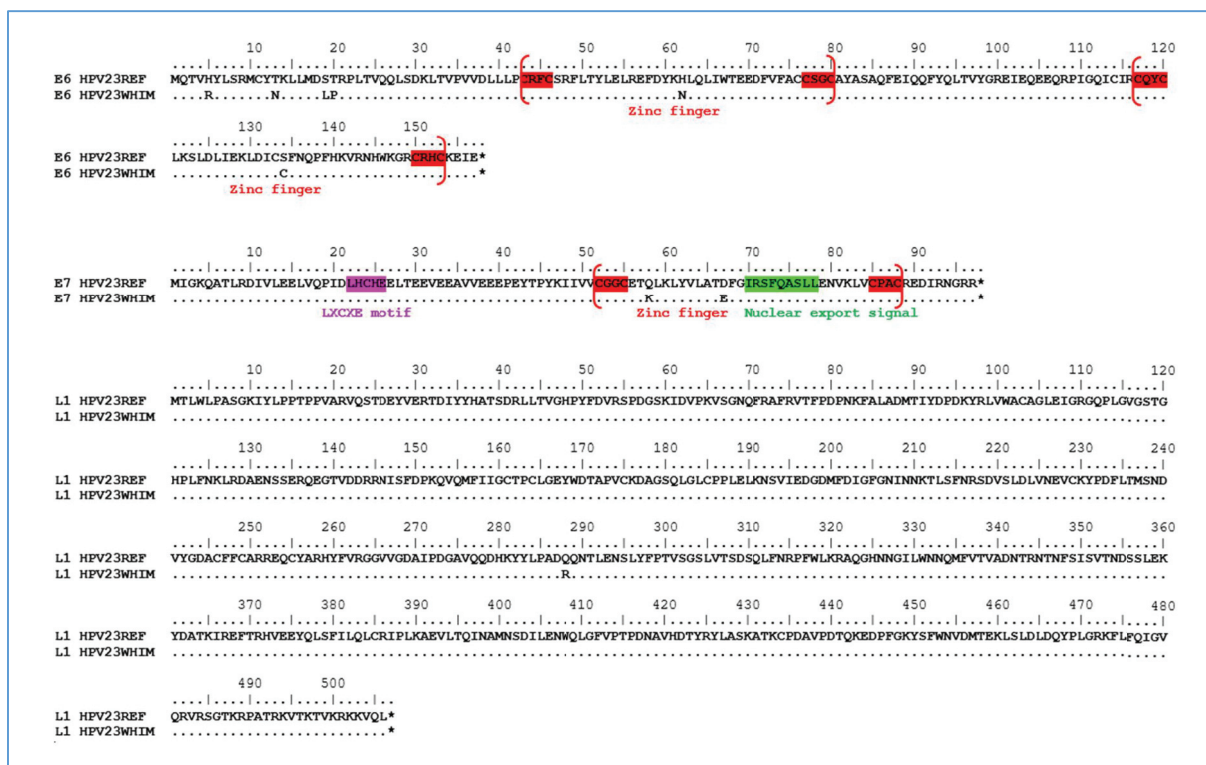


Figure 9 : Mutations observées entre le génome de référence HPV23 et le génome HPV23 WHIM

Alignements multiples des séquences en acides aminés correspondants aux protéines E6, E7 et L1.

Les domaines fonctionnels sont représentés en rouge (zinc finger), violet (LXCXE motif) et vert (Nuclear export signal).

Tableaux

Table 2 : HPV détectés par séquençage haut débit chez le patient WHIM et caractéristiques biologiques connues

Espèce	HPV	Séquence de référence (accession number Genebank)	Caractéristiques biologiques	Références
Alpha-4	HPV57	X55965.1	Non connues	Dang et al. 2006
	HPV25	X74471.1	Non connues	
	HPV124	GQ845446.1	Non connues	
Bêta-2	HPV15	X74468.1	Identifié dans des SCC et des AK	Chaoud et al. 2015, Cohen et al. 2015, Falchhook et al. 2013 White et al.2012
	HPV17	X74469.1	Identifié dans des SCC E6 d'HPV17 se lie à MALM1 (motif LXXLL) et bloque la différenciation cellulaire en dérégulant les voies de signalisation dépendant de Notch	
	HPV23	U31781.1	E6 et E7 d'HPV23 immortalisent les kératinocytes primaires in vitro <ul style="list-style-type: none">E6 d'HPV23 inhibe la transcription de p53 suite à une irradiation UV ; en bloquant HIPK2 une kinase responsable de la phosphorylation de p53E7 d'HPV23 se lie à et déstabilise pRB dans des fibroblastes immortalisés de rongeours (3T3) et provoque son hyperphosphorylation dans des kératinocytes primaires.	
	HPV38	U31787.1	Identifié dans des SCC E6 et E7 d'HPV38 immortalisent les kératinocytes primaires in vitro <ul style="list-style-type: none">E6 d'HPV38se lie à MALM1 (motif LXXLL) et bloque la différenciation cellulaire en dérégulant les voies de signalisation dépendant de Notch, inactive les voies de réparation de l'ADN (ATM/ATR). Se lie à E6AP et active l'expression de hTERT via NFX1-91.E7 d'HPV38 active l'expression de hTERT, se lie à et déstabilise pRB dans des fibroblastes immortalisés de rongeours (3T3) et provoque son hyperphosphorylation dans des kératinocytes primaires.Intégration génomique possible ?	Chaoud et al. 2015 Caldeira et al. 2003 Gabet et al. 2008 Muench et al. 2010 White et al.2012 Accardi et al. 2006, 2011 Saidj et al. 2013 Kazemian et al. 2015
	HPV107	EF422221.1	Non connues	
	HPV110	EU410348.1	Non connues	
	HPV111	EU410349.1	Identifié dans des SCC. Mécanismes probablement similaires à HPV38 et HPV17	
	HPV120	GQ845442.1	Non connues	
	HPV151	FN677756.1	Non connues	Cohen et al. 2015, Falchhook et al. 2013

Table 2 (suite): HPV détectés par séquençage haut débit chez le patient WHIM et caractéristiques biologiques

Espèce	HPV	Séquence de référence (accession number Genebank)	Caractéristiques biologiques	Références
Gamma-7	HPV134	GU117634	Non connues	
Non classés	FA32	AF217677.1	Non connues	
	FA89	AY081196.1	Non connues	
	FA150	DQ418466.1	Non connues	

SCC : Squamous cell carcinoma (carcinome épidermoïde de la peau)
AK : kératose actinique

Table 3 : Quantification des génomes viraux par qPCR spécifiques de type

Ecouillons	HPV15*	HPV17*	HPV23*	HPV25*	HPV38*	HPV57*	HPV107*	HPV110*	HPV111*	HPV120*	HPV124*	HPV134*	HPV151*	FA32*	FA89*	FA150*
2.1 peau saine	11164	13	115645	8238	664874	2664	2	19852	11438	1	76643	778	162121	3831	51	54
2.2 verrue	1515	6	519177	271	43644	308	0	762	7732	3	23702	120	710	535	1	36
3.1 main droite	13	1	871	11	1750	9450	0	65	90	0	261	5	64	2	0	0
3.2 torse	5331	54	2490939	28247	465072	1927	114	2374	54595	36	222692	5612	16230	703	27	79
3.3 bras gauche	1041	76	8413	99893	9384	422	1	6167	3263	1	2685	1252	680	246	40	275
3.4 bras droit	698	38	15349	387	81178	5605	1	691	6065	1	13526	149	2902	395	2	4
3.5 main gauche	181	9	5469	223	34437	3521	0	875	1943	1	2892	340	2256	24	3	6
4.1 ventre	735	23	235418	1388	860046	668	1	4510	10935	1	20819	1388	11280	18	6	3863
4.2 avant-bras	6282	265	29413	304	122391	3609	21	1827	23156	5	47823	15989	8931	1830	7	56
4.3 avant-bras	3789	54	179116	576	253607	33851	15	51840	1543	23	13497	2286	1700	3609	3	13
4.4 ventre	1644	16	2566386	1138	65424	840	68	5544	7344	3	32848	7020	9564	868	9	4
4.5 avant-bras	15111	106	47939	374	87484	7786	4	1511	28097	4	18751	7291	8777	8200	14	391
4.6 ventre	1380	60	89660	942243	115540	1867	4	1687	25307	327	1809907	70000	11820	620	5	2133
5.1 Main Droite	155	5	8176	24	2	461	158	61	397	16	1290	236	799	0	0	-
5.2 Coude Droit	258	1	41775	6	3788	950	5	1015	2505	5	293	918	858	1	37	-
5.3 Thorax	252	4	93884	308	16489	12	2	20	54828	3	5230	520	2000	-	1	-
5.4 Main Gauche	354	13	6884	4	2779	413	11	176	534	23	1715	126	1071	-	0	2
5.5 Coude Gauche	3381	12	22561	178862	2122	22	9	4185	645	13	10739	2662	636	2	25	1003
5.6 Front	1228	13	235692	20	15	25	71	96	9142	31	13188	464	4259	0	2	3

*Les résultats sont exprimés en nombre de copies/ cellule

Table 4 : Quantification des génomes viraux par des qPCR spécifiques de type dans trois biopsies profondes de verrues

Biopsies profondes	HPV15*	HPV17*	HPV23*	HPV25*	HPV38*	HPV57*	HPV107*	HPV110*	HPV111*	HPV120*	HPV124*	HPV134*	HPV151*	FA32*	FA89*	FA150*
Verrue plane « pityriasique- like »	0,003	0,000	9937	0,005	0,711	0,001	0,000	0,026	0,141	0,000	0,029	0,000	0,005	0,000	329	0,000
Verrue plane	0,003	0,000	4,130	4,671	1,282	0,026	0,000	0,011	0,021	0,000	0,280	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
Verrue vulgaire	0,003	0,002	0,321	0,371	0,939	1,736	0,000	0,216	0,089	0,000	0,100	0,002	0,049	0,000	0,000	0,000

*Les résultats sont exprimés en nombre de copies/ cellule

Annexes

Table S1: Reads générés par les amplimères FAP6085/64

Echantillon	S1.1	S1.2	S1.3	S2.2	S2.3	S3.1	S3.2	S3.3	S3.4	S3.5										
Date de prélèvement	biopsie de lésion type avril 2013	biopsie de verrue plane avril 2013	biopsie de verrue avril 2013	peau saine mai 2016	verrue mai 2016	main droite juil 2016	thorax juil 2016	bras gauche juil 2016	bras droit juil 2016	main droite juil 2016										
Reads totaux	176519	46432	106006	70846	203142	99887	78589	144066	119516	119653										
Reads après trimming	176519	46432	106005	70846	203142	99632	78589	144066	119516	119653										
Reads HPV	150790	38791	74173	57959	178565	79192	67171	111123	93160	71395										
% reads HPV	85%	84%	70%	82%	88%	79%	85%	77%	78%	60%										
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique																				
β2-HPV15	17	0%	1	0%	826	1%	12034	21%	32031	18%	17387	22%	10411	15%	29006	26%	19256	21%	18145	25%
β1-HPV23	150750	100%	113	0%	22884	31%	7421	13%	73141	41%	20286	26%	26010	39%	1561	1%	15276	16%	1900	3%
β2-HPV25	1	0%	38670	100%	10107	14%	141	0%	12	0%	34	0%	942	1%	70246	63%	31	0%	78	0%
β2-HPV38b	8	0%	1	0%	10165	14%	5681	10%	954	1%	10763	14%	1180	2%	68	0%	11218	12%	13414	19%
β1-HPV105	0	0%	0	0%	2110	3%	78	0%	10	0%	1000	1%	117	0%	192	0%	508	1%	1251	2%
β2-HPV110	6	0%	0	0%	224	0%	1211	2%	55	0%	1590	2%	15	0%	3176	3%	79	0%	2166	3%
β2-HPV111	0	0%	0	0%	282	0%	7558	13%	15	0%	1815	2%	83	0%	15	0%	2852	3%	8065	11%
β1-HPV124	5	0%	6	0%	26996	36%	15346	26%	68450	38%	25679	32%	28274	42%	700	1%	30756	33%	25823	36%
γ7-HPV134	0	0%	0	0%	91	0%	0	0%	1	0%	23	0%	39	0%	0	0%	18	0%	23	0%
β2-HPV151	0	0%	0	0%	234	0%	0	0%	1	0%	79	0%	55	0%	83	0%	16	0%	265	0%
FA32	0	0%	0	0%	13	0%	8487	15%	3746	2%	489	1%	33	0%	328	0%	13139	14%	120	0%
FA89	0	0%	0	0%	8	0%	2	0%	1	0%	1	0%	1	0%	2	0%	0	0%	2	0%
FA150	3	0%	0	0%	2	0%	0	0%	147	0%	33	0%	11	0%	5746	5%	10	0%	143	0%

Table S1 (suite) : Reads générés par les amplimères FAP6085/64

Echantillon	S4.1	S4.2	S4.3	S4.4	S4.5	S4.6
	thorax	avant-bras	avant-bras	avant-bras	thorax	thorax
Date de prélèvement	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016
Reads totaux	195048	121673	133242	80879	116124	161270
Reads après trimming	195048	121673	133242	80879	116124	161270
Reads HPV	168286	96200	112090	84806	90328	130091
% reads HPV	86%	79%	84%	105%	78%	81%
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique						
β2-HPV15	920	25091	15307	27	24406	83
β1-HPV23	41018	11391	30915	72174	13584	7307
β2-HPV25	18	2	5	4	3	36454
β2-HPV38b	36090	2399	13100	12	1244	48
β1-HPV105	7	1149	1626	5	378	7
β2-HPV110	41	24	11776	600%	47	22
β2-HPV111	183	129	12	5	108	10
β1-HPV124	24646	46367	17428	1183	18955	83706
γ7-HPV134	1	13	13	4	1	0
β2-HPV151	87	1391	307	39	449	1419
FA32	2	8208	21589	12	28405	17
FA89	0	19	0	11335	3	14
FA150	65233	16	12	0	2745	1004

Table S1 (suite): Reads générés par les amplimères FAP6085/64

Echantillon	S5.1	S5.2	S5.3	S5.4	S5.5	S5.6
	verrue vulgaire	verrue vulgaire	verrue plane	verrue vulgaire	verrue plane	verrue plane
Date de prélèvement	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017
Reads totaux	1238726	991998	1631808	1074658	1585348	1281304
Reads après trimming	1238080	991147	1623126	1072893	1585007	1280139
Reads HPV	1180996	956081	1575894	1020944	1161393	1250705
% reads HPV	95%	96%	97%	95%	73%	98%
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique						
β2-HPV15	566520	324662	177891	594203	571902	374945
β1-HPV23	321294	319079	540733	164919	23831	658147
β2-HPV25	654	145	651	118	488002	177
β2-HPV38b	34983	12039	26136	22275	456	9901
β1-HPV105	81	0	0	18	33	29
β2-HPV110	2464	34815	245	10167	17297	281
β2-HPV111	71402	171939	765595	91991	1666	146489
β1-HPV124	80301	2861	45248	76652	24880	47970
γ7-HPV134	59493	76285	8777	12171	25255	2012
β2-HPV151	42648	9016	10477	47135	512	10550
FA32	0	43	0	0	4	0
FA89	52	5169	36	44	185	20
FA150	133	13	0	70	7333	4

Table S2: Reads générés par les amplimères MY09/11

Echantillon	S1.1	S1.2	S1.3	S2.2	S2.3	S3.1	S3.2	S3.3	S3.4	S3.5
Date de prélèvement	biopsie de lésion type avril 2013	biopsie de verrue plane avril 2013	biopsie de verrue avril 2013	peau saine mai 2016	verrue mai 2016	main droite juil 2016	thorax juil 2016	bras gauche juil 2016	bras droit juil 2016	main droite juil 2016
Reads totaux	121815	127579	247235	204977	260704	-	187750	227915	-	-
Reads après trimming	121808	127132	247225	204950	260654	-	187704	227862	-	-
Reads HPV	28351	32604	50005	104083	79145	-	39893	66550	-	-
% reads HPV	23%	26%	20%	51%	30%	-	21%	29%	-	-
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique										
β2-HPV15	5	0%	0	0%	5	0%	1028	1%	-	-
β2-HPV17	0	0%	0	0%	5	0%	6	0%	-	-
β1-HPV23	28300	100%	4	0%	2	0%	88	0%	-	-
β2-HPV25	0	0%	32595	100%	7	0%	7	0%	-	-
α4-HPV57	0	0%	0	0%	31193	62%	723	1%	-	-
β2-HPV110	44	0%	2	0%	18769	38%	62547	79%	-	-
β2-HPV 120	1	0%	2	0%	1	0%	11122	14%	-	-
β1-HPV124	1	0%	1	0%	3	0%	3624	5%	-	-

Table S2 (suite): Reads générés par les amplimères MY09/11

Echantillon	S4.1	S4.2	S4.3	S4.4	S4.5	S4.6
	thorax	avant-bras	avant-bras	avant-bras	thorax	thorax
Date de prélèvement	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016	novembre 2016
Reads totaux	107959	169358	180225	126096	120486	186186
Reads après trimming	107922	169321	180219	126076	120464	186143
Reads HPV	62033	87288	125655	68983	70770	130182
% reads HPV	57%	52%	70%	55%	59%	70%
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique						
β2-HPV15	6767	42923	1139	6049	57649	107
	11%	49%	1%	9%	81%	0%
β2-HPV17	20	2257	6	12	140	7
	0%	3%	0%	0%	0%	0%
β1-HPV23	47	9	7	2721	15	7
	0%	0%	0%	4%	0%	0%
β2-HPV25	13	10	1	0	1	36051
	0%	0%	0%	0%	0%	28%
α4-HPV57	1	0	2	0	0	0
	0%	0%	0%	0%	0%	0%
β2-HPV110	51393	17347	122608	48517	11790	231
	83%	20%	98%	70%	17%	0%
β2-HPV 120	40	2878	1858	363	303	45313
	0%	3%	1%	1%	0%	35%
β1-HPV124	3747	18246	14	2637	860	48461
	6%	21%	0%	4%	1%	37%

Table S2 (suite):Reads générés par les amplimères MY09/11

Echantillon	S5.1	S5.2	S5.3	S5.4	S5.5	S5.6
	verrue vulgaire	verrue vulgaire	verrue plane	verrue vulgaire	verrue plane	verrue plane
Date de prélèvement	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017	septembre 2017
Reads totaux	2910	1048408	516570	1029746	1356474	1030120
Reads après trimming	2804	809777	346582	907849	1294421	969627
Reads HPV	2047	786890	311929	885654	1279186	857490
% reads HPV	73%	97%	90%	98%	99%	88%
Nombre de reads assignés à un genotype spécifique						
β2-HPV15	456	5446	44784	19682	16820	142869
		22%	1%	2%	1%	17%
β2-HPV17	2	429	3860	8421	486	7160
		0%	1%	1%	0%	1%
β1-HPV23	36	2645	2938	481	586	4683
		2%	1%	0%	0%	1%
β2-HPV25	297	112	4076	63	421153	248
		15%	1%	0%	33%	0%
α4-HPV57	9	139414	6929	201791	450	13897
		0%	2%	23%	0%	2%
β2-HPV110	1145	636858	84474	500077	824832	178053
		56%	27%	56%	64%	21%
β2-HPV 120	29	648	28265	129412	2085	188705
		1%	9%	15%	0%	22%
β1-HPV124	40	937	135675	25304	12609	320743
		2%	43%	3%	1%	37%

Discussion et perspectives

- I- Identification des HPV de génotype indéterminé dans les frottis cervico-utérins
- II- Identification des papillomavirus humains impliqués dans les papillomatoses diffuses d'un patient atteint de syndrome WHIM au cours au cours d'un traitement par AMD3100 un antagoniste de CXCR4
- III- Conclusion

I- Identification des HPV de génotype indéterminé dans les frottis cervico-utérins

1- Etat du sujet

Le cancer de l'utérus est une maladie d'évolution lente, permettant la mise en place d'un dépistage organisé des lésions dysplasiques précancéreuses du col de l'utérus chez les femmes de 25 à 65 ans, *via* un frotti cervico-utérin ; et en cas d'ASCUS, la recherche d'HPV HR. Un dépistage positif entrainera la mise en place d'examens complémentaires comme la colposcopie et la biopsie si une dysplasie est retrouvée. En cas de dysplasie sévère, la résection chirurgicale de la zone dysplasique est réalisée. En France, le dépistage des HPV HR est couplé à un génotypage HPV à l'aide de « tests HPV » basés sur l'amplification du génome par PCR avec des amorces telles que GP5+/6+, MY09/11, SPF10, les premières étant les plus couramment utilisées.³⁷² L'identification du génotype incriminé est basée sur la visualisation des amplimères générés par hybridation inverse. Ces tests HPV commerciaux ne détectent pas les mêmes infections chez les femmes subissant un dépistage primaire.¹⁴ Leur concordance dans les résultats positifs varie entre 48% et 69%.^{136,373}

L'INNO-LiPA HPV Génotypage Extra II (Fujirebio®) fait partie des « tests HPV » homologués. Il est conçu pour la détection et l'identification de 32 génotypes HPV : 13 génotypes HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68); 6 génotypes (p) -HR-HPV (26, 53, 66, 70, 73 et 82); 9 génotypes de VPH à faible risque (LR) (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 et 81) et 4 génotypes de signification inconnue (62, 67, 83 et 89).¹¹³ Il est basé sur la PCR utilisant des amorces SPF10 et une hybridation sur 32 sondes oligonucléotidiques, et présente des performances comparables aux autres « tests HPV ». Cependant, dans plusieurs études, environ 1% des échantillons cervicaux détectent un signal positif pour HPV mais échouent à génotyper l'HPV incriminé, désigné HPV-X.

Les nouvelles techniques de séquençage haut débit ont démontré l'existence de multiples génotypes HPV jusqu'alors inconnus, mais aussi des sous-types et des variant intra-type (HPV16) non inclus dans le panel des génotypes reconnus par les tests HPV utilisés pour le diagnostic.

2- Résumé des travaux

L'un des objectifs de ma thèse a été d'identifier les génotypes correspondant aux HPV-X rendus par le test INNO-LiPA HPV Génotypage Extra II (Fujirebio[®]). Le séquençage haut débit a démontré son efficacité pour identifier des génotypes HPV dans des échantillons même en cas d'infections multiples ou en présence d'une charge virale faible.^{374,375} Nous avons donc développé une technique de séquençage HTS des amplimères obtenus en utilisant les amorces GP5+/6+ les plus couramment utilisée dans les « tests HPV » pour l'amplification du génome HPV, et le séquençage haut débit pour l'identification des séquences HPV incriminées ; supprimant ainsi tous les écueils associés à l'hybridation inverse.

En utilisant cette technique nous avons identifié les génotypes HPV impliqués dans 54 échantillons cliniques sur 252 échantillons analysés. Des infections multiples ont été trouvées dans 38% des échantillons. Nous avons identifié 7 HPV-BR non inclus dans le panel de detection de l'INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*[®]; et 9 génotypes dont un HPV-HR35 et un HPV-(p)HR73 non identifiés malgré la présence de sondes spécifiques incluses dans le test. Ces résultats montrent les limites des tests HPV utilisés en diagnostic liés à différents facteurs comme la présence de plusieurs génotypes au sein d'un même échantillon, de faibles charges virales ou la présence de variants ne s'hybridant pas correctement avec les sondes.³⁷⁶

3- Mécanismes mis en jeux et conséquences

Le séquençage HTS est une technique très efficace pour analyser toutes les séquences HPV, même les séquences minoritaires d'un même génotype et a permis de mettre en évidence la présence de variants intra-types ou quasi-espèces. Ce concept de quasi-espèce a déjà été proposé pour HPV16. En effet il existe de nombreux variants d'HPV16 présentant des niveaux de variation génétique identiques à ceux observés chez les virus à ARN. Cette observation est surprenante étant donné le haut niveau de fidélité transcriptionnelle de la machinerie cellulaire et le taux d'évolution faible des substitutions nucléotidiques chez les HPV estimé 2×10^{-8} par site et par an. Ces variants HPV16 suggèrent l'existence d'hypermutations sélectives permettant une évolution rapide du génome d'HPV16 et l'échappement viral aux mécanismes de défense de l'hôte. Nos résultats suggèrent que le concept de quasi-espèces peut être étendu à la séquence L1 des autres génotypes appartenant aux alpha-HPV. Des hypermutations de la séquence L1 entraîneraient des modifications de la structure des boucles hypervariables de la protéine de capsid contenant l'épitope immunitaire majeur.³⁷⁷

La présence de quasi-espèces de L1 nous met face aux limites des "tests HPV" pour la détection et le diagnostic d'infections à HPV, incitant à explorer les infections à HPV-X afin de déterminer le ou les génotypes impliqués ainsi que leur pouvoir oncogène afin d'améliorer la prise en charge des femmes concernées.

Sur un plan plus fondamental, les quasi-espèces pourraient entraîner la production d'anticorps neutralisants d'affinité différente et donc d'efficacité variable permettant l'échappement viral et la persistance d'HPV dans les kératinocytes de la couche basale.

II- Syndrome WHIM : Dynamique du virome HPV au cours d'un traitement par AMD3100

1- Etat du sujet

Le syndrome WHIM est un déficit congénital rare dont l'acronyme signifie « Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis » et résume les principales caractéristiques cliniques du syndrome WHIM,³²⁰ soit des verrues profuses siégeant préférentiellement au niveau du visage des pieds et des mains, une hypogammaglobulinémie et des infections bactériennes récurrentes en rapport avec une leuco-neutropénie associée à une rétention anormale de neutrophiles matures dans la moelle osseuse ou myélkathexie. Cet immunodéficit congénital rare est causé dans la majorité des cas (98%) par une mutation gain de fonction de CXCR4, récepteur de la chimiokine CXCL12. Les mutations décrites au cours du syndrome WHIM entraînent un gain de fonction par altération du processus normal de désensibilisation du récepteur après la liaison avec son ligand.³³² L'AMD3100 est un antagoniste spécifique de CXCR4 ; son utilisation chez les patients atteints de syndrome WHIM est pertinente puisqu'il cible de manière spécifique l'axe CXCR4 et a des retentissements aussi bien sur les symptômes immuno-hématologiques que sur les symptômes dermatologiques associés à HPV.³³³

2- Résumé des travaux

L'analyse par séquençage haut débit a permis d'identifier un virome HPV constitué de 16 génotypes, majoritairement des bêta-2 HPV chez le patient atteint de syndrome WHIM. Les 16 génotypes ont aussi été identifiés dans des biopsies profondes de lésions prélevées trois ans auparavant ; ces résultats montrant la stabilité du virome HPV dans un intervalle de quatre ans. Chaque écouvillon comportait un mélange de 6 à 10 génotypes.

Le traitement par AMD3100 n'a pas modifié qualitativement le virome HPV cutané du patient. Par contre les PCR spécifiques de type ont mis en évidence des modifications des quantités relatives des constituants du virome HPV en présence du traitement par AMD3100 à M1 et M6 par rapport à M16 (6 mois après l'arrêt du traitement). On remarque en particulier une augmentation des charges virales de FA32, HPV38, HPV17, HPV124, HPV57 et HPV134.

D'autre part, le virome du patient est largement dominé par le génotype HPV23, celui-ci étant retrouvé de manière quasi exclusive dans la biopsie profonde de la verrue plane d'allure pityriasique et dans tous les écouvillons analysés. Les séquences d'E6, E7 et L1 d'HPV23whim sont identiques et conservées dans tous les échantillons, attestant de la stabilité génétique HPV23whim au sein du virome de ce patient.

3- Mécanismes mis en jeux et conséquences

L'augmentation globale des charges virales des virus HPV38, HPV17, HPV124, HPV57 et HPV134 et FA32 suggère un effet de l'AMD3100 sur l'expression de ces génotypes en particulier, associés au développement de la papillomatose du patient. Cette observation étaye l'hypothèse selon laquelle l'AMD3100 favoriserait le cycle réplicatif des HPV au détriment du processus carcinogène, comme cela a été montré dans les études pré-cliniques sur la réplication des HR-HPV16 et HR-HPV18.^{73,333}

Enfin l'observation quasi exclusive du génotype HPV23 dans la biopsie profonde de la verrue plane d'allure pityriasique, et sa présence constante dans tous les écouvillons analysés suggère une sélection virale spécifique de type à l'origine du processus lésionnel. Les mutations observées dans la séquence du gène E6 affectent des résidus du bras N-terminal de la protéine. La mutation H61N est particulièrement intéressante. Observée chez d'autres bêta-2 HPV comme HPV38, elle est située entre

les domaines E6N et E6C et proche du motif de liaison aux peptides LXXLL, et pourrait influencer la reconnaissance des protéines cibles de E6, et par la même l'activité biologique de ce variant d'HPV23.

III-Conclusion

Ces travaux ont été organisés en trois axes : mise au point d'une technique de génotypage des HPV par séquençage haut débit et applications : (1) dépistage des HPV de génotype indéterminé dans les frottis cervico-utérin classés ASCUS et (2) analyse du virome HPV cutané d'un patient WHIM au décours d'un traitement par AMD3100. La technique de séquençage haut-débit a montré son efficacité pour identifier des génotypes HPV connus, des séquences putatives HPV et des variants HPV, même en cas de multi-infections ou de concentrations faibles en HPV.

Les applications en pratique médicale sont nombreuses. Citons en exemple la prise en charge des femmes atteintes de dysplasies du col de l'utérus ou le pronostic des cancers liés à HPV.

L'étude du virome cutané HPV pourrait apporter des éléments prédictifs chez les patients à risque de développer des papillomatoses sévères ou cancers de la peau, en distinguant au sein du virome des dynamiques symbiotiques potentiellement pathologiques ; et permettrait aussi d'identifier des HPV semblant posséder des propriétés pathogènes particulières.

Enfin la mise en évidence de variants HPV suggère l'existence de quasi-espèces et permet d'améliorer la compréhension des mécanismes d'évolution des HPV, et d'échappement au système immunitaire.

Références bibliographiques

1. Van Doorslaer, K. *et al.* The Papillomavirus Episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.* **41**, D571-578 (2013).
2. Bravo, I. G. & Félez-Sánchez, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol. Med. Public Health* **2015**, 32–51 (2015).
3. Puustusmaa, M., Kirsip, H., Gaston, K. & Abroi, A. The Enigmatic Origin of Papillomavirus Protein Domains. *Viruses* **9**, 240 (2017).
4. Weissenborn, S. J., De Koning, M. N. C., Wieland, U., Quint, W. G. V. & Pfister, H. J. Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses. *J. Virol.* **83**, 811–816 (2009).
5. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association: Human papillomavirus. *Rev. Med. Virol.* **25**, 2–23 (2015).
6. de Villiers, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* **445**, 2–10 (2013).
7. Bernard, H.-U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79 (2010).
8. Kocjan, B. J. *et al.* Genome announcement: complete genome sequence of a novel Mupapillomavirus, HPV204. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* **24**, 21–23 (2015).
9. de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U. & zur Hausen, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17–27 (2004).
10. Bouvard, V. *et al.* A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* **10**, 321–322 (2009).
11. Anantharaman, D. *et al.* Human Papillomavirus Infections and Upper Aero-Digestive Tract Cancers: The ARCAGE Study. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 536–545 (2013).
12. Beutner, K. R., Becker, T. M. & Stone, K. M. Epidemiology of human papillomavirus infections. *Dermatol. Clin.* **9**, 211–218 (1991).
13. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–350 (2002).
14. de Koning, M. N. C. *et al.* Betapapillomaviruses frequently persist in the skin of healthy individuals. *J. Gen. Virol.* **88**, 1489–1495 (2007).
15. de Koning, M. N. C. *et al.* Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Gen. Virol.* **90**, 1611–1621 (2009).
16. Antonsson, A., Forslund, O., Ekberg, H., Sterner, G. & Hansson, B. G. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J. Virol.* **74**, 11636–11641 (2000).

17. Foulongne, V. *et al.* Human Skin Microbiota: High Diversity of DNA Viruses Identified on the Human Skin by High Throughput Sequencing. *PLoS ONE* **7**, e38499 (2012).
18. Hazard, K. *et al.* Cutaneous Human Papillomaviruses Persist on Healthy Skin. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 116–119 (2007).
19. Kiviat, N. B. Papillomaviruses in non-melanoma skin cancer: epidemiological aspects. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 397–403 (1999).
20. Proby, C. M. *et al.* A case-control study of betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma in organ transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 1498–1508 (2011).
21. Iftner, A. *et al.* The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res.* **63**, 7515–7519 (2003).
22. Giampieri, S. & Storey, A. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br. J. Cancer* **90**, 2203–2209 (2004).
23. Wallace, N. A., Robinson, K., Howie, H. L. & Galloway, D. A. HPV 5 and 8 E6 abrogate ATR activity resulting in increased persistence of UVB induced DNA damage. *PLoS Pathog.* **8**, e1002807 (2012).
24. Viariso, D. *et al.* E6 and E7 from beta HPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog.* **7**, e1002125 (2011).
25. Leiding, J. W. & Holland, S. M. Warts and all: human papillomavirus in primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 1030–1048 (2012).
26. zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. & Bornkamm, G. W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer* **13**, 650–656 (1974).
27. Ryndock, E. J., Biryukov, J. & Meyers, C. Replication of human papillomavirus in culture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1249**, 39–52 (2015).
28. Tommasino, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **26**, 13–21 (2014).
29. Lace, M. J., Anson, J. R., Thomas, G. S., Turek, L. P. & Haugen, T. H. The E8–E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. *J. Virol.* **82**, 10841–10853 (2008).
30. Straub, E., Dreer, M., Fertey, J., Iftner, T. & Stubenrauch, F. The viral E8^{E2C} repressor limits productive replication of human papillomavirus 16. *J. Virol.* **88**, 937–947 (2014).

31. Dreer, M., van de Poel, S. & Stubenrauch, F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. *Virus Res.* **231**, 96–102 (2017).
32. Sankovski, E., Männik, A., Geimanen, J., Ustav, E. & Ustav, M. Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function. *J. Virol.* **88**, 961–973 (2014).
33. Chen, Z., Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R. & Burk, R. D. Human papillomavirus (HPV) types 101 and 103 isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and are related to gamma-papillomaviruses. *Virology* **360**, 447–453 (2007).
34. Nobre, R. J. *et al.* E7 Oncoprotein of Novel Human Papillomavirus Type 108 Lacking the E6 Gene Induces Dysplasia in Organotypic Keratinocyte Cultures. *J. Virol.* **83**, 2907–2916 (2009).
35. Badaracco, G., Venuti, A., Sedati, A. & Marcante, M. L. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J. Med. Virol.* **67**, 574–582 (2002).
36. Yu, T. *et al.* The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **158**, 27–34 (2005).
37. Wentzensen, N. *et al.* Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* **21**, 419–426 (2002).
38. Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* **69**, 2989–2997 (1995).
39. Jeon, S. & Lambert, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1654–1658 (1995).
40. Pett, M. R. *et al.* Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* **64**, 1359–1368 (2004).
41. Smotkin, D. & Wettstein, F. O. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4680–4684 (1986).
42. Ozbun, M. A. & Meyers, C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J. Virol.* **71**, 5161–5172 (1997).
43. Thierry, F., Heard, J. M., Dartmann, K. & Yaniv, M. Characterization of a transcriptional promoter of human papillomavirus 18 and modulation of its expression by simian virus 40 and adenovirus early antigens. *J. Virol.* **61**, 134–142 (1987).
44. Thierry, F. & Howley, P. M. Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol.* **3**, 90–100 (1991).

45. Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U. & Iftner, T. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J. Virol.* **70**, 2339–2349 (1996).
46. Carson, A. & Khan, S. A. Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation. *J. Virol.* **80**, 4356–4362 (2006).
47. Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. Human Papillomavirus Oncoproteins Alter Differentiation-Dependent Cell Cycle Exit on Suspension in Semisolid Medium. *Virology* **250**, 19–29 (1998).
48. Songcock, W. K., Scott, M. L. & Bodily, J. M. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by transcriptional elongation. *Virology* **507**, 179–191 (2017).
49. Bedell, M. A. *et al.* Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J. Virol.* **65**, 2254–2260 (1991).
50. Fehrmann, F. & Laimins, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**, 5201–5207 (2003).
51. Peh, W. L. *et al.* The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J. Virol.* **78**, 2142–2151 (2004).
52. Wilson, R., Fehrmann, F. & Laimins, L. A. Role of the E1–E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **79**, 6732–6740 (2005).
53. del Mar Peña, L. M. & Laimins, L. A. Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J. Virol.* **75**, 10005–10013 (2001).
54. Durzynska, J., Lesniewicz, K. & Poreba, E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **772**, 36–50 (2017).
55. Bergvall, M., Melendy, T. & Archambault, J. The E1 proteins. *Virology* **445**, 35–56 (2013).
56. Amin, A. A. *et al.* Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* **272**, 137–150 (2000).
57. Morin, G. *et al.* A conserved amphipathic helix in the N-terminal regulatory region of the papillomavirus E1 helicase is required for efficient viral DNA replication. *J. Virol.* **85**, 5287–5300 (2011).
58. Moody, C. A., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J. & Laimins, L. A. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19541–19546 (2007).
59. Park, P. *et al.* The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8700–8704 (1994).

60. Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. & Romanos, M. A. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* **72**, 7407–7419 (1998).
61. Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. & Wang, T. S. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J. Biol. Chem.* **274**, 2696–2705 (1999).
62. Clower, R. V., Hu, Y. & Melendy, T. Papillomavirus E2 protein interacts with and stimulates human topoisomerase I. *Virology* **348**, 13–18 (2006).
63. Hu, Y., Clower, R. V. & Melendy, T. Cellular topoisomerase I modulates origin binding by bovine papillomavirus type 1 E1. *J. Virol.* **80**, 4363–4371 (2006).
64. Loo, Y.-M. & Melendy, T. Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J. Virol.* **78**, 1605–1615 (2004).
65. Bernard, B. A. *et al.* The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4317–4324 (1989).
66. Dong, G., Broker, T. R. & Chow, L. T. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J. Virol.* **68**, 1115–1127 (1994).
67. Dostatni, N. *et al.* The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* **5**, 1657–1671 (1991).
68. Hou, S. Y., Wu, S. Y., Zhou, T., Thomas, M. C. & Chiang, C. M. Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 113–125 (2000).
69. Romanczuk, H., Thierry, F. & Howley, P. M. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **64**, 2849–2859 (1990).
70. Tan, S. H., Leong, L. E., Walker, P. A. & Bernard, H. U. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* **68**, 6411–6420 (1994).
71. Mohr, I. J. *et al.* Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**, 1694–1699 (1990).
72. Sanders, C. M. & Stenlund, A. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J.* **17**, 7044–7055 (1998).
73. Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A. & Ustav, M. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J.* **15**, 1–11 (1996).

74. Chow, L. T., Reilly, S. S., Broker, T. R. & Taichman, L. B. Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *J. Virol.* **61**, 1913–1918 (1987).
75. Chow, L. T., Nasser, M., Wolinsky, S. M. & Broker, T. R. Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J. Virol.* **61**, 2581–2588 (1987).
76. Doorbar, J. *et al.* Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**, 254–262 (1990).
77. Wang, X., Meyers, C., Wang, H.-K., Chow, L. T. & Zheng, Z.-M. Construction of a full transcription map of human papillomavirus type 18 during productive viral infection. *J. Virol.* **85**, 8080–8092 (2011).
78. Doorbar, J. *et al.* Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* **238**, 40–52 (1997).
79. Davy, C. E. *et al.* Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **76**, 9806–9818 (2002).
80. Davy, C. E. *et al.* Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J. Virol.* **79**, 3998–4011 (2005).
81. Knight, G. L., Turnell, A. S. & Roberts, S. Role for Wee1 in inhibition of G2-to-M transition through the cooperation of distinct human papillomavirus type 1 E4 proteins. *J. Virol.* **80**, 7416–7426 (2006).
82. Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D. & Lambert, P. F. Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J. Virol.* **79**, 13150–13165 (2005).
83. McIntosh, P. B. *et al.* E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J. Cell Sci.* **123**, 2810–2822 (2010).
84. Borgogna, C. *et al.* Characterization of beta papillomavirus E4 expression in tumours from Epidermodysplasia Verruciformis patients and in experimental models. *Virology* **423**, 195–204 (2012).
85. Griffin, H. *et al.* E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PLoS One* **7**, e49974 (2012).
86. Doorbar, J. & Cubie, H. Molecular basis for advances in cervical screening. *Mol. Diagn. J. Devoted Underst. Hum. Dis. Clin. Appl. Mol. Biol.* **9**, 129–142 (2005).
87. Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G. & Harrison, S. C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell* **5**, 557–567 (2000).
88. Buck, C. B. & Trus, B. L. The papillomavirus virion: a machine built to hide molecular Achilles' heels. *Adv. Exp. Med. Biol.* **726**, 403–422 (2012).

89. Schiller, J. T. & Lowy, D. R. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 681–692 (2012).
90. Wang, J. W. & Roden, R. B. S. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 129–141 (2013).
91. Buck, C. B. *et al.* Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* **82**, 5190–5197 (2008).
92. Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S. & Garcea, R. L. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **77**, 4818–4826 (2003).
93. Okun, M. M. *et al.* L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation. *J. Virol.* **75**, 4332–4342 (2001).
94. Day, P. M. & Schiller, J. T. The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol.* **4**, 1255–1262 (2009).
95. Yang, R. *et al.* Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J. Virol.* **77**, 3531–3541 (2003).
96. Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**, 1565–1570 (2001).
97. Culp, T. D., Spatz, C. M., Reed, C. A. & Christensen, N. D. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology* **361**, 435–446 (2007).
98. Bergant, M. & Banks, L. SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. *J. Virol.* **87**, 1270–1273 (2013).
99. Zhou, J., Sun, X. Y., Louis, K. & Frazer, I. H. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* **68**, 619–625 (1994).
100. Holmgren, S. C., Patterson, N. A., Ozbun, M. A. & Lambert, P. F. The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J. Virol.* **79**, 3938–3948 (2005).
101. Lin, Z. *et al.* Expression pattern and subcellular localization of human papillomavirus minor capsid protein L2. *Am. J. Pathol.* **174**, 136–143 (2009).
102. Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 207–217 (2009).
103. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. & Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 3471–3480 (2013).

104. Doorbar, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* **110**, 525–541 (2006).
105. Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **32 Suppl 1**, S7-15 (2005).
106. Lambert, P. F. *et al.* Using an Immortalized Cell Line to Study the HPV Life Cycle in Organotypic. in *Human Papillomaviruses* **119**, 141–156 (Humana Press, 2005).
107. Egawa, K. Do Human Papillomaviruses Target Epidermal Stem Cells? *Dermatology* **207**, 251–254 (2003).
108. Burghardt, E. & Ostör, A. G. Site and origin of squamous cervical cancer: a histomorphologic study. *Obstet. Gynecol.* **62**, 117–127 (1983).
109. Maddox, P., Sasieni, P., Szarewski, A., Anderson, M. & Hanby, A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **52**, 41–46 (1999).
110. Herfs, M. *et al.* Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Slug and Snail Transcription Factor Up-Regulation Reduces the Density of Langerhans Cells in Epithelial Metaplasia by Affecting E-Cadherin Expression. *Am. J. Pathol.* **172**, 1391–1402 (2008).
111. Herfs, M. *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 10516–10521 (2012).
112. Mirkovic, J. *et al.* Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction: Carcinogenic HPV infection in the cervical SCJ. *J. Pathol.* **236**, 265–271 (2015).
113. Wang, X. *et al.* Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia. *Cell* **145**, 1023–1035 (2011).
114. Yang, E. J. *et al.* Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **28**, 994–1000 (2015).
115. Boxman, I. L. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 712–715 (1997).
116. Johnson, K. M. *et al.* Role of Heparan Sulfate in Attachment to and Infection of the Murine Female Genital Tract by Human Papillomavirus. *J. Virol.* **83**, 2067–2074 (2009).
117. Combita, A. L. *et al.* Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 183–188 (2001).
118. Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G. & Christensen, N. D. Keratinocyte-Secreted Laminin 5 Can Function as a Transient Receptor for Human Papillomaviruses by Binding Virions and Transferring Them to Adjacent Cells. *J. Virol.* **80**, 8940–8950 (2006).

119. Schelhaas, M. *et al.* Entry of Human Papillomavirus Type 16 by Actin-Dependent, Clathrin- and Lipid Raft-Independent Endocytosis. *PLoS Pathog.* **8**, e1002657 (2012).
120. Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1522–1527 (2006).
121. Cerqueira, C., Samperio Ventayol, P., Vogeley, C. & Schelhaas, M. Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *J. Virol.* **89**, 7038–7052 (2015).
122. Cerqueira, C. *et al.* Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus Type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure: Interactions of HPV-16 with GAGs. *Cell. Microbiol.* n/a-n/a (2013). doi:10.1111/cmi.12150
123. Evander, M. *et al.* Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**, 2449–2456 (1997).
124. McMillan, N. A. J., Payne, E., Frazer, I. H. & Evander, M. Expression of the $\alpha 6$ Integrin Confers Papillomavirus Binding upon Receptor-Negative B-Cells. *Virology* **261**, 271–279 (1999).
125. Scheffer, K. D. *et al.* Tetraspanin CD151 Mediates Papillomavirus Type 16 Endocytosis. *J. Virol.* **87**, 3435–3446 (2013).
126. Dziduszko, A. & Ozbun, M. A. Annexin A2 and S100A10 Regulate Human Papillomavirus Type 16 Entry and Intracellular Trafficking in Human Keratinocytes. *J. Virol.* **87**, 7502–7515 (2013).
127. Woodham, A. W. *et al.* The S100A10 Subunit of the Annexin A2 Heterotetramer Facilitates L2-Mediated Human Papillomavirus Infection. *PLoS ONE* **7**, e43519 (2012).
128. Bousarghin, L., Touzé, A., Sizaret, P.-Y. & Coursaget, P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* **77**, 3846–3850 (2003).
129. Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**, 142–150 (1998).
130. Spoden, G. *et al.* Clathrin- and Caveolin-Independent Entry of Human Papillomavirus Type 16—Involvement of Tetraspanin-Enriched Microdomains (TEMs). *PLoS ONE* **3**, e3313 (2008).
131. Aydin, I. *et al.* Large Scale RNAi Reveals the Requirement of Nuclear Envelope Breakdown for Nuclear Import of Human Papillomaviruses. *PLoS Pathog.* **10**, e1004162 (2014).
132. Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P. & Lambert, P. F. Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathog.* **5**, e1000318 (2009).
133. Parish, J. L., Bean, A. M., Park, R. B. & Androphy, E. J. ChIR1 Is Required for Loading Papillomavirus E2 onto Mitotic Chromosomes and Viral Genome Maintenance. *Mol. Cell* **24**, 867–876 (2006).

134. McBride, A. A. Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. in *Advances in Virus Research* **72**, 155–205 (Elsevier, 2008).
135. You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K. & Howley, P. M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**, 349–360 (2004).
136. Münger, K. *et al.* Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**, 7888–7898 (2001).
137. Longworth, M. S. & Laimins, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **78**, 3533–3541 (2004).
138. Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. & McCance, D. J. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* **15**, 1950–1960 (1996).
139. Funk, J. O. *et al.* Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**, 2090–2100 (1997).
140. Li, B. & Dou, Q. P. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3850–3855 (2000).
141. Thomas, M. & Banks, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**, 2943–2954 (1998).
142. Middleton, K. *et al.* Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* **77**, 10186–10201 (2003).
143. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. & Sapp, M. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. *J. Virol.* **76**, 10009–10014 (2002).
144. Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., Maul, G. G. & Sapp, M. Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **78**, 1121–1128 (2004).
145. Modis, Y. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* **21**, 4754–4762 (2002).
146. Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824–827 (1991).
147. Wang, Q. *et al.* Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J. Virol.* **78**, 821–833 (2004).
148. Bryan, J. T. & Brown, D. R. Association of the human papillomavirus type 11 E1(=)E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* **277**, 262–269 (2000).

149. Lehr, E., Hohl, D., Huber, M. & Brown, D. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J. Med. Virol.* **72**, 478–483 (2004).
150. Rascovan, N., Duraisamy, R. & Desnues, C. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 125–141 (2016).
151. Hannigan, G. D. *et al.* The Human Skin Double-Stranded DNA Virome: Topographical and Temporal Diversity, Genetic Enrichment, and Dynamic Associations with the Host Microbiome. *mBio* **6**, e01578-15 (2015).
152. Wylie, K. M. *et al.* Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. *BMC Biol.* **12**, 71 (2014).
153. Ma, Y. *et al.* Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. *J. Virol.* **88**, 4786–4797 (2014).
154. Oh, J., Byrd, A. L., Park, M., Kong, H. H. & Segre, J. A. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell* **165**, 854–866 (2016).
155. Antonsson, A., Karanfilovska, S., Lindqvist, P. G. & Hansson, B. G. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2509–2514 (2003).
156. Hsu, J. Y.-C., Chen, A. C.-H., Keleher, A., McMillan, N. A. J. & Antonsson, A. Shared and persistent asymptomatic cutaneous human papillomavirus infections in healthy skin. *J. Med. Virol.* **81**, 1444–1449 (2009).
157. Antonsson, A. Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *J. Gen. Virol.* **84**, 1881–1886 (2003).
158. Coleman, N. *et al.* Immunological events in regressing genital warts. *Am. J. Clin. Pathol.* **102**, 768–774 (1994).
159. Evans, C. *et al.* HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **42**, 151–160 (1996).
160. Nakagawa, M. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J. Infect. Dis.* **175**, 927–931 (1997).
161. Monnier-Benoit, S. *et al.* Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* **102**, 22–31 (2006).
162. Park, J. S. *et al.* Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 6764–6769 (2000).

163. Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. & Howley, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**, 2061–2072 (1998).
164. Li, S. *et al.* The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- α . *Oncogene* **18**, 5727–5737 (1999).
165. Nees, M. *et al.* Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J. Virol.* **75**, 4283–4296 (2001).
166. Georgopoulos, N. T., Proffitt, J. L. & Blair, G. E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 4930–4935 (2000).
167. Bottley, G. *et al.* High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* **27**, 1794–1799 (2008).
168. Zhou, F., Chen, J. & Zhao, K.-N. Human papillomavirus 16-encoded E7 protein inhibits IFN- γ -mediated MHC class I antigen presentation and CTL-induced lysis by blocking IRF-1 expression in mouse keratinocytes. *J. Gen. Virol.* **94**, 2504–2514 (2013).
169. Ashrafi, G. H., Haghshenas, M., Marchetti, B. & Campo, M. S. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int. J. Cancer* **119**, 2105–2112 (2006).
170. Bruni, L. *et al.* Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.* **202**, 1789–1799 (2010).
171. Majewski, S. & Jablonska, S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 659–685; quiz 686–688 (1997).
172. Clifford, G. *et al.* Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *The Lancet* **366**, 991–998 (2005).
173. Petry, K. U. *et al.* Prevalence of low-risk HPV types and genital warts in women born 1988/89 or 1983/84 -results of WOLVES, a population-based epidemiological study in Wolfsburg, Germany. *BMC Infect. Dis.* **12**, (2012).
174. Guan, P. *et al.* Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int. J. Cancer* **131**, 2349–2359 (2012).
175. Hording, U., Dugaard, S., Junge, J. & Lundvall, F. Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **15**, 230–234 (1996).
176. Toki, T. *et al.* Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* **10**, 107–125 (1991).

177. Rubin, M. A. *et al.* Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **159**, 1211–1218 (2001).
178. De Vuyst, H., Clifford, G. M., Nascimento, M. C., Madeleine, M. M. & Franceschi, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. *Int. J. Cancer* **124**, 1626–1636 (2009).
179. Vera-Iglesias, E., García-Arpa, M., Sánchez-Caminero, P., Romero-Aguilera, G. & Cortina de la Calle, P. [Focal epithelial hyperplasia]. *Actas Dermosifiliogr.* **98**, 621–623 (2007).
180. Wiatrak, B. J., Wiatrak, D. W., Broker, T. R. & Lewis, L. Recurrent respiratory papillomatosis: a longitudinal study comparing severity associated with human papilloma viral types 6 and 11 and other risk factors in a large pediatric population. *The Laryngoscope* **114**, 1–23 (2004).
181. Lindman, J. P., Lewis, L. S., Accortt, N. & Wiatrak, B. J. Use of the Pediatric Quality of Life Inventory to assess the health-related quality of life in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **114**, 499–503 (2005).
182. Derkay, C. S. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **121**, 1386–1391 (1995).
183. Elrefaey, S., Massaro, M. A., Chiocca, S., Chiesa, F. & Ansarin, M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. Organo Uff. Della Soc. Ital. Otorinolaringol. E Chir. Cerv.-facc.* **34**, 299–309 (2014).
184. Mehanna, H. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* **35**, 747–755 (2013).
185. van Haalen, F. M., Bruggink, S. C., Gussekloo, J., Assendelft, W. J. J. & Eekhof, J. A. H. Warts in primary schoolchildren: prevalence and relation with environmental factors. *Br. J. Dermatol.* **161**, 148–152 (2009).
186. Rübben, A., Krones, R., Schwetschenau, B. & Grussendorf-Conen, E. I. Common warts from immunocompetent patients show the same distribution of human papillomavirus types as common warts from immunocompromised patients. *Br. J. Dermatol.* **128**, 264–270 (1993).
187. Rübben, A., Kalka, K., Spelten, B. & Grussendorf-Conen, E. I. Clinical features and age distribution of patients with HPV 2/27/57-induced common warts. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 337–340 (1997).
188. Hagiwara, K. *et al.* A genotype distribution of human papillomaviruses detected by polymerase chain reaction and direct sequencing analysis in a large sample of common warts in Japan. *J. Med. Virol.* **77**, 107–112 (2005).
189. Keefe, M. *et al.* Cutaneous warts in butchers. *Br. J. Dermatol.* **130**, 9–14 (1994).
190. McKee, P. H. *et al.* Carcinoma cuniculatum: a cast metastasizing to skin and lymph nodes. *Clin. Exp. Dermatol.* **6**, 613–618 (1981).

191. Egawa, K., Honda, Y., Inaba, Y. & Ono, T. Pigmented viral warts: a clinical and histopathological study including human papillomavirus typing. *Br. J. Dermatol.* **138**, 381–389 (1998).
192. Zheng, S. *et al.* Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.* **152**, 1243–1247 (2005).
193. Forslund, O. *et al.* Cutaneous Human Papillomaviruses Found in Sun-Exposed Skin: *Beta-papillomavirus* Species 2 Predominates in Squamous Cell Carcinoma. *J. Infect. Dis.* **196**, 876–883 (2007).
194. Alam, M., Caldwell, J. B. & Eliezri, Y. D. Human papillomavirus-associated digital squamous cell carcinoma: Literature review and report of 21 new cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 385–393 (2003).
195. Bouwes Bavinck, J. N. *et al.* Multicenter study of the association between betapapillomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **70**, 9777–9786 (2010).
196. Bosch, F. X. & de Sanjosé, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 3–13 (2003).
197. Steenbergen, R. D. M., Snijders, P. J. F., Heideman, D. A. M. & Meijer, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 395–405 (2014).
198. Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *PLoS Pathog.* **5**, e1000605 (2009).
199. Spriggs, C. & Laimins, L. Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. *Viruses* **9**, 232 (2017).
200. Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690–7700 (1999).
201. Ekström, J., Forslund, O. & Dillner, J. Three novel papillomaviruses (HPV109, HPV112 and HPV114) and their presence in cutaneous and mucosal samples. *Virology* **397**, 331–336 (2010).
202. Kabsch, K. *et al.* The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology* **47**, 48–56 (2004).
203. Kabsch, K. & Alonso, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J. Virol.* **76**, 12162–12172 (2002).
204. Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T. & Galloway, D. A. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* **18**, 2269–2282 (2004).
205. Glaunsinger, B. A., Lee, S. S., Thomas, M., Banks, L. & Javier, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 5270–5280 (2000).

206. Thomas, M. *et al.* Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**, 5088–5096 (2002).
207. Kiyono, T. *et al.* Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11612–11616 (1997).
208. Duensing, S. & Münger, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int. J. Cancer* **109**, 157–162 (2004).
209. Duensing, S. & Münger, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res.* **62**, 7075–7082 (2002).
210. Munger, K. *et al.* Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J. Virol.* **78**, 11451–11460 (2004).
211. Pim, D., Collins, M. & Banks, L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* **7**, 27–32 (1992).
212. Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J. & McCance, D. J. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* **67**, 4521–4532 (1993).
213. Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaissert, H. & Alonso, A. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp. Cell Res.* **241**, 76–83 (1998).
214. Tomakidi, P., Cheng, H., Kohl, A., Komposch, G. & Alonso, A. Modulation of the epidermal growth factor receptor by the human papillomavirus type 16 E5 protein in raft cultures of human keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 407–412 (2000).
215. Straight, S. W., Herman, B. & McCance, D. J. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* **69**, 3185–3192 (1995).
216. Lomas, A., Leonardi-Bee, J. & Bath-Hextall, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer: Worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* **166**, 1069–1080 (2012).
217. Xiang, F., Lucas, R., Hales, S. & Neale, R. Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. *JAMA Dermatol.* **150**, 1063–1071 (2014).
218. Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y. & Favre, M. The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 348–370 (2009).
219. Lindelöf, B., Sigurgeirsson, B., Gäbel, H. & Stern, R. S. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br. J. Dermatol.* **143**, 513–519 (2000).

220. Nindl, I., Gottschling, M. & Stockfleth, E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis. Markers* **23**, 247–259 (2007).
221. Silverberg, M. J. *et al.* HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 350–360 (2013).
222. Patel, A. S., Karagas, M. R., Perry, A. E. & Nelson, H. H. Exposure profiles and human papillomavirus infection in skin cancer: an analysis of 25 genus beta-types in a population-based study. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2888–2893 (2008).
223. Iannacone, M. R. *et al.* Case-control study of genus-beta human papillomaviruses in plucked eyebrow hairs and cutaneous squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **134**, 2231–2244 (2014).
224. Mackintosh, L. J. *et al.* Presence of beta human papillomaviruses in nonmelanoma skin cancer from organ transplant recipients and immunocompetent patients in the West of Scotland. *Br. J. Dermatol.* **161**, 56–62 (2009).
225. Iannacone, M. R. *et al.* Case-control study of cutaneous human papillomavirus infection in Basal cell carcinoma of the skin. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1512–1520 (2013).
226. Struijk, L. *et al.* Presence of human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs is associated with a history of cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1531–1535 (2003).
227. Karagas, M. R. *et al.* Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 389–395 (2006).
228. Struijk, L. *et al.* Markers of cutaneous human papillomavirus infection in individuals with tumor-free skin, actinic keratoses, and squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **15**, 529–535 (2006).
229. Weissenborn, S. J. *et al.* Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 93–97 (2005).
230. Waterboer, T. *et al.* Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin. *Br. J. Dermatol.* **159**, 457–459 (2008).
231. Farzan, S. F. *et al.* Cutaneous alpha, beta and gamma human papillomaviruses in relation to squamous cell carcinoma of the skin: a population-based study. *Int. J. Cancer* **133**, 1713–1720 (2013).
232. Iannacone, M. R. *et al.* Case-control study of cutaneous human papillomaviruses in squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **21**, 1303–1313 (2012).
233. Karagas, M. R. *et al.* Genus beta human papillomaviruses and incidence of basal cell and squamous cell carcinomas of skin: population based case-control study. *BMJ* **341**, c2986 (2010).
234. Muschik, D. *et al.* Cutaneous HPV23 E6 prevents p53 phosphorylation through interaction with HIPK2. *PLoS One* **6**, e27655 (2011).

235. Jackson, S. & Storey, A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* **19**, 592–598 (2000).
236. Underbrink, M. P., Howie, H. L., Bedard, K. M., Koop, J. I. & Galloway, D. A. E6 Proteins from Multiple Human Betapapillomavirus Types Degrade Bak and Protect Keratinocytes from Apoptosis after UVB Irradiation. *J. Virol.* **82**, 10408–10417 (2008).
237. Tommasino, M. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res.* **231**, 128–138 (2017).
238. Howie, H. L. *et al.* Beta-HPV 5 and 8 E6 promote p300 degradation by blocking AKT/p300 association. *PLoS Pathog.* **7**, e1002211 (2011).
239. Muench, P. *et al.* Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis. *Cancer Res.* **70**, 6913–6924 (2010).
240. Accardi, R. *et al.* Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of Δ Np73. *EMBO Rep.* **7**, 334–340 (2006).
241. Saidj, D. *et al.* Oncoprotein E7 from Beta Human Papillomavirus 38 Induces Formation of an Inhibitory Complex for a Subset of p53-Regulated Promoters. *J. Virol.* **87**, 12139–12150 (2013).
242. Sri, J. C. *et al.* Generalized verrucosis: a review of the associated diseases, evaluation, and treatments. *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 292–311 (2012).
243. Rezaei, N., Hedayat, M., Aghamohammadi, A. & Nichols, K. E. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1329–1341.e2; quiz 1342–1343 (2011).
244. Orth, G. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin. Immunol.* **18**, 362–374 (2006).
245. Gewirtzman, A., Bartlett, B. & Tying, S. Epidermodysplasia verruciformis and human papilloma virus: *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 141–146 (2008).
246. Majewski, S. *et al.* Partial defects of cell-mediated immunity in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **15**, 966–973 (1986).
247. Pereira de Oliveira, W. R., Carrasco, S., Neto, C. F., Rady, P. & Tying, S. K. Nonspecific cell-mediated immunity in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J. Dermatol.* **30**, 203–209 (2003).
248. Gliński, W. *et al.* Cell-mediated immunity in epidermodysplasia verruciformis. *Dermatologica* **153**, 218–227 (1976).
249. Gliński, W., Obałek, S., Jabłońska, S. & Orth, G. T cell defect in patients with epidermodysplasia verruciformis due to human papillomavirus type 3 and 5. *Dermatologica* **162**, 141–147 (1981).

250. Haftek, M., Jabłonska, S. & Orth, G. Specific cell-mediated immunity in patients with epidermodysplasia verruciformis and plane warts. *Dermatologica* **170**, 213–220 (1985).
251. Prawer, S. E. *et al.* Depressed immune function in epidermodysplasia verruciformis. *Arch. Dermatol.* **113**, 495–499 (1977).
252. Pyrhönen, S., Jablonska, S., Obałek, S. & Kuismanen, E. Immune reactions in epidermodysplasia verruciformis. *Br. J. Dermatol.* **102**, 247–254 (1980).
253. Cooper, K. D., Androphy, E. J., Lowy, D. & Katz, S. I. Antigen presentation and T-cell activation in epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 769–776 (1990).
254. Kamiński, M. *et al.* Increased natural killer cell activity in patients with epidermodysplasia verruciformis. *Arch. Dermatol.* **121**, 84–86 (1985).
255. Majewski, S. *et al.* Natural cell-mediated cytotoxicity against various target cells in patients with epidermodysplasia verruciformis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **22**, 423–427 (1990).
256. de Oliveira, W. R. P. *et al.* Polymorphisms of the interleukin 10 gene promoter in patients from Brazil with epidermodysplasia verruciformis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 639–643 (2003).
257. Androphy, E. J., Dvoretzky, I. & Lowy, D. R. X-linked inheritance of epidermodysplasia verruciformis. Genetic and virologic studies of a kindred. *Arch. Dermatol.* **121**, 864–868 (1985).
258. McDermott, D. F. *et al.* Autosomal dominant epidermodysplasia verruciformis lacking a known EVER1 or EVER2 mutation. *Pediatr. Dermatol.* **26**, 306–310 (2009).
259. Ramoz, N. *et al.* Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat. Genet.* **32**, 579–581 (2002).
260. Zuelzer, W. W. 'MYELOKATHEXIS'--A NEW FORM OF CHRONIC GRANULOCYTOPENIA. REPORT OF A CASE. *N. Engl. J. Med.* **270**, 699–704 (1964).
261. Krill, C. E., Smith, H. D. & Mauer, A. M. CHRONIC IDIOPATHIC GRANULOCYTOPENIA. *N. Engl. J. Med.* **270**, 973–979 (1964).
262. Beaussant Cohen, S. *et al.* Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French Severe Chronic Neutropenia Registry. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 71 (2012).
263. Kawai, T. & Malech, H. L. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 20–26 (2009).
264. Diaz, G. A. CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system? *Immunol. Rev.* **203**, 235–243 (2005).
265. Gorlin, R. J. *et al.* WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: clinical, hematological, and molecular studies. *Am. J. Med. Genet.* **91**, 368–376 (2000).

266. Palm, M. D., Tying, S. K., Rady, P. L. & Tharp, M. D. Human papillomavirus typing of verrucae in a patient with WHIM syndrome. *Arch. Dermatol.* **146**, 931–932 (2010).
267. Yoshii, Y. *et al.* Primary cutaneous follicle center lymphoma in a patient with WHIM syndrome. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **30**, 529–530 (2016).
268. Tassone, L. *et al.* Clinical and genetic diagnosis of warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome in 10 patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 1170–1173.e3 (2009).
269. Wetzler, M. *et al.* A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am. J. Med.* **89**, 663–672 (1990).
270. Tarzi, M. D. *et al.* Sporadic case of warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, and myelokathexis syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 1101–1105 (2005).
271. Cipriani, N. A., Blair, E. & Taxy, J. B. WHIM syndrome and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **109**, 105–108 (2010).
272. Balabanian, K. *et al.* WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* **105**, 2449–2457 (2005).
273. Meuris, F. *et al.* The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. *PLOS Pathog.* **12**, e1006039 (2016).
274. Heusinkveld, L. E. *et al.* Pathogenesis, diagnosis and therapeutic strategies in WHIM syndrome immunodeficiency. *Expert Opin. Orphan Drugs* **5**, 813–825 (2017).
275. Balabanian, K. *et al.* Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J. Clin. Invest.* **118**, 1074–1084 (2008).
276. Dale, D. C. *et al.* The CXCR4 antagonist plerixafor is a potential therapy for myelokathexis, WHIM syndrome. *Blood* **118**, 4963–4966 (2011).
277. McDermott, D. H. *et al.* The CXCR4 antagonist plerixafor corrects panleukopenia in patients with WHIM syndrome. *Blood* **118**, 4957–4962 (2011).
278. Rodrigues, N. P. *et al.* Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* **106**, 477–484 (2005).
279. Bigley, V. *et al.* The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* **208**, 227–234 (2011).
280. Hahn, C. N. *et al.* Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **43**, 1012–1017 (2011).
281. Vinh, D. C. *et al.* Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* **115**, 1519–1529 (2010).

282. Emberger, J. M., Navarro, M., Dejean, M. & Izarn, P. [Deaf-mutism, lymphedema of the lower limbs and hematological abnormalities (acute leukemia, cytopenia) with autosomal dominant transmission]. *J. Genet. Hum.* **27**, 237–245 (1979).
283. Dickinson, R. E. *et al.* Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* **118**, 2656–2658 (2011).
284. Hsu, A. P. *et al.* Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* **118**, 2653–2655 (2011).
285. Ostergaard, P. *et al.* Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat. Genet.* **43**, 929–931 (2011).
286. Schmook, T. *et al.* Viral warts in organ transplant recipients: new aspects in therapy. *Br. J. Dermatol.* **149 Suppl 66**, 20–24 (2003).
287. Moloney, F. J., Keane, S., O’Kelly, P., Conlon, P. J. & Murphy, G. M. The impact of skin disease following renal transplantation on quality of life: Skin disease effect on QoL after renal transplant. *Br. J. Dermatol.* **153**, 574–578 (2005).
288. Kohler, A. *et al.* Genomic characterization of ten novel cutaneous human papillomaviruses from keratotic lesions of immunosuppressed patients. *J. Gen. Virol.* **92**, 1585–1594 (2011).
289. Berkhout, R. J., Bouwes Bavinck, J. N. & ter Schegget, J. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2087–2096 (2000).
290. Harwood, C. A. *et al.* Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* **61**, 289–297 (2000).
291. Bouwes Bavinck, J. N., Feltkamp, M., Struijk, L. & ter Schegget, J. Human Papillomavirus Infection and Skin Cancer Risk in Organ Transplant Recipients. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **6**, 207–211 (2001).
292. Alimagham, M. *et al.* Frequency of infectious skin lesions in kidney transplant recipients. *Urol. J.* **2**, 193–196 (2005).
293. London, N. J., Farmery, S. M., Will, E. J., Davison, A. M. & Lodge, J. P. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet Lond. Engl.* **346**, 403–406 (1995).
294. Rose, B. *et al.* Human Papillomavirus in the Oral Cavity of Patients with and without Renal Transplantation: *Transplantation* **82**, 570–573 (2006).
295. Abramowitz, L. *et al.* Anal squamous intraepithelial lesions and condyloma in HIV-infected heterosexual men, homosexual men and women: prevalence and associated factors. *AIDS Lond. Engl.* **21**, 1457–1465 (2007).

296. Meys, R., Gotch, F. M. & Bunker, C. B. Human papillomavirus in the era of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus: an immune reconstitution-associated disease? *Br. J. Dermatol.* **162**, 6–11 (2010).
297. Barzegar, C. *et al.* Epidermodysplasia verruciformis-like eruption complicating human immunodeficiency virus infection. *Br. J. Dermatol.* **139**, 122–127 (1998).
298. Huiras, E., Preda, V., Maurer, T. & Whitfeld, M. Cutaneous manifestations of immune reconstitution inflammatory syndrome: *Curr. Opin. HIV AIDS* **3**, 453–460 (2008).
299. Crum-Cianflone, N. F. Immune reconstitution inflammatory syndromes: what's new? *AIDS Read.* **16**, 199–206, 213, 216–217; discussion 214–217 (2006).
300. Iarikov, D., Duke, W. & Skiest, D. Extensive development of flat warts as a cutaneous manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Read.* **18**, 524–527 (2008).
301. Kerob, D. *et al.* A Case of Efflorescence of Cutaneous Warts as a Manifestation of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in an HIV-Infected Patient. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 405–406 (2007).
302. Jevtovic, D. *et al.* The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* **6**, 140–143 (2005).
303. Hu, W., Nuovo, G., Willen, M. & Somach, S. Epidermodysplasia Verruciformis in Two Half Brothers with HIV Infection. *J. Cutan. Med. Surg.* **8**, 357–360 (2004).
304. Sébastien Hantz, Sophie Alain, François Denis. Diagnostic des infections à papillomavirus : état des lieux et perspectives. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* 20–32 (2010).
305. Kleter, B. *et al.* Novel Short-Fragment PCR Assay for Highly Sensitive Broad-Spectrum Detection of Anogenital Human Papillomaviruses. *Am. J. Pathol.* **153**, 1731–1739 (1998).
306. Hesselink, A. T. *et al.* Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-Line Blot Assays for Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Samples from Women with Normal Cytology Results Who Develop Grade 3 Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3215–3221 (2008).
307. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017–Recommendations. *Vaccine* **35**, 5753–5755 (2017).
308. Rivera, A. & Tying, S. K. Therapy of cutaneous human Papillomavirus infections. *Dermatol. Ther.* **17**, 441–448 (2004).
309. Läuchli, S., Kempf, W., Dragieva, G., Burg, G. & Hafner, J. CO₂ laser treatment of warts in immunosuppressed patients. *Dermatol. Basel Switz.* **206**, 148–152 (2003).
310. Lipke, M. M. An armamentarium of wart treatments. *Clin. Med. Res.* **4**, 273–293 (2006).

311. Mahajan, V., Jindal, N., Vohra, S., Sharma, N. & Shanker, V. Autosomal dominant epidermodysplasia verruciformis: A clinicotherapeutic experience in two cases. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **76**, 557 (2010).
312. Berthelot, C. *et al.* Treatment of a patient with epidermodysplasia verruciformis carrying a novel EVER2 mutation with imiquimod. *J. Am. Acad. Dermatol.* **56**, 882–886 (2007).
313. Hayashi, J., Matsui, C., Mitsuishi, T., Kawashima, M. & Morohashi, M. Treatment of localized epidermodysplasia verruciformis with tacalcitol ointment. *Int. J. Dermatol.* **41**, 817–820 (2002).
314. Anadolu, R. *et al.* Treatment of epidermodysplasia verruciformis with a combination of acitretin and interferon alfa-2a. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**, 296–299 (2001).
315. Micali, G., Nasca, M. R., Dall'Oglio, F. & Musumeci, M. L. Cimetidine therapy for epidermodysplasia verruciformis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, S9–10 (2003).
316. Karrer, S. *et al.* Epidermodysplasia verruciformis treated using topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* **140**, 935–938 (1999).
317. Gissmann, L., Pfister, H. & Zur Hausen, H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**, 569–580 (1977).
318. Gissmann, L. & zur Hausen, H. Physical characterization of deoxyribonucleic acids of different human papilloma viruses (HPV). *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **166**, 3–11 (1978).
319. Favre, M., Orth, G., Croissant, O. & Yaniv, M. Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4810–4814 (1975).
320. Orth, G. *et al.* Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1537–1541 (1978).
321. Danos, O., Katinka, M. & Yaniv, M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* **1**, 231–236 (1982).
322. Danos, O., Katinka, M. & Yaniv, M. Molecular cloning, refined physical map and heterogeneity of methylation sites of papilloma virus type 1a DNA. *Eur. J. Biochem.* **109**, 457–461 (1980).
323. Heilman, C. A., Law, M. F., Israel, M. A. & Howley, P. M. Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences. *J. Virol.* **36**, 395–407 (1980).
324. Bzhalava, D., Eklund, C. & Dillner, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* **476**, 341–344 (2015).
325. Hošnjak, L., Fujs Komloš, K., Kocjan, B. J., Seme, K. & Poljak, M. Development of a novel multiplex type-specific quantitative real-time PCR for detection and differentiation of infections with human papillomavirus types HPV2, HPV27, and HPV57. *Acta Dermatovenereol. Alp. Pannonica Adriat.* **25**, (2016).

326. de Koning, M. N. C. *et al.* Evaluation of a Novel Broad-Spectrum PCR-Multiplex Genotyping Assay for Identification of Cutaneous Wart-Associated Human Papillomavirus Types. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1706–1711 (2010).
327. Bauer, H. M. *et al.* Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* **265**, 472–477 (1991).
328. Snijders, P. J. *et al.* The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* **71 (Pt 1)**, 173–181 (1990).
329. Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquist, B. & Hansson, B. G. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.* **80 (Pt 9)**, 2437–2443 (1999).
330. Chouhy, D. *et al.* New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel Beta-papillomavirus species 3. *Virology* **397**, 205–216 (2010).
331. Tieben, L. M. *et al.* Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J. Virol. Methods* **42**, 265–279 (1993).
332. Harwood, C. A. *et al.* Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3545–3555 (1999).
333. Brink, A. A. T. P. *et al.* Development of a General-Primer-PCR-Reverse-Line-Blotting System for Detection of Beta and Gamma Cutaneous Human Papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5581–5587 (2005).
334. Coutlée, F. *et al.* Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 902–907 (2002).
335. de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 4)**, 1057–1062 (1995).
336. Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T. & Pawlita, M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1050–1059 (2008).
337. Soderlund-Strand, A., Carlson, J. & Dillner, J. Modified General Primer PCR System for Sensitive Detection of Multiple Types of Oncogenic Human Papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 541–546 (2009).
338. Forslund, O., Ly, H. & Higgins, G. Improved detection of cutaneous human papillomavirus DNA by single tube nested 'hanging droplet' PCR. *J. Virol. Methods* **110**, 129–136 (2003).

339. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 3020–7 (1998).
340. Perrons, C., Jelley, R., Kleter, B., Quint, W. & Brink, N. Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **32**, 278–285 (2005).
341. Castle, P. E. *et al.* Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3437–3445 (2008).
342. Hwang, T. S. *et al.* Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol. Oncol.* **90**, 51–56 (2003).
343. Albrecht, V. *et al.* Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *J. Virol. Methods* **137**, 236–244 (2006).
344. Oh, Y. *et al.* Polymerase chain reaction-based fluorescent Luminex assay to detect the presence of human papillomavirus types. *Cancer Sci.* **98**, 549–554 (2007).
345. Rector, A., Tachezy, R. & Van Ranst, M. A Sequence-Independent Strategy for Detection and Cloning of Circular DNA Virus Genomes by Using Multiply Primed Rolling-Circle Amplification. *J. Virol.* **78**, 4993–4998 (2004).
346. Johne, R., Müller, H., Rector, A., van Ranst, M. & Stevens, H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* **17**, 205–211 (2009).
347. Bzhalava, D. *et al.* Deep sequencing extends the diversity of human papillomaviruses in human skin. *Sci. Rep.* **4**, 5807 (2014).
348. Kim, K.-H. & Bae, J.-W. Amplification Methods Bias Metagenomic Libraries of Uncultured Single-Stranded and Double-Stranded DNA Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7663–7668 (2011).
349. Bahassi, E. M. & Stambrook, P. J. Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis* **29**, 303–310 (2014).
350. Huang, T. Next generation sequencing to characterize mitochondrial genomic DNA heteroplasmy. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **Chapter 19**, Unit19.8 (2011).
351. Bzhalava, D. *et al.* Unbiased Approach for Virus Detection in Skin Lesions. *PLoS ONE* **8**, e65953 (2013).
352. Phan, T. G. *et al.* The Fecal Viral Flora of Wild Rodents. *PLoS Pathog.* **7**, e1002218 (2011).
353. Tse, H. *et al.* Identification of a Novel Bat Papillomavirus by Metagenomics. *PLoS ONE* **7**, e43986 (2012).
354. Mokili, J. L. *et al.* Identification of a Novel Human Papillomavirus by Metagenomic Analysis of Samples from Patients with Febrile Respiratory Illness. *PLoS ONE* **8**, e58404 (2013).

355. Yu, J. *et al.* Complete genome sequence of a novel human papillomavirus identified by metagenomic analysis from a child with diarrhea in China. *Arch. Virol.* **160**, 549–552 (2015).
356. Akagi, K. *et al.* Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res.* **24**, 185–199 (2014).
357. Barzon, L. *et al.* Human papillomavirus genotyping by 454 next generation sequencing technology. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **52**, 93–97 (2011).
358. Militello, V. *et al.* Accurate human papillomavirus genotyping by 454 pyrosequencing. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, E428–434 (2013).
359. Ambulos, N. P. *et al.* Next-Generation Sequencing-Based HPV Genotyping Assay Validated in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Oropharyngeal and Cervical Cancer Specimens. *J. Biomol. Tech. JBT* **27**, 46–52 (2016).
360. Ekström, J., Bzhalava, D., Svenback, D., Forslund, O. & Dillner, J. High throughput sequencing reveals diversity of Human Papillomaviruses in cutaneous lesions. *Int. J. Cancer* **129**, 2643–2650 (2011).
361. Yi, X. *et al.* Development and Validation of a New HPV Genotyping Assay Based on Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* **141**, 796–804 (2014).
362. Arroyo Mühr, L. S. *et al.* Human papillomavirus type 197 is commonly present in skin tumors. *Int. J. Cancer* **136**, 2546–2555 (2015).
363. Arroyo Mühr, L. S. *et al.* Does human papillomavirus-negative condylomata exist? *Virology* **485**, 283–288 (2015).
364. Johansson, H. *et al.* Metagenomic sequencing of “HPV-negative” condylomas detects novel putative HPV types. *Virology* **440**, 1–7 (2013).
365. Meiring, T. L. *et al.* Next-generation sequencing of cervical DNA detects human papillomavirus types not detected by commercial kits. *Virol. J.* **9**, 164 (2012).
366. Smits, S. L. *et al.* Identification and Characterization of Two Novel Viruses in Ocular Infections in Reindeer. *PLoS ONE* **8**, e69711 (2013).
367. Canuti, M. *et al.* Metagenomic analysis of a sample from a patient with respiratory tract infection reveals the presence of a $\hat{\Gamma}^3$ -papillomavirus. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
368. Maciejewska, A., Jakubowska, J. & Pawłowski, R. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* **127**, 309–319 (2013).
369. Kocjan, B. J., Bzhalava, D., Forslund, O., Dillner, J. & Poljak, M. Molecular methods for identification and characterization of novel papillomaviruses. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 808–816 (2015).

370. Depledge, D. P. *et al.* Specific Capture and Whole-Genome Sequencing of Viruses from Clinical Samples. *PLoS ONE* **6**, e27805 (2011).
371. Houldcroft, C. J., Beale, M. A. & Breuer, J. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 183–192 (2017).
372. Hu, Z. *et al.* Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat. Genet.* (2015). doi:10.1038/ng.3178
373. Holmes, A. *et al.* Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. *Npj Genomic Med.* **1**, (2016).
374. Liu, Y., Lu, Z., Xu, R. & Ke, Y. Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget* **7**, 5852–5864 (2016).

Mots clés : HPV, Séquençage haut-débit, WHIM syndrome, Virome

Résumé : Les papillomavirus humains (HPV) sont classés en 5 genres α , β , γ , μ et η . Leur génome comprend six gènes précoces dont deux oncogènes E6 et E7 et deux gènes tardifs codant les protéines de capsid. Les β - et γ -HPV constituent une part importante du virome cutané. Généralement asymptomatiques ils peuvent se manifester par des papillomatoses et sont associés à certains cancers de la peau, en particulier chez l'immunodéprimé. Les α -HPV ont un tropisme muqueux ; les α -HPV à haut risque (HR) HPV16 et 18 sont impliqués dans 99% des cancers du col de l'utérus.

La détection des α -HR-HPV dans les frottis cervico-utérins lors d'atypie cellulaire de signification indéterminée (ASCUS) constitue une information décisive dans le dépistage du cancer du col de l'utérus, bien que les tests de génotypage ne ciblent que les types les plus fréquents. Le génotypage des β - et γ -HPV devient nécessaire pour l'étude du virome notamment dans des contextes de susceptibilité aux pathogénies HPV (syndrome WHIM : Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis). Cet immunodéficit congénital rare causé par une mutation gain de fonction du récepteur CXCR4 se manifeste dans 70% des cas par des papillomatoses cutanées étendues et ano-génitales évoluant souvent en cancer. Des études du laboratoire ont identifié le rôle intrinsèque de l'axe CXCL12/CXCR4 dérégulé dans la pathogénie virale en démontrant notamment l'action bénéfique du blocage de cet axe par un antagoniste de CXCR4 (AMD3100) *in vitro* et *in vivo* sur l'oncogenèse due à HPV.

Nos objectifs étaient : (i) d'identifier dans des FCU ASCUS, les HPV dont le génotype n'avait pu être déterminé (HPV-X) par un test classique (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II®), (ii) de caractériser le virome HPV d'un patient atteint de WHIM au cours d'un essai thérapeutique par AMD3100 administré à titre compassionnel pendant 7 mois avec pour objectif d'évaluer son impact sur les anomalies associées à HPV.

Dans les deux cas, nous avons mis au point une méthode de génotypage par séquençage haut débit sur Illumina Miseq®. La distribution des génotypes et leur polymorphisme nucléotidique ont été étudiés par analyses comparatives et phylogénétiques. (i) Notre stratégie a permis d'identifier dans 54 ASCUS/HPV-X étudiés une majorité d'HPV bas risque réalisant dans 41% des cas une infection à multiples génotypes (2 à 7), et aussi l'existence de quasi-espèces (41% des FCU) comprenant jusqu'à 17 variants pour un même génotype. Ainsi, de probables compétitions ou défauts d'hybridation des variants minoritaires peuvent expliquer le manque de performance du test INNO-LiPA. (ii) Chez le patient WHIM, le séquençage a été complété par des qPCR spécifiques de types, permettant une étude qualitative et quantitative. L'AMD3100 n'a pas modifié qualitativement le virome HPV cutané composé de 16 types, principalement des β - et γ -HPV, déjà présents 3 ans auparavant dans des verrues cutanées analysées rétrospectivement. En revanche, l'analyse quantitative montre des modifications en proportion relative des génomes viraux suggérant un effet du traitement sur l'expression de certains types pouvant être associés sélectivement à la papillomatose. A cet égard, un des HPV composant le virome cutané du patient qui se trouve être un des deux seuls types présents dans une biopsie profonde de verrue, étaye l'hypothèse d'une sélection dans le processus lésionnel. De plus, les protéines oncogènes E6 et E7 de ce virus présentent des mutations, en comparaison à la séquence du génome HPV de référence, qui pourraient favoriser le potentiel pathogène de ce variant; hypothèse en cours d'investigation.

En conclusion, les techniques de séquençage haut débit que nous avons développées ont permis de mieux caractériser la composition du virome HPV démontrant à la fois sa complexité en génotypes viraux ou en dérivés de ceux-ci (concept de quasi-espèces) et sa dynamique d'évolution qui pourraient sous-tendre le potentiel pathogène de ce virome HPV.

Keywords : HPV, High-throughput sequencing, WHIM syndrome, Virome

Abstract : Human papillomaviruses (HPV) are classified into 5 genera α , β , γ , μ and η . Their genome comprises six early genes including two oncogenes E6 and E7, and two late genes encoding the L1 and L2 capsid proteins. β - and γ -HPV constitute an important part of the cutaneous virome; usually asymptomatic, they can manifest as papillomatosis like warts and are associated with certain skin cancers, especially in immunocompromised patients. α -HPV has a mucosal tropism; high-risk (HR) α -HPV16 and 18 are involved in 99% of cervical cancers.

Detection of α -HR-HPV in cervical samples guide the management of women whose Pap smear result shows atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), although genotyping targets only the most common HPV types. Genotyping of β - and γ -HPV becomes necessary for the study of the virome especially in contexts of susceptibility to HPV pathogenesis (i.e. WHIM syndrome (for Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis)). WHIM syndrome is a rare congenital immunodeficiency caused by a gain-of-function mutation of the CXCR4 receptor of the chemokine CXCL12 and manifests in 70% of cases by extensive cutaneous papillomatosis and ano-genital lesions that often evolve into cancer. Studies in our laboratory have identified the intrinsic role of the dysregulated CXCL12/CXCR4 axis in viral pathogenesis by demonstrating in particular the beneficial action of the blocking of this axis by an antagonist of CXCR4 (AMD3100) *in vitro* and *in vivo* on HPV-associated oncogenesis.

Our objectives were: (i) to identify HPV whose genotype could not be determined (HPV-X) by a conventional test (INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II®) in cervical samples with Pap smear report of ASCUS (ii) to characterize the HPV virome of a patient suffering from WHIM syndrome during a 7-month compassionate AMD3100 clinical trial to assess its impact on HPV-associated abnormalities.

In both cases, we have developed a high-throughput sequencing genotyping method on Illumina Miseq®. The distribution of genotypes and their nucleotide polymorphism were studied by comparative and phylogenetic analyzes. (i) Our strategy identified in the 54 investigated ASCUS/HPV-X a majority of low-risk HPV, achieving a multiple infection (2 to 7 genotypes) in 41% of cases, and also the existence of quasi-species (41% of FCU) comprising up to 17 variants for the same genotype. Thus, probable competitions or hybridization defects of the minority variants may explain the lack of performance of the INNO-LiPA test. (ii) In the WHIM patient, sequencing was supplemented with type-specific qPCRs, allowing a qualitative and quantitative study. AMD3100 did not qualitatively modify the cutaneous HPV virome composed of 16 types, mainly β - and γ -HPV. In contrast, the quantitative analysis shows changes in the relative proportions of viral genomes suggesting a treatment effect on the expression of certain types that can be selectively associated with papillomatosis. In this respect, one of the HPVs belonging to the cutaneous virome of the patient was found to be one of only two types present in a deep wart biopsy. This result supports the hypothesis of HPV selection in the lesion process. In addition, the oncogenic proteins E6 and E7 of this virus have mutations which could promote the pathogenic potential of this viral variant in comparison with the sequence of the reference HPV genome; a hypothesis that is under investigation.

In conclusion, the high throughput sequencing techniques that we have developed have made it possible to better characterize the composition of the HPV virome demonstrating both its complexity in viral genotypes or in derivatives (i.e. quasi-species concept). The dynamics of which may underlie the pathogenic potential of this HPV virome.

