

Host/HPV interactions: focus on keratinocyte innate immune response against HPV

STATE-OF-THE-ART- Human papillomaviruses (HPV) are commensal double-stranded DNA (dsDNA) viruses that selectively infect and replicate into human keratinocytes and reside in skin and mucosal stratified epithelia of healthy individuals. Among the 440 HPV types and variants identified, some are well-known oncogenic types (high-risk HPV, hrHPV), responsible for 32% of human cancers attributable to infectious agents and 5% of all human cancers. Cutaneous HPV (cHPV) are part of skin virome and are mostly associated with an asymptomatic infection, but are also responsible for warts and several epidemiological studies suggest their important role as a cofactor with UV irradiation in non-melanoma skin cancer (NMSC). NMSC are the most frequent cancer in fair-skinned individuals worldwide with more than 5 million new cases per year in the United States and 126-228 thousand new cases per year in France. They have also a strong impact on the quality of life as most NMSCs occurs in sun exposed area (head, neck, face).

OBJECTIVES- Dysfunctional innate immune responses to HPV could be associated with the emergence of pathogenic HPV. To improve our understanding of Host/HPV interactions and identify viral and host factors involved in the transition of commensal HPVs to pathobionts, our project will study the keratinocytes innate immune response against HPV. The aim of this project is to investigate, in different cellular models (2D and 3D cell cultures), the impact of hrHPV vs cHPV E6 and E7 proteins on innate immune receptors (Pattern-recognition receptors, PRRs)-dependent signaling that sense HPV in keratinocytes to trigger antiviral and inflammatory responses and inflammasome activation.

PhD PROJECT- The PhD student will be involved in the characterization of PRRs that sense HPV dsDNA in keratinocytes to trigger innate immune response and the analysis of the impact of E6 and E7 proteins of different cHPV vs hrHPV on the PRR-dependent signaling pathways.

PhD MANAGEMENT- The student will be responsible of developing her/his project under the direction of a full-time researcher, Julien Pothlichet (Inserm Chair "Immunosurveillance & skin virome: relationships and role in inflammatory conditions") with the assistance of team's engineer and technicians. The Head of laboratory, Françoise Bachelerie (UMR996, Inflammation, Microbiome, Immunosurveillance) will co-supervise the PhD within a team that benefits from the complementary expertise of immunologists and virologists.

METHODS- Cell Culture (Primary Keratinocyte and Lines), Skin Organoid Culture (3D Epithelial Cell Culture Model), Expression Vector Transfection and transduction with pseudotyped-lentiviral vectors, Targeted gene inhibition (CRISPR-Cas9 technique and RNA interference), DNA/RNA purification and High-throughput sequencing, Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR), Luciferase reporter assay, ELISA and Meso scale discovery (MSD) assays, Western-blot and Proteomic analysis (Olink proteomics platform), RNAscope and Immunohistochemistry, HPV particles production, purification and infection, Statistical analyses (GraphPad Prism, R software).

EXPECTED RESULTS- It should help to understand how keratinocytes might shape the HPV virome, contain HPV infection and prevent HPV-induced dysplasia. These studies will pave the way for further identification of signaling pathways involved in the risk of HPV dysbiosis and the associated risk of HPV-oncogenesis that may be linked to NMSC.

PROFIL OF THE PhD CANDIDATE- Rigorous, Methodical, Organized, Motivated, Curious, Eager to learn, Lateral thinking, Teamwork, Ability to adapt according to the evolution of the project.

Keywords: Human Papillomavirus (HPV)/host interaction; Innate immunity; Pattern-recognition receptor (PRR); Skin microbiota, Virome, Skin

Interactions VPH/Hôte : focus sur la réponse immunitaire innée des kératinocytes contre les VPH

ETAT DE L'ART-Les papillomavirus humains (VPH) sont des virus à ADN double brin (ADNdb) commensaux qui infectent et se répliquent sélectivement dans les kératinocytes humains et résident dans les épithéliums stratifiés de la peau et des muqueuses des individus sains. Parmi les 440 types et variants de VPH identifiés, certains sont des types oncogènes bien connus (VPH à haut risque, VPH-hr) responsables de 32 % des cancers humains attribuables à des agents infectieux et 5 % de tous les cancers humains. Les VPH cutanés (VPHc) font partie du virome cutané et sont la plupart du temps associés à une infection asymptomatique, mais on les retrouve également dans les verrues et plusieurs études épidémiologiques suggèrent qu'ils jouent un rôle important en tant que cofacteur de l'irradiation UV dans les cancers de la peau non-mélanomes (« non-melanoma skin cancer », NMSC). Les NMSC sont les cancers les plus fréquents dans le monde chez les individus ayant la peau claire avec plus de 5 millions de nouveaux cas par an aux Etats-Unis et 126-228 mille nouveaux cas par an en France. Ils ont également un fort impact sur la qualité de vie car la plupart des NMSC se développent dans les zones exposées au soleil (tête, cou, visage).

OBJECTIFS-Des réponses immunitaires innées dysfonctionnelles aux VPH pourraient être associées à l'émergence de VPH pathogènes. Afin d'améliorer notre compréhension des interactions Hôte/VPH et d'identifier les facteurs viraux et de l'hôte impliqués dans la transition des VPH commensaux vers les pathobiontes, notre projet étudiera la réponse immunitaire innée des kératinocytes contre les VPH. L'objectif est d'étudier, dans différents modèles cellulaires (cultures cellulaires 2D et 3D), l'impact des protéines E6 et E7 de VPH-hr vs VPHc sur la signalisation dépendante des récepteurs immunitaires innés (récepteurs de reconnaissance de formes, PRR) qui détectent le VPH dans les kératinocytes pour déclencher des réponses antivirales, inflammatoires et l'activation de l'inflammasome.

PROJET DOCTORAL-Le/la doctorant(e) sera impliqué(e) dans la caractérisation des PRR qui détectent l'ADNdb du VPH dans les kératinocytes pour déclencher une réponse immunitaire innée et l'analyse de l'impact des protéines E6 et E7 de différents VPH-hr vs VPHc sur les voies de signalisation dépendantes des PRR.

ENCADREMENT-L'étudiant(e) sera chargé(e) de développer son projet sous la direction d'un chercheur à temps plein, Julien Pothlichet (Chaire Inserm) avec l'aide d'une ingénieure et des techniciens de l'équipe. La directrice du laboratoire, Françoise Bachelerie, co-encadrera la thèse au sein d'une équipe qui bénéficie de la complémentarité des expertises des immunologistes et des virologues.

MÉTHODES-Culture cellulaire (kératinocytes primaires et lignées), culture d'organoïdes cutanés (modèle de culture de cellules épithéliales 3D), transfection de vecteur d'expression et transduction avec des vecteurs lentiviraux pseudotypés, Inhibition génique ciblées (CRISPR-Cas9 et interférence ARN), Purification ADN/ARN et Séquençage à haut débit, PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), Test rapporteur luciférase, Tests ELISA et Meso scale discovery (MSD), Western blot et analyse Protéomique (plateforme protéomique Olink), RNAscope et Immunohistochimie, Production et Purification de particules VPH et Infection VPH, analyses Statistiques (GraphPad Prism, logiciel R).

RÉSULTATS ATTENDUS-Cela devrait aider à comprendre comment les kératinocytes pourraient façonner le virome du VPH, contenir l'infection par le VPH et prévenir la dysplasie induite par le VPH. Ces études ouvriront la voie à une meilleure identification des voies de signalisation impliquées dans le risque de dysbiose du VPH et le risque associé d'oncogenèse du VPH qui pourraient être liés aux NMSC.

PROFIL DU DOCTORANT(E)-Rigoureux, Méthodique, Organisé, Motivé, Curieux, Désireux d'apprendre, Pensée latérale, Travail d'équipe, Capacité d'adaptation en fonction de l'évolution du projet.

Mots clés

Interactions papillomavirus humains (VPH)/Hôte, Immunité innée, Récepteurs de reconnaissance de formes (PRRs), Virome, Interaction virus-hôte, microbiote cutanée, Peau

Bibliographie :

- Chow KY, Brotin É, Ben Khalifa Y, Carthagena L, Teissier S, Danckaert A, Galzi JL, Arenzana-Seisdedos F, Thierry F, Bachelerie F. (2010). A pivotal role for CXCL12 signaling in HPV-mediated transformation of keratinocytes: clues to understanding HPV-pathogenesis in WHIM syndrome. *Cell Host Microbe*. 8(6):523-33. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.11.006>.
- Gallego C, Jaracz-Ros A, Laganà M, Mercier-Nomé F, Domenichini S, Fumagalli A, Roingard P, Herfs M, Pidoux G, Bachelerie F, Schlecht-Louf G. (2023). Reprogramming of connexin landscape fosters fast gap junction intercellular communication in human papillomavirus-infected epithelia. *Front Cell Infect Microbiol*. 13:1138232. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1138232>
- Meuris, F., Carthagena, L., Jaracz-Ros, A., Gaudin, F., Cutolo, P., Deback, C., Xue, Y., Thierry, F., Doorbar, J., & Bachelerie, F. (2016). The CXCL12/CXCR4 Signaling Pathway: A New Susceptibility Factor in Human Papillomavirus Pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006039>
- Pothlichet, J., Meola, A., Bugault, F., Jeamment, L., Savitt, A. G., Ghebrehiwet, B., Touqui, L., Pouletty, P., Fiore, F., Sauvanet, A., & Thèze, J. (2022). Microbial Protein Binding to gC1qR Drives PLA2G1B-Induced CD4 T-Cell Anergy. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.824746>
- Pothlichet, J., Meunier, I., Davis, B. K., Ting, J. P.-Y., Skamene, E., von Messling, V., & Vidal, S. M. (2013). Type I IFN Triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent Inflammasome Activation in Influenza A Virus Infected Cells. *PLoS Pathogens*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003256>
- Pothlichet, J., Niewold, T. B., Vitour, D., Solhonne, B., Crow, M. K., & Si-Tahar, M. (2011). A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO Molecular Medicine*, 3(3). <https://doi.org/10.1002/emmm.201000120>
- Pothlichet, J., Rose, T., Bugault, F., Jeamment, L., Meola, A., Haouz, A., Saul, F., Geny, D., Alcamì, J., Ruiz-Mateos, E., Teyton, L., Lambeau, G., & Thèze, J. (2020). PLA2G1B is involved in CD4 anergy and CD4 lymphopenia in HIV-infected patients. *Journal of Clinical Investigation*, 130(6), 2872–2887. <https://doi.org/10.1172/JCI131842>
- Quach, H., Rotival, M., Pothlichet, J., Loh, Y.-H. E., Dannemann, M., Zidane, N., Laval, G., Patin, E., Harmant, C., Lopez, M., Deschamps, M., Naffakh, N., Duffy, D., Coen, A., Leroux-Roels, G., Clement, F., Boland, A., Deleuze, J.-F., Kelso, J., ... Quintana-Murci, L. (2016). Genetic Adaptation and Neandertal Admixture Shaped the Immune System of Human Populations. *Cell*, 167(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.024>
- Schlecht-Louf G, Deback C, Bachelerie F. (2022). The Chemokine System in Oncogenic Pathways Driven by Viruses: Perspectives for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*.14(3):848. <https://doi.org/10.3390/cancers14030848>.
- Si-Tahar, M., Blanc, F., Furio, L., Choppy, D., Balloy, V., Lafon, M., Chignard, M., Fiette, L., Langa, F., Charneau, P., & Pothlichet, J. (2014). Protective role of LGP2 in influenza virus pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases*, 210(2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu076>