



HAL
open science

Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les cellules dendritiques

Amélie De Saint Jean

► **To cite this version:**

Amélie De Saint Jean. Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les cellules dendritiques. Virologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2015. Français. NNT : 2015STET008T . tel-01558793

HAL Id: tel-01558793

<https://theses.hal.science/tel-01558793>

Submitted on 10 Jul 2017

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.



**UNIVERSITÉ
JEAN MONNET**
SAINT-ÉTIENNE

Ecole Doctorale : Sciences, Ingénierie, Santé (ED SIS 488)

Laboratoire : GIMAP EA-3064

THESE

présentée par

Amélie De Saint Jean

le 5 novembre 2015

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les cellules dendritiques

Jury

Pr Frédéric Lucht	Président du Jury	EA-3064, Université de Saint-Etienne
Dr Nathalie Dejuçq-Rainsford	Rapporteur	INSERM U1085, Université Rennes 1
Dr Elisabeth Menu	Rapporteur	INSERM, Institut Pasteur, Paris
Dr Nathalie Bendriss-Vermare	Examineur	UMR INSERM 1052 CNRS 5286, Lyon
Pr Thomas Bourlet	Directeur de Thèse	EA-3064, Université de Saint-Etienne
Dr Olivier Delézy	Co-directeur de Thèse	EA-3064, Université de Saint-Etienne

Sommaire

Liste des abréviations	3
Remerciements	6
I. Données bibliographiques.....	9
Contexte général.....	9
Introduction	10
1. Les muqueuses : sites d'entrée du virus	14
A. Description générale	14
B. La muqueuse génitale féminine	16
C. La muqueuse génitale masculine	18
D. La muqueuse colo-recto-anale	20
E. Le franchissement muqueux du VIH-1	22
F. Modulation de la transmission du VIH-1 par les cellules épithéliales.....	28
G. Influence de facteurs endogènes et exogènes sur la transmission sexuelle du VIH-1 .	32
2. Rôle des cellules dendritiques dans la transmission sexuelle du VIH-1	37
A. Diversité des cellules dendritiques dans l'organisme	38
B. Fonctions des cellules dendritiques	40
C. Interactions du VIH-1 avec les cellules dendritiques.....	47
3. Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1.....	55
A. Composition du plasma séminal et propriétés physico-chimiques.....	55
B. Effet direct du plasma séminal sur la transmission du VIH-1.....	57
C. Modulation de la réponse immunitaire par le plasma séminal	60
D. Influence de l'infection par le VIH-1 sur la composition du plasma séminal	62
4. Prévention de la transmission	63
II. Objectifs et démarche expérimentale.....	70
III. Matériels et Méthodes.....	72

1.	Patients et Prélèvements	72
2.	Culture cellulaire	72
3.	Cytométrie en flux.....	74
4.	Production de souches virales.....	75
5.	Prise en charge des particules virales par les MDDC.....	75
6.	Dosage des concentrations en facteurs solubles	75
7.	Analyse protéique par western blot.....	76
8.	Statistiques	77
IV.	Résultats expérimentaux.....	79
1.	Influence directe du plasma séminal sur les cellules dendritiques.....	79
A.	Contexte	79
B.	Résultats préliminaires.....	79
C.	Effet du TGF- β 1 sur l'expression de CD169 par les MDDC (Article 1)	85
D.	Effet du plasma séminal sur l'expression de CD169 (Article 2).....	94
E.	Discussion.....	117
2.	Influence indirecte du plasma séminal sur les cellules dendritiques via les cellules épithéliales	121
A.	Contexte	121
B.	Rôle des cellules épithéliales dans la transmission sexuelle du VIH-1 (Revue).....	122
C.	Résultats.....	133
D.	Discussion.....	141
V.	Discussion générale et perspectives	146
VI.	Conclusion	151
VII.	Annexes	152
VIII.	Références.....	157

Abréviations

ADCC : Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-Like 3G

ARV : AntiRétroViraux

ARV⁺ : Patient sous traitements ARV

BDCA : Blood Dendritic Cells Antigen

CCL : C-C Chemokine Ligand

CCR : C-C Chemokine Receptor

CD : Cluster de Différenciation

CDC : Centers for Disease Control and prevention

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLR : C-Type Lectin Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : CytoMégaloVirus

COX : Cyclooxygénase

CRD : Carbohydrate Recognition Domain

CXCR : C-X-C Chemokine Receptor

DC : Dendritic Cells

DCIR : Dendritic Cell ImmunoReceptor

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-Integrin

DMPA : Depot MedroxyProgesterone Acetate

EBV : Epstein-Barr Virus

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FITC : Fluorescein IsoThioCyanate

Galcer : Galactosyl Ceramide

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

HEV : High Endothelial Veinule

HLA : Human Leukocyte Antigen

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HMGB1 : High-Mobility Group protein B1

HRP : HorseRadish Peroxidase

HSH : Hommes qui ont des rapports Sexuels avec les Hommes

HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycans

HSV : Herpes Simplex Virus

ICAM : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobulin

IL : Interleukin

IP : Iodure de Propidium

IST : Infection Sexuellement Transmissible

LC : Cellules de Langerhans

Lf : Lactoferrine

LPS : Lipopolysaccharide

LTNP : Long-Term Non Progressor

LTR : Long Terminal Repeat

MCP : Monocyte Chemotactic Protein

mDC : Cellules Dendritiques Myéloïdes

MDDC : Monocyte Derived Dendritic Cells

MIG : Monokine Induced By γ -Interferon

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

NK : Natural Killer, cellules tueuses naturelles

NLR : NOD-Like Receptor

NOD : Nucleotide-Binding Oligomerization Domain

ns : non significatif

NT : Non Traité

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PAP : Prostatic Acid Phosphatase

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

pDC : Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes

PG : Prostaglandin

PrEP : Pre-Exposure Prophylaxis

PRR : Pattern Recognition Receptor

PS : Plasma Séminal

PSA : Prostate Specific Antigen

RANTES : Regulated On Activation, Normal T Cell Expressed And Secreted

RIG : Retinoic Acid-Inducible Gene 1

RLR : RIG-I-Like Receptor

ROS : Reactive Oxygen Species

SDF1 : Stromal Cell-Derived Factor 1

SEM : Standard Error to the Mean

SIDA : Syndrome D'ImmunoDéficiency Acquis

Siglec : Sialic Acid-Binding Ig-Like Lectin

SIV : Simian Immunodeficiency Virus

SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor

SMAC : SupraMolecular Activation Cluster

SP : Seminal Plasma

SVF : Sérum de veau foetal

TEER : Transepithelial Electrical Resistance

TGF : Transforming Growth Factor

Th : Lymphocyte T *Helper*

TLR : Toll Like Receptor

TMB : 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine

TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocyte T régulateur

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin

VIH : Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine

σ : Ecart-type

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci aux rapporteurs, Docteur Dejuçq-Rainsford et Docteur Menu, pour leur lecture attentive. Merci au Docteur Bendriss-Vermare de faire également partie de ce jury. Je la remercie par ailleurs ainsi que le Professeur Nicolas pour leur accompagnement et les conseils prodigués lors du comité de thèse. Merci pour vos encouragements. Merci au Professeur Lucht pour la présidence de ce jury mais également pour avoir répondu présent pour Pint of Science.

Je remercie l'ARC Santé ainsi que SIDACTION pour leur soutien financier. Je remercie également vivement les personnels hospitaliers ainsi que l'EFS Auvergne-Loire pour leur collaboration sur ce projet de thèse. Grâce à eux, j'ai pu travailler sur des prélèvements humains.

Merci au laboratoire GIMAP pour m'avoir accueillie au sein de ses locaux. Merci au Professeur Thomas Bourlet, pour son soutien et m'avoir aidée à finir cette thèse. Un grand merci au Docteur Olivier Delézay, mon encadrant. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour vos conseils, votre accompagnement et le temps que vous m'avez accordé.

Merci à tous les membres du labo qui ont fait du quotidien un moment de partage agréable. Merci Fabienne, Blandine, Agathe, Hind, Fabrice, Benjamin, Stéphane, Sylvie, Séverine et Françoise. Merci pour vos conseils techniques, votre aide mais également nos discussions informelles et votre soutien. Fabienne et Agathe merci pour votre accueil et d'avoir tant facilité mon intégration au sein du laboratoire. Merci Charles-Antoine et Marie-Ange, pour nos repas bihebdomadaires en petit comité, les conseils voyage, les coups de main luminex et la consultation de votre extraordinaire banque d'anticorps !

Merci à tous les doctorants avec qui j'ai passé du temps au laboratoire, Pauline, Thibaut, Kim-Ahn, Fahd, Julie, Amandine, Sandrine, Chaker, Sofiane, Caroline et Rémi.

Merci à Pierre pour les échanges Caco, HT29 et T84, pimentés d'un peu de fluorescence et de gratin de ravioles.

Merci même à ceux qui n'étaient que de passage : mes stagiaires (Erwin, Elodie, Emilie, Fabien, Coralea et Marion), merci à Benoît, Cécile, Pascale, Marie-Ange, Samuel, Marine, ...

Mention spécial pour la tripléte de collègues, Nico, Alex et Adrien. Merci pour les sorties ciné, wake, ski mais aussi les fondues quelles qu'elles soient, les bons vins... On se retrouve au Chinaillon ou à Samoëns pour la saison 2015-2016 ?!! Merci à Delphine pour les retours à pieds, les bons repas de Stéphane et nos discussions. Merci Alice, de ta gentillesse et de toujours prendre des nouvelles.

Merci à tous, pour votre soutien.

A ceux qui ne sont pas du Gimap mais des étages en dessous (ou à côté), merci Clotilde, Giacomo (et aussi du coup à Amandine), Aurélien, Binh Minh, Zhigo, Fiona, Guillaume, Laura, Marine, Agathe, Andréa, Lara, Jean-Philippe et également à ceux qui ne sont pas de la fac de médecine : Maxym, Antoine, Estelle, Olivier, Baptiste, Franck (et aussi du coup à Alexia), Jules (et à Aurélie), Ali, Klervi, Fanette, David, Dimitrios...

Andréa merci pour tes conseils, ton soutien et ton optimisme. Clotilde merci de m'avoir accrochée à cette journée de rentrée des doc et de m'avoir fait connaître l'ASEC, ses adhérents et tous les copains maintenant.

Enfin à ceux qui ne sont pas thésards mais qui ont suivi ça de près : Merci les copains !

Un grand merci à Mathilde et Claire. Cette coloc a été une super rencontre. Merci mille fois et encore bravo à vous ! A cette année 2015, champagne!

A Jean, Chacha, Ju, Amo, Jacky, Boris, Anna, Pierre : alors c'est qui le Doc' maintenant !!! On fêtera ça autour d'une matouille ?!?

Merci les copines d'Ingé, Lucile, Céline, Carole, Flora et Coline. Et aux copains d'avant : Axelle, Clo, Erwan, Cut' et Mo'. Même de loin merci d'avoir été là.

A Julie Médina, merci de m'avoir épaulée, guidée et si bien formée. Je garde un souvenir tout particulier de nos discussions psm, de ta première grossesse et de ce fameux stage. Merci pour tes petits mots, ton soutien et ton amitié. Les occasions de te voir me manquent. A quand celle de retravailler ensemble ?

Enfin un grand merci à ma famille. En particulier, merci à mes 4 parents. Merci Papa, merci Maman pour votre soutien, votre amour et d'avoir su toujours me montrer l'essentiel. Merci Patricia de m'avoir tant aidée dans mes démarches, mes raisonnements et de m'avoir si bien accompagnée. Merci Lolo pour ton œil critique, tes remarques constructives et le réconfort parfois nécessaire. Merci à mes grands-parents pour leur admiration, leur soutien et leur étonnement. Merci à ma grande sœur chérie que j'aime tant. Merci pour tout, pour ton amour, ta protection, ton soutien et de tant partager avec moi. Merci à Flo et à toi de nous accueillir dans votre maison pour des soirées jeux, manger des gaufres et me laisser faire le jardin ! Merci à mon petit filleul Rémi, qui a illuminé cette troisième année thèse et me ramène les pieds sur terre.

Une pensée pour mon cousin Martin. Chapeau bas, quelle belle leçon de vie.

Enfin, merci à Brice d'être venu en terre stéphanoise pour cette chouette année. De partager le quotidien, les voyages, les bons et les mauvais moments. « Je dis ça, je dis rien mais je le dis quand même ».

Données bibliographiques

Contexte général

Dans le début des années 80, le monde fait face à l'émergence d'une nouvelle épidémie meurtrière avec la découverte des premiers cas de SIDA. En 1983, le rétrovirus responsable de cette pathologie est isolé et permet à la communauté scientifique de progresser aussi bien sur la compréhension de l'interaction entre l'hôte et le pathogène que sur le développement d'approches thérapeutiques et préventives.

Ces découvertes ont permis de belles avancées puisque des données épidémiologiques récentes de l'ONUSIDA et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (ONUSIDA, 2013; UNAIDS, 2015; WHO Media Centre, 2014) établissent que:

- Le nombre de nouvelles infections a diminué de 41% depuis 2001. Dans le monde, 2 millions de personnes [1,9 million–2,2 millions] ont été nouvellement infectées par le VIH en 2014, contre 3,4 millions [3,3 millions–3,6 millions] en 2001.
- L'accès aux trithérapies se démocratise. En 2015, l'OMS estime que 15 millions de personnes ont eu accès aux thérapies antirétrovirales au niveau mondial.
- Le nombre de femmes enceintes infectées par le VIH-1 ayant accès à un traitement antirétroviral a atteint les 73% [68%-79%] en 2014.
- Le nombre de décès dus au SIDA s'élève à 1,2 million [980 000-1,6 million] en 2014 et est en recul par rapport aux 2 millions [1,7 million-2,7 millions] en 2005.
- Le nombre de transmissions mère-enfant a diminué de 35% entre 2009 et 2012.

Cependant, la situation reste sensible pour de nombreuses personnes infectées et les progrès réalisés ne doivent pas masquer les inégalités persistantes.

- Les femmes demeurent une population fragile notamment en Afrique Sub-saharienne où elles représentent 58% des personnes infectées. Cette différence peut s'expliquer par des particularités biologiques (exposition d'une plus grande superficie de la muqueuse à un plus grand volume de fluides contaminés par exemple), mais résulte également d'inégalités sociales (accès à l'éducation, violence et relations sexuelles non consenties...). De plus, la mise en place de certaines stratégies de prévention est dépendante de l'implication des hommes rendant les femmes plus vulnérables (usage du préservatif, circoncision).

- En 2014, l'ONUSIDA estime que 19 millions de personnes sur les 36,9 millions infectées dans le monde ne connaissent pas leur séropositivité. L'accès au dépistage demeure un important facteur d'inégalité.
- La stigmatisation et la discrimination des personnes vivant avec le VIH-1 perdurent à travers le monde et constituent des freins majeurs à la prévention des nouvelles infections, à l'atténuation de l'impact de la maladie et à la prise en charge adéquate des patients.

En 2009, l'essai clinique de phase III RV144 fournit la preuve de concept qu'un vaccin anti-VIH-1 peut induire une protection efficace chez des sujets séronégatifs (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Toutefois, la protection observée est modeste, entre 26,6% et 31,2% en fonction du groupe étudié, confirmant la nécessité de développer des stratégies de protection alternatives telles que l'utilisation de microbicides ou de traitements préexposition. L'association de ces différents moyens de prévention et leur adaptation à différentes populations ciblées pourraient permettre de gagner en efficacité. Mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'infection par le VIH-1 est donc primordial afin de progresser dans la lutte contre la transmission du virus. En particulier, la transmission sexuelle étant la cause majeure de contamination à travers le monde, décortiquer les mécanismes de franchissement muqueux et les interactions entre les différents acteurs au niveau des portes d'entrée privilégiées du virus est capital. Cette thèse a pour objectif principal d'étudier l'influence du plasma séminal, fraction acellulaire du sperme, sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les cellules dendritiques présentes au niveau des muqueuses génitales féminines et colorectales.

Introduction

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) appartient à la famille des rétrovirus, caractérisée par son mode de réplication. Le génome constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive est transcrit en un ADN bicaténaire grâce à une enzyme contenue dans le virion et caractéristique de cette famille de virus : la transcriptase inverse. Le VIH-1 est un virus d'environ 120 nm de diamètre. Les particules virales sont constituées d'une enveloppe externe d'origine cellulaire dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe. Cette enveloppe est tapissée à l'intérieur d'une matrice qui entoure la capsid virale qui contient le génome viral, la nucléocapsid et les enzymes nécessaires à la réplication (Figure 1). Les virus VIH-1 sont divisés en quatre groupes, M, N, O et P dérivant de virus simiens transmis à l'homme lors de trois épisodes indépendants de zoonoses. Les groupes N, O et P se retrouvent essentiellement en Afrique centrale. Les virus du groupe M sont responsables de la pandémie et se divisent en 8 sous-types : A-D ; F-H, J et K. Le sous-type C est majoritaire en Afrique et en Inde alors que le sous-type B est dominant en Europe, en Amérique et

en Australie. Il existe une forte diversité génétique entre ces virus du fait, d'une part, de l'apparition de mutations suite à des erreurs de la transcriptase inverse (estimée à 1/10 000 bases soit une par cycle de réplication) mais également de la recombinaison entre virus de différents sous-types, d'autre part (Maartens *et al.*, 2014). L'infection des cellules cibles met en jeu l'interaction entre un trimère de glycoprotéines d'enveloppe gp120 et un récepteur (principalement le CD4). La contribution de corécepteurs dont les principaux sont le CXCR4 et le CCR5, est également nécessaire. L'exploitation de ces corécepteurs définit le tropisme du virus dit X4 lorsque le virus utilise le CXCR4, R5 lorsque le virus utilise le CCR5 ou X4R5 aussi désigné « dual-tropic » lorsque le virus peut utiliser les deux corécepteurs. D'autres mécanismes d'entrée du virus ont également été décrits comme la pénétration par l'intermédiaire du récepteur Fc des Immunoglobulines ou encore l'endocytose selon une voie CD4-indépendante. Les cellules cibles du virus sont majoritairement les lymphocytes T CD4 et en particulier les lymphocytes mémoires. D'autres cellules sont toutefois infectables comme les macrophages, les cellules dendritiques (DC) ou les cellules microgliales du cerveau.

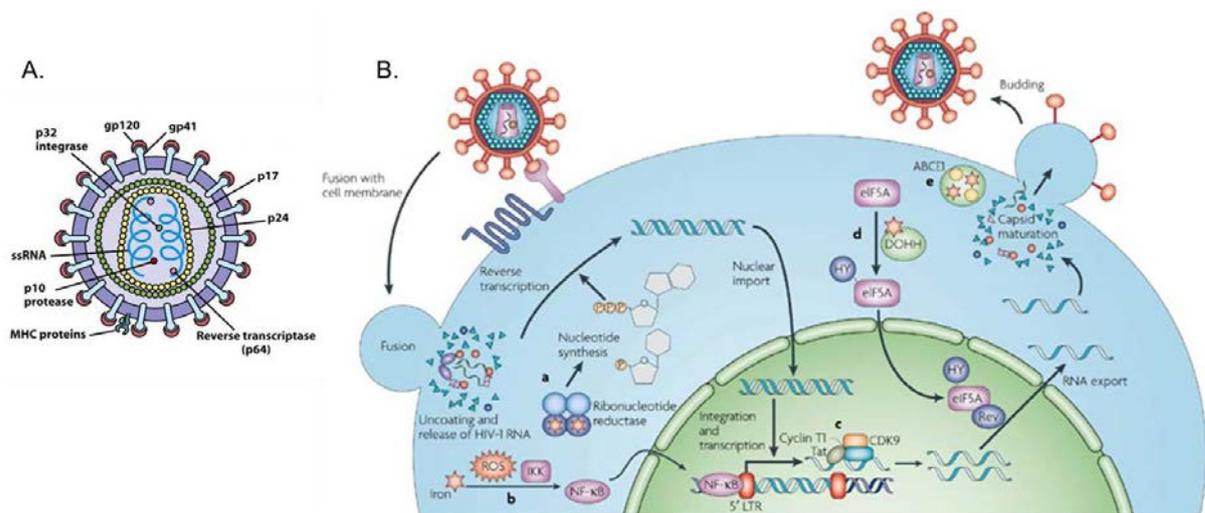


Figure 1 : Structure et cycle répliatif du VIH-1. A. Structure du VIH-1, d'après Owen *et al.* (2013). B. Cycle répliatif du VIH-1 d'après Drakesmith and Prentice (2008).

Le virus se transmet sous forme de particules virales libres ou associées aux cellules *via* des fluides biologiques contaminés. La transmission peut avoir lieu par contact avec du sang contaminé, comme cela a été le cas chez des personnes transfusées dans plusieurs pays à la fin des années 1980. La transmission par le sang concerne également les usagers de drogues injectables ainsi que les personnels soignants. La transmission peut avoir lieu entre une mère et son enfant, au cours de la grossesse, de l'accouchement ou de l'allaitement. On parle alors de transmission verticale. En l'absence d'intervention, les taux de transmission varient de 15 à 45%. Une bonne prise en charge de la femme enceinte peut permettre de diminuer ce risque à moins de 5% (OMS, 2015). En 2015, l'OMS a d'ailleurs validé l'élimination de la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant à Cuba,

premier pays au monde à y parvenir. Enfin, l'exposition des muqueuses à du sperme ou des sécrétions cervicovaginales contaminés peut conduire à l'infection. La transmission sexuelle du VIH-1 est d'ailleurs le mode de contamination le plus fréquent à travers le monde, bien que le risque de transmission par acte soit plutôt faible (Tableau 1, Figure 2).

Tableau 1 : Risque de transmission par acte sans protection ni prise de traitements antirétroviraux (ARV), d'après Patel *et al.* (2014)

Mode de transmission	Risque pour 10 000 expositions à une source infectée
<u>Transmission parentérale</u>	
• Transfusion sanguine	9250
• Partage d'aiguilles entre usagers de drogues injectables	63
• Piquûre d'aiguille percutanée	23
<u>Transmission sexuelle</u>	
• Rapport sexuel anal réceptif	138
• Rapport sexuel anal insertif	11
• Rapport sexuel vaginal réceptif	8
• Rapport sexuel vaginal insertif	4
• Rapport sexuel oral	faible
<u>Transmission verticale</u>	
• Mère à l'enfant	2260

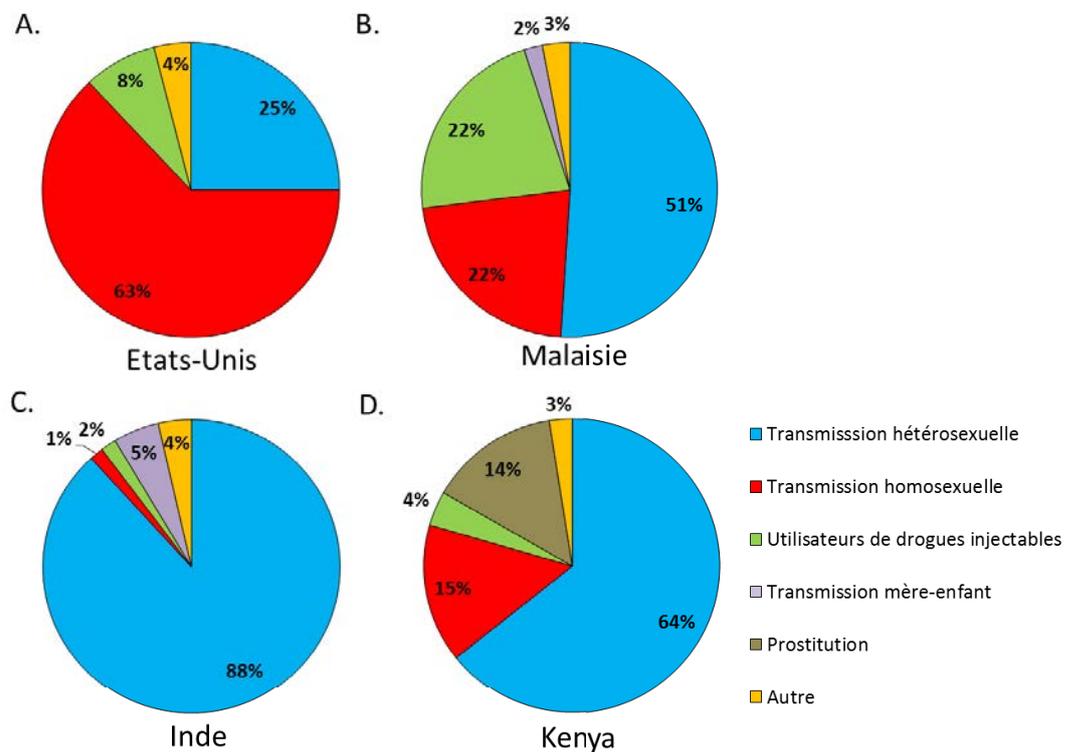


Figure 2 : Incidence par groupe de transmission du VIH-1 dans quatre pays différents. A. En 2010, aux Etats-Unis, d'après le CDC, 2015. B. En 2013, en Malaisie, d'après Malaysian AIDS Council & Malaysian AIDS foundation, (2014). C. En 2012-2013, en Inde, d'après Rewari, (2013). D. En 2008 au Kenya, d'après Kenya National AIDS Control Council, (2009). Bien que l'épidémie diffère en fonction des pays, la transmission sexuelle est le mode majeur de contamination par le VIH-1 dans le monde.

L'évolution spontanée de l'infection par le VIH-1 peut-être divisée en trois phases : la phase aiguë ou primo-infection, la phase chronique et la phase finale ou stade SIDA. En l'absence de traitement, le virus se réplique activement quelle que soit la phase. Cette réplication est toutefois plus importante au cours de la primo-infection et du stade SIDA, augmentant de ce fait le risque de transmission (Frange *et al.*, 2012; Hollingsworth *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, les traitements antirétroviraux disponibles sont uniquement virostatiques. S'ils permettent le contrôle de la réplication, ils sont incapables d'éradiquer le virus du fait de la présence de réservoirs viraux latents non ciblés par cette stratégie thérapeutique (Blankson *et al.*, 2014). Le tractus génital masculin pourrait notamment constituer un réservoir viral jouant un rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1 (Le Tortorec and Dejuq-Rainsford, 2010). Prévenir l'infection par le VIH-1 constitue une approche complémentaire essentielle pour endiguer l'épidémie. Bien qu'ils existent déjà des moyens de prévention contre l'infection par le VIH-1, ceux-ci sont imparfaits soit du fait de leur manque d'efficacité, de leur coût ou de leur inadéquation pratique et culturelle. Pour pouvoir proposer de nouvelles stratégies préventives, il est primordial de bien connaître les mécanismes de transmission du VIH-1. La transmission sexuelle du VIH-1 constituant le mode majeur de contamination à travers

le monde, les muqueuses sont, de ce fait, les portes d'entrée privilégiées du virus. Comprendre les interactions entre le virus, son vecteur, les cellules cibles et leur environnement constitue donc un enjeu de taille.

1. Les muqueuses : sites d'entrée du virus

A. Description générale

Les muqueuses sont des tissus recouvrant l'ensemble des cavités internes du corps. Elles sont constituées de cellules épithéliales reposant sur un tissu conjonctif de soutien, appelé *lamina propria* ou chorion. Ces deux structures sont séparées par une lame basale, couche acellulaire d'épaisseur variable et non vascularisée. Les épithéliums sont classés selon trois critères morphologiques :

1. Le nombre de couches cellulaires qui les constituent. Les épithéliums simples sont constitués d'une seule couche de cellules tandis que les épithéliums stratifiés sont constitués de plusieurs.
2. La forme des cellules observées sur des coupes perpendiculaires à la surface épithéliale. Les épithéliums peuvent être pavimenteux, cubiques, prismatiques ou cylindriques. Pour les épithéliums stratifiés, la classification structurale est déterminée par la forme de la couche la plus externe.
3. La présence d'annexes telles que les cils.

Les cellules épithéliales possèdent deux régions principales, le domaine apical et le domaine basolatéral, définies par des caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques. La fonction de barrière de l'épithélium est assurée grâce à l'attachement solide des cellules les unes aux autres et à la lame basale *via* la présence de molécules d'adhérence et de jonctions cellulaires spécialisées. Trois types de jonctions cellulaires sont distinguées (Figure 3) : (i) les jonctions serrées (ou tight junctions) ; (ii) les jonctions d'ancrage et (iii) les jonctions communicantes (ou gap junctions).

Les muqueuses sont caractérisées par la sécrétion de mucus, fluide composé principalement de glycoprotéines et d'eau mais également de molécules antimicrobiennes et de plusieurs types d'anticorps sécrétoires favorisant la défense de l'organisme contre l'infection par des agents pathogènes dont le VIH. Néanmoins, les muqueuses représentent de plus faibles barrières que la peau et les agents pathogènes peuvent plus facilement pénétrer ces tissus.

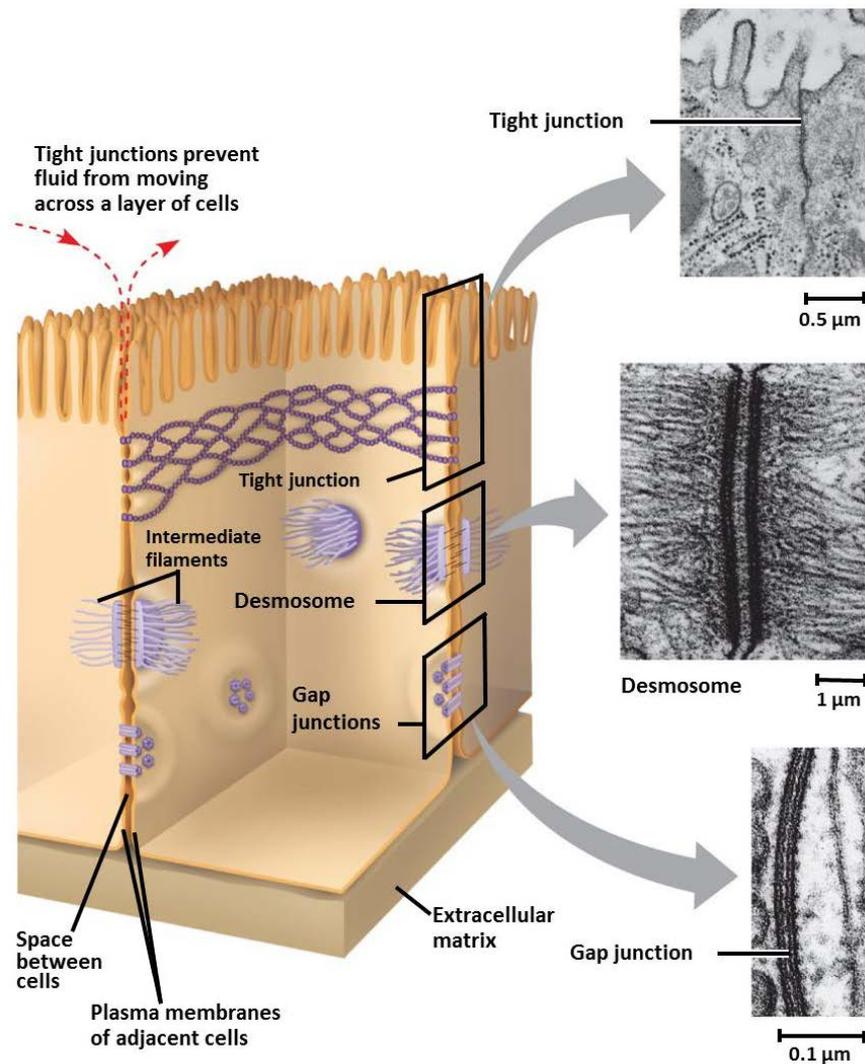


Figure 3 : Les différents types de jonctions cellulaires d'après Cummings (2008). Les jonctions serrées régulent les transports paracellulaires. La résistance électrique d'un épithélium (TEER, trans electrical resistance) est fonction du nombre de jonctions serrées présentes. Ces jonctions sont formées par l'interaction de plusieurs protéines dont les claudines, famille de seize protéines transmembranaires et l'occludine, protéine transmembranaire constituée de quatre sous-unités qui interagit avec quatre protéines principales : ZO-1, ZO-2, ZO-3 et AF-6. Les jonctions d'ancrage assurent la cohésion mécanique en présentant des points d'ancrage pour le cytosquelette des cellules adjacentes. Deux formes distinctes existent : les jonctions adhérentes ou *zonula adherens* et les desmosomes ou *macula adherens*. Les jonctions adhérentes se situent sous les jonctions serrées dont elles renforcent les effets. Elles sont formées par des bandes péricellulaires continues contenant des glycoprotéines transmembranaires appelées e-cadhérines, sur lesquelles s'appuient des filaments d'actine. Les desmosomes forment eux des disques d'environ 0,5 μm de diamètre contenant des desmoglénines, autres glycoprotéines transmembranaires appartenant à la famille des cadhérines. Ils sont qualifiés d'hémidesmosomes lorsqu'ils assurent l'ancrage ponctuel entre certaines cellules épithéliales et la lame basale. Les jonctions communicantes créent de petits canaux intercellulaires reliant les cytosols des cellules adjacentes. Elles sont constituées par un complexe de six connexines, protéines transmembranaires, qui s'assemblent pour former un connexon. L'aboutement des deux connexons présents dans les membranes plasmiques de cellules voisines forme un pore de 2 nm de diamètre.

Dans le cadre de la contamination par voie sexuelle, les muqueuses génitales et ano-rectale constituent les principales portes d'entrée du virus. La muqueuse buccale apparaît plus résistante à l'infection par le VIH-1 et les cas reportés d'infection sont souvent couplés à la présence d'infections buccales comme les gingivites ou les périodontites (Campo *et al.*, 2006).

B. La muqueuse génitale féminine

a. Organisation tissulaire

La muqueuse génitale féminine se divise en deux zones : le tractus génital inférieur qui comprend le vagin et l'exocol et le tractus génital supérieur qui comprend l'endocol, l'endomètre et les trompes de Fallope. Le vagin et l'exocol sont recouverts d'un épithélium pavimenteux stratifié tandis que l'endocol, l'endomètre et les trompes de Fallope sont recouverts d'un épithélium cylindrique simple. L'endocol contient des glandes tubuleuses mucosécrétantes dont l'activité sécrétoire est régulée par les œstrogènes. Entre l'exocol et l'endocol se trouve la zone de jonction (ou zone de transformation), zone de transition entre les 2 types d'épithéliums (Figure 4).

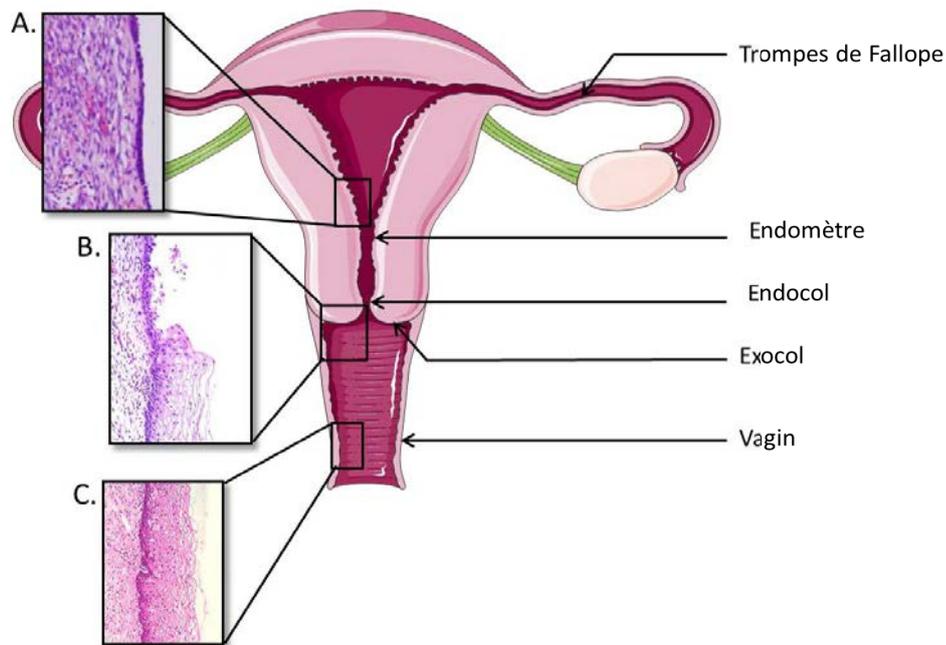


Figure 4 : Histologie de la muqueuse génitale féminine. A. Epithélium cylindrique simple de l'endomètre ; B. Epithélium transitionnel de la zone de jonction ; C. Epithélium pavimenteux stratifié de la muqueuse vaginale, d'après : www.histology-world.com

b. Système immunitaire

Le système immunitaire du tractus génital féminin remplit la double fonction de protection contre les agents pathogènes et de tolérance vis-à-vis des spermatozoïdes et de l'unité foeto-placentaire. La répartition des cellules immunitaires n'est pas homogène au sein du tractus (Givan *et al.*, 1997, Figure 5). Au niveau de l'utérus, quelques rares formations lymphoïdes organisées existent avec du centre vers la périphérie de rares lymphocytes B, quelques lymphocytes T CD4 et une majorité de T CD8⁺. Au niveau du vagin, de telles formations sont rarement observées. Peu de

cellules immunitaires intra épithéliales sont présentes. La plupart de ces cellules sont des DC et en particulier des cellules de Langerhans (Iijima *et al.*, 2008) et des lymphocytes T CD8. Au niveau de la *lamina propria*, la majorité de lymphocytes T sont de type mémoires (CD45RO⁺) et des macrophages sont également présents. Au niveau de l'exocol, la quantité de lymphocytes T CD4 intraépithéliaux et de DC augmente. Des «cellules tueuses naturelles» (NK) CD57⁺ sont présents en même proportion au niveau vaginal et ectocervical alors que les CD56⁺ sont retrouvés en plus grand nombre au niveau ectocervical. La plus forte densité de cellules immunitaires est retrouvée au niveau de la zone de transformation où se concentrent essentiellement des lymphocytes T CD4 et des DC. Dans l'endocol, la densité cellulaire est la plus faible avec une majorité de lymphocytes exprimant des marqueurs de cytotoxicité (Pudney *et al.*, 2005).

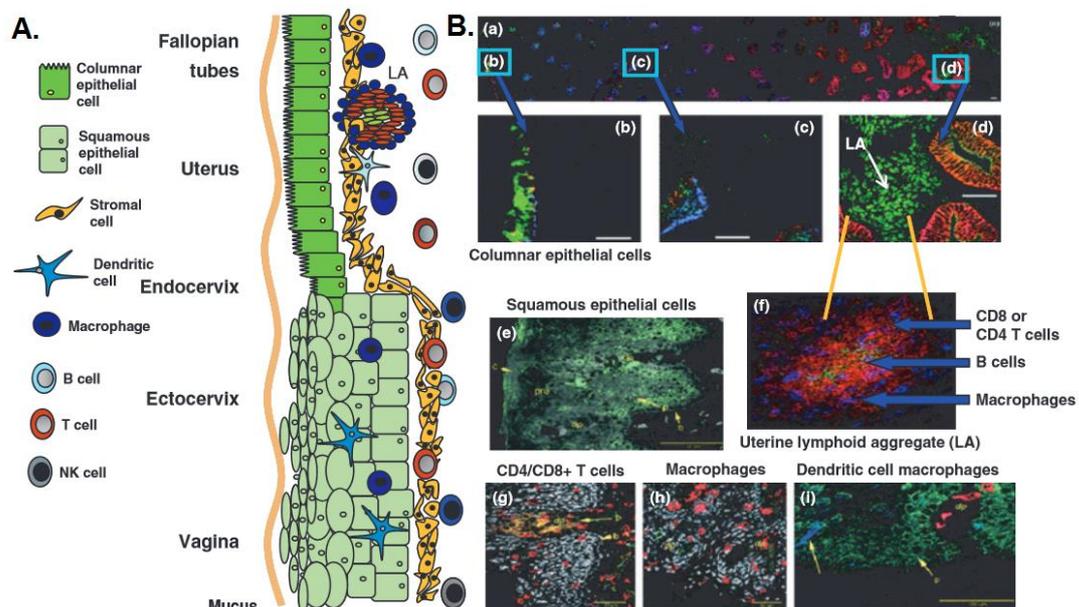


Figure 5 : Répartition des cellules immunitaires au sein du tractus génital féminin, d'après Wira *et al.* (2010). A. Schéma de la répartition des cellules immunitaires au sein des épithéliums simples et stratifiés. B. Distribution des cellules immunitaires visualisée par microscopie confocale. (a-d) Répartition au niveau de l'utérus, avec le marquage de cellules épithéliales en rouge, du CCR5 en vert et de CXCR4 en bleu. (a) Glande épithéliale qui s'étend de l'interface du myomètre (à gauche) au côté apical de l'épithélium (à droite). (b-d) Agrandissement des régions visibles en (a). (f) Agrégat lymphoïde au niveau de l'endomètre au cours de la phase proliférative. En rouge : cellules T, en vert : cellules B et en bleu : macrophages. (e) Epithélium vaginal stratifié qui exprime GalCer (vert). (g) Détection des lymphocytes T CD8 au niveau de l'épithélium stratifié et du stroma. (h) Détection des macrophages CD14⁺ au niveau du stroma et au sein de l'épithélium stratifié. (i) Détection des DC CD1a⁺ présentes au sein de l'épithélium vaginal.

c. Zones potentielles d'infection par le VIH-1

Le site privilégié de l'infection par le VIH au sein du tractus génital féminin n'est pas clairement établi. L'utilisation de modèles simiens a permis de montrer que l'infection peut avoir lieu au niveau vaginal, ectocervical ou endocervical (Li *et al.*, 2009; Miller, 1998; Zhang *et al.*, 1999). L'épithélium stratifié est le premier tissu en contact avec le liquide séminal contaminé et il représente la majorité de la superficie totale exposée. Cependant, s'il demeure intact, il constitue une meilleure barrière

mécanique que la monocouche de l'épithélium simple. La desquamation des couches supérieures de l'épithélium stratifié confère une certaine protection contre l'installation d'une infection persistante tout comme la présence de bactéries commensales, en particulier *Lactobacillus acidophilus*, qui produisent de l'acide lactique en dégradant le glycogène présent à la surface de l'épithélium stratifié créant un environnement acide (pH=3) défavorable à la prolifération bactérienne et virale (Cone, 2014). La zone de transformation est une zone particulièrement fragile puisqu'il s'agit d'une zone de rupture entre les deux types d'épithéliums (risque accru de brèches) et sensible à l'infection du fait de la concentration importante en cellules cibles (lymphocytes T CD4, macrophages et DC).

C. La muqueuse génitale masculine

a. *Organisation tissulaire*

Lors de relations sexuelles, le pénis peut être en contact avec des sécrétions cervico-vaginales ou colorectales contaminées. Le prépuce, le gland et l'urètre constituent de ce fait de potentielles portes d'entrée du virus. Au niveau de la muqueuse génitale masculine, le prépuce et le gland sont recouverts d'un épithélium stratifié kératinisé (Figure 6). Cette kératinisation est moindre au niveau de la surface interne du prépuce. Concernant l'urètre pénien, le méat est recouvert d'un épithélium stratifié kératinisé correspondant à un retour de peau. Au niveau de la fossette naviculaire, un épithélium stratifié non kératinisé est présent et laisse ensuite la place à un épithélium cylindrique pseudostratifié. L'urètre contient de nombreuses glandes de Littré sécrétant des mucines.

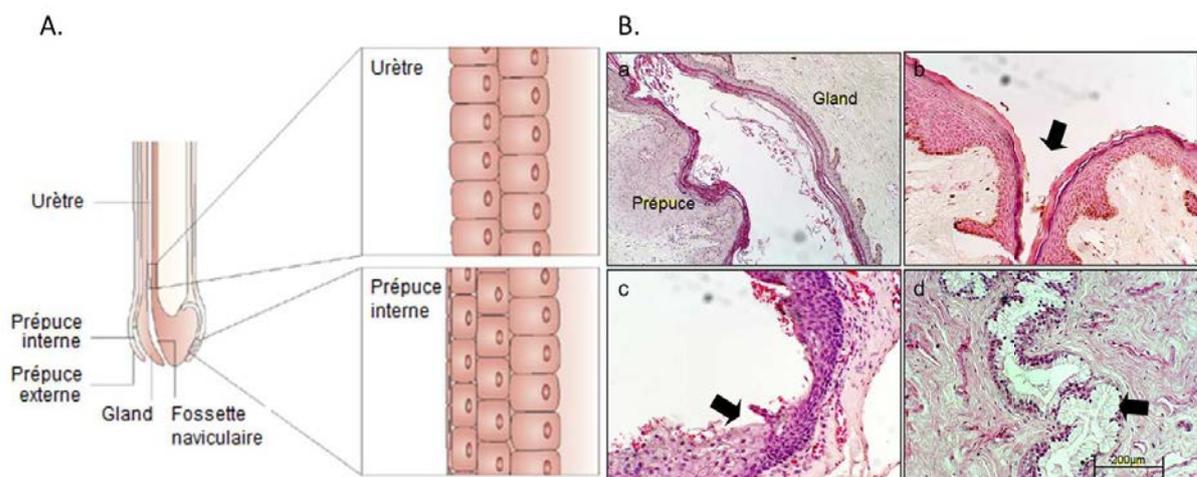


Figure 6 : Histologie de la muqueuse génitale masculine d'après Anderson *et al.*, (2011); Hladik and McElrath, (2008).
 A. Schéma. B. Coupes histologiques. (a) Gland et prépuce interne, tous les deux composés d'un épithélium stratifié kératinisé. (b) Le méat (flèche) est couvert par un retour de peau (c) Zone de transition (flèche) entre l'épithélium stratifié non kératinisé de la fossette naviculaire du méat urétral et l'épithélium cylindrique pseudostratifié de l'urètre pénien. (d) Urètre pénien avec une glande de Littré (flèche).

b. Système immunitaire

La muqueuse génitale masculine contient un grand nombre de cellules cibles du VIH-1 et de cellules CCR5⁺ et/ou CXCR4⁺ (Figure 7, Anderson *et al.*, 2011; McClure *et al.*, 2005). Le prépuce est riche en cellules immunitaires puisque des cellules de Langerhans et des lymphocytes T CD4 se retrouvent au niveau de l'épithélium stratifié. Des lymphocytes T, des macrophages et des cellules dendritiques sont aussi détectés au niveau de la *lamina propria* (Donoval *et al.*, 2006; Ganor and Bomsel, 2011; Hussain and Lehner, 1995; McCoombe and Short, 2006; Patterson *et al.*, 2002). L'épithélium cylindrique de l'urètre contient de nombreux lymphocytes T CD4 et CD8 intraépithéliaux ainsi que des macrophages également présents au niveau de la *lamina propria* (Pudney and Anderson, 1995).

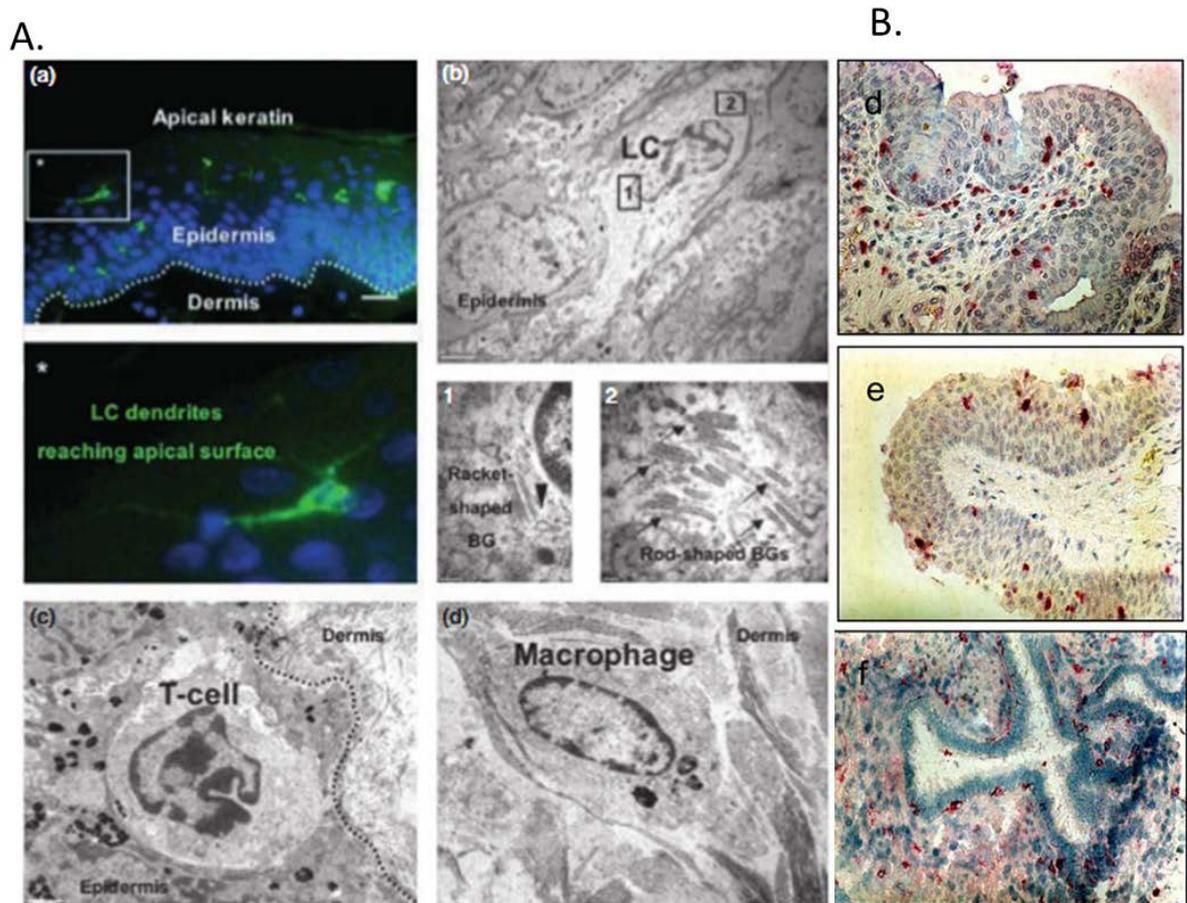


Figure 7 : Cellules cibles du VIH-1 au niveau de la muqueuse génitale masculine d'après Anderson *et al.*, (2011); Ganor and Bomsel, (2011). A. Au niveau du prépuce. (a) Prépuce interne avec les cellules de Langerhans en vert, les noyaux cellulaires en bleu. (b) Cellule de Langerhans visualisée au microscope électronique. (1-2) Agrandissement permettant de voir les granules de Birbeck. (c) Lymphocyte T et (d) macrophage visualisés au microscope électronique B. Au niveau de l'urètre. (e) Lymphocytes T CD4 présents au niveau de l'épithélium et de la *lamina propria*. (f) Macrophages situés principalement au sein de l'épithélium. (g) Cellules CCR5⁺ abondantes aussi bien au niveau intraépithélial qu'au niveau de la *lamina propria*.

c. Sensibilité à l'infection

La protection apportée par la circoncision suggère que le prépuce est un tissu particulièrement vulnérable à l'infection par le VIH-1 (Auvert *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2007). Plusieurs études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* confirment cette sensibilité (Dinh *et al.*, 2015; Ganor *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2011). Certains hommes circoncis peuvent également être infectés par le VIH-1, indiquant l'existence d'autres portes d'entrée du virus. D'après les résultats obtenus chez le singe ainsi que sur des cultures d'explants, l'urètre semble notamment sensible à l'infection (Fischetti *et al.*, 2009; Ganor *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 1989). Le franchissement muqueux du virus au niveau du gland a longtemps été considéré comme improbable, compte tenu de sa forte kératinisation (Hladik and McElrath, 2008). Cependant, une étude *ex vivo* ainsi qu'une récente étude chez le singe remettent en question cette hypothèse et semblent indiquer que le virus pourrait être capable de franchir cette barrière (Dinh *et al.*, 2015; Fischetti *et al.*, 2009).

D. La muqueuse colo-recto-anale

d. Organisation tissulaire

Lors de relations sexuelles anales, la muqueuse peut être en contact avec le sperme au niveau de l'anus, du rectum et d'une partie du colon sigmoïde (Louissaint *et al.*, 2012). La muqueuse colique est constituée :

1. d'un épithélium superficiel cylindrique simple formé par des entérocytes absorbants et des cellules caliciformes sécrétrices de mucus. Ce mucus lubrifie la surface de la muqueuse et sert de barrière protectrice.
2. D'un épithélium glandulaire, bordant les glandes ou les cryptes de Lieberkühn comprenant des entérocytes et une majorité de cellules caliciformes, des cellules souches et des cellules entéro-endocrines clairsemées.

Dans le rectum, la muqueuse est plus épaisse, avec des veines proéminentes, et les cryptes de Lieberkühn, bordées par des cellules majoritairement caliciformes, sont plus longues. Au niveau du canal anal, les cryptes disparaissent progressivement. La muqueuse du canal anal est caractérisée par huit à dix colonnes anales longitudinales ou colonnes de Morgagni. La base des colonnes anales constitue la ligne pectinée. Au-delà de la ligne pectinée, l'épithélium cylindrique de la muqueuse rectale est remplacé par un épithélium pavimenteux stratifié. Cet épithélium est kératinisé au niveau de la zone externe (Figure 8).

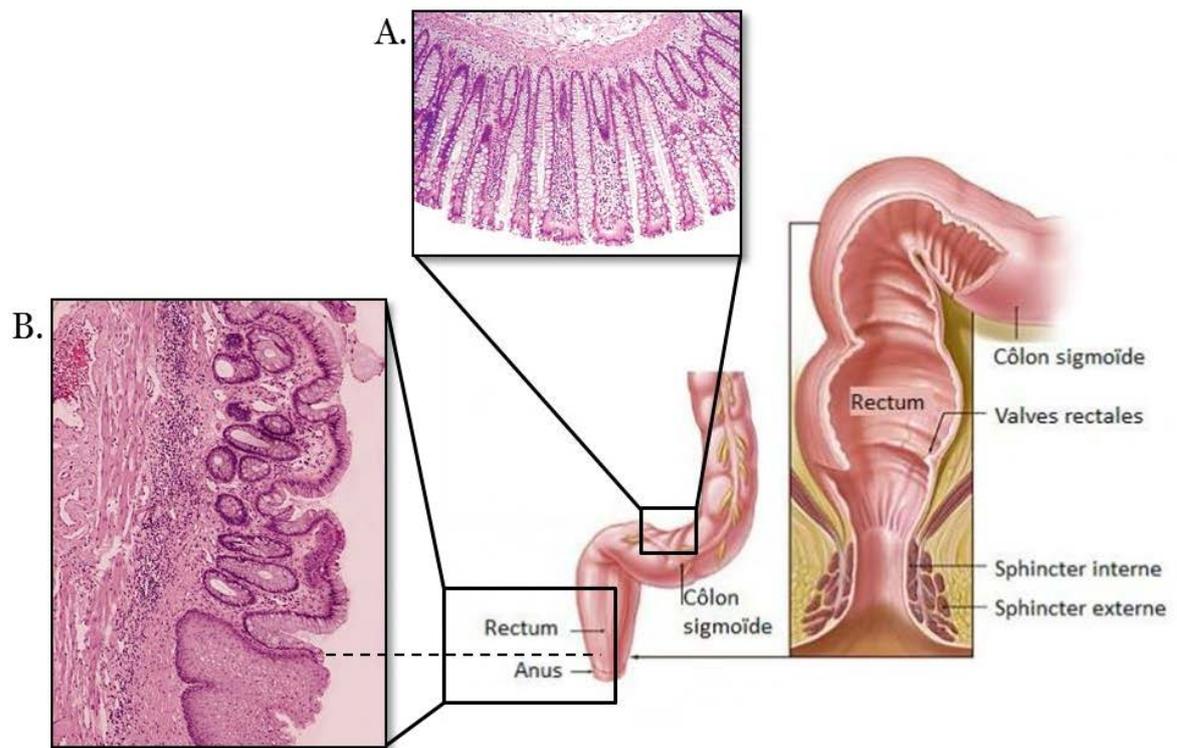


Figure 8 : Histologie de la muqueuse colo-recto-anaale. A. Epithélium cylindrique simple du colon sigmoïde. B. Zone de transition entre l'épithélium cylindrique simple du rectum et l'épithélium pavimenteux stratifié de l'anus.

e. Système immunitaire

La muqueuse colo-recto-anaale est riche en cellules immunitaires. Elle présente des nodules lymphoïdes solitaires similaires aux plaques de Peyer présentes dans l'intestin grêle (Figure 9, Vajdy, 2008). La *lamina propria* contient un grand nombre de cellules susceptibles à l'infection par le VIH-1 telles que des DC, des macrophages et des lymphocytes exprimant CD4, CCR5 et dans une moindre mesure CXCR4.

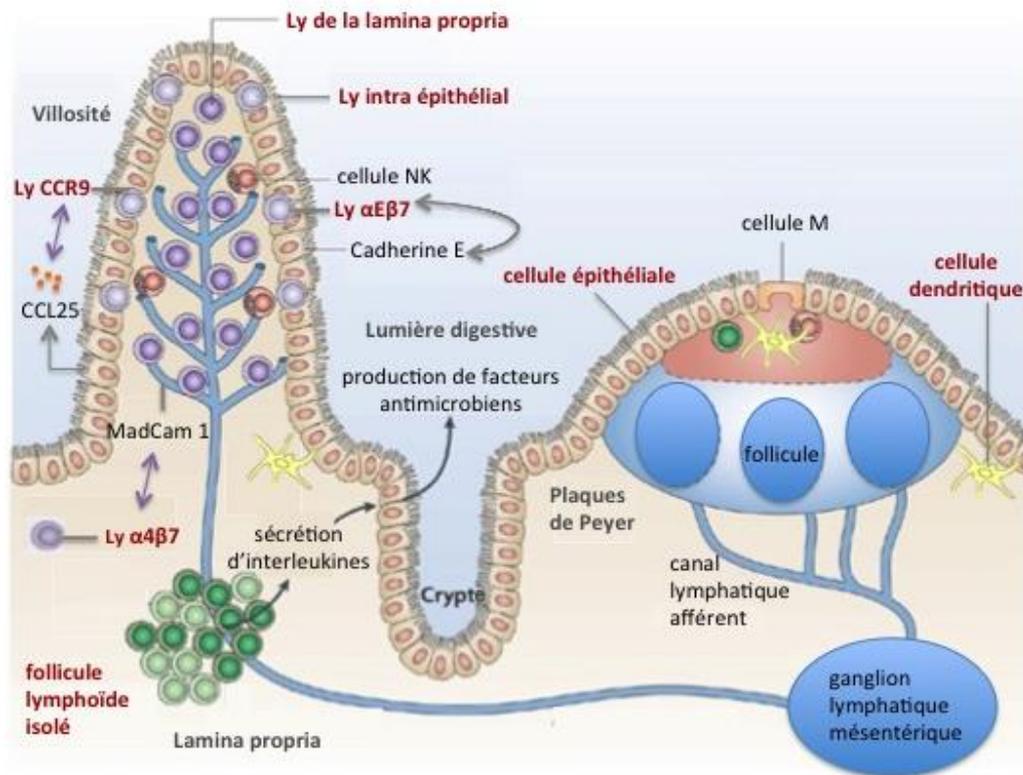


Figure 9 : Site inducteur et effecteur de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale (Vergnon-Miszczycha *et al.*, 2015). Le compartiment effecteur est constitué de lymphocytes intra épithéliaux et de lymphocytes présents au sein de la *lamina propria*. Les cellules M agissent comme des portes d'entrée pour les antigènes, favorisant la capture et la présentation au niveau de sites inducteurs (plaque de Peyer et ganglion lymphatique mésentérique). Les cellules T naïves activées au niveau des sites inducteurs surexpriment l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ qui interagit avec MADCAM1 (mucosal addressin cell-adhesion molecule 1) exprimé au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins HEV (High Endothelial Veinule) favorisant le homing au niveau du site effecteur de la muqueuse. La production de la chimiokine CCL25 par les cellules épithéliales favorise également la migration de lymphocytes (exprimant le récepteur CCR9) vers la muqueuse. Les cellules cibles potentielles du VIH-1 sont notées en gras et en rouge.

Les différences entre les compositions des muqueuses cervicovaginales et anorectales expliquent en partie le plus grand risque de transmission lors d'un rapport sexuel anal (Tableau 1).

E. Le franchissement muqueux du VIH-1

Lors de la transmission sexuelle du VIH-1, l'infection est établie lorsque les particules virales, libres ou associées aux cellules (majoritairement lymphocytes T CD4 et macrophages), pénètrent la muqueuse et atteignent les cellules cibles. La Figure 10 illustre les différents mécanismes de franchissement muqueux qui ont été décrits. L'infection peut être établie suite : a/ au passage de particules virales libres ou associées aux cellules du fait de la présence de brèches au sein de la muqueuse ; b/ à l'infection des cellules épithéliales ; c/ à la transcytose des particules virales libres ; d/ la transmigration de leucocytes infectés ; e/ à la prise en charge des particules virales par les cellules immunitaires sous muqueuses ; et f/ dans le cas particulier de la muqueuse colo-recto-anale, au transport des particules virales par les cellules M.

Le rôle des cellules épithéliales du tractus génital féminin dans la transmission sexuelle du VIH-1a fait l'objet d'une revue présentée plus loin dans le manuscrit (De Saint Jean *et al.*, 2015).

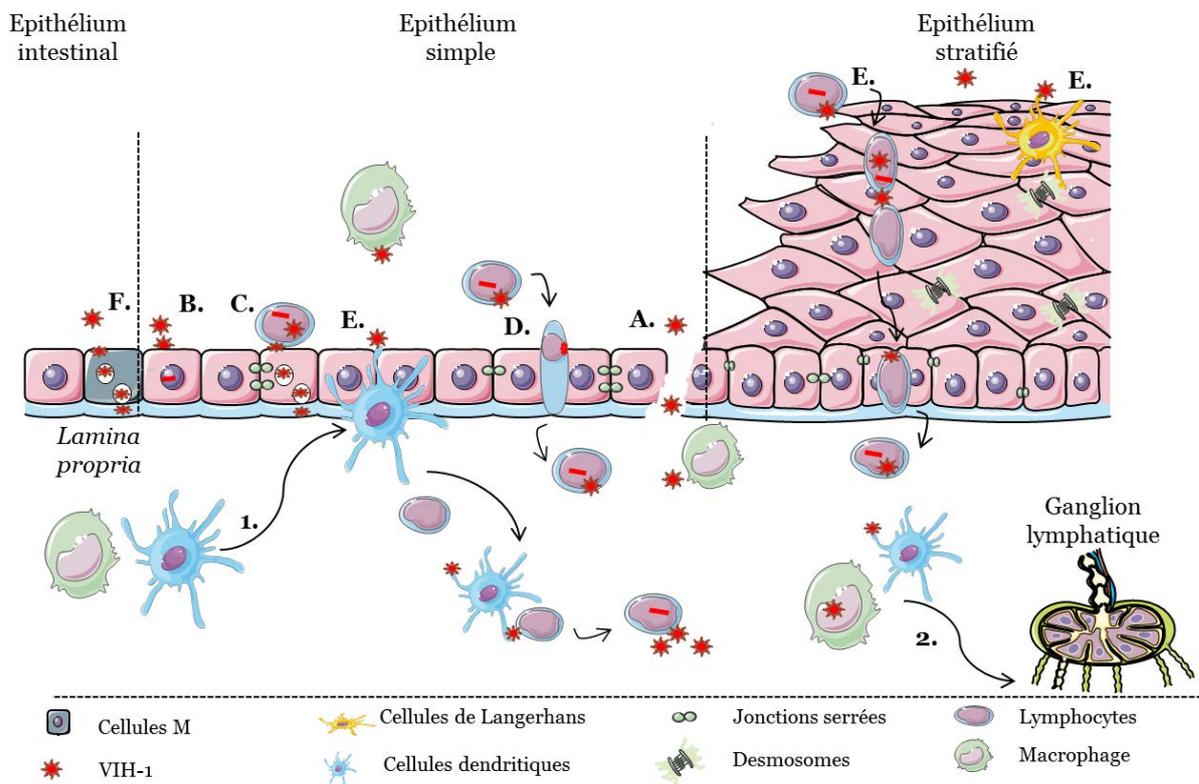


Figure 10: Mécanismes de franchissement de la muqueuse par le VIH-1, d'après Lawrence *et al.* (2009). A. Passage passif par brèche. B. Infection non productive des cellules épithéliales. C. Transcytose des particules virales de la lumière vers la sous-muqueuse. D. Transmigration des leucocytes du sperme infectés. E. Prise en charge du virus par les cellules immunitaires intra ou sous muqueuses. Les particules virales peuvent être captées par les cellules de Langerhans intraépithéliales ou les cellules dendritiques de la *lamina propria* ou infecter des leucocytes intraépithéliaux. F. Transport des particules virales par les cellules M. 1. Dans un premier temps, une chimioattraction des cellules immunitaires au niveau du site d'infection est observée. 2. Dans un second temps, les cellules présentatrices de l'antigène ayant capté les particules virales vont migrer vers les ganglions lymphatiques.

a. Altération de l'intégrité de la muqueuse : passage passif des particules virales

Les rapports sexuels, peuvent conduire à des ruptures et des abrasions de la muqueuse. Dans une étude réalisée par Norvell *et al.* (1984), la présence de brèches au niveau de la muqueuse vaginale est observée chez 60% des femmes ayant eu des rapports consentants. L'existence de brèches permet aux particules virales présentes dans le sperme, qu'elles soient libres ou associées aux cellules, d'accéder directement aux cellules cibles des muqueuses et donc d'établir rapidement l'infection.

b. Infection des cellules épithéliales

La capacité des cellules épithéliales à être infectées par le VIH-1 est largement débattue. La plupart des études montrent que ces cellules n'expriment pas ou peu le récepteur CD4 et les

corécepteurs CXCR4 et CCR5. (Berlier *et al.*, 2005; Bobardt *et al.*, 2007; Dezzutti *et al.*, 2014; Kohli *et al.*, 2014; Micsenyi *et al.*, 2013; Yeaman *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que le VIH-1 peut utiliser plusieurs récepteurs alternatifs exprimés par les cellules épithéliales tels que le gp340 (ou SAG, Salivary Agglutinin) (Stoddard *et al.*, 2007, 2009), le GalCer (galactosylceramide) (Berlier *et al.*, 2005; Bomsel, 1997; Dezzutti *et al.*, 2001; Fantini *et al.*, 1993; Fotopoulos *et al.*, 2002; Yahi *et al.*, 1992) ou les HSPG, (heparan sulphate proteoglycans) (Bobardt *et al.*, 2007; Micsenyi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2003), pour pénétrer dans ces cellules.

Si certains chercheurs montrent que l'entrée du virus mène à une infection des cellules épithéliales avec intégration du génome viral, celle-ci est rarement suivie par la production de particules infectieuses (Adachi *et al.*, 1987; Asin *et al.*, 2004; Berlier *et al.*, 2005; Furuta *et al.*, 1994; Howell *et al.*, 1997; Iversen *et al.*, 1998; Micsenyi *et al.*, 2013; Tan and Phillips, 1996, 1998). D'autres parlent plutôt de capture puis séquestration des particules virales par les cellules épithéliales qui sont ensuite capables de les transmettre aux cellules cibles sous muqueuses d'une façon contact-dépendent proche de la synapse virologique (Dezzutti *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003).

c. Transcytose

La transcytose est un mécanisme de transport vésiculaire transcellulaire permettant le passage de macromolécules de la face apicale de la cellule épithéliale vers la face basale. Les particules virales du VIH-1, qu'elles soient libres ou associées aux cellules, peuvent traverser la barrière muqueuse par transcytose (Bomsel, 1997; Hocini and Bomsel, 1999; Hocini *et al.*, 2001).

Le mécanisme mis en jeu lors de la transcytose n'est pas encore clairement élucidé. Le rôle de la protéine d'enveloppe est notamment débattu. Certains auteurs évoquent une liaison nécessaire de la gp120 aux récepteurs HSPG (Bobardt *et al.*, 2007) et au récepteur gp340 (Stoddard *et al.*, 2007) tandis que d'autres parlent d'un mécanisme indépendant de l'enveloppe virale (Chomont *et al.*, 2008; Kinlock *et al.*, 2014). Dans le cas du passage de particules associées aux cellules, ce mécanisme semble dépendent de l'établissement d'une synapse virologique entre la cellule infectée et le pôle apical des cellules épithéliales (Alfsen *et al.*, 2005). L'établissement de cette synapse virologique nécessite l'expression de trois molécules par les cellules épithéliales : (i) l'HSPG agrin qui interagit avec la gp41 des particules virales (ii) l'intégrine $\beta 1$ et (iii) GalCer.

L'efficacité de la transcytose des particules virales est faible (Bobardt *et al.*, 2007; Sodora *et al.*, 1998). La présence d'IgG spécifiques de la glycoprotéine d'enveloppe, tel qu'il peut y en avoir dans le sperme ou les sécrétions cervicovaginales, semble toutefois favoriser la transcytose des particules virales libres *via* le récepteur Fc néonatal (Gupta *et al.*, 2013).

d. Transmigration

La transmigration correspond au passage des particules virales associées aux cellules du sperme par infiltration à travers la muqueuse intacte (Tan and Phillips, 1996; Zacharopoulos *et al.*, 1997). Ce mécanisme ne semble pas impliquer la glycoprotéine d'enveloppe ni les corécepteurs principaux CXCR4 et CCR5 mais pourrait être dépendent de l'interaction entre l'intégrine $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ CD11a/CD18 exprimée par les monocytes infectés et les molécules d'adhésion intercellulaire ICAM-1,-2 ou -3 exprimées au niveau apical des cellules épithéliales (Carreno *et al.*, 2002a; Chancey *et al.*, 2006). Ce mécanisme a été observé *in vitro* mais également *in vivo* chez la souris humanisée (Di Fabio *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2002) et le singe (Sallé *et al.*, 2010).

Ce mécanisme pourrait être particulièrement efficace puisqu'une fois la barrière épithéliale franchie, la transmission peut avoir lieu soit par des particules virales libres produites *de novo* par les cellules infectées ayant transmigré soit par un contact entre la cellule ayant transmigré et des cellules cibles du receveur. La transmission de cellule à cellule se révèle bien plus performante que la transmission par des particules libres puisqu'il y a une production de particules virales concentrée au niveau de la zone de contact. Cette zone de contact, appelée synapse virologique, rend le virus moins vulnérable aux facteurs de restriction et molécules antivirales présentes dans l'environnement local participant également à l'efficacité de la transmission de cellule à cellule (Anderson and Le Grand, 2014).

e. Prise en charge du VIH-1 par les cellules immunitaires intra ou sous muqueuses

Au niveau de l'épithélium pluristratifié, les particules virales libres ou associées aux cellules du sperme peuvent être prises en charge par les lymphocytes T CD4 intraépithéliaux et les macrophages menant à une infection productive de ces cellules avec réplication du virus (Collins *et al.*, 2000; Ganor *et al.*, 2013; Greenhead *et al.*, 2000; Hladik and McElrath, 2008). Les particules virales peuvent également être captées par les cellules de Langerhans, cellules présentatrices de l'antigène appartenant à la famille des DC. Ces cellules possèdent des extensions cytoplasmiques appelées dendrites leur permettant de capter les particules virales au sein de la muqueuse mais également au niveau de la lumière. Les conséquences de la capture des particules virales par les cellules de Langerhans sont controversées. Celle-ci peut aboutir soit à l'internalisation des virions au niveau de vésicules d'endocytose dans lesquels ils peuvent être conservés pendant plusieurs jours avant d'être transmis à d'autres cellules cibles au niveau de la *lamina propria* et des ganglions lymphatiques après la migration des cellules de Langerhans vers ces sites (Ganor *et al.*, 2010; Hladik *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2011), soit à l'internalisation des virions au niveau des granules de Birbeck au sein desquelles ils sont dégradés conférant ainsi un rôle protecteur aux cellules de Langerhans (de

Witte et al., 2008). Ces deux mécanismes dépendent notamment de l'état de maturation des cellules de Langerhans et de la quantité de virus à laquelle elles sont exposées (de Witte et al., 2007a). Au niveau de l'épithélium simple, les DC présentes au niveau de la *lamina propria* peuvent également capter des particules virales *via* la projection de leurs dendrites au niveau de la lumière et participer à la dissémination du VIH-1 par un mécanisme similaire à celui des cellules de Langerhans (Pope and Haase, 2003).

f. Transport des particules virales par les cellules M

Les cellules M (M pour microfold) sont des cellules spécialisées dans le transport transépithélial de macromolécules. Elles se retrouvent au niveau des plaques de Peyer au sein de l'intestin grêle et du gros intestin ainsi qu'au niveau des follicules lymphoïdes au sein de la muqueuse rectale. Ces cellules jouent un rôle dans la capture et la présentation des agents pathogènes aux cellules immunitaires sous muqueuses. De nombreux agents pathogènes exploitent les cellules M comme porte d'entrée de l'organisme dont le VIH-1 (Amerongen *et al.*, 1991; Neutra, 1999; Neutra *et al.*, 1996; Owen, 1998; Wang *et al.*, 2014). Le transport des particules virales par les cellules M concerne à la fois les particules libres et celles associées aux cellules et semble être récepteur dépendent (implication de GalCer et des corécepteurs CXCR4 et CCR5) (Fotopoulos *et al.*, 2002).

g. Sélection des souches R5 lors la transmission sexuelle

Lorsque le VIH-1 est transmis par voie sexuelle, il a été observé que dans 80% des cas l'infection est établie par un seul virus libre ou associé aux cellules (un seul génotype) et que ce virus est généralement de tropisme R5 (Keele *et al.*, 2008; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2009). Au niveau des fluides biologiques contaminants (sperme, sécrétions cervico-vaginales, sécrétions rectales, sang), les trois types de virus X4, R5 et X4R5 sont pourtant présents suggérant l'existence de mécanismes de restriction de l'infection plus efficaces concernant les virus X4 (Delwart *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 2005). Au niveau du tractus gastro-intestinal, ce tropisme pourrait s'expliquer par la plus grande disponibilité de cellules exprimant CCR5 par rapport à CXCR4 (Poles *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1998). De plus, il a été observé sur un modèle utilisant des cellules CaCo-2, que les particules virales de tropisme R5 sont capables de déclencher le recrutement de DC au niveau de la muqueuse favorisant ainsi leur capture et leur dissémination (Cavarelli *et al.*, 2013). Au niveau du tractus génital féminin, la tendance est plutôt inversée avec une majorité de cellules CXCR4⁺ (Trifonova *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 1998). Toutefois, les cellules endocervicales sécrètent du SDF-1 (Laird *et al.*, 2011) qui lorsqu'il se lie au CXCR4 provoque son internalisation et sa dégradation partielle diminuant ainsi le nombre de récepteurs véritablement disponibles pour les particules virales (Agace *et al.*, 2000; Tarasova *et al.*, 1998). D'autre part, dans un modèle *in vitro* de transmigration, Lawrence *et al.* (2012) ont montré la

transmigration préférentielle des souches R5 par rapport aux souches X4 qui seraient séquestrées au sein des cellules épithéliales, ce qui pourrait expliquer en partie la transmission prédominante de ces souches lors de contaminations par voie sexuelle. De la même façon, Meng *et al.*, (2002) observent eux, une transcytose préférentielle des souches R5 au niveau de cellules primaires intestinales. Par ailleurs, la transmission des particules virales *via* une synapse infectieuse semble privilégier les souches R5, et ce même en présence d'anticorps neutralisants (David *et al.*, 2001; Ganesh *et al.*, 2004). Le mucus pourrait également jouer un rôle dans la restriction du franchissement muqueux en affectant différemment les virus de type R5 ou X4. Les virus X4 possèdent une gp120 dont la charge cationique exposée est plus élevée que celle des virus R5. L'interaction entre les particules virales et les mucines polyanioniques est donc plus forte et favorise la clairance de ces particules réduisant ainsi leur infectivité (Kwong *et al.*, 2000). Par ailleurs, les souches préférentiellement transmises, en particulier pour les sous-types A, C et D, présentent la particularité de posséder moins de sites de N-glycosylation codés par leur gène *env* (Chohan *et al.*, 2005; Derdeyn *et al.*, 2004; Ping *et al.*, 2013; Sagar *et al.*, 2009). Cela pourrait leur conférer une résistance aux anticorps neutralisants à large spectre dont les paratopes reconnaissent certains glycanes (Lavine *et al.*, 2012). Finalement, l'existence d'une unique barrière empêchant l'infection par les virus de type X4 est peu probable. Il semblerait plutôt qu'une multitude de mécanismes permette de protéger de l'infection par le VIH-1 et que l'action de ces mécanismes soit plus efficace contre les souches de type X4 par rapport aux souches R5 (Figure 11). Il est fort probable que ces sélections, qu'elles aient lieu au niveau du contaminant ou du contaminé, mettent en jeu des mécanismes redondants et que leur efficacité diffère entre les individus (Grivel *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2015; Margolis and Shattock, 2006).

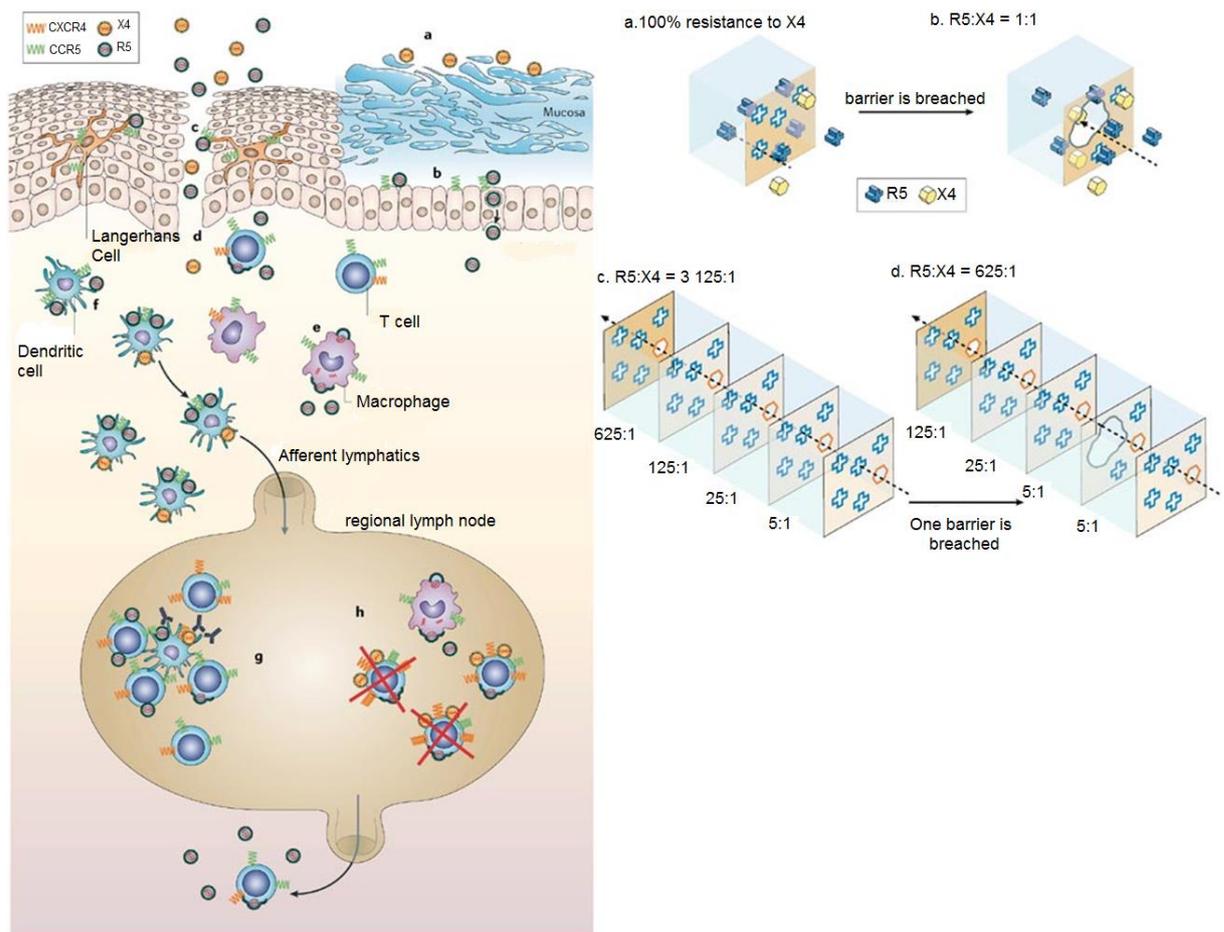


Figure 11 : Sélection des souches à tropisme R5, d'après Margolis and Shattock (2006). A. Mécanismes de restriction expliquant potentiellement la faible transmission des souches X4. a. Immobilisation et inactivation préférentielle des souches X4 par le mucus. b. Transmigration et transcytose préférentielles des souches R5. c. d. e. Présence d'un plus grand nombre de cellules cibles des souches R5 (cellules de Langerhans, lymphocytes T mémoire et macrophages). f. Capture préférentielle des souches R5 par les DC favorisant la dissémination de ses souches au niveau des ganglions lymphatiques. g. Transmission des souches R5 *via* une synapse virologique plus efficace, même en présence d'anticorps neutralisants. h. Persistance du réservoir R5 constitué par les macrophages alors que les lymphocytes infectés par les souches R5 et X4 sont rapidement éliminés B. Deux mécanismes de sélection de la transmission des souches R5. a. Cas d'une barrière unique protégeant parfaitement contre l'infection par les souches X4. b. En cas de rupture de cette barrière, il n'y a plus de protection contre l'infection des souches X4. c. Cas d'une multitude de barrières imparfaites qui protège seulement cinq fois plus efficacement contre les souches X4 que contre les R5. Les probabilités d'infection exprimées sous forme de ratios sont indiquées. Si les cinq barrières sont intactes, un virus R5 a 3 125 fois plus de chances d'atteindre le dernier compartiment qu'une souche X4. Si une de ces barrières est rompue, il y a alors 625 fois plus de chance qu'une souche R5 atteigne le dernier compartiment par rapport à une souche X4.

F. Modulation de la transmission du VIH-1 par les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ne constituent pas qu'une simple barrière physique. Ces cellules sont capables de réagir à la présence de pathogènes et disposent de mécanismes de défenses. Cependant, ces mécanismes peuvent parfois se montrer délétères dans le cadre d'une infection par le VIH-1.

a. Reconnaissance du VIH-1

Les cellules épithéliales expriment un grand nombre de récepteurs appelés Pattern Recognition Receptor (PRR) leur permettant de reconnaître des motifs moléculaires récurrents associés aux agents pathogènes (appelés PAMPs pour : Pathogen-Associated molecular Patterns). Parmi ces PRR se trouvent : les Toll-Like Receptors (TLR) TLR1-3, TLR5-9 (Andersen *et al.*, 2006; Cremel *et al.*, 2006; Fazeli *et al.*, 2005; Fichorova *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2004), les Nucleotide-binding Oligomerization Domain receptors (NOD) NOD1 et NOD2 (Hart *et al.*, 2009) et le récepteur RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) appartenant à la famille des RNA helicases like receptors. (RLR) (Sathe and Reddy, 2014). Le TLR4 est exprimé au niveau des tissus supérieurs (endocol, endomètre et trompes de Fallope) mais est absent de l'exocol et du vagin (Fazeli *et al.*, 2005; Fichorova *et al.*, 2002; Herbst-Kralovetz *et al.*, 2008; Nazli *et al.*, 2010; Pioli *et al.*, 2004). L'expression du TLR10 semble être restreinte aux trompes de Fallope.

A l'exception du TLR9 détecté à la surface des cellules épithéliales de l'urètre, les autres TLR ne sont pas détectés à la surface des cellules épithéliales de la muqueuse génitale masculine (Pudney and Anderson, 2011).

Les cellules épithéliales de la muqueuse colorectale expriment un grand nombre de PRR dont, la plupart des TLR à l'exception de TLR10 (Abreu, 2010; Fan and Bingro, 2015), NOD1 et 2 et RIG-I (Lech *et al.*, 2010). Parmi ses PRR, les TLR3, 7/8, 9 et les RLR sont capables de reconnaître des motifs viraux. Leur activation induit la production de chimiokines et de cytokines par les cellules épithéliales permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires au niveau du site d'infection.

b. Sécrétions de facteurs modulateurs de l'infection

Les cellules épithéliales sont capables de sécréter de nombreux facteurs de nature différente. Elles participent à la production du mucus, sécrètent des peptides antimicrobiens ou encore des chimiokines ou cytokines. Ces sécrétions peuvent être constitutives ou induites par différents *stimuli*.

➤ *Production de mucus*

Les cellules épithéliales de la muqueuse génitale féminine tout comme celles de la muqueuse colorectales sont recouvertes de mucus, fluide hydrophobe permettant à la fois une protection de la muqueuse ainsi que sa lubrification. Le mucus est essentiellement composé de mucines, sécrétées par les glandes endocervicales dans le cas de la muqueuse génitale féminine (Linden *et al.*, 2008), par les cellules caliciformes dans le cas de la muqueuse colorectale (Deplancke and Gaskins, 2001) ou les glandes de Littre dans le cas de la muqueuse génitale masculine (Anderson *et al.*, 2011). Le réseau viscoélastique formé par le mucus peut piéger les particules virales et empêcher leur diffusion

(Shukair *et al.*, 2013). Les mouvements réguliers du mucus permettent l'élimination des particules piégées contribuant ainsi à la protection de la muqueuse contre l'infection (Miller *et al.*, 2005). En plus de ce mécanisme non spécifique, Stax *et al.* ont montré que le mucus colorectal était capable d'inhiber la *trans*-infection des lymphocytes T CD4 par les DC en faisant compétition avec la capture des particules virales (Stax *et al.*, 2015).

➤ *Sécrétion de facteurs solubles*

- Peptides antimicrobiens

Les cellules épithéliales sécrètent un grand nombre de molécules ayant naturellement des propriétés antivirales, antibactériennes et/ou antifongiques. (Cole and Cole, 2008; Ghosh, 2014; Hooper, 2009; Kopp *et al.*, 2015). L'expression de ces peptides antimicrobiens apparaît augmentée au cours d'infections sexuellement transmissibles (IST) (Levinson *et al.*, 2009; Simhan *et al.*, 2007; Valore *et al.*, 2006; Wiesenfeld *et al.*, 2002). La plupart des peptides antimicrobiens présentent une activité anti-VIH-1 *in vitro* (détaillé dans le Tableau 2).

Tableau 2 : Effets anti-VIH/pro-VIH des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales

Peptides antimicrobiens	Rôle dans la transmission du VIH-1	Références
Cathélicidine	Inhibe la transcriptase inverse ainsi que la protéase virale	Bergman <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008 ; Wong <i>et al.</i> , 2011
	Favorise la <i>Trans</i> -infection des lymphocytes T CD4 par les cellules de Langerhans	Ogawa <i>et al.</i> , 2013
Lactoferrine	Bloque l'attachement des particules virales VIH-1 aux cellules épithéliales et inhibe le transfert des particules virales des DC aux lymphocytes T CD4	Carthagena <i>et al.</i> , 2011 Saidi <i>et al.</i> , 2006
Serpines et Cystatines	Inhibent l'attachement et la réplication du virus Diminuent l'inflammation locale	Aboud <i>et al.</i> , 2014
SLPI	Altère la stabilisation de la fusion initiée par l'annexine V	Ma <i>et al.</i> , 2004
Trappine/elafine	Réduit l'attachement du virus et sa transcytose à travers les cellules épithéliales génitales Réduit la sécrétion d'IL-8 et de TNF- α	Drannik <i>et al.</i> , 2012a, 2012b Ghosh <i>et al.</i> , 2009
α-défensine-5	Empêche l'interaction entre la gp120 et la CD4	Furci <i>et al.</i> , 2012
	Favorise l'attachement du virus aux cellules cibles	Rapista <i>et al.</i> , 2011
β-défensines	Interagissent directement avec le virus, favorisent l'internalisation de CXCR4 et inhibent la réplication virale	Feng <i>et al.</i> , 2006 Klotman and Chang, 2006

Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la cathélicidine (Bergman *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2011) et les défensines 5 et 6 (Furci *et al.*, 2012; Rapista *et al.*, 2011). Peu de données sur l'effet *in vivo* de ces molécules sont disponibles. Récemment, une étude prospective a montré une corrélation entre les concentrations d' α -défensines et de SLPI présents au niveau du prépuce et le risque d'infection par le VIH-1 indiquant que leur rôle protecteur est clairement insuffisant voire même suggérant un effet facilitateur pouvant résulter de leur capacité à recruter les cellules cibles qui primerait sur leurs propriétés antivirales (Hirbod *et al.*, 2014). Des recherches supplémentaires sont encore nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces molécules dans la transmission sexuelle du VIH-1.

- Chimioquinas et cytokines

Les cellules épithéliales sécrètent de façon constitutive des cytokines et chimiokines participant ainsi à la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes (Fahey *et al.*, 2005). Certains de ses facteurs jouent un rôle protecteur contre le VIH-1 tels que SDF-1 ou RANTES qui sont les ligands naturels respectifs des corécepteurs CXCR4 et CCR5 (Agace *et al.*, 2000; Cocchi *et al.*, 1995). Les interférons de type I ont une action directe en inhibant la réplication virale (Okumura *et al.*, 2006) alors que les chimiokines et cytokines comme l'IL8, MCP1, MIP-3 α ou le TNF- α ont une action indirecte en recrutant et activant diverses cellules immunitaires telles que les lymphocytes, les neutrophiles, les DC ou les monocytes. La reconnaissance des PAMP *via* les TLR conduit à une augmentation de la sécrétion de nombreux facteurs dont l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, RANTES, le CCL2, la prostaglandine E2 (PGE2) et le GM-CSF (Andersen *et al.*, 2006; Fichorova *et al.*, 2002; Herbst-Kralovetz *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2012; Nazli *et al.*, 2013; Sathe and Reddy, 2014; Schaefer *et al.*, 2004). Les cellules épithéliales sont donc capables de moduler l'inflammation au niveau muqueux jouant ainsi un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Cependant, dans le cas d'une infection par le VIH-1, le virus peut tirer profit de cette situation. Il a en effet été montré que l'activation immunitaire favorise la réplication virale (Lawn *et al.*, 2001; Rollenhagen and Asin, 2011) et induit une réponse pro-inflammatoire associées à une compartimentalisation tissulaire (Abel *et al.*, 2005). D'ailleurs, les particules virales VIH-1 sont elles-mêmes capables d'induire la production de cytokines inflammatoires suite à l'interaction de la gp120 avec les cellules épithéliales. Cette sécrétion mène à une détérioration des jonctions serrées, augmentant ainsi la perméabilité de la muqueuse et donc les chances de passage des particules virales à travers l'épithélium (Nazli *et al.*, 2010). Les cytokines pro-inflammatoires favorisent également la transmigration des particules virales en favorisant l'expression d'ICAM 2 et 3 (CD102, CD50) par les cellules épithéliales. Ces molécules interagissent avec LFA-1 exprimé par les monocytes favorisant ainsi le passage de l'épithélium

(Carreno *et al.*, 2002b). D'autre part, le recrutement et l'activation de cellules immunitaires *via* les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales favorisent la contamination au niveau muqueux puisque dans le cas particulier du VIH-1, ces cellules immunitaires constituent les cellules cibles. Ainsi, Fontenot *et al.* (2009) ont montré que les particules virales du VIH-1 induisent la sécrétion de TSLP par les cellules épithéliales, provoquant le recrutement et l'activation de DC capables de stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4 et de favoriser leur infection. D'autres cytokines ont un rôle plus ambivalent. Le CCL20, aussi appelé MIP-3 α , a par exemple, été décrit comme une molécule ayant des activités anti-VIH-1 (Ghosh *et al.*, 2009). Pourtant, cette molécule a la capacité d'attirer les DC connues pour jouer un rôle dans la dissémination du VIH-1. De plus, les DC recrutées au niveau de la muqueuse par le CCL20 sécrètent des chimiokines attirant les cellules CCR5⁺ (notamment MIP-1 α et MIP-1 β) créant ainsi un environnement riche en cellules cibles au niveau du site d'infection (Haase, 2011; Li *et al.*, 2009).

En plus de ceux sécrétés par les cellules épithéliales, de nombreux autres facteurs endogènes ou exogènes peuvent influencer l'infection par le VIH-1.

G. Influence de facteurs endogènes et exogènes sur la transmission sexuelle du VIH-1

a. Facteurs génétiques

Certains facteurs génétiques de l'hôte peuvent avoir une influence sur la susceptibilité de l'individu à l'infection (Kaslow *et al.*, 2005; Kaur and Mehra, 2009; Lama and Planelles, 2007). Ainsi, la présence d'une délétion de 32 nucléotides au niveau de CCR5 (CCR5 Δ 32) confère une protection contre l'infection par le VIH-1 (Dean *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996). Cette mutation est courante au sein de la population caucasienne où 40% des individus sont hétérozygotes et 1% homozygotes. Les porteurs hétérozygotes infectés par le VIH-1 ont une progression plus lente vers le stade SIDA et sont surreprésentés au sein des patients dits non progressifs à long terme (LTNP) (Stewart *et al.*, 1997). Les porteurs homozygotes n'expriment pas de CCR5 fonctionnels et sont donc protégés de l'infection par les souches R5, tropisme majoritairement observé lors de la transmission sexuelle du virus. Quelques cas de personnes homozygotes infectées par des souches X4 ont tout de même été rapportés (Balotta *et al.*, 1997; Biti *et al.*, 1997; Michael *et al.*, 1998; Naif *et al.*, 2002). La protection apportée par cette mutation est confirmée par la description du premier cas de rémission d'une personne infectée par le VIH-1 suite à une greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur CCR5 Δ 32 homozygote (Allers *et al.*, 2011; Hütter *et al.*, 2009).

Certains gènes du HLA (Human Leukocytes Antigen) de classe I et notamment le HLA-B sont également liés au contrôle de l'infection par le VIH-1 (Carrington and O'Brien, 2003; Kaslow *et al.*, 2005). Les gènes HLA codent les protéines formant les complexes majeurs d'histocompatibilité présents à la surface des leucocytes et leur polymorphisme est important. Les allèles HLA-B27 et HLA-B57 sont associés à un bon pronostic alors que les allèles HLA-B35 et HLA-B53 sont associés à un mauvais (Carrington *et al.*, 1999; Hendel *et al.*, 1999; Itescu *et al.*, 1992; Migueles *et al.*, 2000; Scorza Smeraldi *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 2002).

b. Stade de l'infection et charge virale

La charge virale du liquide biologique contaminant constitue un facteur déterminant du risque de transmission (Baeten *et al.*, 2011; Gaillard *et al.*, 2000; Quinn *et al.*, 2000). Plus la charge virale est importante plus le risque de transmission est grand (Figure 12). La charge virale est corrélée avec le stade de l'infection (Busch and Satten, 1997; Mellors *et al.*, 1995, 1996; O'Brien *et al.*, 1996a, 1996b). La charge virale d'un individu infecté étant plus importante au cours de la primo-infection et du stade SIDA qu'au cours de la phase chronique, les risques de transmission du VIH-1 sont plus élevés lors de ces phases (Pilcher *et al.*, 2004, 2007; Wawer *et al.*, 2005).

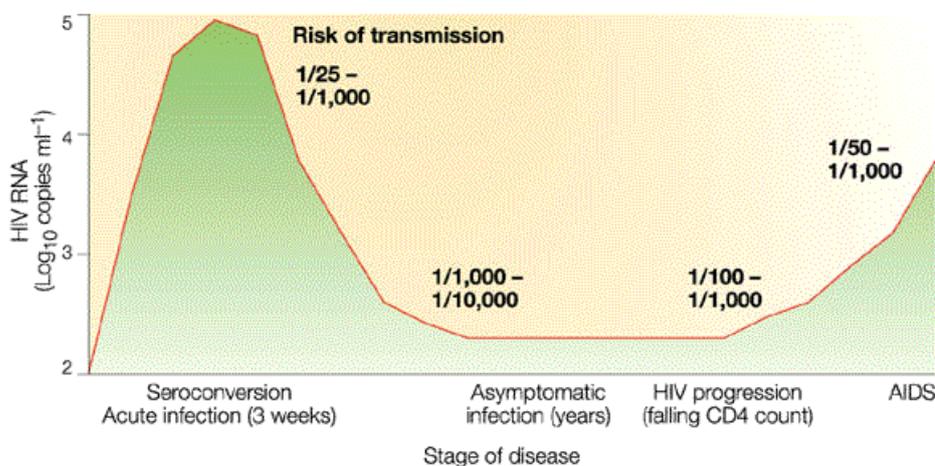


Figure 12 : Influence de la charge virale et de ses variations au cours de l'infection sur les risques de transmission du VIH-1, d'après Galvin and Cohen (2004).

c. Les hormones sexuelles

➤ *Cycle menstruel et hormones sexuelles endogènes*

Les variations en concentrations circulantes d'œstrogène et de progestérone au cours du cycle menstruel influencent l'immunité du tractus génital féminin (Wira *et al.*, 2015). Au moment de l'ovulation, les hormones sexuelles régulent plusieurs aspects de l'immunité permettant de créer un contexte favorable à la procréation. Cependant, cette régulation crée également une fenêtre de

vulnérabilité aux infections virales (Figure 13; Wira and Fahey, 2008). Le risque de transmission sexuelle du VIH-1 est accru sur une dizaine de jours pendant la phase lutéale, correspondant aux taux les plus élevés de progestérone (Saba *et al.*, 2013). Les hormones sexuelles influencent à la fois le recrutement de cellules cibles au niveau de la muqueuse génitale féminine, l'expression des récepteurs et corécepteurs par les cellules immunitaires et les cellules épithéliales de la muqueuse et la sécrétion de facteurs (Casslén *et al.*, 1998; Wira *et al.*, 2010, 2014). Il a par exemple été observé que l'expression de GalCer par les cellules endométriales est plus importante pendant la phase lutéale que pendant la phase folliculaire (Yeaman *et al.*, 2003). Il a également été montré que l'œstrogène stimule d'une part, la sécrétion de SLPI et inhibe d'autre part l'expression de TNF α et MIP3 α que celles-ci soient constitutives ou induites suite à une stimulation par des agonistes des TLR (Fahey *et al.*, 2008; Grant-Tschudy and Wira, 2004). D'ailleurs une étude montre que les sécrétions de cellules épithéliales utérines de femmes non ménopausées présentent une activité antivirale partiellement due au SLPI qui n'est plus observée chez des femmes ménopausées (Fahey and Wira, 2002). Concernant les peptides antimicrobiens, la sécrétion d'un grand nombre de ces facteurs dont les α -défensines 1, 2, 3 et 5, les β -défensines 1 et 3, le SLPI et l'elafin est augmentée au cours de la phase lutéale (Yarbrough *et al.*, 2015). Au contraire, les concentrations en β -défensine 2 et 4 sont, elles, plus importantes au cours des menstruations et de la phase folliculaire respectivement. La sécrétion cyclique des peptides antimicrobiens est abolie par la prise de contraceptifs (Fleming *et al.*, 2003; King *et al.*, 2003; Shust *et al.*, 2010).

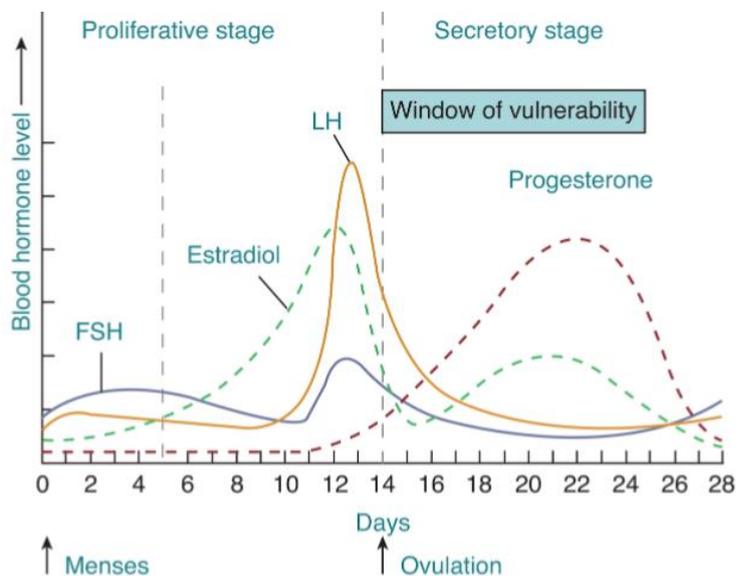


Figure 13 : Evolution des concentrations en hormones sexuelles dans le sang au cours du cycle menstruel et du risque d'infection par le VIH-1, d'après Wira and Fahey (2008). FSH: Follicle stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone. Proliferative stage: phase folliculaire; Secretory stage : Phase lutéale. Entre les jours 14 et 23 de la phase lutéale, le risque de transmission du VIH-1 est accru.

➤ *Contraception hormonale*

Compte-tenu des effets du cycle menstruel et des hormones sexuelles sur le risque de transmission du VIH-1, on peut s'interroger sur le risque lié à l'utilisation d'une contraception hormonale. Cette question est largement débattue et peut avoir des implications majeures sur la santé des femmes (Heffron *et al.*, 2012; Morrison *et al.*, 2015; Polis *et al.*, 2014). L'utilisation de d'acétate de médroxyprogestérone (DMPA, Depot Medroxyprogesterone Acetate), contraceptif injectable, a été associée avec une augmentation du risque d'infection par le VIH-1 en particulier chez les femmes à haut risque (Ralph *et al.*, 2015). Pour certains auteurs, la DMPA et la progestérone seraient responsables d'un amincissement de la barrière épithéliale (Marx *et al.*, 1996; Tjernlund *et al.*, 2015; Vishwanathan *et al.*, 2011). Cependant, cet effet est discuté et plusieurs études ne montrent aucun effet des hormones de ce point de vue-là (Bahamondes *et al.*, 2000, 2014; Mauck *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2014). L'utilisation de contraceptifs hormonaux est associée à une diminution du taux de protéines dans le mucus cervicovaginal altérant sa viscosité (Chappell *et al.*, 2014). Une moindre expression des mucines est notamment observée, ce qui pourrait impacter le rôle protecteur du mucus (Goode *et al.*, 2014). Des études *in vitro* montrent par ailleurs que le DMPA augmente la transcytose des particules virales du VIH-1 (Ferreira *et al.*, 2015). L'utilisation d'une contraception hormonale modifie l'environnement immunitaire du tractus génital avec un recrutement plus important des cellules inflammatoires, une modification des sécrétions de facteurs solubles (Blish and Baeten, 2011; Ghanem *et al.*, 2005; Goode *et al.*, 2014; Ngcapu *et al.*, 2015) et une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens (Fleming *et al.*, 2003). Enfin, l'utilisation de contraceptifs hormonaux pourraient perturber la flore vaginale et favoriser l'infection par d'autres agents pathogènes favorisant ainsi indirectement l'infection par le VIH-1 (Cherpes *et al.*, 2008; Shust *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2001).

d. Le microbiome vaginal

La composition de la flore vaginale a une influence sur l'environnement immunitaire local. Le microbiome vaginal est majoritairement composé par des bactéries de type *Lactobacillus* qui produisent de l'acide lactique créant ainsi un environnement acide protecteur. Les lactobacilles produisent également du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui, *in vitro*, présente des propriétés antivirales (Klebanoff and Coombs, 1991). Un déséquilibre au sein de la population microbienne vaginale est associé à une augmentation du risque d'infection par le VIH-1 mais également par d'autres agents pathogènes (Borgdorff *et al.*, 2014; Mirmonsef and Spear, 2014; Petrova *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014). En particulier, lors de vaginoses bactériennes qui se caractérisent par la prolifération de bactéries comme *Gardnerella vaginalis* ou *Mycoplasma hominis* au détriment des lactobacilles, le risque d'infection par le VIH-1 est accru et ce probablement du fait de l'induction

d'une réaction pro-inflammatoire qui favorise le recrutement de cellules cibles, fragilise la barrière épithéliale et inhibe le rôle protecteur de la flore vaginale saine (Martin *et al.*, 1999; Taha *et al.*, 1998).

e. Co-infections par des agents pathogènes sexuellement transmissibles

Les agents pathogènes responsables d'infections sexuellement transmissibles (IST) constituent des cofacteurs importants pour l'infection par le VIH-1 (Fleming and Wasserheit, 1999; Sexton *et al.*, 2005). Il a ainsi été estimé que le risque de contamination par le VIH est sept fois plus important chez des personnes ayant des infections ulcéraives génitales et trois fois chez des personnes présentant des urétrites ou des cervicites (inflammation de l'urètre /du col de l'utérus suite à l'infection par un pathogène sexuellement transmissible) (Mehendale *et al.*, 1995). En raison de sa prévalence, l'infection par l'Herpes simplex virus de type 2 (HSV-2) constitue en particulier un cofacteur majeur de l'infection par le VIH-1 (Looker *et al.*, 2008; Wald and Link, 2002). Les IST ulcéraives influencent de façon évidente la transmission du VIH-1 en créant des brèches au niveau de la barrière épithéliale (Horbul *et al.*, 2011). Cependant, les IST non ulcéraives peuvent également détériorer la barrière épithéliale. Ainsi, l'infection par *C.Trichomatis* s'accompagne d'une dégradation des jonctions cellulaires impliquant les N-cadhérines, d'une séquestration de la β -caténine et d'une diminution de l'expression de nectine-1, qui ensemble, diminuent l'étanchéité de l'épithélium (Prozialeck *et al.*, 2002; Sun and Schoborg, 2009; Sun *et al.*, 2008). Les IST ont également une influence sur la charge virale ainsi que sur la réplication du VIH-1 (Røttingen *et al.*, 2001). Chez les Hommes, par exemple, l'infection par *N.Gonorrhoeae*, *C.Trichomatis*, le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou encore par le cytomégalovirus (CMV) augmente l'excrétion du VIH-1 au niveau du sperme (Coombs *et al.*, 2003; Dyer *et al.*, 1998; Gianella *et al.*, 2013, 2014; Mbopi-Kéou *et al.*, 2000). Par ailleurs, les IST provoquent des changements immunitaires notables au sein des muqueuses principalement par induction d'une réponse inflammatoire qui s'accompagne de la sécrétion de nombreux facteurs solubles et du recrutement de cellules cibles (Borde *et al.*, 2011; Galvin and Cohen, 2004). Il a ainsi été montré que chez des femmes présentant une IST, le nombre de lymphocytes T CD4 ainsi que l'expression du corécepteur CCR5 au niveau cervical sont augmentés, ce qui peut favoriser l'infection par le VIH-1 (Levine *et al.*, 1998; Patterson *et al.*, 1998). Par exemple, il a été montré que la syphilis augmentait l'expression de CCR5 par les macrophages et que *C.Trichomatis* stimulait celle de GalCer, CXCR4, et de CCR5 à la surface des cellules épithéliales (Schust *et al.*, 2012; Sellati *et al.*, 2000).

f. Sperme

Le sperme joue un rôle complexe dans la transmission sexuelle du VIH-1 (Doncel *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2014; Sabbaté *et al.*, 2011). Plus qu'un simple vecteur des particules virales, il

semblerait qu'il influence les mécanismes de transmission sexuelle du VIH-1 (Doncel *et al.*, 2011; Münch *et al.*, 2013). Le sperme est constitué d'un compartiment acellulaire appelé plasma séminal et de cellules, majoritairement des spermatozoïdes mais aussi des cellules immunitaires, des cellules germinales immatures ou encore des cellules épithéliales. Les cellules immunitaires infectées du sperme peuvent être à l'origine de la contamination par le VIH-1 soit suite à la production de particules virales libres soit *via* des mécanismes d'infection cellules-cellules qui se révèlent particulièrement efficaces (Anderson and Le Grand, 2014; Bernard-Stoecklin *et al.*, 2014; Houzet *et al.*, 2014). Bien que leur infectabilité soit discutée (Cardona-Maya *et al.*, 2009), les spermatozoïdes pourraient également être impliqués dans les processus de transmission puisque ces cellules ont la capacité d'interagir avec les particules virales libres *via* diverses molécules exprimées à leur surface comme le récepteur au mannose ou l'héparan sulfate et de les transmettre efficacement aux DC (Cardona-Maya *et al.*, 2011; Ceballos *et al.*, 2009). De plus, les spermatozoïdes expriment le CCR5 à leur surface, ce qui pourrait favoriser leur interaction avec le virus (Muciaccia *et al.*, 2005). Des études montrent que certains éléments du sperme dont les exosomes, nanovésicules membranaires sécrétées dans le milieu extracellulaire par différents types de cellules, possèdent une activité anti-VIH-1 (Madison *et al.*, 2014, 2015). Enfin, le plasma séminal pourrait lui aussi être impliqué dans la modulation de la transmission sexuelle du VIH-1. Démontrant à la fois des propriétés facilitatrices et inhibitrices de l'infection de cellules cibles *in vitro*, son rôle est l'objet de nombreux questionnements et au cœur de ce sujet de thèse.

Du fait de la multiplicité des mécanismes de transmission qui peuvent, en plus, être influencés par de nombreux facteurs, endogènes ou exogènes, l'infection par le VIH-1 apparaît comme un processus complexe. La défense contre l'infection par le VIH-1 est d'autant plus difficile que le virus cible le système immunitaire qui constitue le système de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. En effet, le virus est capable de détourner les réponses immunitaires à son profit et de tirer avantages des mécanismes de défenses mis en place pour pénétrer et se répandre dans l'organisme. C'est le cas, par exemple, des DC qui sont des cellules présentatrices de l'antigène jouant un rôle primordial dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative mais que les particules virales utilisent comme « cheval de Troie » pour favoriser leur dissémination.

2. Rôle des cellules dendritiques dans la transmission sexuelle du VIH-1

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène qui sont au cœur du déclenchement de la réponse immunitaire spécifique. Elles contrôlent l'intensité, la spécificité et la nature de la réponse immunitaire se plaçant ainsi à l'interface entre la réponse innée et la réponse adaptative. Les DC

représentent une population hétérogène de cellules tant du point de vue de leur origine, de leur distribution dans l'organisme que de leur fonction.

A. Diversité des cellules dendritiques dans l'organisme

Les DC sont d'origine hématopoïétique. A partir des cellules progénitrices CD34⁺, elles se différencient soit en cellules dendritiques dites myéloïdes (mDC) soit en cellules dendritiques dites plasmacytoïdes (pDC).

a. Cellules dendritiques myéloïdes

Les mDC sont principalement présentes au niveau des tissus périphériques comme les muqueuses mais elles peuvent également circuler dans le sang. Lorsqu'elles sont immatures, elles jouent un rôle de sentinelle capable de détecter et de capter les agents pathogènes. Elles possèdent une forte capacité d'endocytose et expriment faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ainsi que les molécules de co-stimulation lymphocytaire (CD40, CD80, CD83 et CD86). La maturation des DC peut-être déclenchée par différents signaux tels que des composants de la paroi bactérienne (le lipopolysaccharide, LPS), une infection virale ou la présence de cytokines inflammatoires (IL-1 β ou TNF- α par exemple). Celle-ci s'accompagne de modifications morphologiques, avec l'accroissement des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites et de changements phénotypiques avec une augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de co-stimulation (Figure 14). Les cellules matures perdent leur capacité d'endocytose et expriment de nombreuses molécules impliquées dans la migration cellulaire telles que des intégrines (CD54, CD50) ou des récepteurs aux chimiokines (CCR7). Les DC matures vont migrer vers les régions sous-muqueuses ou les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes aux lymphocytes déclenchant ainsi la réponse immunitaire adaptative.

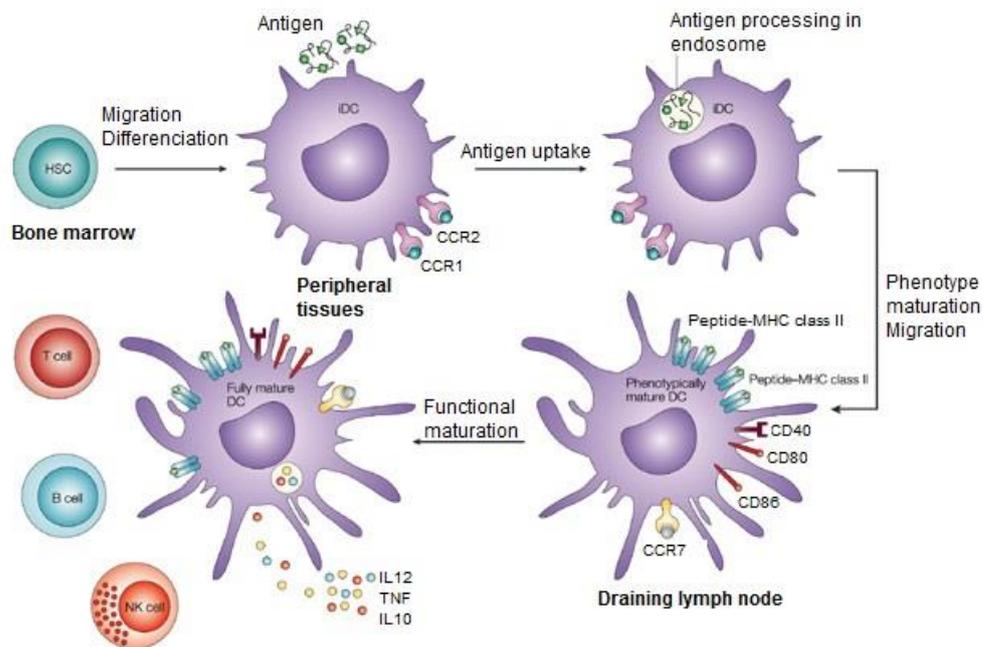


Figure 14 : Maturation des cellules dendritiques myéloïdes, d'après Hackstein and Thomson (2004). HSC Cellules souches hématopoïétiques ; iDC : Cellules Dendritiques immatures

Les mDC humaines peuvent être divisées en différents sous-groupes fonctionnels selon leur répartition dans l'organisme ainsi que leur phénotype. Dans le sang, les cellules dendritiques dites « classiques » ou « conventionnelles » expriment le CD11c ainsi que le CD1c (BDCA-1) et le CD141 (BDCA-3) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Au niveau de la peau et des muqueuses, au moins trois sous-types peuvent être distingués. Les mieux caractérisées sont les cellules de Langerhans, qui expriment le CD1a et la langérine. Elles sont présentes au sein des muqueuses stratifiées et notamment au niveau anal, vaginal et ectocervical (Morris *et al.*, 1983; Sobhani *et al.*, 2002). Les cellules de Langerhans sont caractérisées par l'expression de granules de Birbeck qui sont des compartiments cytoplasmiques ayant la forme de raquettes de tennis en microscopie électronique et dont la fonction reste mal comprise. (Cunningham *et al.*, 2013). Les autres cellules se trouvent au niveau du derme et des *lamina propria* des muqueuses notamment endocervicale et colorectale. Elles expriment soit le CD1a soit le CD14. Les cellules CD1a⁺ sont caractérisées par l'expression de CD4 et CD206 alors qu'elles n'expriment pas le CD14 ni le CD16. Les cellules CD14⁺ n'expriment pas non plus le CD16 mais expriment que faiblement CD1a et CD206. Les cellules CD14⁺ sont également CD4⁺.

Au niveau du col utérin, il a été estimé qu'un tiers des leucocytes présents sont des cellules dendritiques CD14⁺, CD11c⁺, CD11b⁺ et CD103⁻. De plus, ces cellules expriment DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) et CX₃CR1, deux molécules capables de se lier au VIH (Trifonova *et al.*, 2014).

b. Cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC se retrouvent principalement dans le sang ou au niveau des ganglions lymphatiques. Ce sont des cellules rares puisqu'elles ne représentent que 0,2 à 0,8 % des cellules mononuclées du sang (PBMC) (Zhang and Wang, 2005). Ces cellules expriment les marqueurs de surface CD4, CXCR4, CCR5, BDCA-2, BDCA-4 et CD123. En cas d'infection virale, ces cellules sont capables de migrer vers le site d'infection ou d'inflammation et de sécréter de grandes quantités d'interféron- α (IFN- α). Cette cytokine stimule l'activité cytolytique des cellules NK, inhibe la réplication virale au sein des cellules cibles et favorise la réponse immunitaire adaptative *via* la voie Th1. Les pDC demeurent capables de capter les antigènes *via* le BDCA-2 et de les présenter à des lymphocytes (Sandgren *et al.*, 2013). Cette capacité est toutefois moindre que celle des mDC mais perdurent même après maturation des pDC (Villadangos and Young, 2008).

c. Modèle de cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC)

Compte-tenu de la rareté des DC, leur étude a longtemps été limitée par la difficulté d'obtenir un grand nombre de cellules à partir de prélèvement (tissus ou sang). Le développement de systèmes de culture *in vitro* permettant d'obtenir des cellules phénotypiquement et fonctionnellement très proches des DC a permis de s'affranchir de cette contrainte et d'approfondir les connaissances sur les DC. Un de ces systèmes, repose sur l'utilisation de monocytes isolés à partir de sang humain dont la différenciation en DC est induite en 4 à 6 jours en présence de GM-CSF et IL-4 (Romani *et al.*, 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Cette méthode est particulièrement intéressante du fait de l'abondance et de l'accessibilité des monocytes. En effet, les monocytes représentent environ 10% des PBMC. Les MDDC ainsi obtenus sont proches des cellules dendritiques myéloïdes CD1a⁺, CD14⁻ présentes au niveau de la *lamina propria* des muqueuses et représentent donc un bon modèle d'étude. Elles présentent les caractéristiques des DC immatures et leur maturation peut être induite par différentes stimulations dont le LPS, l'IL1- β ou le TNF- α .

B. Fonctions des cellules dendritiques

Les DC en tant que cellules présentatrices de l'antigène ont principalement pour rôle de reconnaître les signaux de danger, que ceux-ci soient exogènes, dans le cas d'une infection par un agent pathogène, ou endogènes, dans le cas de tissus endommagés ou cancéreux, et de présenter les antigènes aux autres cellules immunitaires afin d'induire la réponse adaptative adéquate.

a. Spécificité morphologique

En tant que cellules sentinelles, les DC ont une morphologie très particulière. Elles possèdent la capacité de se déformer ce qui leur permet notamment de transmigrer à travers les cellules

endothéliales des vaisseaux sanguins pour assurer la migration du sang vers les tissus périphériques. Dans le cas des cellules de Langerhans, cette capacité à se déformer leur permet également de s'insérer au sein des épithéliums pluristratifiés. Les cellules myéloïdes présentent des extensions cytoplasmiques appelées dendrites leur permettant d'augmenter la surface de leur membrane cellulaire et donc les zones de contact avec les agents pathogènes. Ces dendrites peuvent également permettre aux DC de capter les agents pathogènes n'ayant pas encore franchi la muqueuse. En effet, les DC expriment des protéines des jonctions serrées dont l'occludine, la claudine 1 et ZO-1, leur permettant d'ouvrir les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et donc de capter les agents pathogènes au niveau de la lumière sans altérer l'intégrité de la barrière épithéliale (Rescigno *et al.*, 2001).

b. Reconnaissance de signaux de danger

Les DC expriment une grande variété de PRR leur permettant de reconnaître les PAMPS d'un certain nombre d'agents pathogènes mais également les signaux de dangers provenant du soi (tissus ou cellules endommagés). Alors que certains PRR ne sont impliqués que dans la capture des antigènes, d'autres peuvent en plus conduire à l'activation cellulaire. Parmi ces PRR sont retrouvés les lectines de types C, les TLR, les récepteurs scavengers, le RLR et les NOD Like Receptor (NLR).

➤ *Les lectines de type C*

Les lectines de type C sont des protéines possédant un ou plusieurs domaines CRD (Carbohydrate Recognition Domain) leur permettant de se lier à des ligands glycosylés de façon dépendante du calcium. Cette famille présente une grande diversité tant sur le plan fonctionnel que structural. Elle regroupe à la fois des protéines solubles telles que les collectines et les protéoglycanes et des protéines transmembranaires dont les CLR (C-type lectin receptors). Les CLR peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur structure. Les CLR de type I comme le récepteur au mannose (CD206) ou DEC205 possèdent plusieurs CRD alors les récepteurs de type II tels que DC-SIGN, la langérine, DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor), les dectine-1 et -2, BDCA-2 et CLEC-1 n'en possèdent qu'un seul (Figdor *et al.*, 2002, Figure 15).

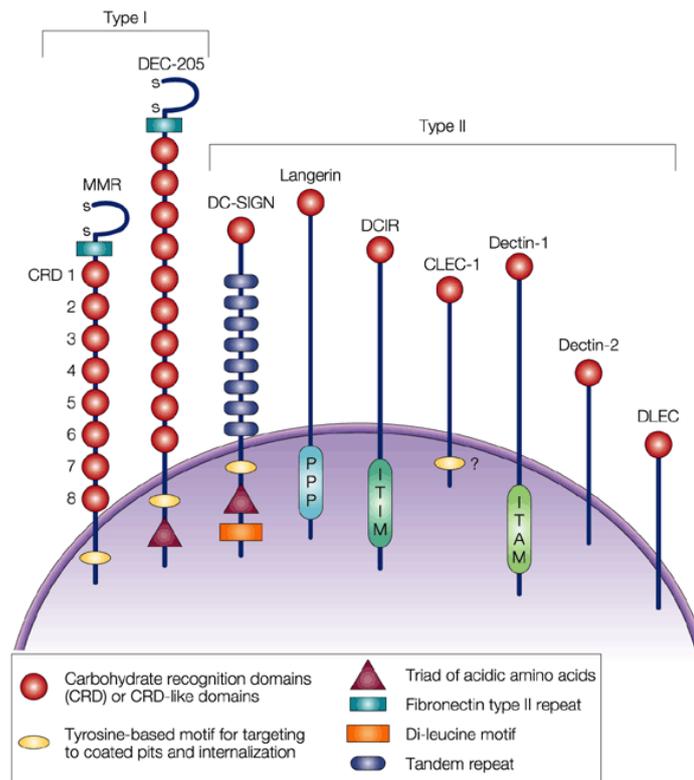


Figure 15 : Lectines de type C exprimées à la surface des cellules dendritiques, d'après Figdor *et al.* (2002). Les lectines de type-C sont classées en deux types en fonction du nombre de CRD qu'elles possèdent. Les lectines de types I possèdent plusieurs domaines CRD alors que les lectines de type I n'en possèdent qu'un.

L'expression des CLR varie en fonction des sous-types de DC. Les cellules de Langerhans, par exemple, expriment la langérine sans pour autant exprimer DC-SIGN ni le récepteur au mannose. A l'inverse, les cellules dendritiques CD14+ et les MDDC expriment à la fois DC-SIGN et le récepteur au mannose sans exprimer la langérine (Turville *et al.*, 2002).

DC-SIGN est le CLR majoritairement exprimé par les MDDC et a d'ailleurs été le plus étudié. Il possède une forte affinité pour le mannose et se lie à de nombreux agents pathogènes dont le VIH, Ebola, le virus de la dengue, l'hépatite C ou encore *Candida Albicans* (Alvarez *et al.*, 2002; Cambi *et al.*, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2000a; Pöhlmann *et al.*, 2003). En plus de sa fonction de PRR, DC-SIGN joue également un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire. Son interaction avec l'ICAM-3 exprimée par les cellules T naïves permet la stabilisation de la synapse établie entre ces deux types de cellules (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). L'interaction avec l'ICAM-2 exprimée par les cellules endothéliales permet quant à elle la transmigration des DC (Geijtenbeek *et al.*, 2000c).

➤ Les récepteurs scavenger

Les récepteurs scavenger (SR) ont été initialement regroupés selon leur capacité à lier des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotein, LDL) (Goldstein *et al.*, 1979). Il a depuis été

montré que les SR se lient également à bien d'autres molécules polyanioniques qu'elles soient d'origine bactérienne, virale ou endogène (Gough and Gordon, 2000). Les SR sont exprimés par peu de types cellulaires (dont les macrophages, les DC et les cellules endothéliales) et sont impliqués dans les mécanismes de phagocytose des molécules non opsonisées. Certains SR jouent également un rôle de corécepteurs des TLR (Wang *et al.*, 2015a).

➤ *Les TLR*

Les TLR sont des PRR ubiquitaires exprimés par un grand nombre de cellules. Les DC expriment les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 10 à la surface de la membrane plasmique et les TLR 3, 7/8 et 9 à la surface des membranes endosomales (Figure 16). Les TLR de surface détectent les protéines et les lipides des agents pathogènes alors que les TLR intracellulaires détectent les acides nucléiques. Le TLR3 reconnaît plus particulièrement les ARN double brin, les TLR7/8 les ARN simple brin et le TLR9 les motifs CpG de l'ADN. L'expression de ses TLR varie en fonction du type de DC observées. Ainsi, les cellules de Langerhans expriment les TLR 1, 2, 3, 5, 6 et 10 (Flacher *et al.*, 2006) alors que les cellules myéloïdes CD14⁺ expriment les TLR 1, 2, 3, 4, 6, 8 et 10 (Kadowaki *et al.*, 2001). L'activation des TLR peut déclencher une cascade de signalisation intracellulaire responsable de la maturation des cellules avec augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation, sécrétion de cytokines inflammatoires ou antivirales (comme le TNF- α , l'IL-12, l'IL23 ou l'IFN α/β) et de chimiokines (RANTES, IL-8) (Watts *et al.*, 2010).

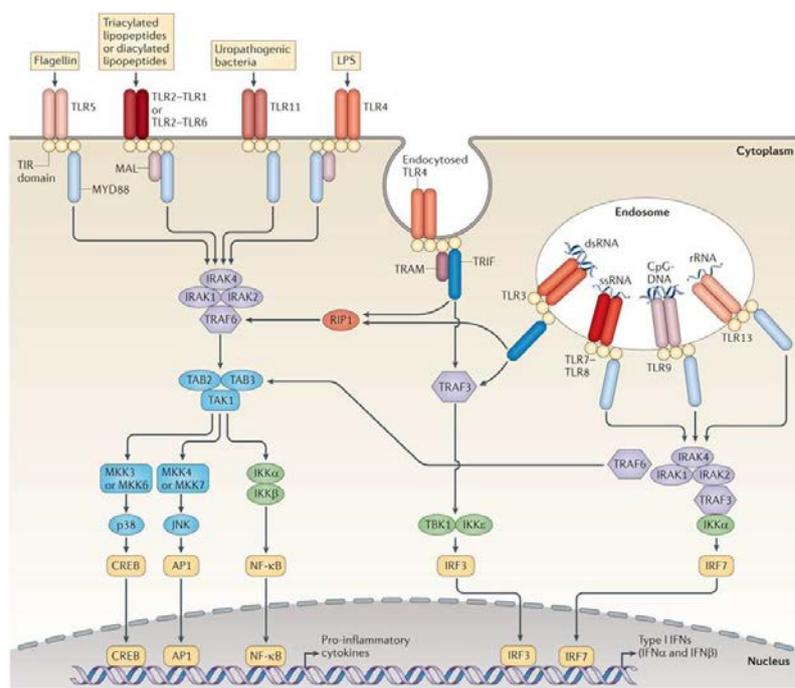


Figure 16 : Diversité des récepteurs TLR et de leurs ligands, d'après O'Neill *et al.* (2013)

➤ *Récepteurs cytosoliques*

La reconnaissance des agents pathogènes intracellulaires est réalisée par la famille des RLR ainsi que par les NLR. La famille des RLR est actuellement constituée de trois membres : RIG I (Retinoic acid Inducible Gene), MDA-5 (Melanoma Differentiation Associated Gene) and Lgp2. RIG I et MDA-5 détectent les ARN double brins viraux dans le cytoplasme alors que Lgp2 agirait comme un régulateur négatif des deux autres membres de la famille RLR. La famille des NLR comprend elle une vingtaine de récepteurs dont NOD1 et NOD2.

c. *Présentation de l'antigène*

La capture des agents pathogènes provoque la maturation des DC qui vont ensuite présenter l'antigène aux lymphocytes T au niveau de la *lamina propria* ou des ganglions lymphatiques. Cette présentation nécessite l'apprêtement de l'antigène c'est-à-dire la dégradation de l'agent pathogène en peptides par des enzymes protéolytiques puis la présentation de ces peptides par les molécules du CMH. Généralement, les peptides dérivés d'antigènes endogènes sont présentés aux lymphocytes T CD8 par le biais du CMH de classe I alors que les peptides dérivés d'antigènes exogènes sont présentés aux lymphocytes T CD4 *via* le CMH de classe II. Il existe cependant des cas de présentation croisée où les antigènes exogènes sont présentés par le CMH de classe I et les antigènes endogènes par le CMH de classe II. C'est notamment par ce procédé de « cross-présentation » que les DC participent à la mise en place de la réponse adaptative antivirale et anti-tumorale.

Lors de la présentation de l'antigène, l'interaction entre le récepteur de la cellule T (TCR) et la molécule du CMH déclenche la formation d'une synapse immunologique, jonction dynamique et hautement structurée entre la cellule dendritique et le lymphocyte T (Figure 17). Celle-ci résulte d'un processus de polarisation cellulaire qui conduit à la relocalisation, au niveau de la zone de contact intercellulaire des différentes protéines constituant la synapse (Huppa and Davis, 2003). Cette polarisation fait apparaître des zones distinctes appelés SMAC (SupraMolecular Activation Cluster) (Monks *et al.*, 1998). Au centre de la synapse, la zone appelée cSMAC (central SMAC) regroupe les TCR, les récepteurs CD4/CD8, la molécule de costimulation CD28 et la molécule CD2. A la périphérie de la synapse, la zone pSMAC (peripheral SMAC) comprend la protéine d'adhérence LFA-1. La zone la plus externe, la dSMAC (distal SMAC) regroupe les grosses protéines comme CD43 ou CD45, exclues du centre de la synapse du fait de leur taille importante (Delon *et al.*, 2001; Leupin *et al.*, 2000).

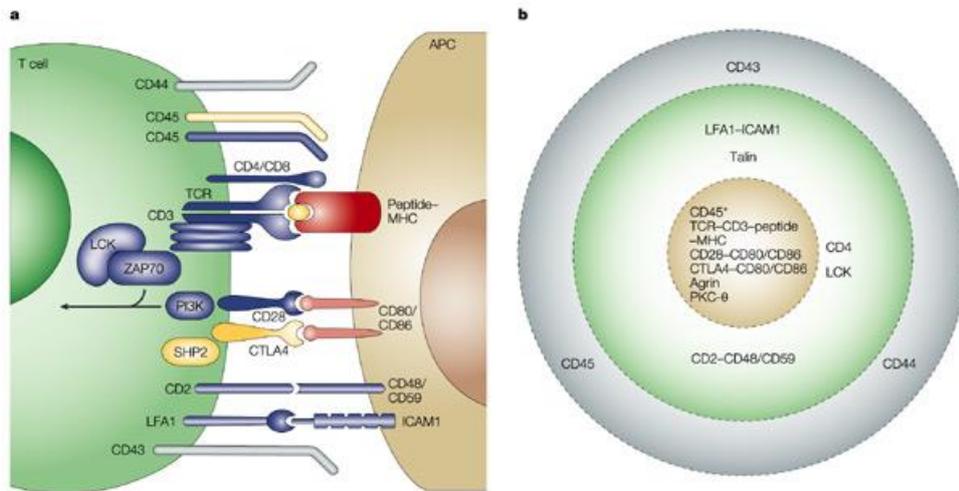


Figure 17 : La synapse immunologique, d'après Huppa and Davis (2003). (a) Schéma de la synapse immunologique (b) Représentation des différentes zones composant la synapse avec en marron la cSMAC, en vert la pSMAC et en bleu la dSMAC. SMAC : SupraMolecular Activation Cluster, cSMAC : central SMAC pSMAC : peripheral SMAC, dSMAC : distal SMAC.

L'interaction entre le TCR et les molécules du CMH constitue le premier signal utilisé par les DC pour activer les lymphocytes T naïfs. Le second signal met en jeu les molécules de costimulation et les molécules d'adhérence. Enfin, le troisième signal, correspond à la sécrétion de cytokines participant à la polarisation en un type spécifique de lymphocytes T auxiliaires ou helper (Th) (Kapsenberg, 2003).

d. Induction de la réponse immunitaire

➤ *Polarisation des Th*

Les DC orientent la réponse adaptative vers une réponse généralement contrôlée soit par les lymphocytes Th1, auxiliaires des lymphocytes T CD8⁺ engagés dans les réponses cytotoxiques, soit par les lymphocytes Th2, auxiliaires des lymphocytes B impliqués dans les réponses humorales. La sécrétion de cytokines appartenant à la famille de l'IL-12 (comme l'IL-12, l'IL-23 ou l'IL-27) oriente les lymphocytes vers une voie Th1 alors que l'absence de ces cytokines favorise la voie Th2. La nature du stimulus reconnu par les DC conditionne également la polarisation des lymphocytes Th puisqu'elle influence la sécrétion des cytokines par les DC. Par exemple, les MDDC activées par le LPS ou la flagelline (ligands respectifs des TLR 4 et 5) induisent une polarisation Th1 *via* la sécrétion d'IL-12p70 tandis que l'activation par Pam3Cys (ligand du TLR2) induit une polarisation Th2 (Agrawal *et al.*, 2003). Enfin, l'environnement des DC est déterminant pour la polarisation des lymphocytes. Les signaux générés par les cellules épithéliales, stromales ou endothéliales entourant les DC peuvent moduler la réponse immunitaire. Ainsi, la cytokine TSLP (Thymic Stromal LymphoPoietin), cytokine de

la famille de l'IL-7 produite par les cellules épithéliales, oriente la réponse immunitaire vers une réponse allergique de type Th2 (Soumelis *et al.*, 2002).

Plus récemment une troisième sorte de T *helper*, les Th17, ont été décrits. Ces cellules majoritairement présentes au niveau du tractus gastro-intestinal sont capables de recruter des neutrophiles et des cellules myéloïdes aux niveaux des sites effecteurs *via* la sécrétion de GM-CSF, de participer à la régénération des épithéliums muqueux et contribuent à la réponse inflammation puisqu'elles sécrètent un grand nombre de cytokines dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-2, l'IL-21 et l'IL-22 (Klatt and Brenchley, 2010). Les cytokines impliquées dans la différenciation des Th17 sont débattues. Pour certains, les cytokines IL-1 β et IL-23 suffisent à induire la différenciation en Th17 (Wilson *et al.*, 2007) alors que pour d'autres le TGF- β , l'IL-23, l'IL-1 β et l'IL-6 sont nécessaires (Volpe *et al.*, 2008).

Enfin, la réponse Th est régulée par des cellules T dites régulatrices (Treg) CD4⁺ et CD25⁺. Ces cellules préviennent les réactions auto-immunes et la destruction des tissus qui pourraient résulter d'une activation chronique ou excessive de la réponse immunitaire innée et adaptative. Elles possèdent notamment la capacité de supprimer la prolifération des cellules T effectrices. L'induction des Treg a lieu lorsque les DC dites tolérogènes présentent l'antigène (interaction TCR/MCH) sans l'implication des molécules de costimulations (Kapsenberg, 2003).

➤ *Interactions avec d'autres cellules immunitaires*

En plus de leur rôle dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺, les DC sont impliquées dans l'activation de plusieurs autres types cellulaires.

Elles sont notamment capables d'activer les lymphocytes CD8⁺ en présentant l'antigène *via* leur CMH de classe I. Cette activation est particulièrement importante dans le cadre de l'infection par le VIH-1 puisqu'elle est impliquée dans le contrôle de la réplication virale. Les CTL sont capables de lyser les cellules infectées et de produire de l'IFN γ , cytokine ayant une activité anti-virale (Marañón *et al.*, 2004).

Les cellules peuvent également interagir avec les NK, impliqués dans la réponse innée. Les DC, et notamment les CD11c⁺ situées au niveau des ganglions lymphatiques, participent à l'activation des NK *via* la cytokine IL-15 (Lucas *et al.*, 2007). Les NK peuvent également induire la maturation des DC (Vitale *et al.*, 2005). L'interaction NK-DC joue notamment un rôle crucial dans la production de cytokines et la lyse des cellules infectées lors d'infection virales (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Mailliard *et al.*, 2003).

Les DC jouent donc un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire. Cependant, il a également été montré que ces cellules sont largement impliquées dans les mécanismes de contamination par le VIH-1. En effet, ce dernier détourne le fonctionnement des DC et profite de leur capacité de migration et de présentation de l'antigène pour favoriser sa transmission à d'autres cellules cibles et donc sa dissémination.

C. Interactions du VIH-1 avec les cellules dendritiques

Les DC présentes au niveau des muqueuses font partie des premières cellules à être en contact avec les particules virales lors d'un rapport sexuel contaminant. Après la capture des particules virales, les DC vont présenter l'agent pathogène aux lymphocytes de la *lamina propria* ou des ganglions lymphatiques. Dans le cas particulier du VIH-1, malgré l'initiation de la réponse immunitaire, ce procédé va surtout contribuer à la dissémination du virus en lui permettant d'être apporté à proximité des cellules cibles (Wu and KewalRamani, 2006). Dans ce paragraphe, les différentes interactions entre les DC et le VIH ainsi que leurs conséquences sur la réponse immunitaire et l'évolution de la pathologie seront détaillés.

a. Permissivité des cellules dendritiques à l'infection par le VIH-1

Les cellules dendritiques, aussi bien les pDC que les mDC, les LC ou les MDDC sont sensibles à l'infection par le VIH-1 (Blauvelt *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2011; Fairman and Angel, 2012; Fong *et al.*, 2002; Kawamura *et al.*, 2003; Nasr *et al.*, 2014; Popov *et al.*, 2005; Sprenger *et al.*, 1995; Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 1995). Ces cellules expriment le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs principaux CXCR4 et CCR5 (Granelli-Piperno *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2000). La permissivité à l'infection varie tout de même en fonction du sous-type de DC étudié (Schmitt *et al.*, 2006; Smed-Sørensen *et al.*, 2005) et de la souche virale. En effet, les virus de type R5 infectent plus efficacement les mDC que les souches X4 probablement du fait de l'expression majoritaire de CCR5 à la surface des cellules par rapport au CXCR4 (Patterson *et al.*, 2001; Zaitseva *et al.*, 1997). Bien que les DC soient sensibles à l'infection par le VIH-1, celle-ci est peu efficace et la réplication virale est faible par rapport à celle observée au sein des lymphocytes T CD4 (Cameron *et al.*, 1992a; Pope *et al.*, 1995). La fréquence des DC infectées *in vivo* a ainsi été estimée de 10 à 100 fois inférieure à celle des lymphocytes T CD4 (McIlroy *et al.*, 1995). Des études menées *in vitro* sur des cellules de donneurs sains, ont également montré de faibles taux d'infection productive (1 à 3%) (Kawamura *et al.*, 2003; Smed-Sørensen *et al.*, 2005). Plusieurs raisons peuvent expliquer la faible infectabilité des DC dont la dégradation rapide des particules virales internalisées (Moris *et al.*, 2004; Nobile *et al.*, 2005; Turville *et al.*, 2004; de Witte *et al.*, 2007a) et l'expression de facteurs de restriction qui bloquent la réplication du virus. Parmi les facteurs de restrictions, les DC expriment notamment, APOBEC, une

cytidine déaminase qui induit un grand nombre de mutations au niveau de l'ADN viral et perturbe la transcription inverse (Pion *et al.*, 2006) et SAMHD1, une enzyme ayant à la fois une activité de phosphohydrolase qui déphosphoryle le pool de désoxyribonucléotides intracellulaires, réduisant ainsi les ressources exploitables lors de la transcription inverse et une activité ribonucléase (RNase) lui permettant de dégrader l'ARN viral et donc de restreindre la réplication (Bloch *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015, 2015; Laguette *et al.*, 2011; Ryoo *et al.*, 2014).

La sensibilité à l'infection est également influencée par l'état de maturation des DC. La maturation est associée avec une diminution de la réplication virale qui peut s'expliquer par une modulation de l'expression des corécepteurs (augmentation de l'expression de CXCR4 mais diminution de CCR5) (Sallusto *et al.*, 1998), un blocage dans le processus de la transcription inverse (Bakri *et al.*, 2001), une diminution de la fusion (Cavrois *et al.*, 2006) ou bien par l'augmentation de l'expression d'APOBEC3G (Pion *et al.*, 2006).

b. Capture des particules virales

En plus du récepteur CD4, les DC expriment un grand nombre de récepteurs alternatifs du VIH-1. Les DC peuvent capter les particules virales *via* les lectines de types C comprenant notamment DC-SIGN (CD209), la Langérine (CD207), DCIR (CD367) et le récepteur au mannose, (CD206) (Lambert *et al.*, 2013; Turville *et al.*, 2002). Ces récepteurs reconnaissent des motifs d'oligosaccharides fréquemment trouvés à la surface des microorganismes. La capture des particules virales VIH-1 par ces lectines nécessite l'interaction avec la glycoprotéine d'enveloppe gp120 qui est une protéine hautement glycosylée (environ 50% de son poids moléculaire est dû à des glycosylations). L'affinité entre DC-SIGN et la gp120 est cinq fois plus importante qu'avec le CD4 (Curtis *et al.*, 1992). La reconnaissance de la gp120 est généralement favorisée par la formation d'un polymère de récepteurs. Pour DC-SIGN, les récepteurs s'associent en trimère (Bernhard *et al.*, 2004), pour le récepteur au mannose (Lai *et al.*, 2009), il y a établissement d'un dimère alors que dans le cas de la langérine, la formation d'un trimère est observée (Feinberg *et al.*, 2010; Stambach and Taylor, 2003). Les DC peuvent également interagir avec la gp120 *via* l'expression de syndecan-3, une molécule de la famille des HSPG (de Witte *et al.*, 2007b) et de GalCer (Magérus-Chatinet *et al.*, 2007). GalCer présente la particularité de se lier aussi bien à la gp120 (Bomsel, 1997; Harouse *et al.*, 1991; Yahi *et al.*, 1992) qu'à la gp41 (Alfsen and Bomsel, 2002; Alfsen *et al.*, 2001).

Les DC peuvent par ailleurs interagir avec les particules virales *via* des mécanismes indépendants de la glycoprotéine d'enveloppe. Les DC expriment notamment des récepteurs du complément CR3 et CR4 leur permettant de capter les particules virales VIH-1 opsonisées (Bajtaj *et al.*, 2004; Bouhlal *et al.*, 2007; Pruenster *et al.*, 2005; Tjomsland *et al.*, 2011).

Enfin, il a été récemment décrit que les DC peuvent capter les particules virales *via* Siglec-1 (aussi appelé CD169 ou sialoadhésine) (Izquierdo-Useros *et al.*, 2014; Puryear *et al.*, 2013). Les Siglecs (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins) appartiennent à la famille des lectines de type I. Ils possèdent un domaine immunoglobuline (domaine Ig) N-terminal variable qui reconnaît les acides sialiques et un nombre variable de domaines Ig constants de type 2 (16 concernant Siglec-1) (Crocker *et al.*, 2007, Figure 18). Siglec-1 se lie aux gangliosides présents au niveau de l'enveloppe virale (GM1 et GM3) et permet donc une reconnaissance du VIH-1 indépendante de la glycoprotéine d'enveloppe (Figure 18; Izquierdo-Useros *et al.*, 2012a, 2014; Puryear *et al.*, 2012). Siglec-1 n'est que faiblement exprimé par les DC à l'état immature mais la maturation des cellules en présence de LPS ou d'IFN- α provoque une forte augmentation de l'expression de Siglec-1 menant à une augmentation de la capture des particules virales et de la transmission aux lymphocytes T CD4 *via* ce récepteur (Izquierdo-Useros *et al.*, 2012b; Puryear *et al.*, 2013).

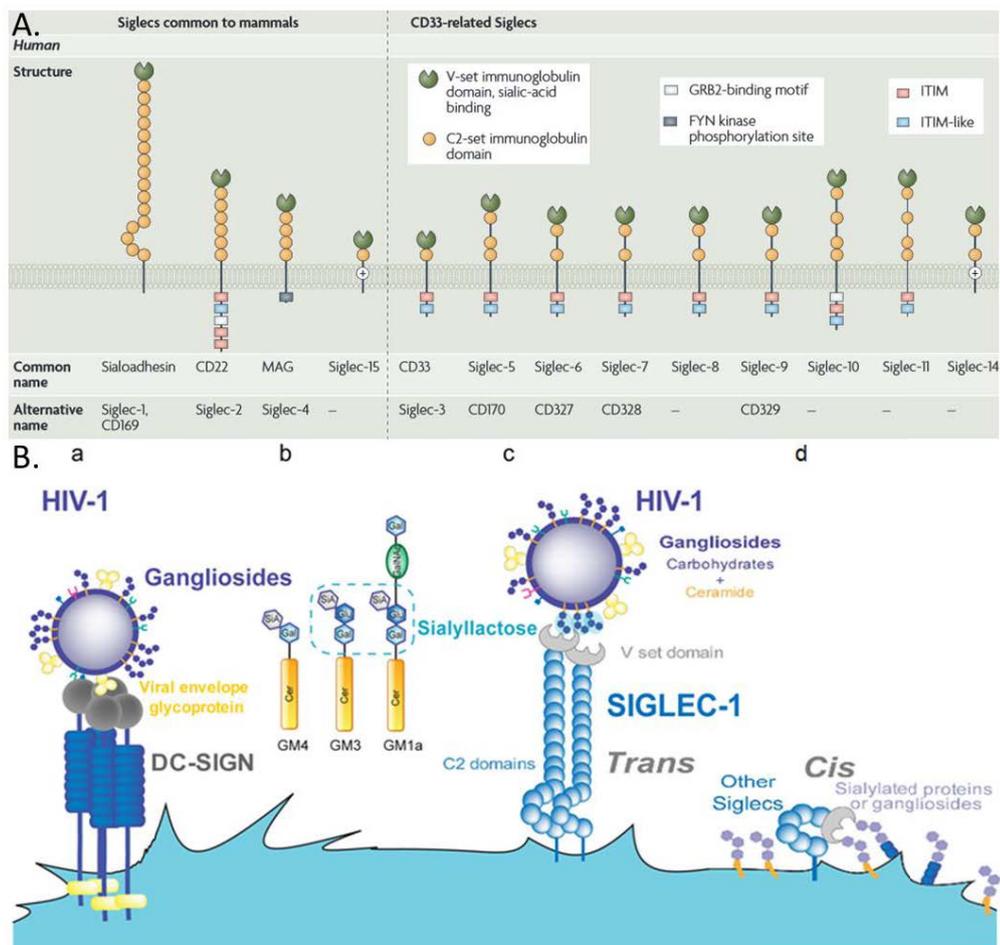


Figure 18 : Capture du VIH-1 par Siglec-1, d'après Crocker *et al.* (2007) et Izquierdo-Useros *et al.* (2014) A. Structure des différents récepteurs de la famille des Siglecs. B. (a) La liaison des particules VIH-1 sur DC-SIGN met en jeu la gp120 (a) alors que celle sur Siglec-1 met en jeu des groupements sialyllactoses des gangliosides membranaires (c). Plusieurs gangliosides sont présents au niveau de la membrane lipidique des particules virales. A l'exception du GM4, où l'acide sialique est lié à un galactose, les autres gangliosides exposent des groupements sialyllactose (c). Contrairement aux autres récepteurs de la même famille, le siglec-1 possède de nombreux domaines constants permettant la projection du domaine variable et ainsi la reconnaissance de divers ligands et agents pathogènes dont le VIH-1. Les autres membres de la famille, interagissent plutôt en *cis* avec des éléments sialylés à la surface de la même cellule (d).

a. Transmission aux lymphocytes T

La transmission des particules virales captées par les DC aux lymphocytes T CD4 est un processus décrit depuis plus de vingt ans (Cameron *et al.*, 1992b). Néanmoins, les mécanismes mis en jeu restent méconnus et de nombreuses études sont toujours menées sur ce sujet. La transmission des particules virales aux lymphocytes T CD4 peut avoir lieu soit par *cis*-infection impliquant l'infection des DC qui produisent alors des virus *de novo* pouvant infecter les lymphocytes T CD4 soit par *trans*-infection résultant d'un transfert de particules virales captées par les DC sans infection de ces dernières. Turville *et al.* indiquent que ces deux mécanismes constituent des phases distinctes dans le temps. Dans les 24h suivant l'infection, la transmission du VIH-1 aux lymphocytes T a lieu par *trans*-infection alors que dans un second temps, après 1 ou 2 jours, la transmission se fait majoritairement par *cis*-infection (Turville *et al.*, 2004). Néanmoins, il semblerait que ces deux mécanismes ne soient pas nécessairement interdépendants ou séquentiels. En revanche, ils dépendent du sous-type de DC observé (Peressin *et al.*, 2014) et de l'état de maturation des cellules (Graneli-Piperno *et al.*, 1998). Alors que les cellules immatures peuvent transmettre les particules en *cis*, la réplication virale au sein des cellules matures est faible voire nulle. En revanche, les DC matures transmettent efficacement les particules virales par *trans*-infection (Dong *et al.*, 2007).

➤ *Cis-infection*

La *cis*-infection des DC résulte de l'accomplissement complet du cycle de réplication du VIH-1. Les particules virales nouvellement synthétisées bourgeonnent à la surface des cellules et infectent les lymphocytes T CD4 à proximité. Cette transmission peut être favorisée par l'établissement d'une synapse virologique qui s'établit entre la cellule dendritique infectée et le lymphocyte T CD4 non infecté, constituant la cellule cible. Cette synapse virologique est très proche de la synapse immunologique. L'établissement de la synapse est déclenché par l'interaction par l'engagement du CD4 de la cellule cible qui interagit avec la gp120 de la particule virale bourgeonnante (Jolly *et al.*, 2004; Vasiliver-Shamis *et al.*, 2008). Le rassemblement des récepteurs et corécepteurs, CD4, CXCR4 et CCR5, au niveau de la synapse ainsi que la moindre diffusion des virions favorisent l'infection des lymphocytes T CD4.

Bien que l'infection en *cis* découle de la fusion du VIH-1 avec la membrane des DC (Janas *et al.*, 2008), DC-SIGN semblerait influencer ce mécanisme. En concentrant des particules virales au niveau de la zone membranaire où sont localisés CD4, CCR5 et CXCR4, DC-SIGN augmenterait la susceptibilité des DC à l'infection (Burleigh *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001). DCIR semble également impliqué dans la *cis*-infection des DC bien que son rôle n'ait pas encore été clairement déterminé (Lambert *et al.*, 2008).

➤ *Trans-infection*

Généralement la phagocytose d'agents pathogènes par les DC mène à leur dégradation *via* le lysosome ou le protéasome. Dans le cas de l'internalisation du VIH-1, notamment par les DC matures, les particules virales sont au contraire redirigées vers la surface membranaire pour échapper à la dégradation. En effet, la liaison des particules virales au DC-SIGN provoque une internalisation rapide des particules virales au sein d'un compartiment endosomal non lysosomal riche en tétraspanines (Garcia *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2002) ou au sein d'invaginations de la membrane plasmique différentes des vésicules d'endocytose (Yu *et al.*, 2008) dans lesquels les particules virales demeurent intactes et infectieuses. La transmission des particules virales s'opère *via* l'établissement d'une synapse infectieuse (McDonald *et al.*, 2003) très similaire à la synapse virologique bien qu'il n'y ait pas de production de virus. A la différence de la synapse virologique, l'établissement de la synapse infectieuse est indépendante de la glycoprotéine d'enveloppe mais nécessite l'interaction entre LFA-1 et l'ICAM1 (Rodriguez-Plata *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009). DC-SIGN semble également jouer un rôle dans l'établissement de la synapse puisque l'absence de ce récepteur inhibe la transmission aux lymphocytes T (Arrighi *et al.*, 2004a, 2004b).

Le rôle de DC-SIGN dans la *trans*-infection est tout de même débattu (Boggiano *et al.*, 2007a). L'utilisation de mannan ou d'anticorps anti-DC-SIGN n'ont parfois qu'un effet minime sur la capture des virions et la *trans*-infection par les DC alors que cela inhibe complètement le mécanisme avec des cellules transfectées avec DC-SIGN (Izquierdo-Useros *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). De plus, toutes les DC n'expriment pas DC-SIGN (Graneli-Piperno *et al.*, 2006; Turville *et al.*, 2002). C'est le cas notamment des mDC du sang et des cellules de Langerhans qui sont pourtant capables de capter et de transmettre efficacement les particules virales par *trans*-infection, en particulier après maturation (Boggiano *et al.*, 2007b; Fahrbach *et al.*, 2007; Izquierdo-Useros *et al.*, 2007). Gummuluru *et al.* ont montré que des radeaux lipidiques (« lipid raft », cf Figure 19), microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides, présents au niveau de l'enveloppe virale jouent un rôle dans l'internalisation des particules virales par les DC de façon indépendante du CD4, des HSPG et des CLR (Gummuluru *et al.*, 2003). Après endocytose, les particules virales sont transférées dans des corps multivésiculaires (MVB, MultiVesicular Body) et la *trans*-infection a lieu *via* la voie de sécrétion des exosomes (Izquierdo-Useros *et al.*, 2009; Wiley and Gummuluru, 2006). La composition des radeaux lipidiques conditionne grandement l'efficacité de la capture par les DC. Ainsi, un appauvrissement en glycosphingolipides provoque une diminution de la prise en charge des virions (Hatch *et al.*, 2009; Izquierdo-Useros *et al.*, 2009). Ces radeaux lipidiques issus de la cellule hôte sont incorporés à l'enveloppe virale au moment de l'assemblage et du bourgeonnement de la particule. De façon générale, les radeaux lipidiques sont impliqués dans le déroulement d'un certain nombre d'étapes du cycle réplcatif, à savoir l'entrée et la fusion des particules virales avec la membrane cellulaire, la

signalisation cellulaire et la réplication virale *via* leur interaction avec la protéine virale Nef ou encore au moment du bourgeonnement (Campbell *et al.*, 2001; Ono, 2010; Waheed and Freed, 2009). Enfin, les radeaux lipidiques sont impliqués dans la mise en place des synapse immunologique et virologiques (Harder *et al.*, 2007; Jolly and Sattentau, 2005).

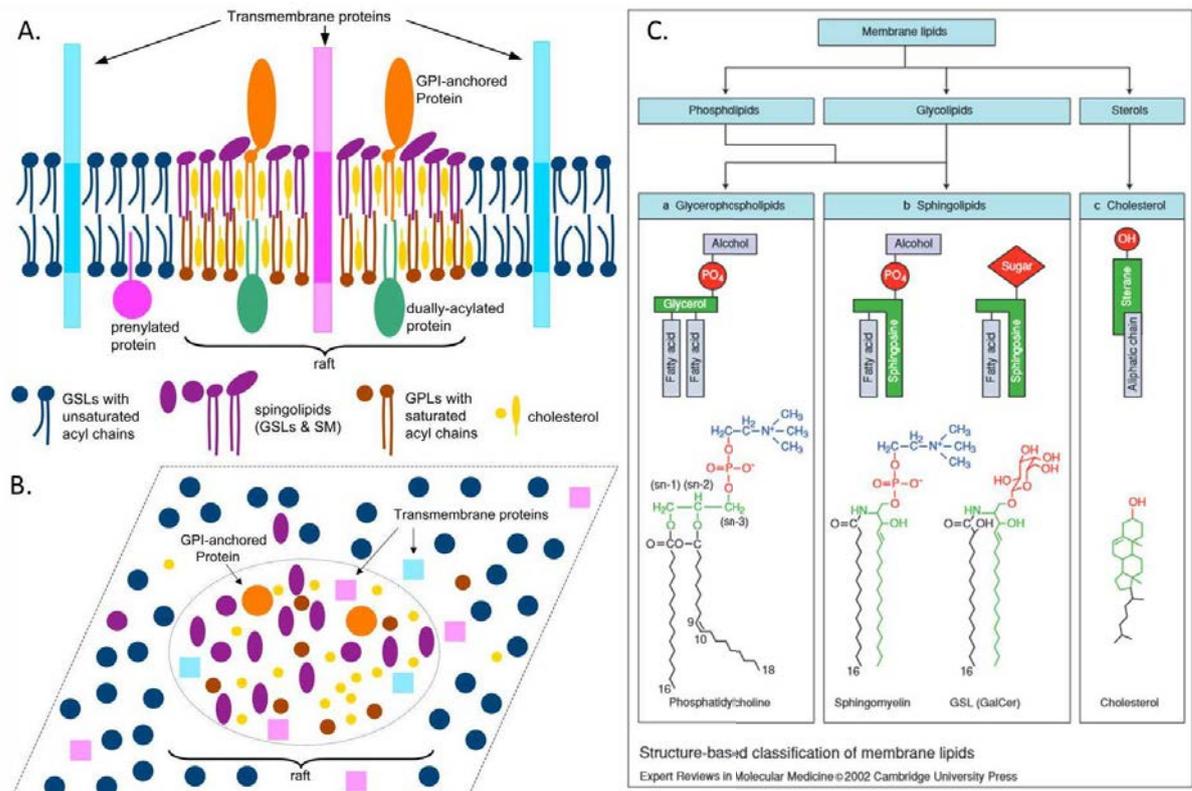


Figure 19 : Composition des radeaux lipidiques d'après Fantini *et al.* (2002); Waheed and Freed (2009) A. Schéma de la structure d'un radeau lipidique au niveau de la membrane plasmique cellulaire. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines enrichis en sphingolipides au niveau du feuillet externe (en violet) et en cholestérol (en jaune) au niveau des deux feuillet. Les phospholipides (en marron) présents au niveau des radeaux lipidiques possèdent généralement de longues chaînes saturées alors qu'à l'extérieur des radeaux, les phospholipides (en bleu) possèdent des chaînes plus courtes et insaturées. B. Schéma de la membrane plasmique vue du dessus. C. Classification des lipides membranaires en fonction de leur structure. La membrane plasmique comprend des phospholipides, des glycolipides et des stérois.

A la surface des DC, Siglec-1 a été récemment identifié comme le récepteur impliqué dans la reconnaissance des glycosphingolipides, GM1 et GM3, présents au niveau des radeaux lipidiques (Izquierdo-Users *et al.*, 2012a, 2012b; Puryear *et al.*, 2012, 2013).

Au total, plusieurs mécanismes permettent donc le transfert des particules virales des DC vers les lymphocytes T CD4 (Figure 20).

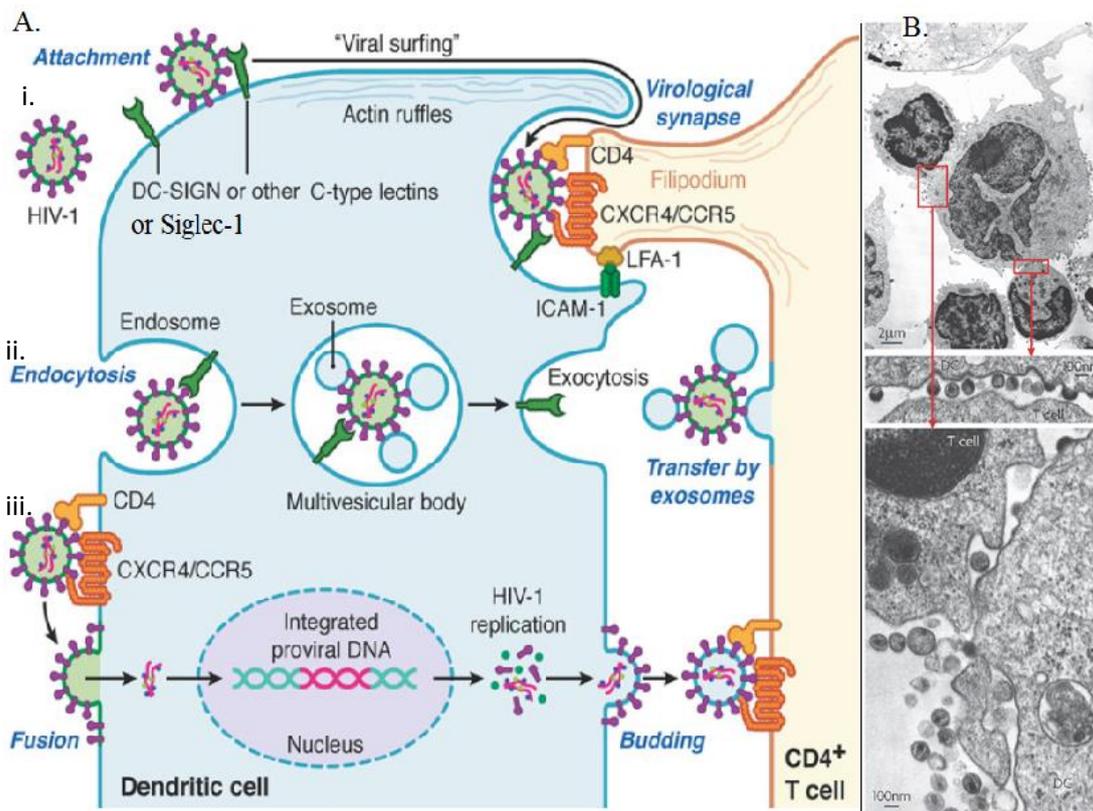


Figure 20 : Mécanismes de *trans*-et *cis*-infection d'après Coleman *et al.* (2013) et Hladik and McElrath (2008)

A/Résumé des mécanismes de transmission du VIH-1 *via* les DC. Les particules virales peuvent être transmises aux lymphocytes T CD4 par (i) *trans*-infection *via* la synapse infectieuse, (ii) *trans*-infection empruntant la voie de sécrétion des endosomes et/ou (iii) *cis*-infection. B/Exemple de la formation de synapses virologiques. Les particules bourgeonnent au niveau de la zone de contact entre la cellule dendritique infectée et les lymphocytes T.

b. Altération de la réponse immunitaire initiée par les cellules dendritiques lors de l'infection par le VIH-1

Lors de l'infection par le VIH-1, la modulation du fonctionnement des DC et notamment l'altération de leur capacité de présentation de l'antigène explique en partie la pathogénèse de la maladie et l'échappement du virus au système immunitaire. Frleta *et al.* montrent que les microparticules apoptotiques produites suite à la mort cellulaire engendrée soit par l'infection directe des cellules T CD4 par le VIH-1 soit par des mécanismes indirectes suivant l'infection semblent perturber l'activation de la voie Th1 par les DC (Frleta *et al.*, 2012). D'autres études observent que les DC du sang périphérique de patients à différents stades de l'infection stimulent moins efficacement des lymphocytes T allogéniques comparées à des DC de personnes saines (Knight *et al.*, 1991; Macatonia *et al.*, 1990; Roberts *et al.*, 1994). Le suivi de l'expression des marqueurs de maturation et de la sécrétion d'IFN α par les DC de patients infectés au stade chronique montrent que ces cellules répondent moins bien à une stimulation des TLR 7/8 que des DC de personnes saines (Martinson *et al.*, 2007). De façon similaire, il a été montré que l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 par les DC DC-SIGN⁺ chez les patients primo-infectés était réduite ce qui

pouvait altérer la réponse des cellules T induite par les DC (Loré *et al.*, 2002). De plus, l'infection *in vitro* de MDDC ou de DC de patients séropositifs n'induit pas la maturation des DC mais stimule la production d'IL-10, favorisant ainsi une réponse immunosuppressive (Granelli-Piperno *et al.*, 2004, 2006). Enfin, du fait de l'altération de la maturation des pDC, le VIH-1 est capable de stimuler de façon répétée ces cellules, provoquant la sécrétion continue d'IFN α ayant des conséquences néfastes sur l'évolution de la maladie (Herbeuval and Shearer, 2007; O'Brien *et al.*, 2011; von Sydow *et al.*, 1991).

Cependant, des résultats conflictuels ont été publiés. D'une part, Smed-Sørensen *et al.* (2005) montrent que l'infection des mDC et des pDC n'altère pas la réponse fonctionnelle des cellules. D'autre part, Sabado *et al.* (2010) montrent que la stimulation par des agonistes TLR 7/8 induit bien la maturation de mDC et de pDC de patients VIH⁺. Enfin, certaines études montrent que les DC de patients infectés par le VIH-1 sont capables d'induire efficacement une réponse T CD8 cytotoxique, ce qui suggère que la modulation de l'expression des molécules de costimulation à la surface des DC n'altère pas nécessairement les capacités des DC à activer les lymphocytes CD8⁺ (Fidler *et al.*, 1996; Sapp *et al.*, 1999).

En plus de la perturbation de la fonctionnalité des DC, l'infection par le VIH-1 affecte également la dynamique des DC. Très rapidement après l'infection, le nombre de DC circulantes, aussi bien les mDC que les pDC, est diminué (Donaghy *et al.*, 2001; Sabado *et al.*, 2010). Cette diminution est corrélée avec la charge virale (Barron *et al.*, 2003). Elle est observée même chez les patients placés sous traitement antirétroviral précocement et persiste au cours de la maladie, bien que les traitements permettent une certaine amélioration (Almeida *et al.*, 2006; Gompels *et al.*, 1998; Grassi *et al.*, 1999; Pacanowski *et al.*, 2001). Cette diminution du nombre de DC circulantes pourrait être due à l'infection des cellules et leur apoptose (Donaghy *et al.*, 2003). Cependant, dans un modèle macaque, il a été décrit un faible taux d'infection des DC, ne correspondant pas avec la perte observée, ce qui laisse présager l'existence d'autres mécanismes (Brown *et al.*, 2009). La diminution du nombre de DC au niveau plasmatique pourrait notamment s'expliquer par leur migration vers les tissus lymphatiques (Dillon *et al.*, 2008; Lehmann *et al.*, 2010; Nascimbeni *et al.*, 2009). Ainsi au cours de l'infection chez le macaque rhésus, il est observé à la fois une augmentation de l'expression de CCR7 par les DC circulantes et une augmentation de l'expression de CCL19, le ligand du CCR7 au niveau des ganglions lymphatiques (Wijewardana *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression de CCR7 est également observée *in vitro* sur des pDC suite à l'interaction avec les particules virales VIH-1 (Fonteneau *et al.*, 2004). Enfin l'infection par le VIH-1 s'accompagne d'un dérèglement des sécrétions

de cytokines/chimiokines au niveau des tissus lymphatiques qui provoque le recrutement et la rétention de cellules menant au développement d'une adénopathie (Biancotto *et al.*, 2007).

Les DC jouent donc un rôle prépondérant dans la transmission sexuelle du VIH-1. Lors d'un rapport sexuel non protégé contaminant, les DC peuvent être en contact avec le sperme qui n'est pas seulement le véhicule du virus mais influence également le processus de transmission du fait de sa composition riche en facteurs immunomodulateurs. Cette action peut s'exercer directement sur les DC (brèches au sein de la muqueuse ou dendrites intercellulaires) ou indirectement *via* la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales.

3. Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1

Le sperme est un fluide biologique constitué de cellules, majoritairement des spermatozoïdes mais également des cellules germinales testiculaires, des cellules épithéliales des voies urétrales ou des leucocytes, contenues dans une phase liquide appelée plasma séminal (PS). Le plasma séminal joue un rôle multiple au cours du processus de fécondation puisqu'il (i) fournit des ressources énergétiques aux spermatozoïdes, (ii) influence la fonctionnalité des spermatozoïdes et notamment leur capacitation et leur interaction avec l'ovocyte et (iii) module l'environnement immunitaire du tractus génital féminin favorisant ainsi la tolérance des spermatozoïdes (Caballero *et al.*, 2012; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011).

A. Composition du plasma séminal et propriétés physico-chimiques

Le plasma séminal, qui représente donc la fraction acellulaire du sperme, est un fluide complexe composé par un ensemble de sécrétions de différentes glandes. Lors de l'éjaculation, les sécrétions sont séquentielles et de ce fait, l'éjaculat initial n'est pas un fluide parfaitement homogène. La première portion de l'éjaculat (~5%) provient de glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper et de Littré), la deuxième portion (~15 à 30%) de la prostate et enfin la dernière, constituant la portion majoritaire, des vésicules séminales. L'épididyme et l'ampoule du canal déférent participent également dans une plus faible mesure à la sécrétion de molécules constituant le plasma séminal. Ce dernier contient des ions (dont le calcium, le magnésium, le potassium, le sodium et le zinc), des sucres (notamment fructose et glucose), source d'énergie pour les spermatozoïdes, des acides aminés, présents à une concentration plus importante que dans le plasma sanguin, de nombreuses protéines, ainsi que plusieurs autres molécules dont l'urée, l'acide lactique, des lipides, de la choline, des acides sialiques, de l'inositol ou encore de la spermine, du pyruvate, de la créatine, du citrate et de l'acide ascorbique (Owen and Katz, 2005; Rolland *et al.*, 2013). Le plasma séminal présente un fort pouvoir tampon, permettant le maintien de son pH entre 7,2 et 8,4 même dans l'environnement

vaginal acide protégeant ainsi les spermatozoïdes. Son osmolarité dépend fortement de sa concentration en sucre et autres molécules organiques ou ions. Elle apparaît tout de fois plus élevée que celle du plasma sanguin. Le plasma séminal présente également des propriétés rhéologiques particulières. L'éjaculat initial forme rapidement un coagulum qui se liquéfie par la suite. Les principaux composants du coagulum sont les séménogélines 1 et 2 et la fibronectine. Des facteurs de liquéfaction, PAP (Prostatic Acid Phosphatase) et PSA (Prostate Specific Antigen) sécrétés par la prostate vont cliver les séménogélines permettant ainsi la liquéfaction du coagulum. La liquéfaction est observée cinq minutes après éjaculation *in vivo* et 20 à 30 minutes après éjaculation *in vitro* (Owen and Katz, 2005).

Des études protéomiques ont mis en évidence la présence de plus de 2 500 protéines dans le plasma séminal (Batruch *et al.*, 2011; Fung *et al.*, 2004; Pilch and Mann, 2006; Rolland *et al.*, 2013). Elles se retrouvent sous formes solubles ou contenues dans des vésicules lipidiques d'origine prostatique appelées prostasomes (Aalberts *et al.*, 2014; Duncan and Thompson, 2007; Utleg *et al.*, 2003). Leur concentration totale est estimée à 50 mg/mL en moyenne. Ces protéines peuvent avoir des fonctions variées et permettent la réalisation d'un certain nombre de mécanismes biologiques (Figure 21). Une grande variété d'enzymes a été identifiée, comme par exemple des lipases, des glycosidases, des glucosidases, des hyaluronidases qui peuvent jouer un rôle catalytique dans les phénomènes métaboliques mais également dans l'activation des spermatozoïdes ou encore la liquéfaction du plasma séminal. Le plasma séminal contient aussi de l'albumine, qui est une protéine de transport, des molécules antimicrobiennes comme de la lactoferrine ou des mucines ou encore des protéines basiques comme la putrescine, la cadaverine, la spermine ou la spermidine qui participent à la neutralisation du pH acide vaginal. Enfin le plasma séminal contient un grand nombre de cytokines et chimiokines permettant la communication cellulaire et en particulier la modulation de l'environnement immunitaire du tractus génital féminin (Maegawa *et al.*, 2002; Politch *et al.*, 2007; Robertson, 2005). Parmi les facteurs présents aux concentrations les plus élevées se retrouvent aussi bien des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-8 et GRO que des facteurs anti-inflammatoires comme MCP-1, IP10 ou M-CSF. La cytokine majoritaire est le TGF- β présent sous trois isoformes 1 à 3. La concentration en TGF- β 1 du plasma séminal (~150-200 ng/mL) est nettement supérieure que celle des autres fluides biologiques. Cette cytokine induit la différenciation et l'expansion de Treg permettant l'induction de la tolérance immunitaire envers les antigènes paternels portés par les spermatozoïdes ainsi que par l'embryon (Robertson *et al.*, 2009). Le plasma séminal induit également très clairement une inflammation au niveau du tractus génital féminin. Cette modulation de l'environnement immunitaire, bien que nécessaire à la fécondation, peut-être délétère dans le cadre de la défense contre les agents pathogènes dont le sperme peut être le

vecteur. Plus qu'un simple véhicule, le plasma séminal pourrait jouer un rôle dans la modulation de la transmission sexuelle du VIH-1. En effet, des études *in vitro* montrent que le plasma séminal peut avoir à la fois un effet direct sur les particules virales ou sur les cellules cibles mais également un effet indirect notamment *via* l'induction de sécrétions par les cellules épithéliales qui pourraient influencer l'infection de cellules cibles. Les effets observés sont variables et le rôle du plasma séminal en tant que facilitateur ou inhibiteur de l'infection est encore débattu (Doncel *et al.*, 2011; Sabatté *et al.*, 2011).

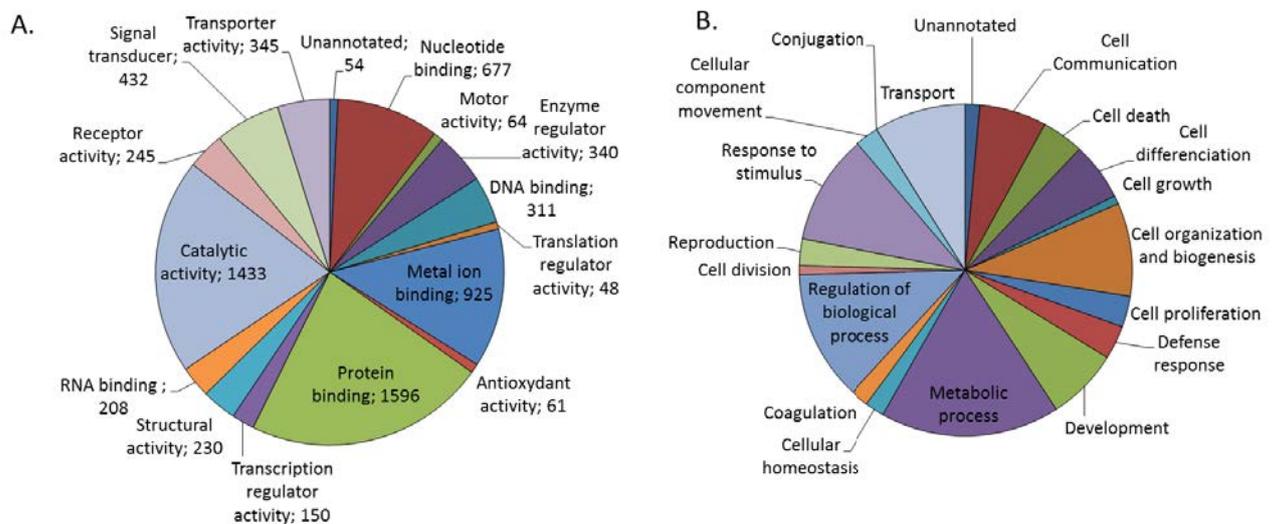


Figure 21 : Distribution des protéines présentes dans le plasma séminal A. Selon leur fonction métabolique B. Selon les processus biologiques dans lesquelles elles sont impliquées, d'après Batruch *et al.* (2011).

B. Effet direct du plasma séminal sur la transmission du VIH-1

a. Effet facilitateur

➤ *Neutralisation du pH vaginal*

L'acidité de l'environnement vaginal constitue une des premières barrières non spécifiques du tractus génital féminin pour se protéger contre les agents pathogènes. Cette barrière est notamment efficace contre l'infection par le VIH-1 puisque le pouvoir infectieux du virus est réduit en condition acide (O'Connor *et al.*, 1995; Ongradi *et al.*, 1990). L'acidité protège également contre la transmission du virus associé aux cellules (Olmsted *et al.*, 2005). Cependant, lors d'un rapport sexuel non protégé, le plasma séminal du fait de son fort pouvoir tampon, est capable de neutraliser rapidement le pH vaginal et ce pendant plusieurs heures (Fox *et al.*, 1973; Tevi-Bénissan *et al.*, 1997; Wolters-Everhardt *et al.*, 1986). Ce mécanisme permettant la protection des spermatozoïdes fournit donc également une protection au virus favorisant ainsi l'infection (Bouvet *et al.*, 1997). De plus, il a été constaté que

l'efficacité de capture et de clairance des particules virales par le mucus était diminuée lors de la neutralisation du pH (Lai *et al.*, 2009; Shukair *et al.*, 2013).

➤ *Rôle des fibrilles amyloïdes*

La présence de fibrilles amyloïdes dans le plasma séminal a été décrite comme un facteur favorisant l'infection par le VIH-1 (Münch *et al.*, 2007; Roan *et al.*, 2011; Usmani *et al.*, 2014). Ces fibrilles amyloïdes sont formées par des fragments protéiques issus de la PAP (on parle alors de SEVI, Semen-derived Enhancer of Viral Infection) ou des séménogélines 1 et 2. Ces peptides sont composés de nombreux résidus basiques portant des charges positives qui vont favoriser l'infection des cellules cibles en diminuant la répulsion électrostatique entre les membranes virales et cellulaires chargées négativement (French *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2012; Roan *et al.*, 2009). Ce mécanisme est indépendant du tropisme de la souche virale. L'augmentation de l'infection a été observée sur un certain nombre de type cellulaire dont des lignées reportrices de l'infection (TZM-BL, CEMx-M7), des lignées de cellules épithéliales du tractus génital féminin (Ect1/E6E7 et End1/E6E7) et des cellules primaires dont des PBMC, des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ (Kim *et al.*, 2010; Micsenyi *et al.*, 2013; Münch *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2010; Roan and Greene, 2007; Roan *et al.*, 2009). L'effet facilitateur de l'infection induit par le plasma séminal est dépendant du donneur et diminue progressivement au cours de la liquéfaction du sperme qui est associé à la dégradation des fragments de séménogélines (Kim *et al.*, 2010; Roan *et al.*, 2014). Des résultats controversés ont été obtenus *in vivo* chez le macaque rhésus, mettant en cause la réalité physiologique de ce mécanisme (Münch *et al.*, 2013). Une étude récente montre que l'action des fibrilles amyloïdes dépendrait du contexte anatomique. Au niveau de l'épithélium stratifié, les fibrilles captent et retiennent la plupart des particules virales à la surface de la muqueuse, diminuant ainsi la quantité de virus franchissant la muqueuse alors qu'au niveau de l'épithélium simple, les fibrilles se déstructurent et favorisent la pénétration des particules virales (Allen *et al.*, 2015).

➤ *Opsonisation des particules virales*

Le plasma séminal contient des molécules du complément qui peuvent être activées par les particules virales VIH-1 (indépendamment du tropisme de la souche) menant au clivage de C3. L'opsonisation des particules virales par les fragments C3a formés va favoriser l'infection des cellules exprimant le récepteur au complément comme les cellules épithéliales, les macrophages, les DC et les lymphocytes T CD4 (Bouhlal *et al.*, 2007).

Le plasma séminal de personnes séropositives contient également des anticorps dirigés contre l'enveloppe virale qui peuvent opsoniser les particules virales libres. La formation de ces complexes favorise la transcytose du virus *via* l'interaction avec le récepteur Fc néonatal exprimé par les cellules

épithéliales (Gupta *et al.*, 2013). Ce phénomène est observé même avec des anticorps neutralisants supposés protecteur de l'infection.(Lo Caputo *et al.*, 2003; Söderlund *et al.*, 2004).

b. Effet inhibiteur

Dès 1995, O'Connor *et al* montrent *in vitro* un effet protecteur du plasma séminal sur l'infection par le VIH-1 (O'Connor *et al.*, 1995). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer cette inhibition.

➤ *Toxicité des dérivés réactifs de l'oxygène*

Les polyamines présentes dans le plasma séminal, en particulier la spermine et la spermidine, peuvent être oxydées par les amines oxydases présentes dans le plasma séminal ou les sécrétions cervicovaginales. Ceci provoque la production de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) capables d'inactiver les particules virales (Agarwal and Prabakaran, 2005; Klebanoff and Kazazi, 1995; Stief, 2003).

➤ *Renforcement de la barrière physique*

Des études sur différentes lignées cellulaires du tractus génital féminin ont montré que le plasma séminal augmentait la résistance trans-épithéliale des épithéliums en culture renforçant ainsi leur étanchéité (Gorodeski and Goldfarb, 1998; Lawrence *et al.*, 2012). Cet effet serait dû à la présence d'un lipide de faible poids moléculaire (<10 kDa) capable d'influencer la distribution de la protéine ZO-1 impliquée dans l'établissement des jonctions serrées.

➤ *Présence de peptides antimicrobiens*

Le plasma séminal contient un certain nombre de peptides antimicrobiens dont la cathélicidine, des défensines ou encore de SLPI qui présentent des activités anti-VIH (cf Tableau 2) (Com *et al.*, 2003; Malm *et al.*, 2000; Moriyama *et al.*, 1998). Martellini *et al.* (2009) ont identifié jusqu'à cinquante-deux polypeptides cationiques séminaux contribuant à l'activité inhibitrice du plasma séminal. Cette activité inhibitrice est observée même lorsque le plasma séminal est fortement dilué (jusqu'à 1/3 200).

➤ *Interférence avec la capture des particules virales par DC-SIGN*

Sabatté *et al.* (2007) ont montré que le plasma séminal est capable d'inhiber spécifiquement la capture et la transmission des particules virales *via* le DC-SIGN. Cet effet est observé après seulement 30 minutes d'incubation des cellules avec le plasma séminal et cela même lorsque le plasma séminal est fortement dilué (1/100 000). Cette étude a permis de déterminer que l'effet n'était pas dû à la cytotoxicité du plasma séminal mais à la présence d'un facteur de haut poids moléculaire (>100 kDa), résistant à la trypsine et thermostable. Stax *et al.* (2009) ont confirmé ces résultats et identifié la

mucine 6 comme un ligand du DC-SIGN capable d'inhiber la capture et la transmission du VIH-1. La clusterine, protéine présente en grande quantité dans le plasma séminal (0,2 à 3,5 mg/mL), a également été désignée comme potentiellement impliquée dans l'inhibition par le plasma séminal de la capture et de la transmission des particules virales *via* DC-SIGN (Sabatte *et al.*, 2011).

➤ *Modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs*

Balandya *et al.* (2010) ont montré que le plasma séminal protège les cellules CD4⁺ de l'infection par le VIH-1 en diminuant l'expression du récepteur CD4 à la surface de ces cellules. Cette inhibition est corrélée avec le temps d'incubation et la concentration de plasma séminal utilisée. Dans le cas des lymphocytes T CD4, le plasma séminal inhibe également l'activation et la prolifération des cellules. L'incubation avec le plasma séminal s'accompagne toutefois d'une augmentation de l'expression du corécepteur CCR5 rendant la protection du plasma séminal moins efficace contre les souches R5 que X4, ce qui pourrait participer à la sélection des souches R5 lors de la transmission sexuelle. L'augmentation de l'expression de CCR5 suite à une exposition au plasma séminal a également été observée sur des cellules épithéliales du col de l'utérus ce qui pourrait rendre discutable la protection apportée par le plasma séminal *via* la modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs du VIH-1 (Sales *et al.*, 2014). Cependant, cette dernière étude n'a pas déterminé si le plasma séminal modulait l'infection par le VIH-1.

C. Modulation de la réponse immunitaire par le plasma séminal

Le plasma séminal est un fluide riche en facteurs immunomodulateurs et notamment en cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, immunoglobulines, prostaglandines...(Maegawa *et al.*, 2002; Politch *et al.*, 2007). Plusieurs études montrent même que la concentration de certains facteurs dont l'IL5, l'IL6, l'IL7, l'IL8, l'IL15, MIG, IP10, le TGF- β , MCP-1, la fractalkine, le GM-CSF, MIP-1 α et MIP-1 β est plus importante dans le plasma séminal que dans le sang (Anderson *et al.*, 2010; Olivier *et al.*, 2013). Ces facteurs jouent un rôle dans le recrutement, la prolifération et la maturation des cellules immunitaires (monocytes/macrophages, lymphocytes T et B, DC et NK). Le TGF- β , présent à des taux cinq fois plus importants que dans le sang, induit la tolérance au niveau du tractus génital. Il supprime la réponse des NK et oriente la différenciation des lymphocytes T CD4 en Treg et en CD4 Th17, cibles privilégiées du virus (Robertson *et al.*, 2002a, 2009, 2013). Les prostaglandines sont également présentes à des concentrations élevées, bien que variables selon les individus (Bendvold *et al.*, 1984; Oliw *et al.*, 1986; Svanborg *et al.*, 1989; Templeton *et al.*, 1978). Les prostaglandines et en particulier PGE2, le facteur le plus étudié de cette famille, inhibent les fonctions effectrices des macrophages et neutrophiles, limitent la réponse cytotoxique des lymphocytes et NK, favorisent la polarisation des lymphocytes T CD4 vers la voie Th2 et induisent la

différenciation de DC tolérogènes (Kalinski, 2012; Kelly *et al.*, 1994; Remes Lenicov *et al.*, 2012, 2014; Sakata *et al.*, 2010). Introini *et al.* (2013) ont montré sur un modèle *ex vivo* que l'IL7, cytokine essentielle pour l'homéostasie lymphocytaire, stimule la prolifération des lymphocytes T CD4 et inhibe leur apoptose, favorisant ainsi la réplication du VIH-1. Une étude chez le macaque rhésus, montre que l'IL7 augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2, mécanisme qui pourrait jouer un rôle dans la protection des lymphocytes T CD4 infectés (Vassena *et al.*, 2012).

Le plasma séminal est également capable de déclencher la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales des muqueuses avec lesquelles il est en contact. Il induit notamment la sécrétion de facteurs inflammatoires dont l'IL6, l'IL8, le GM-CSF, MCP-1 favorisant ainsi le recrutement de nombreuses cellules immunitaires (Sharkey *et al.*, 2007, 2012a, 2012b). Narimatsu *et al.* (2005) estiment, à partir d'expériences *in vitro* et *ex vivo*, que la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 est augmentée de cinq à huit fois en présence de ces cytokines inflammatoires. L'expression de ces facteurs inflammatoires est notamment due à l'augmentation de la translocation du facteur de transcription NFκB, qui joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire innée et dans l'induction de l'expression des gènes du VIH-1 (Baba, 2006; Berlier *et al.*, 2006a; Doncel *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2012; Kafka *et al.*, 2012). Le plasma séminal et en particulier la PGE2 séminale augmente l'expression de COX-2, enzyme impliquée dans la synthèse des prostaglandines, par les cellules vaginales et potentialise l'activation induite par des ligands TLR (Joseph *et al.*, 2012; Sales *et al.*, 2002). Le plasma séminal augmente également la sécrétion de CCL20 par les cellules vaginales, ce qui provoque le recrutement de cellules de Langerhans au niveau de la muqueuse et donc potentiellement favorise la dissémination du virus (Berlier *et al.*, 2006a; Sharkey *et al.*, 2007, 2012a). Une étude chez le macaque rhésus a montré que l'inhibition de la sécrétion de CCL20 protégeait les singes contre l'infection par le SIV (Li *et al.*, 2009). Les modifications immunitaires provoquées par le plasma séminal favorisant la fécondation se montrent délétères dans le cadre de l'infection par le VIH-1. Ces événements favorisent la tolérance, créent une inflammation locale qui s'accompagne du recrutement de cellules cibles pour le virus. De plus, la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales de la muqueuse génitale féminine induite par le plasma séminal active le LTR du VIH-1 favorisant la réplication virale (Kafka *et al.*, 2012).

Peu d'études ont été réalisées sur la muqueuse colorectale. Les réponses immunitaires à ce niveau semblent différentes. En effet, l'injection de plasma séminal au niveau rectal chez des singes ne s'accompagne pas de la suppression de la fonction des cellules immunitaires comme cela peut être le cas au niveau de la muqueuse génitale ce qui pourrait être en partie lié à la moindre diffusion de PGE2 au niveau rectal qu'au niveau vaginal (Alexander *et al.*, 1987).

D. Influence de l'infection par le VIH-1 sur la composition du plasma séminal

L'infection par le VIH-1 provoque une perturbation du « réseau cytokinique » du plasma séminal avec notamment une augmentation de l'expression de cytokines proinflammatoires (Lisco *et al.*, 2012a; Olivier *et al.*, 2013). Plusieurs équipes ont décrit une augmentation des concentrations d'IL1 β , d'IL6, d'IL7, d'IL8, de MIG, MCP-1, du GM-CSF (Anderson *et al.*, 2010; Lisco *et al.*, 2012a, 2012b). L'expression de certains facteurs peut également varier en fonction du stade de l'infection par le VIH-1. Kafka *et al.* (2012) ont montré que l'IL6, l'IL8 et MCP-1 sont présents en plus grandes concentrations dans le plasma séminal de patients en primo-infection par rapport à des patients au stade chronique. Au contraire, la concentration en TGF- β 1 est respectivement trois et huit fois plus élevée dans le plasma séminal d'individus chroniques que d'individus en primo-infection ou non infectés. Certains auteurs ont décrit des corrélations entre la présence de facteurs et la charge virale. Une corrélation positive a ainsi été établie avec RANTES, l'IL6, l'IL8, l'IL12, l'IFN γ , l'IL1 β , l'IL17 et l'IFN γ (Berlier *et al.*, 2006b; Hoffman *et al.*, 2014; Sheth *et al.*, 2005; Storey *et al.*, 1999). Hoffman *et al.* (2014) ont également mis en évidence une corrélation négative entre la charge virale et la concentration en IL5 du plasma séminal. Ces variations de concentrations en cytokines pourraient avoir de nombreuses conséquences puisqu'il a par exemple été montré que des concentrations élevées en cytokines proinflammatoires menaient à une expansion et une activation des cellules immunitaires de la muqueuse. D'autre part, l'augmentation de la concentration en TGF- β pourrait être à l'origine de l'accumulation des lymphocytes Treg (Lisco *et al.*, 2012a; Andersson *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2009). Une augmentation de la concentration en IL7 pourrait quant à elle favoriser la persistance et la survie des lymphocytes T mémoires, cibles préférentielles du virus. Cependant, cela pourrait également augmenter le nombre de cellules effectrices capables de contenir l'infection. Une concentration élevée en RANTES pourrait avoir un effet protecteur en faisant compétition avec la liaison au CCR5 mais cela peut également provoquer une sélection de souches résistantes virulentes (Biancotto *et al.*, 2009). Enfin une augmentation de la concentration en ligands du CXCR4 pourrait inhiber l'infection par des souches X4 et être un des mécanismes expliquant la sélection tropique ayant lieu lors de la transmission sexuelle du VIH-1 (Margolis and Shattock, 2006). La modification de la composition du plasma séminal en facteurs immunomodulateurs affecte également la réponse des cellules épithéliales de la muqueuse. Kafka *et al.* constatent que la sécrétion des cytokines proinflammatoires IL1 α , IL6 et TNF α est diminuée chez les patients chroniques comparé aux patients en primo-infection et aux personnes non infectées du fait de la forte concentration en TGF- β de leurs plasmas séminaux. Ils observent également une augmentation de l'activation du LTR du virus par les sécrétions des cellules épithéliales stimulées par les plasmas séminaux de patients en primo-infection par rapport à ceux se trouvant au stade chronique ou n'étant pas infectés.

Finalement, de nombreux effets du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 ont été décrits. La majorité de ses résultats ont été obtenus à partir de modèles permettant de décortiquer les mécanismes mais pas d'évaluer l'impact global du plasma séminal. Les études réalisées *in vivo* montrent que le plasma séminal n'est pas nécessaire à l'établissement de l'infection (Miller *et al.*, 1989; Sallé *et al.*, 2010). Le rôle du plasma séminal n'est pas encore élucidé mais il semblerait qu'il ait tendance à faciliter l'infection par SIV lors de l'inoculation au niveau vaginal de faibles concentrations de virus libres chez le macaque rhésus (Le Grand *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1989; Münch *et al.*, 2013; Neildez *et al.*, 1998).

4. Prévention de la transmission

Bien que les traitements antirétroviraux permettent de contrôler la réplication de VIH, ils ne permettent pas la guérison du patient. De plus, 90% des patients résident dans des pays en voie de développement où les traitements ne sont pas toujours disponibles. Le préservatif, moyen de protection efficace contre l'ensemble des IST ne suffit cependant pas à enrayer la propagation du VIH-1. Développer des stratégies de prévention alternatives semble donc indispensable pour combattre la pandémie.

a. Vaccination

Le développement d'un vaccin contre le VIH-1 a fait l'objet de nombreuses études. Depuis la découverte du virus, plus de 250 essais cliniques, majoritairement de phase I et II, ont été réalisés (Wang *et al.*, 2015b). Les essais menés pendant les dix premières années de recherche se sont focalisés essentiellement sur l'utilisation de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 monomérique afin de stimuler une réponse humorale spécifique de l'enveloppe virale (Flynn *et al.*, 2005; Miedema, 2008; Pitisuttithum *et al.*, 2006). En 1994, suite aux échecs des vaccins induisant des anticorps, la communauté scientifique change de stratégie vaccinale. Deux études chez le macaque rhésus montrent que la stimulation de la réponse cellulaire ne protège pas les singes contre l'infection mais favorise leur survie et est corrélée avec un set-point viral plus faible (Hirsch *et al.*, 1994; Shiver *et al.*, 2002). La réponse spécifique des lymphocytes T semble donc jouer un rôle crucial dans le contrôle de l'infection. L'essai clinique VIH Vaccine Trials Network (HVTN) 502 aussi appelé STEP est initié pour évaluer si un vaccin stimulant la réponse des lymphocytes T permet de protéger ou tout du moins diminuer la charge virale après infection. Malgré une bonne immunogénicité du vaccin en phase I, l'essai clinique STEP est rapidement arrêté. Aucune efficacité du vaccin n'est observée ni sur la protection ni sur la charge virale. Un plus grand nombre d'infection est même observé parmi les vaccinés. Deux ans après cet échec, l'essai RV144 Thaï apporte enfin la preuve de concept d'un vaccin efficace contre le VIH-1. La protection observée, de 31,2%, demeure tout de fois modeste (Rerks-

Ngarm *et al.*, 2009). Le corrélat de protection met en évidence un rôle protecteur des IgG dirigées contre les boucles V1V2. En revanche, les IgA ciblant la protéine d'enveloppe pourraient atténuer la protection fournie. Il apparaît dans cette étude que les anticorps neutralisants à large spectre n'apportent pas de protection contrairement aux anticorps impliqués dans la réponse cellulaire cytotoxique (ADCC) (Haynes *et al.*, 2012). Si cette étude montre la faisabilité de la vaccination anti-VIH, le développement d'un vaccin performant reste délicat que ce soit du fait de (i) la diversité antigénique du VIH-1, liées aux recombinaisons entre souches mais également aux mutations induites par la transcriptase inverse, (ii) la capacité du virus à échapper au système immunitaire ou encore (iii) le manque de corrélats de protection identifiés. Plusieurs essais en phase I ou II sont actuellement en cours mais aucun en phase III. Le développement d'un vaccin anti-VIH-1 demeure donc un véritable challenge pour la communauté scientifique. Des études récentes montrent l'importance de la voie d'administration du vaccin sur l'efficacité de la réponse induite au niveau du tractus génital. Ainsi, chez le macaque, une immunisation par voie nasale et orale favoriserait une réponse IgG et IgA plus spécifique au niveau de la muqueuse génitale qu'une immunisation par voie vaginale ou systémique (Mann *et al.*, 2013). Le développement de l'eCD4-Ig, une immunoadhésine CD4 fusionnée à un peptide se liant au CCR5 qui se révèle capable de protéger contre la transmission sexuelle du VIH-1 chez le macaque montre bien que l'induction d'anticorps neutralisants n'est pas le seul moyen de protéger de l'infection par le VIH-1 (Gardner *et al.*, 2015).

Parallèlement à l'avancement de la recherche d'un vaccin, d'autres moyens de prévention de l'infection ont également été développés.

b. La circoncision

Trois essais cliniques de phase III menés en Afrique du Sud, au Kenya et en Ouganda (Avert *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2007) ont montré que la circoncision protégeait de façon efficace contre l'infection par le VIH-1. Les taux de protection observés variant de 51 à 60% ont amené l'Organisation Mondiale de la Santé et l'ONUSIDA à recommander en mars 2007, la circoncision comme un moyen supplémentaire de prévention de la transmission hétérosexuelle du VIH-1 dans les pays à forte prévalence pour le virus et à faible taux de circoncision (WHO and UNAIDS, 2007). La circoncision confère une protection contre l'infection en diminuant la surface exposée au virus et en éliminant une zone particulièrement sensible à l'infection (Jayathunge *et al.*, 2014). En effet, le prépuce étant riche en cellules de Langerhans, macrophages et lymphocytes T exprimant les récepteurs et corécepteurs CD4, CXCR4 et CCR5, il constitue une porte d'entrée majeure du virus (Ganor *et al.*, 2010; Hirbod *et al.*, 2010; McCoombe and Short, 2006; Patterson *et al.*, 2002). Le risque d'infection au niveau du prépuce est encore plus forte en cas de co-infections

génitales du fait de l'augmentation du recrutement de cellules cibles dans cette zone mais également de la présence de micro érosions fréquentes lors de ses infections. Cependant, si la circoncision confère une protection pour l'homme dans le cadre de contamination hétérosexuelle, la protection de la femme est plus difficile à évaluer. La circoncision masculine ne semble pas avoir d'effets bénéfiques directs (Hankins, 2007; Lei *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2009). En revanche, il est évident que les femmes bénéficient indirectement de la diminution de la prévalence du VIH-1. La circoncision ne semble pas non plus être un moyen de prévention efficace pour les homosexuels (Doerner *et al.*, 2013; Goodreau *et al.*, 2014; Londish *et al.*, 2010). Par ailleurs, la circoncision demeure une pratique controversée (Halioua and Lobel, 2014; Van Howe, 2015). Le CDC a récemment ravivé le débat en lançant un appel à la discussion à propos de nouvelles recommandations qui conseilleraient la circoncision comme moyen de prévention généralisé contre le VIH-1 (Earp, 2015; Nelson, 2015; Parker *et al.*, 2015; Wamai *et al.*, 2015a, 2015b).

c. Traitement des co-infections

S'il est évident que les IST constituent un cofacteur majeur de la réplication du VIH-1 et du risque de transmission, le traitement des IST comme stratégie de prévention de l'infection par le VIH-1 reste controversé. En effet, les résultats d'essais cliniques concernant cette stratégie sont mitigés, provoquant le désintérêt de certaines institutions vis-à-vis de cette approche (Hayes *et al.*, 2010). Il a pourtant été observé que le traitement des IST permet une diminution de la charge virale du VIH-1 au niveau des sécrétions génitale diminuant ainsi le risque de transmission (Cohen *et al.*, 1997; Ghys *et al.*, 1997; McClelland *et al.*, 2001; Rotchford *et al.*, 2000; Zuckerman *et al.*, 2009). L'utilisation de modélisations mathématiques confirme l'importance du traitement des co-infections dans la prévention de l'infection par le VIH-1 en particulier chez les populations à risque pour le VIH-1 où la prévalence des co-infections est élevée (White *et al.*, 2008). Si le traitement des IST n'est pas reconnu comme moyen de prévention en soi, il doit en revanche être envisagé comme un moyen supplémentaire à utiliser permettant de diminuer la mortalité et la morbidité liées aux IST elles-mêmes.

d. TasP et PrEP

Le TasP ("Treatment as Prevention") consiste en l'utilisation précoce des traitements antirétroviraux (quel que soit le taux de CD4) chez les personnes séropositives, l'objectif étant de diminuer la charge virale et donc la transmission puisque la relation dose-effet entre la charge virale et la transmission est clairement établie. Plusieurs études ont montré l'efficacité de la TasP (Cohen *et al.*, 2011; Donnell *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2008; Musicco *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2010). Lors de l'essai HTPN 052, le traitement précoce du partenaire séropositif

a diminué de 96% le taux d'infection. A ce titre-là, en 2011, le journal *Science* a d'ailleurs désigné la TasP comme révolution médicale de l'année (Cohen, 2011). Si le bénéfice individuel est évident, le bénéfice populationnel est encore débattu. Cette stratégie nécessite une large couverture par les antirétroviraux mais également le dépistage précoce des personnes infectées (Montaner *et al.*, 2014). L'essai ANRS 12 249, qui a pour objectif d'estimer directement l'impact du TasP en Afrique du Sud sur l'incidence de nouvelles infections VIH-1 dans la population générale de la même région, permettra d'apporter des éléments de réponse à cette question. Cependant, l'accessibilité du TasP pour tous les patients y compris dans les pays en voie de développement et au sein des populations les plus fragiles représente un véritable challenge (Mills *et al.*, 2013; Ogbuagu and Bruce, 2014; Wilson *et al.*, 2014).

La PrEP ("pre-exposure prophylaxis ") consiste, elle, en la prescription préventive de traitements antirétroviraux à des personnes séronégatives fortement exposées afin de réduire le risque d'infection. Le cas des microbicides, qui peuvent faire partie de la stratégie de PrEP, est abordé dans le paragraphe suivant. Plusieurs essais cliniques témoignent d'une protection apportée par la PrEP. La réduction du risque d'infection suite à la prise de Truvada (combinaison de ténofovir et d'emtricitabine) chez les HSH (Hommes qui ont des rapports Sexuels avec les Hommes) est de 44% au sein de la cohorte iPrex (prise quotidienne) et 86% pour les cohortes PROUD (prise quotidienne) et Ipergay (prise à la demande) (Grant *et al.*, 2010; McCormack *et al.*, 2015; Molina *et al.*, 2015). Ce chiffre passe à 92% pour la cohorte iPrex lorsque les antirétroviraux sont détectables dans le sang. D'autres études ont également rapporté un bénéfice de la PrEP chez les hétérosexuels. L'essai TDF-2 a montré une réduction du risque de 62% sous Truvada et l'essai Partners PrEP, portant sur des couples hétérosexuels sérodifférents, a montré une réduction du risque d'infection de 67% sous ténofovir et de 75 % sous Truvada (Baeten *et al.*, 2012; Thigpen *et al.*, 2012). L'observance des traitements constitue un élément critique pour l'efficacité de la PrEP (Amico, 2014; Nachega *et al.*, 2013). Malgré des résultats très encourageants, ces études sur la PrEP soulèvent de nombreuses questions notamment sur l'efficacité et la tolérance de cette approche sur le long terme mais également sur les moyens mis en œuvre pour l'accessibilité, le remboursement et l'encadrement de cette pratique.

e. Microbicides

Les microbicides sont des composés se présentant sous forme de gels, crèmes, films, anneaux ou suppositoires qui peuvent être appliqués au niveau des muqueuses vaginale ou rectale pour protéger contre les IST dont le VIH-1. Les microbicides doivent (i) être efficaces, (ii) respecter le pH et la flore vaginale, (iii) ne pas altérer la barrière épithéliale ni induire d'inflammation, (iv) préserver la réponse

immunitaire innée, (v) éviter l'induction de résistance aux antirétroviraux et (vi) être facilement utilisables. Plusieurs essais cliniques évaluant l'efficacité de divers composés dont des détergents, des surfactants ou des agents polyanioniques se sont soldés par des échecs, majoritairement du fait de la toxicité et des réponses proinflammatoires induites par ces molécules (Feldblum *et al.*, 2008; Fichorova *et al.*, 2001; Van Damme *et al.*, 2002, 2008). Le succès encourageant de l'essai clinique de phase II CAPRISA 004 utilisant un gel à base de Ténofovir apporte la preuve de concept que les antirétroviraux peuvent servir de microbicides efficaces (Abdool Karim *et al.*, 2010). Cependant, les déconvenues récentes d'essais cliniques comme l'essai VOICE (Vaginal and Oral Interventions to Control the epidemic) indiquent que des progrès sont encore nécessaires afin de développer des stratégies efficaces (Marrazzo *et al.*, 2015; MTN, microbicide trials network, 2011; Van Damme *et al.*, 2012). Il est entre autre primordial de sensibiliser les utilisateurs afin de renforcer l'adhérence, cause de grandes variations des taux de protection. L'influence du sperme sur l'efficacité des microbicides est un autre point, souvent négligé, qui pourrait être à l'origine de certains échecs (Herold *et al.*, 2011; Keller and Herold, 2009; Ramjee, 2010). Une étude sur l'utilisation du microbicide PRO 2000 par des couples hétérosexuels révèle que les sécrétions cervicovaginales postcoïtales ne montrent aucune activité antivirale contre le VIH-1 et HSV-2 contrairement aux prélèvements précoïtaux (Keller *et al.*, 2010). Plusieurs études *in vitro* montrent une perte de l'activité antivirale des microbicides polyanioniques en présence de plasma séminal (Neurath *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007). Le plasma séminal perturbe l'interaction du virus ou des cellules avec le microbicide diminuant ainsi son efficacité. Cette interférence peut notamment être due à la présence de peptides chargés positivement à un pH neutre comme la spermine ou la putrescine qui se complexent avec les microbicides polyanioniques. Ce mécanisme expliquerait pourquoi l'activité antivirale de certains microbicides agissant sur le virus intracellulaire dont les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs des enzymes à doigts de zinc n'est pas affectée par le plasma séminal (Neurath *et al.*, 2006). Cependant, plus récemment Zirafi *et al.* (2014) ont montré que le plasma séminal inhibe l'action protectrice d'un grand nombre de microbicides dont des anticorps neutralisants, des microbicides polyanioniques, des inhibiteurs nucléotidiques ou non de la transcriptase inverse et des inhibiteurs de l'intégrase. Seule l'activité du maraviroc, qui est un inhibiteur de la liaison avec le CCR5, n'est pas affectée par le plasma séminal. Cette étude montre que ce sont les fibrilles amyloïdes du plasma séminal qui sont responsables de l'inhibition de l'activité antirétrovirale des drogues, en agrégeant les particules virales et en les concentrant au niveau de la surface cellulaire favorisant ainsi l'infection. Pour être efficaces, les microbicides dont l'action cible le virus (extra ou intracellulaire) devraient donc être utilisés à des concentrations plus élevées, ce qui a été souvent observé lors d'études cliniques. En revanche, l'efficacité du maraviroc n'est pas affectée par la présence de plasma séminal puisque ce microbicide cible un facteur cellulaire. Le maraviroc est un inhibiteur

allostérique de CCR5 empêchant le changement conformationnel du corécepteur nécessaire à l'entrée du virus. Si la concentration utilisée permet une saturation des corécepteurs CCR5 à la surface des cellules cibles, la protection conférée devient indépendante du nombre de virions à proximité des cellules.

Ce résultat encourage le développement de microbicides constitués par des combinaisons d'antirétroviraux. Le récent succès de la l'essai clinique de phase I concernant l'utilisation d'un anneau vaginal contenant du maraviroc et de la dapivirine est une avancée prometteuse (Chen *et al.*, 2015). Les nombreux essais cliniques en cours dont trois en phase III, concernant pour l'un l'utilisation d'un gel à base de Ténofovir et pour les deux autres l'utilisation d'anneaux vaginaux contenant de la dapivirine, font espérer des progrès rapides dans le domaine des microbicides (MTN, microbicide trials network, 2014). Le développement de microbicides rectaux est également une nécessité. Des études sont en cours bien que moins nombreuses que pour les microbicides vaginaux (Cranage *et al.*, 2008; Dezzutti *et al.*, 2014; Leyva *et al.*, 2015; McGowan *et al.*, 2015; MTN, microbicide trials network, 2014; Nunes *et al.*, 2014).

Objectifs et démarche expérimentale

Une meilleure compréhension des mécanismes de transmission du VIH-1 par voie muqueuse, et notamment des interactions entre les différents « acteurs » impliqués, pourrait faciliter le développement de nouvelles stratégies antivirales, à la fois thérapeutiques et préventives.

Le laboratoire du Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP, EA 3064) étudie les mécanismes de transmission sexuelle du VIH-1 ainsi que la réponse immunitaire à ce virus au niveau des muqueuses. Comme cela a été détaillé dans la partie bibliographique, il est désormais clairement établi que le virus présent sous forme de particules virales libres et/ou associées aux cellules dans le sperme d'hommes infectés peut traverser les muqueuses génitales et colo-recto-anales même en l'absence de brèches. Parmi les différents mécanismes de franchissement muqueux décrits, le laboratoire GIMAP a travaillé *in vitro* sur plusieurs d'entre eux dont la transmigration de monocytes et le franchissement muqueux *via* les DC. Au cours de ces études, il a été montré que le sperme, en plus d'être un vecteur pour le virus, influençait la transmission de façon directe ou indirecte.

L'objectif de cette Thèse est de déterminer l'influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 *via* les DC. Les DC de la muqueuse peuvent être en contact direct avec le plasma séminal du fait de la projection de leurs dendrites au niveau de la lumière de la muqueuse ou par diffusion du plasma séminal à travers des brèches. L'action du plasma séminal peut également s'exercer indirectement *via* l'induction de la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales. En effet, de précédentes études au laboratoire ont montré que le plasma séminal induit la sécrétion de CCL20 par les cellules vaginales (lignée SiHa) entraînant le recrutement de cellules de Langerhans pouvant influencer la transmission.

Ce travail *in vitro* a été réalisé sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC). L'effet indirect a été étudié à l'aide de deux modèles d'épithéliums simples. Ces modèles reposent sur la culture de lignées cellulaires HEC-1A et CaCo2-C2E sur insert mimant respectivement l'épithélium endocervical et colorectal humain.

Matériels et Méthodes

Le détail des expérimentations se trouvent dans les chapitres dédiés des deux articles présentés plus loin. Le schéma général de la démarche expérimentale est résumé Figure 22.

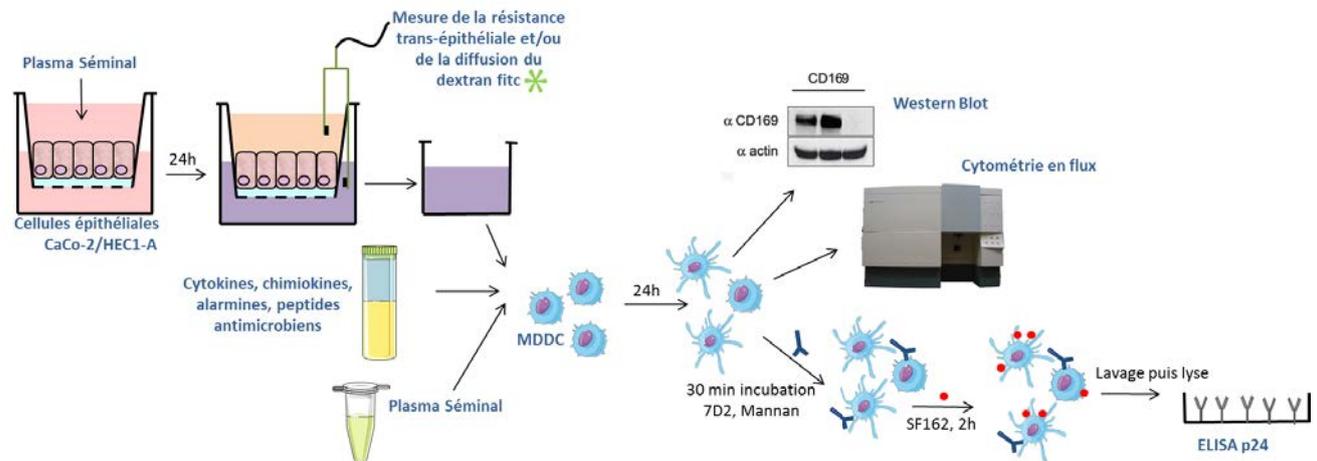


Figure 22 : Démarche expérimentale résumant les différentes techniques utilisées. Les DC sont incubées pendant 24h en présence de cytokines, chimiokines ou de milieux basaux de cellules épithéliales. Le phénotype des MDDC est analysé par cytométrie en flux et Western Blot. Des expériences de prises en charge des particules virales VIH-1 sont également réalisées. Pour cela, les cellules sont incubées pendant 30 minutes en présence d’inhibiteurs ou d’anticorps bloquant les récepteurs étudiés avant d’être mis en présence de virus VIH_{SF122} pendant 2h. Après 5 lavages et lyse des cellules la quantité de p24 est dosée par ELISA.

1. Patients et Prélèvements

Les échantillons de sperme ont été collectés auprès de patients VIH⁻ par le service de Biologie de la Reproduction du Pr Cottier du CHU de Saint-Etienne et d’hommes VIH⁺ ARV⁺ (au stade chronique ou SIDA, sous traitement antirétroviral et ayant une charge virale séminale inférieure à 40 copies d’ARN/mL) par le service des Maladies Infectieuses et Tropicales du Pr Lucht du CHU de Saint-Etienne. Un consentement écrit a été recueilli auprès de chaque participant préalablement à l’étude. Les échantillons de sperme ont été obtenus par masturbation dans des flacons stériles et manipulés dans les quatre heures suivant l’éjaculation. Après avoir été dilué au 1/2 dans du tampon phosphate salin (PBS), le plasma séminal a été séparé de la fraction cellulaire par centrifugation (800g, 30min). Vingt et un plasmas séminaux VIH⁻ et 19 plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺ ont été conservés de façon individuelle. Dix autres de chaque statut ont été mélangés afin de constituer des « pools ». Ces échantillons ont ensuite été aliquotés puis congelés à -80°C jusqu’à utilisation.

2. Culture cellulaire

Les cellules utilisées dans cette étude (MDDC, HEC-1A, CaCo-2) ont été cultivées à 37°C, en atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂. Les milieux utilisés sont tous supplémentés en SVF (10%) et en antibiotiques (1% d’une solution contenant de l’amphotéricine B à 25µg/mL, de la streptomycine à 10 mg/mL et de la pénicilline à 10 000U/mL).

- Cellules Primaires : Obtention de cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC)

Les MDDC sont issues de monocytes cultivés durant 6 jours dans du milieu RPMI 1640 en présence de 100 ng/ml de GM-CSF et de 50 ng/ml d'IL-4 afin d'obtenir des MDDC immatures. Les monocytes sont isolés par tri magnétique positif (CD14 MicroBeads Kit, Miltenyi Biotec) réalisé sur des cellules mononuclées du sang (PBMC) obtenues par gradient de densité à partir de concentrés leucocytaires (Buffy Coats fournis par l'EFS Auvergne-Loire).

Les MDDC ont été stimulées pendant 24h en présence de différentes molécules ou de plasma séminal. L'IL1- β (100ng/mL, Preprotech), le TNF- α (50ng/mL, Preprotech) et le LPS (200ng/mL, InvivoGen) ont été utilisés comme témoins de l'induction de la maturation.

- Lignées Cellulaires :
 - Entretien

Les cellules HEC-1A, cellules humaines issues d'un adénocarcinome de l'endomètre, sont cultivées dans du milieu Mc Coy's (Sigma-Aldrich).

Les cellules CaCo-2, cellules humaines issues d'un adénocarcinome du colon, sont cultivées dans du DMEM High glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA).

Ces cellules sont adhérentes et forment une monocouche mimant respectivement la muqueuse endocervicale et colorectale. Pour détacher les cellules, permettre leur entretien et leur ensemencement, une solution de trypsine recombinante/EDTA a été utilisée.

- Culture sur insert

Afin de mimer au mieux les muqueuses les cellules HEC-1A et CaCo-2 ont été cultivées sur des inserts, supports perméables dont la porosité est de 3 μ M. Ce système permet d'avoir un accès indépendant au compartiment apical et basal. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques d'un rapport sexuel non protégé, le plasma séminal est déposé sur la monocouche de cellules épithéliales au niveau du compartiment apical. Après 24h d'incubation, le milieu basal est récupéré afin d'évaluer l'impact des sécrétions des cellules épithéliales sur les DC.

Deux types d'inserts ont été utilisés, des inserts pour plaque 24 puits (BD Falcon, 35 3096) et des inserts pour plaque 96 puits (Corning, 3386).

Les inserts pour plaque 24 puits sontensemencés par 200 000 cellules par puits. L'intégrité de la monocouche épithéliale est évaluée grâce à la mesure de la résistance transépithéliale (TEER) à l'aide d'un appareil Millicell-ERS. Après quatre jours de culture, les cellules peuvent être stimulées.

Les inserts pour plaque 96 puits sontensemencés par 20 000 cellules par puits pour les cellules CaCo-2 et 30 000 pour les HEC-1A. Le suivi de la résistance ne pouvant être réalisé grâce à l'appareil Millicell-ERS (sonde inadaptée), l'étanchéité de la monocouche est évaluée par mesure de la diffusion de dextran-fitc comme décrit par Cavarelli *et al.*(2013). Après quatre jours de culture, les cellules peuvent être stimulées.

3. Cytométrie en flux

Après ces différentes stimulations, le phénotype des MDDC a été analysé par cytométrie en flux. Pour cela, les MDDC ont été incubées pendant 20 min à 4°C en présence de différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes ainsi que des isotypes contrôles (Tableau 3). La mortalité cellulaire a été mesurée grâce à l'utilisation d'iodure de propidium (IP). L'IP est un agent intercalant fluorescent, qui permet de marquer l'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Les MDDC ont été incubées en présence d'IP pendant 5 min à 4°C. Pour le marquage des molécules de surface comme pour l'IP, un lavage est nécessaire avant de réaliser l'acquisition du signal de fluorescence puis les analyses sur un cytomètre Facscalibur (BD Biosciences) grâce au logiciel CellQuest Pro.

Tableau 3: Marqueurs cellulaires étudiés par cytométrie en flux

Marqueurs	Clone-fournisseur	Rôle
CD209 ou DC-SIGN	Clone DCN 47.5 Miltenyi Biotec	CLR capable de fixer le VIH-1
CD169 ou Siglec-1 ou sialoadhésine	Clone 7-239 Miltenyi Biotec	Lectine de type C capable de fixer le VIH-1
CD206 ou récepteur au mannose	BD Pharmingen	CLR capable de fixer le VIH-1
HLA DP-DQ-DR	Clone REA 332 Miltenyi Biotec	Complexe majeur d'histocompatibilité, surexprimé par les DC matures
HLA-DP	Clone REA 303 Miltenyi Biotec	
CD86 ou B7-2	Clone 2331(FUN-1) BD Pharmingen	Molécule de costimulation des lymphocytes T, ligand du CD28 et CTLA4
CD4	Clone RPA-T4 BD Pharmingen	Récepteur principal du VIH-1

CD184 ou CXCR4	Clone 12G5 Pharmingén	BD	Corécepteur du VIH-1
CD195 ou CCR5	Clone 2D7/CCR5 Pharmingén	BD	Corécepteur du VIH-1
CD54 ou ICAM-1	Clone HA58 Pharmingén	BD	Intégrine surexprimée par les DC matures. Elle est impliquée dans la <i>trans</i> -infection des lymphocytes T CD4

4. Production de souches virales

La souche de référence VIH-1_{SF162} à tropisme R5 fournie par le NIH (Bethesda, Etats-Unis) a été produite par amplification après infection de PBMC fraîchement isolés à partir de sang de donneurs sains et activés en présence d'IL2 et de PHA. La production virale a été déterminée par quantification de l'antigène p24 par ELISA (ABL et Infinity Biomarkers) dans le surnageant.

5. Prise en charge des particules virales par les MDDC

Les expériences de prise en charge des particules virales VIH-1 par les MDDC ont été réalisées en plaque 96 puits à fond rond. 120 000 cellules par puits ont été traitées en présence de 200ng/mL de LPS, différentes concentrations de TGF- β , de plasma séminal ou de milieux basaux des cellules épithéliales pendant 24h. Les cellules ont ensuite été incubées en présence ou non de 500 μ g/mL de mannan (Sigma-Aldrich), de 10 μ g/mL de l'anticorps Hsn 7D2 bloquant le CD169 (Abcam, Paris) ou de différentes concentrations de plasma séminal pendant 30 min à température ambiante. Après lavage, les cellules sont incubées pendant 2h en présence de virus VIH-1_{SF162} (20 ng/ml de p24). Après cinq lavages, les cellules sont lysées en présence d'un tampon phosphate avec 2,5% de Triton-X-100 (commercial). Après centrifugation, la concentration en p24 des lysats cellulaires est mesurée par ELISA selon les recommandations des fournisseurs (ABL, Rockville, Etats-Unis et Infinity Biomarkers, Lyon, France).

6. Dosage des concentrations en facteurs solubles

Les concentrations de treize molécules ont été mesurées dans les plasmas séminaux. La sécrétion de quatre de ces facteurs a également été dosée au niveau des milieux basaux des cellules épithéliales. Quatre cytokines proinflammatoires ont été dosées : l'IL1 β , l'IL6, l'IL8 et du TNF α . Les chimiokines SDF-1 α et RANTES étant les ligands naturels des corécepteurs principaux du VIH-1, CXCR4 et CCR5 respectivement, leur concentration a été mesurée. Les concentrations en TGF- β 1 et IL7 ont été mesurées puisque ces molécules font partie des cytokines majoritaires du plasma séminal ayant déjà été décrites comme modulatrices de l'infection par le VIH-1 (Introini *et al.*, 2013; Kafka *et al.*, 2012). La lactoferrine et la cathélicidine (LL-37) sont deux peptides antimicrobiens décrits comme

capables d'influencer le phénotype des DC et notamment d'induire leur maturation (Ogawa *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2008). De la même façon, il a été montré qu'HMGB1 et la TSLP influencent le comportement des cellules dendritiques, raison pour laquelle leur concentration a été dosée (Fontenot *et al.*, 2009; Gougeon *et al.*, 2012). Enfin, la concentration en CCL20 a été dosée car cette chimiokine, jouant un rôle dans l'attraction des DC au niveau de la muqueuse, a déjà fait l'objet d'études au sein du laboratoire permettant ainsi d'avoir un élément de référence (Berlier *et al.*, 2006a; Lourenço *et al.*, 2014).

Le dosage de la lactoferrine a été réalisé par ELISA sandwich. Des anticorps polyclonaux produits chez la chèvre reconnaissant la lactoferrine humaine ont été utilisés comme anticorps de capture alors que des anticorps monoclonaux (clone LF.2B8 ou anciennement LF-10) ont été utilisés comme anticorps de détection (AbD Serotec, Raleigh, Etats-Unis). Des anticorps polyclonaux anti-immunoglobuline de souris couplés à l'HRP (Horseradish peroxidase) produits chez le lapin (Dako, Les Ulis, France) ont été utilisés comme anticorps secondaires. Le TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine dans un tampon légèrement acide, SurModics, Eden Prairie, Etats-Unis) a été utilisé comme substrat de l'enzyme HRP.

Les dosages d'HMGB1 (IBL International, Hambourg, Allemagne), CCL20 (RayBiotech Inc, Norcross, Etats-Unis) et LL-37 (Hycult biotech, Uden, Pays-bas) ont été réalisés par ELISA à l'aide de kits commerciaux.

L'acquisition et l'analyse des tests ELISA ont été effectuées sur le lecteur d'absorbance polyvalent Sunrise pour plaques à 96 puits (TECAN, Männedorf, Suisse) à l'aide du logiciel Magellan™.

Les concentrations des autres cytokines et chimiokines ont été mesurées grâce à la technologie Luminex™. Les dosages à partir de kits commerciaux ont été réalisés selon les recommandations des fournisseurs (Bio-Plex Pro™ TGF- β , Bio-Plex Pro™ Human Cytokines Group I, Bio-Plex Pro™ Human Cytokines Group II, Biorad, Marnes-la-Coquette ; MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel II, Millipore, Molsheim). L'acquisition et l'analyse des tests multiplex ont été effectuées sur le Bioplex 200™ (Luminex®, BioRad) à l'aide du logiciel Bioplex Manager 6.0.

7. Analyse protéique par western blot

Deux millions de MDDC ont été traitées pendant 24h en présence de LPS, d'IL1- β , de TNF- α , de TGF- β 1 ou de plasma séminal. Après lavage puis lyse, les échantillons ont été congelés à -20°C. La quantité totale de protéines par échantillon a été mesurée par un dosage de Bradford et 10mg de chaque échantillon ont été chargés sur un gel (10% Bis-Tris, Technologies, Saint Aubin, France). Après

migration (1h à 140V), transfert (1h à 40V) sur membrane de nitrocellulose (ECL, Hybond; GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) puis blocage dans un tampon PBS contenant 5% de lait en poudre et 0,05% Tween 20, une incubation d'1h30 à température ambiante en présence des anticorps primaires anti-CD169 (7D2, 1 :500, Abcam) et anti-actine AC-40 (1 :1000, Dako) humains a été réalisée. Après lavage, la membrane a été incubée pendant 1h30 en présence de l'anticorps secondaire polyclonal couplé HRP (1 :1000, Dako). Les bandes ont été visualisées en présence d'un substrat (Sigma-Aldrich) grâce au système ChemiDocXRS et au logiciel Quantity One (Biorad).

8. Statistiques

Les analyses statistiques, test t de student ou ANOVA suivi d'un test post-hoc (correction de Bonferroni) ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism Version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, Etats-Unis).

Résultats expérimentaux

1. Influence directe du plasma séminal sur les cellules dendritiques

A. Contexte

La transmission sexuelle du VIH-1 constitue le mode majeur de contamination à travers le monde. Au cours d'un rapport sexuel avec un homme séropositif vis à vis du VIH-1, le virus transporté par le sperme est déposé à la surface des muqueuses sous forme de virus libre ou de virus associé aux cellules mononuclées du sperme. Les particules virales peuvent alors être captées par les DC intra ou sous-muqueuses qui transportent le virus jusqu'aux lymphocytes T CD4 des ganglions lymphatiques favorisant ainsi la dissémination du virus. Lors de ce mécanisme, les DC peuvent être en contact avec le plasma séminal, fraction acellulaire du sperme, du fait de la présence de brèches au sein de la muqueuse ou bien, en l'absence de brèches, par exposition de leurs dendrites, extensions se prolongeant jusqu'à la lumière de la muqueuse (Norvell *et al.*, 1984; Rescigno *et al.*, 2001). Plusieurs études décrivent déjà une influence du plasma séminal sur le comportement des DC. Remes Lenicov *et al.* (2012) ont montré, par exemple, que le plasma séminal induit la différenciation des DC en cellules tolérogènes. Ces cellules expriment alors fortement le CD14 mais pas le CD1a, sécrètent peu de cytokines inflammatoires (comme l'IL12p70, l'IL1- β , le TNF- α ou encore l'IL6) mais sécrètent de grande quantité d'IL10 et de TGF- β . Ce processus de différenciation serait propice à la fécondation mais pourrait également favoriser l'établissement d'infections sexuellement transmissibles. Le plasma séminal, contient par ailleurs, des ligands du DC-SIGN tels que la mucine 6 ou la clusterine qui interfèrent avec la capture des particules virales VIH-1 (Sabatte *et al.*, 2007; Stax *et al.*, 2009). S'il semble donc que le plasma séminal ne soit pas qu'un simple vecteur pour les particules virales, son rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1 et en particulier son effet facilitant ou inhibiteur reste débattu. De plus, son mécanisme d'action sur les DC demeure mal connu. Cette première partie de thèse s'intéresse donc à l'influence du plasma séminal sur le phénotype des DC ainsi que sur leur capacité à prendre en charge les particules virales VIH-1.

B. Résultats préliminaires

a. Toxicité du plasma séminal

De précédentes études mettent en évidence le caractère cytotoxique du plasma séminal sur les lymphocytes T CD4, les monocytes et les DC lorsque le temps d'exposition est prolongé (Allen and Roberts, 1986; Remes Lenicov *et al.*, 2012; Stax *et al.*, 2009). Afin de déterminer la cytotoxicité du plasma séminal dans nos conditions de culture, les MDDC ont été incubées 24h en présence de

différentes concentrations d'un pool de plasmas séminaux de patients séronégatifs vis-à-vis du VIH-1. La mortalité cellulaire a ensuite été analysée par cytométrie en flux suite à un marquage à l'IP.

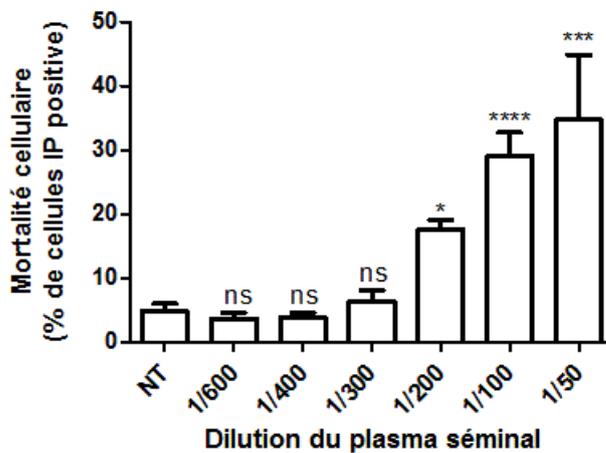


Figure 23 : Cytotoxicité du plasma séminal. Les MDDC ont été incubées pendant 24h en présence d'un pool de plasma séminal dilué au 1/50^{ème}, 1/100^{ème}, 1/200^{ème}, 1/300^{ème}, 1/400^{ème} ou 1/600^{ème}. La mortalité cellulaire est mesurée par cytométrie en flux suite à un marquage à l'IP. Ces données sont représentatives de cinq expériences indépendantes réalisées avec des MDDC de donneurs différents. Les moyennes et les écarts-types (σ) à la moyenne sont représentés * $p < 0,05$ *** $p = 0,0001$ **** $p < 0,0001$. NT : Non traitées

Les résultats présentés dans la Figure 23 indiquent que le plasma séminal dilué au 1/300^{ème} n'est plus cytotoxique. Cette dilution étant importante, nous avons décomposé l'étude en nous intéressant dans un premier temps à l'effet de constituants du plasma séminal. Afin de déterminer les molécules d'intérêt à tester, des plasmas séminaux individuels ainsi que des pools ont été analysés pour leur contenu en cytokines et chimiokines.

b. Composition des plasmas séminaux

Les concentrations de treize molécules ont été dosées. Les concentrations en IL1 β , IL6, IL7, IL8, RANTES, TNF α , lactoferrine et SDF-1 α ont été évaluées dans 21 plasmas séminaux d'hommes VIH⁻ et 19 d'hommes VIH⁺ARV⁺. Les concentrations en TGF- β 1, TSLP, CCL20 et HMGB1 ont été mesurées dans 8 de ces plasmas séminaux VIH⁻ et 8 VIH⁺ ARV⁺. Enfin, la concentration en LL-37 a été mesurée pour 19 plasmas séminaux VIH⁻ et 11 plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺. Les pools VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ ont également été analysés.

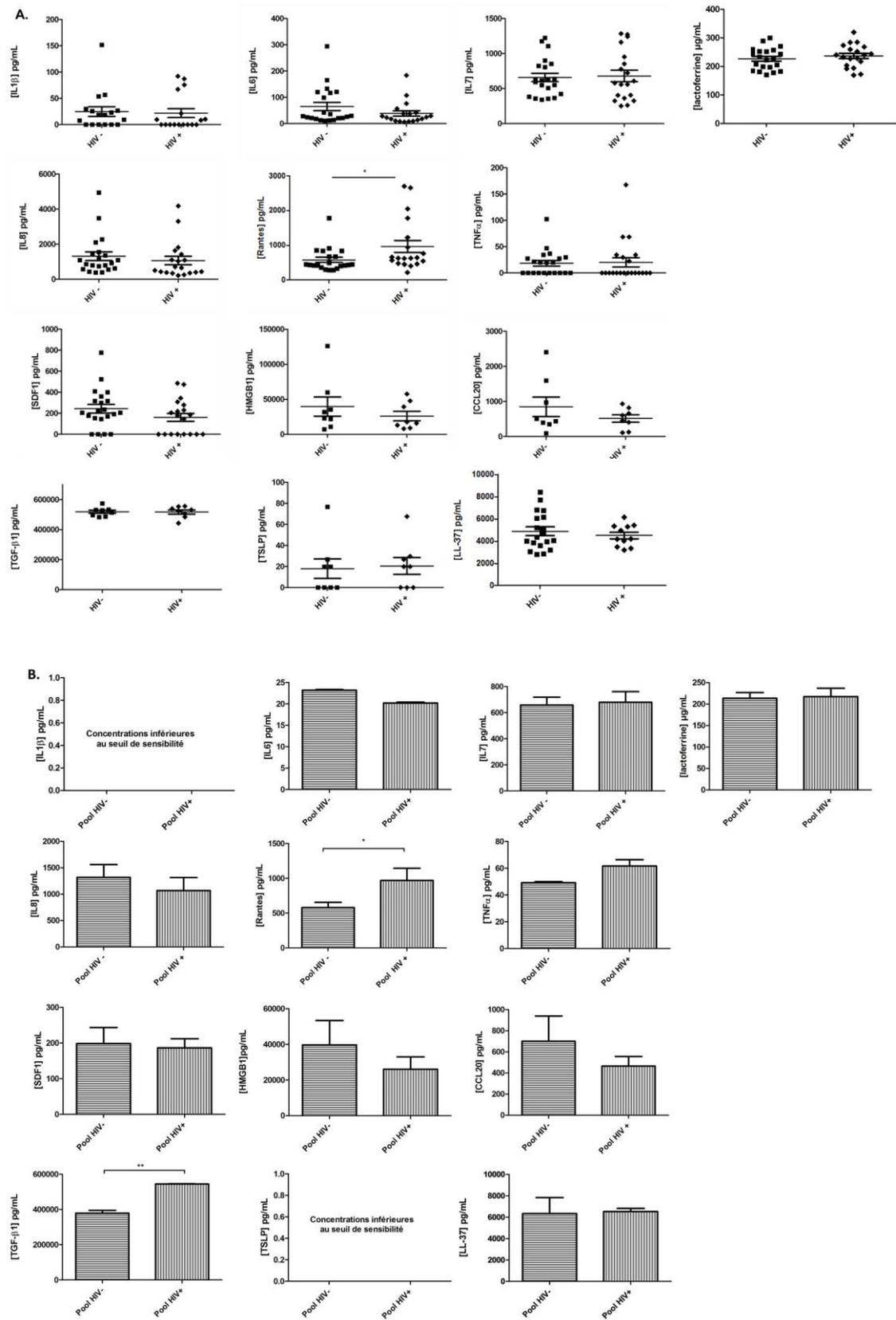


Figure 24 : Criblage des plasmas séminaux. Les concentrations en cytokines et chimiokines ont été mesurées par luminex ou ELISA et sont indiquées en pg/mL à l'exception de celle de la lactoferrine qui est présentée en µg/mL. A et B. Présentation des concentrations par cytokines pour les plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ individuels (A) et les pools (B). *p<0,05, **p<0,01. Les moyennes±σ sont indiquées sur les graphes.

Les résultats présentés dans la Figure 24 indiquent que les plasmas séminaux individuels contiennent tous de l'IL6, de l'IL7, de l'IL8, du RANTES, de la lactoferrine, du LL-37, du TGF- β 1, du HMGB1 et du CCL20 alors que l'IL1 β , le TNF- α , le SDF-1 α et la TSLP ne sont pas systématiquement détectés. La lactoferrine est la molécule présente en plus forte concentration dans nos échantillons avec une moyenne de 227 \pm 8 μ g/mL dans les plasmas séminaux VIH⁻ et de 237 \pm 9 μ g/mL pour les VIH⁺ ARV⁺. Le TGF- β 1 est également présent à de fortes concentrations avec en moyenne 518 \pm 11 ng/mL dans les plasmas séminaux VIH⁻ et 517 \pm 13 ng/mL pour les VIH⁺ ARV⁺. La concentration en LL-37 est en moyenne de 4,9 \pm 0,4ng/mL dans les plasmas séminaux VIH⁻ et de 4,5 \pm 0,3 ng/mL dans les VIH⁺ ARV⁺. Pour HMGB1, la concentration moyenne dans les plasmas séminaux VIH⁻ s'élève à 39,7 \pm 14 ng/mL alors qu'elle est de 26,1 \pm 7ng/mL pour les VIH⁺ ARV⁺. L'IL6, l'IL7, l'IL8 et le CCL20 sont présents à des concentrations moyennes respectives de 65,2 \pm 16 ; 659 \pm 4,9; 1317,7 \pm 244 et 845,6 \pm 277 pg/mL dans les plasmas séminaux VIH⁻ et de 39 \pm 10 ; 679,5 \pm 82 ; 1070 \pm 244 et 515,7 \pm 106 pg/mL dans les VIH⁺ ARV⁺. La TSLP ainsi que les cytokines inflammatoires IL1 β et TNF- α sont présentes en faibles concentrations et de façon dépendante des individus. La concentration en SDF-1 α semble également dépendante des individus. Elle varie entre 0 et 777,4 pg/mL avec une moyenne de 243,5 \pm 41 pg/mL pour les plasmas VIH⁻ et entre 0 et 486,2 avec une moyenne de 160 \pm 38 pg/mL pour les VIH⁺ ARV⁺.

Seule la concentration de RANTES varie significativement en fonction du statut virologique avec une concentration plus importante dans les plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺ (970 \pm 174 pg/mL) que dans les plasmas séminaux VIH⁻ (579,2 \pm 75pg/mL, $p < 0,05$).

La composition des pools de plasma séminaux reflètent assez bien la composition des plasmas séminaux individuels. Les concentrations moyennes en HMGB1, IL7, IL8, RANTES, CCL20, SDF-1, LL-37 et en lactoferrine des pools sont semblables à celles calculées à partir des mesures individuelles des différents plasmas séminaux. La différence de concentration de RANTES en fonction du statut est également observée avec les pools. Les concentrations en IL1 β et TSLP ne sont pas détectables dans les pools, ce qui n'est pas surprenant puisque ces molécules ne sont pas systématiquement détectées dans des plasmas séminaux individuels. Toutefois, les concentrations en IL6, TNF- α et TGF- β 1 diffèrent. L'IL6 est détectée à des concentrations moyennes de 22,9 \pm 0,5 et 19,92 \pm 0,5 pg/mL dans les pools VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ qui sont plus faibles que les moyennes des plasmas séminaux individuels. A l'inverse, pour le TNF- α , les concentrations détectées dans les pools sont plus élevées que celles des plasmas séminaux individuels (49,15 \pm 0,8 et 61,69 \pm 4,7 pg/mL pour les VIH⁻ et les VIH⁺ ARV⁺ respectivement). Pour le TGF- β 1, la concentration dans le pool VIH⁻ (379,2 \pm 16 ng/mL) est plus faible que la moyenne calculée pour les plasmas individuels. De ce fait, il existe une différence significative entre la concentration en TGF- β 1 des pools VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺, ce qui n'était pas observé avec les

plasmas séminaux individuels. Dans l'ensemble, ces mesures indiquent tout de même que la composition des pools reflète bien la composition moyenne de plasmas séminaux individuels.

Les résultats obtenus lors de ce criblage indiquent que la lactoferrine, le TGF- β 1, HMGB1, et le LL-37 sont les molécules présentes aux concentrations les plus importantes parmi les treize testées. Leur effet sur les DC a donc été étudié.

c. Effets de composés du plasma séminal sur le phénotype des MDDC

Afin d'évaluer l'impact du TGF- β 1, d'HMGB1, de la lactoferrine et du LL-37 sur les cellules dendritiques, des MDDC ont été incubées pendant 24h en présence de protéines commerciales (recombinantes ou purifiées) et leur phénotype a été analysé par cytométrie en flux. Un cocktail de cytokines proinflammatoires (IL1 β +TNF α) a été utilisé comme témoin d'induction de la maturation des DC (Colić *et al.*, 2004). Le LPS a également été utilisé comme témoin de (i) l'induction de la maturation des DC (mimant ainsi une coinfection bactérienne) et (ii) de l'expression de CD169 (lectine de type C capable de capter le VIH-1) (Izquierdo-Useros *et al.*, 2012b). Le phénotype des MDDC a été analysé de façon à étudier une variation d'expression de récepteurs, corécepteurs et lectines capables de capter le VIH-1 (DC-SIGN, CD169, CD206, CD4, CXCR4 et CCR5) et l'induction de la maturation (HLA-II). Le CD54 a également été mesuré. L'expression de cette intégrine est augmentée lors de la maturation des DC. Par ailleurs, elle joue un rôle primordial dans la trans-infection des lymphocytes T CD4 par les DC. Les protéines recombinantes (HMGB1, LL-37 et TGF- β 1) ou purifiées (lactoferrine humaine purifiée à partir de lait) ont été testées à une concentration choisie en fonction des résultats du criblage à l'exception de LL-37 qui a été testé pour deux concentrations. En effet, les valeurs trouvées dans la littérature étant très différentes de nos résultats de criblage, deux concentrations ont été évaluées : 50 μ g/mL et 5ng/mL. Pour le TGF- β 1, la concentration moyenne de nos plasmas séminaux est de 500ng/mL. Cependant la technique luminex utilisée ne permet pas de distinguer la proforme de la forme active. D'après la littérature, cette dernière représente 25 % de la concentration totale. Nous avons donc testé une concentration de 100ng/mL.

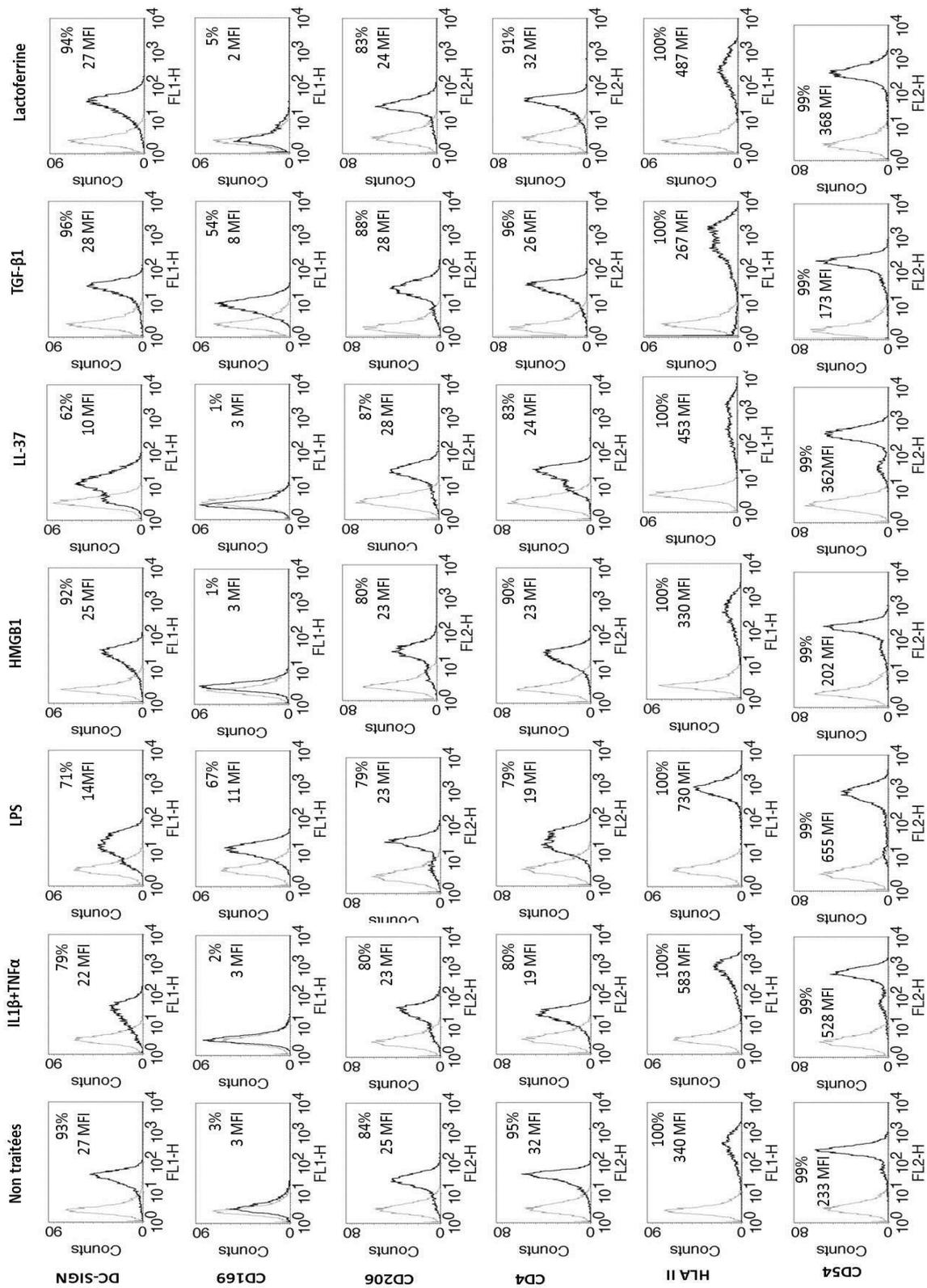


Figure 25 : Caractérisation phénotypique des MDDC après stimulation par différentes molécules. Les MDDC ont été incubées pendant 24h en présence d'IL1β et de TNF-α (100 et 50 ng/mL respectivement), de LPS (200 ng/mL), d'HMGB1 (30 ng/mL), de LL-37 (50 µg/mL), de TGF-β1 (100 ng/mL) ou de lactoferrine (100 µg/mL). Des analyses de cytométrie ont été réalisées pour mesurer l'expression de DC-SIGN, CD169, CD206, CD4, HLA II et CD54 à la surface des MDDC. La courbe grise représente l'isotype contrôle alors que la courbe noire représente le marquage par l'anticorps spécifique. Ces données issues d'une expérience réalisée à partir de MDDC d'un seul donneur sont représentatives de trois expériences réalisées avec des donneurs différents.

Les résultats présentés sur la Figure 25 montrent que les cytokines proinflammatoires et le LPS induisent une maturation des MDDC qui se caractérise par une forte augmentation de l'expression du HLA de classe II et de CD54. Ces stimulations provoquent également une diminution de l'expression de DC-SIGN et de CD4 déjà décrite dans la littérature (Bakri *et al.*, 2001; Fairman and Angel, 2012; Izquierdo-Useros *et al.*, 2007). L'expression de CD169 est fortement induite par le LPS alors qu'elle n'est pas modulée par les cytokines inflammatoires. Les résultats concernant CXCR4 et CCR5 ne sont pas indiqués dans la figure, l'expression de ces récepteurs étant faible et non modulée par les traitements.

L'incubation des MDDC en présence de LL-37 ou de lactoferrine provoque la maturation des DC comme cela a déjà été montré (Ogawa *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2008). Le traitement par la lactoferrine ne semble pas affecter l'expression des autres marqueurs. Le LL-37 diminue l'expression de DC-SIGN en accord avec les résultats d'Ogawa *et al.* (2013). En revanche, contrairement aux résultats de cette équipe, les nôtres suggèrent que le LL-37 diminue l'expression de CD4. Seuls les résultats obtenus avec la plus forte concentration apparaissent dans la Figure 25. Les résultats obtenus avec 5ng/mL sont similaires. De plus faibles augmentations de l'expression de CD54 et du HLA-II sont observées. De la même façon, l'expression de DC-SIGN est une nouvelle fois diminuée mais de façon plus modeste. Aucune variation de l'expression de CD206 et de CD4 n'est observée. HMGB1 et le TGF- β 1 ne provoquent pas la maturation des DC. L'incubation en présence d'HMGB1 ne semble pas modifier le phénotype des MDDC. En revanche, le TGF- β 1 induit une forte augmentation de l'expression du CD169 qui n'est observée pour aucun autre traitement à l'exception du LPS.

L'augmentation de l'expression de CD169 par le TGF- β 1 n'ayant jamais été décrit dans la littérature, des expériences complémentaires ont été réalisées.

C. Effet du TGF- β 1 sur l'expression de CD169 par les MDDC (Article 1)

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans AIDS en juillet 2014. Il s'intéresse à l'effet du TGF- β 1 sur le phénotype des MDDC. Afin de confirmer l'augmentation de l'expression de CD169 induite par le TGF- β 1, les MDDC ont été incubées en présence de différentes concentrations de cette cytokine. L'expression de CD169 a ensuite été analysée par cytométrie en flux et par western blot. Ces expériences confirment que l'incubation des MDDC en présence de TGF- β 1 induit une augmentation de l'expression de CD169 sans provoquer la maturation des MDDC. Par ailleurs, cet effet est spécifique de CD169 puisqu'il n'est pas observé pour les autres membres de la famille des Siglecs ou d'autres CLR. La surexpression de CD169 est due à la synthèse *de novo* de la molécule et est corrélée avec la concentration de cytokine utilisée. Le CD169 étant une lectine capable de fixer le VIH-1, la capacité des MDDC à capter les particules virales suite à une incubation en présence de

TGF- β 1 a été étudiée. Les résultats montrent qu'effectivement un traitement au TGF- β 1 provoque une augmentation de la capture des particules virales par les MDDC. La modification du phénotype des MDDC s'accompagne donc d'une modification fonctionnelle. Le TGF- β 1 étant la cytokine majoritaire du sperme, ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans la transmission sexuelle du HIV-1.

Article 1

Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission

Amélie De Saint Jean, Frédéric Lucht, Thomas Bourlet and Olivier Delézay

AIDS 2014, 28 :2375-2380

Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission

Amélie De Saint Jean, Frédéric Lucht, Thomas Bourlet and Olivier Delézay

Objective: Recent data describe CD169 (also called sialoadhesin or Siglec-1) as the main HIV-1 receptor expressed by mucosal dendritic cells involved in the capture of the virus and its transmission to target cells. In this study, we investigated the effect of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), a cytokine found in abundance in semen, on the expression of CD169 on dendritic cells in order to characterize its potential role in the capture of HIV-1 particles by these antigen-presenting cells.

Methods: Monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) were cultured in the presence of lipopolysaccharide, pro-inflammatory cytokines [interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor alpha (TNF- α)] or different concentrations of TGF- β 1, and analyzed for maturation marker and Siglec expression. The ability of MDDCs to capture HIV particles following the different treatments was also analyzed.

Results: TGF- β 1 treatment promotes a significant increase of CD169 expression on MDDCs. This effect was specific since neither DC-SIGN nor other Siglec expressions were changed. The CD169 increase was due to a de-novo synthesis as evidenced by Western blot experiment. This up-regulation was well correlated to the concentration of TGF- β 1 and associated with an increase of the MDDC ability to bind HIV particles. Interestingly, this phenomenon was independent of the maturation status of MDDCs.

Conclusion: This study demonstrates that the most abundant cytokine present in semen (TGF- β 1) is able to enhance specifically the expression of an important molecule (CD169) involved in the capture and transmission of HIV-1 particles from the mucosal lumen to the submucosal compartment. Our results suggest that this mechanism may play a relevant role in sexual HIV transmission.

© 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2014, **28**:2375–2380

Keywords: CD169, dendritic cells, HIV-1, semen, TGF- β 1

Introduction

Dendritic cells are known to play an important role in HIV sexual transmission process, acting as ‘Trojan horses’,

able to capture HIV-1 particles from mucosa lumen and transmit them to permissive target cells in the submucosa compartments such as lymph nodes [1,2]. The semen is not only a vehicle for free or cell-associated HIV particles,

GIMAP, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Saint Etienne, France.
Correspondence to Olivier Delézay, GIMAP, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 42023 Saint-Etienne, Cedex 02, France.
E-mail: delezay@univ-st-etienne.fr
Received: 19 June 2014; revised: 28 July 2014; accepted: 31 July 2014.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000431

ISSN 0269-9370 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

2375

but also contains factors modulating HIV infectiousness and epithelial crossing mechanism [3,4]. Its action can be direct on HIV particles [5,6] or indirect through the recruitment of target cells and activation of cytokine secretions by epithelial cells [7–9]. However, little is known about the potential role of seminal fluid on antigen-presenting cells present at the mucosal level. Such interactions may notably influence dendritic cell behavior and their role in HIV sexual contamination. The recent characterization of CD169, also called sialoadhesin or Siglec-1, as a very efficient HIV-1-binding receptor expressed on dendritic cell [10] prompts us to analyze its expression on monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) and its modulation by the most abundant cytokine present in semen, that is, the transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) [3,11–13].

Methods

Primary cell cultures

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from buffy coats of healthy donors by density gradient centrifugation over a lymphocyte separation medium (Eurobio; Abcys, Courtaboeuf France). Monocytes expressing CD14 were purified from fresh PBMCs by positive immunoselection with magnetic beads (Miltenyi Biotec, Paris France). MDDCs were generated from monocytes cultured in the presence of 100 ng/ml of interleukin (IL)-4 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Miltenyi Biotec) for 6 days in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with 10% fetal bovine serum. MDDCs were stimulated for 24 h with 100 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS) (InvivoGen, Toulouse France), or 100 ng/ml of IL-1 β and 50 ng/ml of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Preprotech, Neuilly-Sur-Seine France) or different concentrations of TGF- β 1 (Shenandoah Biotechnology Inc., Warwick Pennsylvania, USA).

Virus stock

The SF162 HIV-1 laboratory strain (R5, subtype B) was obtained from the National Institutes of Health (NIH) AIDS Reagent Program, Germantown, Maryland, USA) and amplified in phytohemagglutinin (PHA)-activated PBMCs.

FACS analysis

Monocyte-derived dendritic cells were incubated with various fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies and isotype-matched negative controls at 4°C for 20 min. The following monoclonal antibodies were used: anti-human CD169, antihuman Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) (Miltenyi Biotec), antihuman Siglec 5/14, 7, 9 and 10 (R&D Systems, Lille France),

antihuman HLA-DP-DQ-DR, antihuman CD83, antihuman CD86 (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Propidium iodide (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) was used at 10 μ g/ml in order to evaluate cellular viability. Samples were analyzed on a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur apparatus (Becton-Dickinson) using CellQuest Pro software.

Detection of CD169 using Western blotting

Batches of 2×10^6 MDDCs were stimulated with LPS, IL-1 β and TNF- α or TGF- β 1, washed with phosphate-buffered saline and lysed before freezing. Cells lysates were quantified for protein contents and 10 μ g of each sample were loaded into a 10% Bis-Tris gel (Life Technologies, Saint Aubin, France). Proteins were fractionated in reducing conditions by electrophoresis for 1 h at 140 V, electroblotted for 1 h at 40 V onto a nitrocellulose membrane (ECL, Hybond; GE Healthcare, Velizy-Villacoublay France). The membrane was probed with antihuman CD169 7D2 (1:500; Abcam, Paris, France), anti-Actin AC-40 and secondary horseradish peroxidase-labeled polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (1:1000; Dako, Les Ulis, France). Bands were visualized by using a chemiluminescent peroxidase substrate (Sigma-Aldrich) on a ChemiDoc XRS system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette France).

HIV-1 capture assays

Batches of 1.2×10^5 MDDCs, preincubated with LPS, IL-1 β and TNF- α or TGF- β 1 were treated or not with 10 μ g/ml of antihuman CD169 7D2 (Abcam) or with 500 μ g/ml of mannan from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich) for 30 min before being washed and incubated with SF162 HIV-1 strain (20 ng/ml of HIV p24 antigen) for 2 h. Cells were extensively washed and lysed in disruption buffer (Advanced BioScience Laboratories, Inc., Rockville Maryland, USA). After centrifugation, p24 concentrations were quantified in supernatants by ELISA (Advanced BioScience Laboratories, Inc.).

Statistical analysis

Statistical analyses to determine significance were tested with *t* test. A *P* value less than 0.05 was considered as indicative of statistical significance. All statistical calculations were performed by using Prism Version 5.04 Software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results

Analysis of the expression of CD169 on monocyte-derived dendritic cells under various stimulations

As shown on Fig. 1a, the CD169 expression on MDDCs is weak, but is enhanced on LPS-matured cells (6%

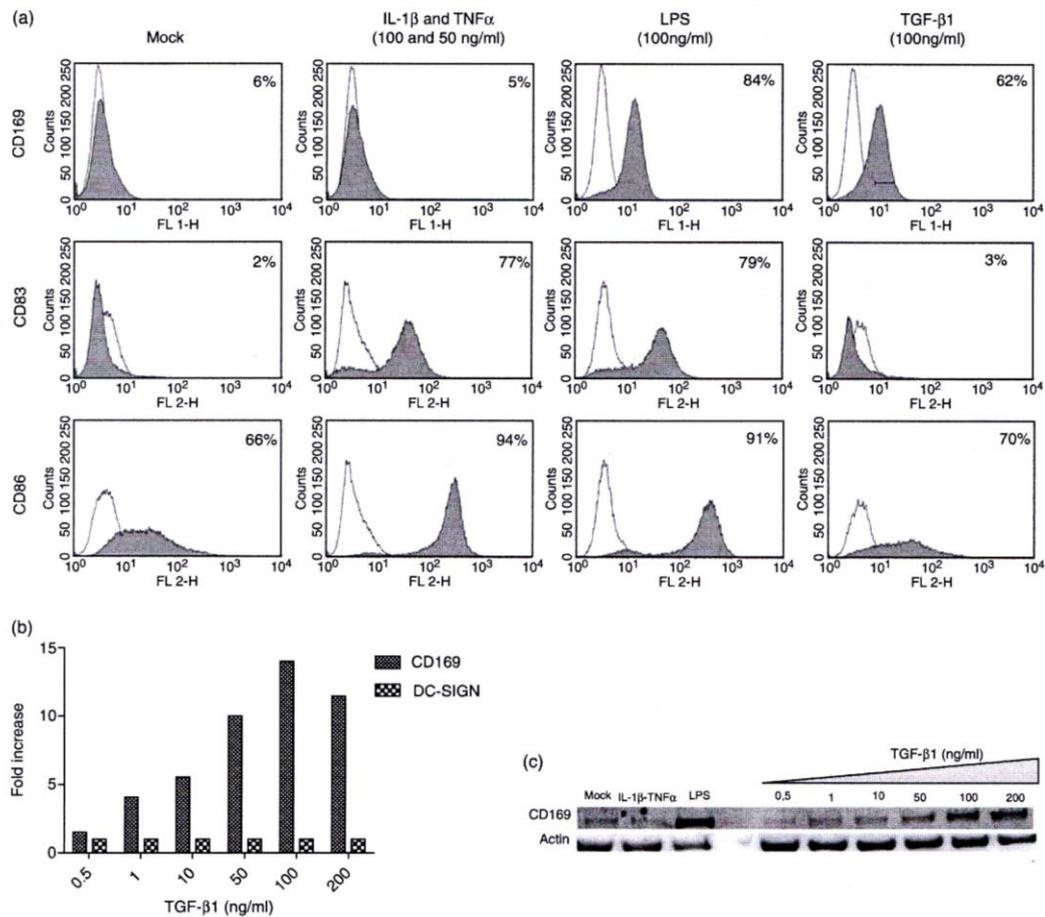


Fig. 1. Transforming growth factor beta 1 increases expression of CD169 on monocyte-derived dendritic cells. Monocyte-derived dendritic cells were cultured for 24 h in the presence of LPS, IL-1 β and TNF- α or different concentrations of TGF- β 1. (a, b) Flow cytometry experiments were done to analyze cell surface expression of CD169, DC-SIGN, CD83 and CD86. (a) Shaded curves show specific antibody binding; unshaded curves show isotype control immunoglobulin staining. Values are percentages of CD169, CD83 and CD86 expression. Data are representative of 14 independent experiments performed with different donors. (b) Fold increase expression of CD169 and DC-SIGN on MDDCs treated by various concentrations of TGF- β 1 compared to untreated cells. Data are representative of four independent experiments performed with different donors. (c) Western blot was used to evaluate CD169 expression for each condition by using 7D2 monoclonal antibody. Actin detection was used as a control. MDDC, monocyte-derived dendritic cell; TGF- β 1, transforming growth factor beta 1; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

compared to 84% for untreated and LPS-treated cells, respectively). On the contrary, IL-1 β and TNF- α are unable to mimic this effect on the MDDCs, indicating that the expression of CD169 is not dependent on the MDDC maturation status since in both cases, the expression of maturation markers (CD83 and CD86) is increased. TGF- β 1 treatment results in a significant increase of CD169 on MDDCs (62% of the cells compared to 6% obtained with untreated cells), but do not promote a significant change for CD83 or CD86 expression.

To confirm the effect of TGF- β 1 on CD169 expression, the MDDCs were treated for 24 h with different concentrations of the cytokine (0.5–200 ng/ml) and were analyzed for CD169 expression. The expressions of DC-SIGN, Siglec-5/14, 7, 9 and 10 were also measured by flow cytometry. Figure 1b shows that the expression of CD169 is correlated to the amount of TGF- β 1 added in the medium. CD169 expression was increased four-fold in the presence of 1 ng/ml of TGF- β 1. This value reached 14-fold after 100 ng/ml of TGF- β 1 treatment. In the same condition, DC-SIGN expression was not

modified. This increase was reproducible for each MDDC preparation independently of the basal expression of CD169 on MDDC surface. This effect is specific for CD169 since Siglec-5/14, 7, 9 and 10 (data not shown) are not significantly changed by TGF- β 1 treatment, whatever the concentration used.

The expression of CD169 was then analyzed by Western blotting assay (Fig. 1c) to confirm the effect of TGF- β 1. The specific band of 182 kDa was detected in all conditions (untreated or 24 h cytokine-treated cells), confirming the constitutive expression of the protein. However, the intensity of the band was significantly enhanced after LPS treatment and increased by TGF- β 1 in a dose-dependent manner. By contrast, IL-1 β + TNF- α stimulation was not associated with a detectable up-regulation of the protein expression, confirming our previous results.

Taken together, our first experiments demonstrated that CD169 expression on dendritic cells could be enhanced by TGF- β 1 independently of their maturation status.

Effect of transforming growth factor beta 1 on the monocyte-derived dendritic cell capacity to capture HIV particles

Lipopolysaccharide treatment of MDDCs was associated with an increasing ability of the cells to capture SF162 HIV particles compared to untreated cells. The capacity of MDDCs to capture HIV particles was well correlated with increasing concentrations of TGF- β 1. The treatment of MDDCs with 10 ng/ml of TGF- β 1 was sufficient to significantly enhance their ability to capture HIV particles ($P < 0.05$). This effect remains statistically significant with a concentration up to 200 ng/ml of TGF- β 1 (Fig. 2a). At this highest concentration tested, the HIV-1 capture was increased by 30% compared to untreated cells.

The specificity of the interaction between Siglec-1 and HIV was evaluated by using the anti-CD169 neutralizing antibody 7D2. In parallel, mannan was used in order to inhibit HIV-DC-SIGN interaction on MDDCs. As shown in Fig. 2b, the 7D2 antibody, as well as mannan, was able to reduce the capture of HIV by untreated MDDCs (27 and 21% of HIV-binding inhibition, respectively). LPS treatment, used as a positive control for the stimulation of CD169 expression, was associated with a large increase of HIV binding on MDDCs that could be totally inhibited by 7D2 antibody. The mannan was a less efficient inhibitor of HIV-binding. As previously demonstrated, TGF- β 1 treatment was associated with an increase in HIV-binding capacity of MDDCs. This increase of HIV-binding could be totally reversed by the use of the 7D2 antibody and more slightly by mannan treatment as for LPS. Mannan inhibited HIV binding for approximately 20% in each condition

confirming that LPS or TGF- β 1 do not modulate DC-SIGN expression.

Discussion

Considering that sexual contact can generate mucosal abrasion [14], HIV particles can directly influence monolayer epithelial permeability [15], and dendritic cells can interact directly with the mucosal lumen by inter-digitating dendrites [2,16], it seems reasonable to postulate that dendritic cells could be in close contact to semen compounds such as cytokines. This could be reinforced by the fact that we have previously demonstrated that seminal plasma was able to attract CCR6-positive dendritic cells at the contact site between epithelium and semen through the stimulation of CCL20 secretion by epithelial cells [9].

The CD169 molecule has been characterized on the immune cell surface and is involved in the capture and transmission of HIV particles [10,17–20]. Since semen contains large amounts of TGF- β 1 [3,11–13], we hypothesize that this cytokine could modulate HIV epithelial crossing. In this study, our results demonstrate, for the first time, that TGF- β 1 treatment of MDDCs enhanced the expression of CD169, leading to an increase of HIV attachment on the cell surface. This increase of CD169 appears to be due to a de-novo synthesis as suggested by the western blot results. This effect is clearly correlated with the amount of TGF- β 1 used close to the concentration found in semen [11]. The ability of MDDCs to bind HIV-1 particles was correlated with the level of CD169 expression at the surface of the cells, as well as the amount of TGF- β 1 used for cell stimulation. The use of the neutralizing anti-CD169 antibody reinforces the involvement of this molecule in the HIV capture process by dendritic cells that seems to be more potent than DC-SIGN, as previously suggested by Izquierdo-Useros *et al.* [10]. The specificity of this phenomenon was evidenced by the use of irrelevant antibodies, which were unable to inhibit CD169-HIV-1 interaction. It is interesting to note that the expression of CD169 does not depend on the maturation status of the MDDCs: the treatment of the cells with pro-inflammatory molecules (IL-1 β and TNF- α) that strongly stimulate dendritic cell maturation (up-regulation of CD83 and CD86 expression) was unable to mimic the increase of CD169 generated by LPS or TGF- β 1 treatment. In addition, the effect of TGF- β 1 is specific for CD169 since the expressions of other Siglec molecules are not significantly modified by this treatment.

All these data are in favor of an important role of the major semen cytokine TGF- β 1 in the HIV-1 capture mechanisms by dendritic cells. However, semen is a very complex fluid composed by a lot of active compounds that could interfere with this specific effect of TGF- β 1 on

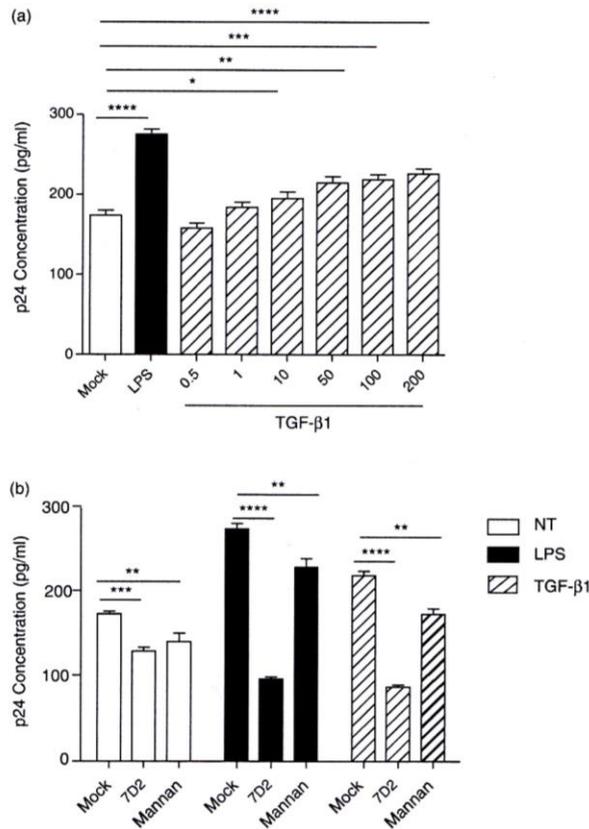


Fig. 2. Transforming growth factor beta 1 increases HIV-1 capture by monocyte-derived dendritic cells in a CD169-dependent manner. (a) Cells were cultured for 24 h in presence of 100 ng/ml of LPS, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml or 100 ng/ml of TGF-β1 and then incubated for 2 h with HIV-1 SF162. The amounts of captured viral particles were quantified by p24 ELISA. (b) Similar capture assays were done in the absence or presence of CD169 monoclonal 7D2-neutralizing antibody or mannan. LPS, lipopolysaccharide; MDDC, monocyte-derived dendritic cell; TGF-β1, transforming growth factor beta 1; TNF-α, tumor necrosis factor alpha. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.0002, *****P* < 0.0001.

CD169 expression. A better characterization of the involvement of semen cytokines in HIV transmission will be helpful for the development of new antiviral strategies.

Acknowledgements

The study is financially supported by a grant from SIDACTION.

A.D.S.J. is a recipient of a grant provided by the region Rhône-Alpes (ARC 1 santé). We thank Blandine Noailly for expert technical assistant in virus production, Marius Dorkenoo for advices in statistical analysis and EFS Auvergne-Loire for providing us buffy coats.

Author contribution: A.D.S.J. and O.D. conceived the experiments. A.D.S.J. performed experiments. O.D. and A.D.S.J. wrote the paper. T.B. and F.L. corrected the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Coleman CM, Gelais CS, Wu L. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 2013; 762:109–130.

2. Shen R, Richter HE, Smith PD. **Interactions between HIV-1 and mucosal cells in the female reproductive tract.** *Am J Reprod Immunol* 2014; **71**:608–617.
3. Doncel GF, Anderson S, Zalenskaya I. **Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment: implications for HIV transmission.** *Am J Reprod Immunol* 2014; **71**:564–574.
4. Southern PJ. **Missing out on the biology of heterosexual HIV-1 transmission.** *Trends Microbiol* 2013; **21**:245–252.
5. Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, et al. **Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection.** *Cell* 2007; **131**:1059–1071.
6. Bouhhal H, Chomont N, Haeflner-Cavaillon N, Kazatchkine MD, Belec L, Hocini H. **Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells.** *J Immunol Baltim Md* 2002; **169**:3301–3306.
7. Chen JC, Johnson BA, Erikson DW, Piltonen TT, Barragan F, Chu S, et al. **Seminal plasma induces global transcriptomic changes associated with cell migration, proliferation and viability in endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts.** *Hum Reprod (Oxf Engl)* 2014; **29**:1255–1270.
8. Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. **Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus.** *J Immunol Baltim Md* 1950 2012; **188**:2445–2454.
9. Berlier W, Cremel M, Hamzeh H, Lévy R, Lucht F, Bourlet T, et al. **Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV.** *Hum Reprod* 2006; **21**:1135–1142.
10. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Puertas MC, Rodriguez-Plata MT, Zangger N, Erikson E, et al. **Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides.** *PLoS Biol* 2012; **10**:e1001448.
11. Robertson SA, Ingman WV, O'Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. **Transforming growth factor β -a mediator of immune deviation in seminal plasma.** *J Reprod Immunol* 2002; **57**:109–128.
12. Loras B, Vétélé F, Malki AE, Rollet J, Soufir J-C, Benahmed M. **Seminal transforming growth factor- β in normal and infertile men.** *Hum Reprod* 1999; **14**:1534–1539.
13. Robertson SA. **Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract.** *Cell Tissue Res* 2005; **322**:43–52.
14. Norvell MK, Benrubi GI, Thompson RJ. **Investigation of micro-trauma after sexual intercourse.** *J Reprod Med* 1984; **29**:269–271.
15. Nazli A, Chan O, Dobson-Belair WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. **Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation.** *PLoS Pathog* 2010; **6**:doi: 10.1371/journal.ppat.1000852.
16. Wu L, KewalRamani VN. **Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination.** *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:859–868.
17. Puryear WB, Akiyama H, Geer SD, Ramirez NP, Yu X, Reinhard BM, et al. **Interferon-inducible mechanism of dendritic cell-mediated HIV-1 dissemination is dependent on Siglec-1/CD169.** *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003291.
18. Rempel H, Calosing C, Sun B, Pulliam L. **Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity.** *PLoS One* 2008; **3**:e1967.
19. Van der Kuyl AC, van den Burg R, Zorgdrager F, Groot F, Berkhout B, Cornelissen M. **Sialoadhesin (CD169) expression in CD14+ cells is upregulated early after HIV-1 infection and increases during disease progression.** *PLoS One* 2007; **2**:doi: 10.1371/journal.pone.0000257.
20. Zou Z, Chastain A, Moir S, Ford J, Trandem K, Martinelli E, et al. **Siglecs facilitate HIV-1 infection of macrophages through adhesion with viral sialic acids.** *PLoS One* 2011; **6**:e24559.

D. Effet du plasma séminal sur l'expression de CD169 (Article 2)

Ce travail fait l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* en septembre 2015. Le TGF- β 1, cytokine majeure du plasma séminal, est donc capable de moduler la prise en charge des particules virales par les MDDC en augmentant l'expression de CD169. Cependant, le plasma séminal est un fluide biologique complexe contenant de nombreux facteurs immunomodulateurs. Il est donc envisageable que certains autres facteurs puissent amplifier cet effet ou au contraire l'inhiber. Afin de répondre à cette question, les MDDC ont été incubées en présence de plasma séminal (dilué au 1/300 afin d'éviter la cytotoxicité). De façon surprenante, le plasma séminal n'augmente pas la capture des particules virales par les MDDC. Il semblerait même que cette capture ait tendance à être diminuée. D'un point de vue phénotypique, le traitement des MDDC par du plasma séminal ne module pas l'expression de CD169. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : soit la concentration en TGF- β 1 est insuffisante pour avoir un effet (trop forte dilution ou cytokine présente sous sa proforme biologiquement inactive), soit il existe un mécanisme inhibiteur prévenant la synthèse de CD169 ou son adressage à la membrane plasmique. Malgré l'utilisation de plus fortes concentrations de plasma séminal sur des temps d'incubation plus court (2h de contact, lavage puis réalisation de la cytométrie après 24h d'incubation) ou de traitements (enzymatiques ou chimiques) dans le but d'activer le TGF- β 1, aucune modulation de l'expression de CD169 n'a été observée. L'incubation des MDDC en présence de plasma séminal et simultanément de LPS ou de TGF- β 1 montre que le plasma séminal est capable, contre toute attente, de limiter l'augmentation de l'expression de CD169. De courtes incubations des MDDC exprimant le CD169 avec du plasma séminal prouvent que le CD169 n'est pas simplement masqué par des protéines capables de se lier au récepteur comme c'est le cas pour le DC-SIGN mais que le plasma séminal inhibe véritablement la synthèse de CD169.

Article 2

Seminal Plasma inhibits the induction of CD169 expression on dendritic cell surface by LPS and TGF- β 1: implication in HIV-1 sexual transmission.

Amélie De Saint Jean, Marion Mouly, Jean-Philippe Klein, Michèle Cottier, Frédéric Lucht, Thomas Bourlet, Olivier Delézay

Seminal Plasma inhibits the induction of CD169 expression on dendritic cell surface by LPS and TGF- β 1: implication in HIV-1 sexual transmission.

Abstract word count: 181; Main Word Count: 3082; Figures: 5

Amélie De Saint Jean^a, Marion Mouly^a, Jean-Philippe Klein^b, Michèle Cottier^b, Frédéric Lucht^a, Thomas Bourlet^{a, c}, Olivier Delézay^{a1}

^aGIMAP Research Unit, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Campus Santé Innovations, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Université Jean Monnet, COMUE de Lyon, Saint-Etienne, France;

^bLINA, Laboratoire Interdisciplinaire d'étude des Nanoparticules Aérosolisées (EA 4624), Campus Santé Innovations, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Université Jean Monnet, COMUE de Lyon, Saint-Etienne, France ;

^cService des Agents Infectieux et Hygiène, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

¹Corresponding author: Mailing address: GIMAP, Campus Santé Innovations, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 10 rue de la Marandière, 42270 St Priest en Jarez ; France. E-mail: olivier.delezay@univst-etienne.fr

Conflicts of Interest and Source of Funding : The authors declare no conflict of interest.

This work is financially supported by a grant from SIDACTION.

A.D.S.J is a recipient of a grant provided by the region Rhône-Alpes (ARC 1 santé).

Abstract:

Background: Mucosal dendritic cells are involved in the sexual transmission of HIV-1 as they are able to capture viral particles and to transmit those to CD4 T cells. The capture and transmission could be assured by CD169 that is expressed by activated dendritic cells.

Design and Methods: We investigated the effect of seminal plasmas from VIH positive and negative men on dendritic cells phenotype and on their ability to capture VIH particles in order to analyse the role of this fluid in the contamination process.

Results: We found that seminal plasma does not increase HIV-1 particles capture by monocyte derived dendritic cells (MDDC). Flow cytometry experiments revealed that seminal plasma induced a slight maturation of MDDC, masked DC-SIGN and was unable to enhance CD169 expression despite its high TGF- β 1 content. Furthermore, the up-regulation of CD169 induced by TGF- β 1 or LPS treatment was counteracted by seminal plasma.

Conclusions: Seminal plasma may display a “protective effect” against HIV-1 capture and transmission through CD169 by limiting its expression at the dendritic cell surface, in particular in the presence of LPS associated to bacterial co-infection.

Key Words: HIV-1, Dendritic Cells, CD169, Siglec-1, Semen.

Introduction

Sexual contacts remain the main mode of HIV-1 transmission worldwide. Numerous mechanisms have been described in order to explain the crossing of HIV-1 through the female genital mucosa. Among them, the involvement of dendritic cells in HIV-1 capture, transport and transmission to T cells in the lymph nodes appears to be the most relevant in the absence of breaches¹. Several receptors could mediate HIV-1 capture on dendritic cells surface. It is the case for DC-SIGN that has been first described as the HIV-1 receptor involved in this process^{2,3}. However, CD169 (also known as Siglec-1 or sialoadhesin) has been characterized recently as the main HIV-1 capture molecule that is expressed by LPS-matured dendritic cells⁴. Other molecules such as IFN α and TGF- β 1 also induce CD169 expression by MDDC^{5,6}. This receptor interacts with HIV-1 membrane glycolipid (GM3) and actively participates in the trans-infection of T lymphocytes^{4,5,7,8}. We and other have previously demonstrated the correlation between CD169 expression on dendritic cells and their ability to bind HIV-1 particles^{4,6}. In addition to its involvement in efficient HIV-1 capture, CD169 could also favor the establishment of HIV-1 infection by protecting virions from neutralizing antibodies⁹. All these data argue in favor of a major role of this molecule in the HIV-1 contamination/dissemination process.

Following unprotected sexual intercourse, dendritic cells may be in contact with seminal plasma, the acellular fraction of semen, through breaches or exposition of their dendrites that reach the mucosal lumen. It has already been described that seminal plasma may influence HIV-1 transmission^{10,11}. However, whether seminal plasma is an enhancer or an inhibitor of HIV-1 transmission is still a matter of debate. It has been demonstrated that seminal plasma promotes recruitment of HIV-1 target cells, and notably of Langerhans cells, favoring thus HIV-1 transmission¹²⁻¹⁴. On the contrary, seminal plasma can inhibit HIV-1 transmission as it contains components that interfere with the capture of the viral particles by DC-SIGN^{15,16}.

In a previous study, we reported that TGF- β 1 treatment promoted a significant increase of CD169 expression associated with an increase ability of MDDC to bind HIV-1 particles⁶. As seminal plasma is rich in TGF- β 1, we investigated whether this fluid was able to modulate HIV-1 capture by MDDC through the induction of CD169 expression.

Results

Seminal plasma does not increase HIV-1 capture through CD169

Results presented in Fig. 1(a) show that untreated cells were able to capture HIV-1 particles (100.6 ± 3.3 pg.mL⁻¹ of p24 detected by ELISA). As expected, LPS treatment significantly increased the HIV-1 capture by MDDC to 128.1 ± 5.9 pg.mL⁻¹ of p24 ($p < 0.01$). On the contrary, the treatment of MDDC with pools of seminal plasmas, whatever the HIV-1 status, did not increase significantly the capture of HIV-1 particles by MDDC. A slight decrease, but not statistically significant, was even observed when compared to untreated MDDC. This tendency was confirmed with the use of individual seminal plasmas on MDDC from other donors. All individual seminal plasmas decreased the capture of HIV-1 particle by MDDC whatever the virological status of the donors. This effect was, nevertheless, statistically significant for only two seminal plasmas of each group (Fig. 1(b) and (c)). It should be noted that the level of HIV-1 attachment on immature dendritic cells is donor dependent, probably due to variable basal expression of the diverse HIV-1 receptors such as DC-SIGN, CD4, CD206 and CD169. In the Fig. 1 (d), the use of the CD169 neutralizing antibody 7D2 allowed us to confirm the absence of CD169 involvement in the capture of HIV-1 particles by untreated or seminal plasmas treated MDDC.

These results are not in agreement with the hypothesis that seminal TGF- β 1 could promote CD169 expression. As no enhancement of HIV-1 capture by MDDC was observed following seminal plasma treatment, we performed FACS experiments to evaluate the CD169 expression at their surface.

Seminal plasma does not induce CD169 expression by MDDC

The Fig. 2 (a) and (b) clearly demonstrated that individual and pooled seminal plasmas were unable to modulate CD169 expression. Seminal plasmas decreased the detection of DC-SIGN probably because it contains components able to bind DC-SIGN competing thus with antibody recognition^{15,16}. Seminal plasmas promoted a slight MDDC maturation as evidenced by the increase of HLA-II expression. Western blotting assay (data not shown) confirmed that seminal plasma did not induce CD169 expression. We wondered then, whether the absence of seminal plasma effect may be due to the lack of TGF- β 1 activity as a major part of this cytokine is in a latent form. We thus incubated MDDC with seminal plasmas previously treated in acid conditions or in presence of plasmin in order to activate latent TGF β 1 as described by Lyons *et al* (1988)¹⁷. We then performed a western blotting assay. However, none of these treatments led to an induction of CD169 expression

by MDDC (Fig. 2 (c)). Similar results were obtained using FACS experiments (data not shown). The “non-induction” of CD169 expression on MDDC by seminal plasmas may finally be attributed to the important dilution done to avoid the cytotoxicity leading to a too low concentration of TGF- β 1 present in samples. To clarify this point, other experiments were done, using higher concentrations of seminal plasmas (from 1:160 to 1:10) but for a shorter time of incubation (2h). Cells were washed and after 24h, analyzed for viability and CD169 expression. CD169 expression remained unchanged whatever the condition except for LPS treatment. No cytotoxicity was observed in these experiments (data not shown).

Seminal plasma counteracts CD169 up-regulation induced by LPS and TGF- β 1

Finally, the absence of effect of seminal plasma despite its high concentration in TGF- β 1 suggests the presence of factors able to block cell stimulation or mechanisms that prevent CD169 synthesis.

To verify this hypothesis, MDDC were treated with LPS or TGF- β 1 in the absence or presence of seminal plasma diluted 1:300. The expression of CD169, DC-SIGN and HLA-II was measured by FACS. The results clearly indicate that seminal plasma decreased the effect of LPS on CD169 expression as 54% of LPS treated cells were CD169 positive against 13% in the presence of seminal plasma (Fig. 3(a)). In the same way, seminal plasma decreased the effect of TGF- β 1 as 30% of TGF- β 1 treated cells were CD169 positive against 15% when seminal plasma was added simultaneously to TGF- β 1. These results, obtained with pooled seminal plasmas were identical to those performed with individual seminal plasmas (data not shown) To check whether this decrease was due to the binding of seminal plasma components that may impair immunostaining or to a regulation of CD169 expression, CD169 positive MDDC (24 h LPS treated cells) were briefly incubated (30 min) with seminal plasma just before FACS experiments. Results shown in Fig. 3 (b) demonstrated that CD169 detection was not altered by the presence of seminal plasma. In contrast, the decreases of DC-SIGN detection previously observed in Fig. 2 (a), Fig. 2 (b) and Fig. 3 (a) following seminal plasma treatment were obviously due to the presence of molecules that bind DC-SIGN and mask the receptor. HLA-II detection was not modified by the 30 min exposure to seminal plasma. HIV-1 capture assays performed with immature MDDC (CD169 negative) and LPS-matured MDDC (CD169 positive) briefly incubated with seminal plasma (Fig. 3 (c)) were in agreement with FACS experiments since seminal plasma was able to block HIV-1 capture by immature MDDC without affecting the capture by LPS-matured one. Such results confirm that seminal plasma inhibits the capture of HIV-1 by DC-SIGN without interfering with HIV-1 binding to CD169.

Seminal plasma competes with LPS to bind on TLR4 at the MDDC surface

Since seminal plasma appears to counteract LPS-induced CD169 up-regulation, we investigated whether it can interfere with LPS binding on its signaling receptor TLR4.

FACS experiments presented in Fig. 4 (a) revealed that individual or pooled VIH⁻ seminal plasmas as well as LPS were able to decrease TLR4 detection. The expression of TLR4 was detected on 18% of untreated cells compared to 6% for LPS or seminal plasma (individual or pooled) treated cells (see table in Fig. 4 (b)). Incubation of MDDC in presence of LPS and the pooled VIH⁻ seminal plasmas (1:300) simultaneously revealed a cumulative effect since the detection of TLR4 was only conserved on 3% of the cell population. Results presented in Fig. 4(c) clearly indicate that the seminal plasma effect on TLR4 detection was dose-dependent. As expected and previously described, DC-SIGN detection was also affected in a dose-dependent manner whereas HLA-II detection was stable and even slightly enhanced by seminal plasma treatment.

Similar results were obtained when MDDC were incubated with seminal plasma for only 30 minutes before FACS experiments indicating that the decrease of TLR4 detection after seminal plasma treatment was due to TLR4 epitope masking rather than modulating of the receptor synthesis (data not shown).

The ability of seminal plasma to counteract LPS-induced CD169 up-regulation at the MDDC cell surface was further investigated by incubating cells with increasing LPS concentrations in the presence or not of a unique seminal plasma concentration (1:300). Expressions of CD169 and HLA-II were measured by FACS. As demonstrated in Fig. 5(a) seminal plasma was able to greatly diminish CD169 up-regulation induced by 0,2 ng.mL⁻¹ of LPS and remained efficient even for the highest LPS concentration (200 ng.mL⁻¹). The analysis of HLA-II expression confirmed the specificity of this effect as seminal plasma did not significantly interfere with dendritic cell maturation induced by LPS (Fig. 5(b)).

All these data argue in favor of a “protective effect” of the seminal plasma HIV-1 capture by dendritic cells through CD169.

Discussion

In the case of HIV-1 sexual transmission, numerous data indicate that semen is not only a vehicle for viral particles (free or cell-associated) but rather represents an important factor modulating the different steps leading to HIV-1 epithelial crossing and dissemination¹⁰. Since this fluid contains large amount of TGF- β 1, we postulated that it could influence HIV-1 capture by dendritic cells through the increase of CD169 expression. However, the results presented here are not in agreement with this hypothesis, since none of the seminal plasmas tested were able to enhance HIV-1 capture. Phenotypic analyses of seminal plasma-treated MDDC revealed that CD169 was unchanged. The decrease of DC-SIGN detection on MDDC treated with seminal plasmas could explain the lower level of HIV-1 transmission compared to untreated cells as already described^{15,16}. The absence of seminal plasma effect on CD169 expression could be attributed to the lack of biological activity of latent seminal TGF- β 1 or the use of too diluted seminal plasma on dendritic cells. However, neither activation of latent TGF- β 1 nor the use of higher seminal plasma concentrations had any effect on CD169 expression. As the seminal plasma contains a large array of proteins, the presence of an interfering agent should not be excluded. The decrease of LPS and TGF- β 1 effects on CD169 expression observed in presence of seminal plasma argues in favor of such hypothesis. Furthermore, the detection of TLR4 on the cell surface was greatly diminished following MDDC incubation with seminal plasma (individual or pooled) for 30min or 24h, suggesting that one (or more) seminal compound(s) compete with LPS binding on this receptor. The diminution of TLR4 detection was dose-dependent and was observed even with low dose of seminal plasma (diluted 1: 30 000). In agreement with these results, seminal plasma diluted 1:300 simultaneously added with increasing concentrations of LPS was able to diminish the induction of CD169 expression without interfering with the induction of MDDC maturation. This point may be critical in the case of sexual HIV-1 transmission as bacterial co-infections are frequently detected and are known to favor the contamination.

Thus, in addition to its capacity to inhibit HIV-1 capture through DC-SIGN, seminal plasma appears to be also able to prevent the expression of CD169 that is also involved in viral particles capture and transmission.

In line with our results, a recent study demonstrates the activation of TLR4 signaling by endogenous components of seminal fluid in mice¹⁸. This article shows that exposure to seminal fluid at coitus decreased TLR4 expression, suggesting a possible negative feedback after ligation of TLR4 by seminal fluid constituents.

We did not identify the seminal component(s) that bind(s) to the TLR4. Considering the composition of seminal plasma, several proteins may play this role such as β -defensins, fibronectin, angiotensin II...¹⁸⁻²⁵.

In addition to this competitive binding on TLR4 that is a mechanism that occurs at the cellular level, we cannot exclude the existence of other mechanisms that may explain the seminal plasma ability to inhibit CD169 expression after LPS stimulation. Mechanisms at the protein level may also arise such as complex formation between LPS and seminal plasma components. For example, lactoferrin present in large amount in semen has been described to bind to LPS blocking thus the activation pathway through TLR4²⁶.

Concerning TGF- β 1, the mechanism by which seminal plasma inhibits CD169 up-regulation by this cytokine remains unknown. However, we could hypothesize that some seminal plasma compounds may also bind to TGF- β 1 receptor. Besides, lactoferrin has been recently described as able to bind to the type III TGF- β receptor (β -glycan or T β RIII).²⁷.

Finally, despite its high concentration in TGF- β 1, seminal plasma does not increase CD169 expression on MDDC cell surface. On the contrary, seminal plasma diminishes the expression of this molecule induced by LPS treatment suggesting that this fluid may have a “protective effect” against HIV-1 capture and transmission. Furthermore, as seminal plasma does not interfere with the dendritic cell maturation, initiation of immune response may not be altered by this mechanism. Our results provide new data concerning the involvement of semen in HIV-1 transmission, demonstrating its potential “protective role” in HIV-1 particles capture by dendritic cells.

Methods

Primary Cell Cultures

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from buffy coats of healthy donors by density gradient centrifugation over a lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). Monocytes expressing CD14 were purified from fresh PBMCs by positive immunoselection with magnetic beads (Miltenyi Biotec, Paris, France).

MDDC were generated from monocytes cultured in presence of 100 ng.mL⁻¹ of interleukin-4 (IL-4) and granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Miltenyi Biotec) for 6 days in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum. MDDC were stimulated for 24h with 200 ng.mL⁻¹ of lipopolysaccharide (LPS) (InvivogGen, Toulouse, France), 100 ng.mL⁻¹ of TGF-β1 (Preprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) and/or dilution of seminal plasmas. When seminal plasma was diluted from 1:160 to 1:10, MDDC were incubated for 2h with seminal plasma, washed and then cultured for 24h. Activation of TGF-β1 was achieved by acidification of the seminal plasmas with HCl 1N until pH reached 2. After 1h incubation at room temperature, NaOH 1N was added to neutralize the sample. Activation of TGF-β1 was also achieved following sample treatment by 1U.mL⁻¹ of plasmin for 2h at 37°C.

Virus Stock

The SF162 HIV-1 laboratory strain (R5, subtype B) was obtained from the National Institutes of Health (NIH, Bethesda, USA) and amplified on PHA-activated PBMCs.

Seminal plasma samples

Semen samples were collected from chronically HIV-1 infected patients under-going a program of highly active antiretroviral therapy (HAART) and from VIH⁻ patients attempting medically assisted conception, after they gave their fully informed written consent. (CHU Hôpital Nord, Saint-Etienne, France). Samples were tested for the presence/absence of other infectious diseases and for endotoxin content. Only LPS-free samples were used.

Sperms were obtained by masturbation into a sterile container and processed within 4 h after ejaculation. After being diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS), seminal plasma was separated from the cell fraction by centrifugation (800 g, 30 min) and stored at -80°C until use.

FACS Analysis

Live MDDC were incubated with the different fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies and isotype-matched negative controls at 4°C for 20 min. The following monoclonal antibodies were

used: anti-human CD169, anti-human DC-SIGN, anti-human HLA-II (Miltenyi Biotec) and anti-human TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne). Propidium iodide (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used at $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ in order to evaluate cellular viability. Samples were analyzed on FACSCalibur platform (Becton-Dickinson) using CellQuest Pro software.

Detection of CD169 using Western Blotting

Batches of 2×10^6 MDDC were stimulated with LPS or seminal plasma, washed with PBS and lysed before freezing. Cells lysates were quantified for protein contents and $10\mu\text{g}$ of each sample were loaded into a 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were fractionated in reducing conditions by electrophoresis for 1 h at 140 V, electroblotted for 1 h at 40V onto a nitrocellulose membrane (ECL, Hybond, GE Healthcare, Piscataway, NJ). The membrane was probed with anti-human CD169 7D2 (1:500; Abcam, Cambridge, UK), anti-Actin AC-40 and secondary horseradish peroxidase-labeled polyclonal rabbit anti-Mouse immunoglobulins (1:1000; Dako, Glostrup, Denmark). Bands were visualized by using a chemiluminescent peroxidase substrate (Sigma-Aldrich) on a ChemiDoc XRS system (Biorad, Carlsbad, CA).

HIV-1 Capture Assays

Batches of 1.2×10^5 MDDCs pre-incubated with LPS (200ng.mL^{-1}) or seminal plasma (1:300) for 24h were treated or not with $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ of anti-human CD169 7D2 (HSn 7D2, Abcam) for 30 minutes before being washed and incubated with SF162 HIV-1 strain (20ng.mL^{-1} of viral p24 Ag) for 2h. Cells were extensively washed and lysed in the disruption buffer. After centrifugation, p24 concentrations in supernatant were quantified by ELISA using a commercial kit (Infinity Biomarkers, Lyon, France).

Statistical Analysis

All data are shown as mean values \pm SEM. All statistical calculations were performed by using Prism Version 5.04 Software (GraphPad). Student paired *t* test was used to determine the significance of differences between treatment groups. Multiple analyses were followed by Bonferroni's multiple-comparison posttest. The *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

We thank Blandine Noailly and Fabienne Jospin for expert technical assistance in virus production and EFS Auvergne-Loire for providing us buffy coats.

Author contribution: A.D.S.J. and O.D. conceived the experiments. A.D.S.J. and M.M performed experiments. O.D. and A.D.S.J. wrote the paper. T.B. corrected the manuscript. J.P.K, M.C. and F.L provide us seminal plasma samples.

References

1. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with VIH: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(11):859-868. doi:10.1038/nri1960.
2. Jin W, Li C, Du T, Hu K, Huang X, Hu Q. DC-SIGN plays a stronger role than DCIR in mediating HIV-1 capture and transfer. *Virology*. 2014;458–459:83-92. doi:10.1016/j.virol.2014.04.016.
3. Geijtenbeek TBH, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a Dendritic Cell–Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell*. 2000;100(5):587597. doi:10.1016/S0092-8674(00)80694-7.
4. Izquierdo-Useros N, Lorzate M, Puertas MC, et al. Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001448. doi:10.1371/journal.pbio.1001448.
5. Puryear WB, Akiyama H, Geer SD, et al. Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003291. doi:10.1371/journal.ppat.1003291.
6. De Saint Jean A, Lucht F, Bourlet T, Delézay O. Transforming growth factor beta 1 upregulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission. *AIDS*. 2014;28(16):2375-2380. doi:10.1097/QAD.0000000000000431.
7. Izquierdo-Useros N, Lorzate M, Contreras F-X, et al. Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1. *PLoS Biol*. 2012;10(4):e1001315. doi:10.1371/journal.pbio.1001315.
8. Puryear WB, Yu X, Ramirez NP, Reinhard BM, Gummuluru S. HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for capture by mature dendritic cells. *PNAS*. April 2012;201201104. doi:10.1073/pnas.1201104109.
9. Akiyama H, Ramirez N-GP, Gudheti MV, Gummuluru S. CD169-Mediated Trafficking of HIV to Plasma Membrane Invaginations in Dendritic Cells Attenuates Efficacy of Antigtg120 Broadly Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004751. doi:10.1371/journal.ppat.1004751.
10. Doncel GF, Joseph T, Thurman AR. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(3):292-301. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00931.x.
11. Sabatté J, Lenicov FR, Cabrini M, et al. The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. *Microbes and Infection*. 2011;13(12–13):977982. doi:10.1016/j.micinf.2011.06.005.
12. Berlier W, Cremel M, Hamzeh H, et al. Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of VIH. *Hum Reprod*. 2006;21(5):1135-1142. doi:10.1093/humrep/dei496.
13. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*. 2005;322(1):43-52. doi:10.1007/s00441-005-1127-3.

14. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(7):491-501. doi:10.1093/molehr/gam028.
15. Sabatte J, Ceballos A, Raiden S, et al. Human Seminal Plasma Abrogates the Capture and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to CD4+ T Cells Mediated by DC-SIGN. *J Virol.* 2007;81(24):13723-13734. doi:10.1128/JVI.01079-07.
16. Stax MJ, van Montfort T, Sprenger RR, et al. Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4+ T lymphocytes. *Virology.* 2009;391(2):203-211. doi:10.1016/j.virol.2009.06.011.
17. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 1988;106(5):1659-1665.
18. Schjenken JE, Glynn DJ, Sharkey DJ, Robertson SA. TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol Reprod.* July 2015:biolreprod.114.125740. doi:10.1095/biolreprod.114.125740.
19. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13(1):24-57.
20. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol.* 2010;87(6):989-999. doi:10.1189/jlb.1209775.
21. Geipel U, Kropf J, Krause W, Gressner AM. The concentration pattern of laminin, hyaluronan, and aminoterminal propeptide of type III procollagen in seminal fluid. *Andrologia.* 1992;24(4):205-211. doi:10.1111/j.1439-0272.1992.tb02638.x.
22. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *Journal of Clinical Investigation.* 1987;80(2):281-285. doi:10.1172/JCI113070.
23. O'Mahony OA, Djahanbakhch O, Mahmood T, Puddefoot JR, Vinson GP. Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod.* 2000;15(6):1345-1349. doi:10.1093/humrep/15.6.1345.
24. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40. doi:10.1186/gb-2006-7-5-r40.
25. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, et al. Hyaluronan fragments generated by spermsecreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. *Development.* 2008;135(11):2001-2011. doi:10.1242/dev.020461.
26. Drago-Serrano ME, de la Garza-Amaya M, Luna JS, Campos-Rodríguez R. Lactoferrinlipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology.* 2012;12(1):1-9. doi:10.1016/j.intimp.2011.11.002.
27. Jang Y-S, Seo G-Y, Lee J-M, et al. Lactoferrin causes IgA and IgG2b isotype switching through betaglycan binding and activation of canonical TGF- β signaling. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):906-917. doi:10.1038/mi.2014.121.

Figures

Fig. 1. Seminal plasma does not increase HIV-1 capture by MDDC.

Cells were cultured for 24h in presence of LPS (200ng.mL⁻¹) or dilutions of seminal plasma (1:300) and then incubated for 2h with HIV-1 SF162. After extensive washes, the amounts of captured viral particles were quantified by p24 ELISA. Experiments were performed using pooled seminal plasmas from VIH⁻ and VIH⁺ donors (a), or four individual seminal plasmas from either VIH⁻ (b) or VIH⁺ (c) donors. (d) Similar capture assays were done in the absence or presence of CD169 monoclonal 7D2 neutralizing antibody. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. All experiments were performed in quadruplicate. MDDC. Monocyte-derived dendritic cells; SP: Seminal Plasma; LPS: Lipopolysaccharide.

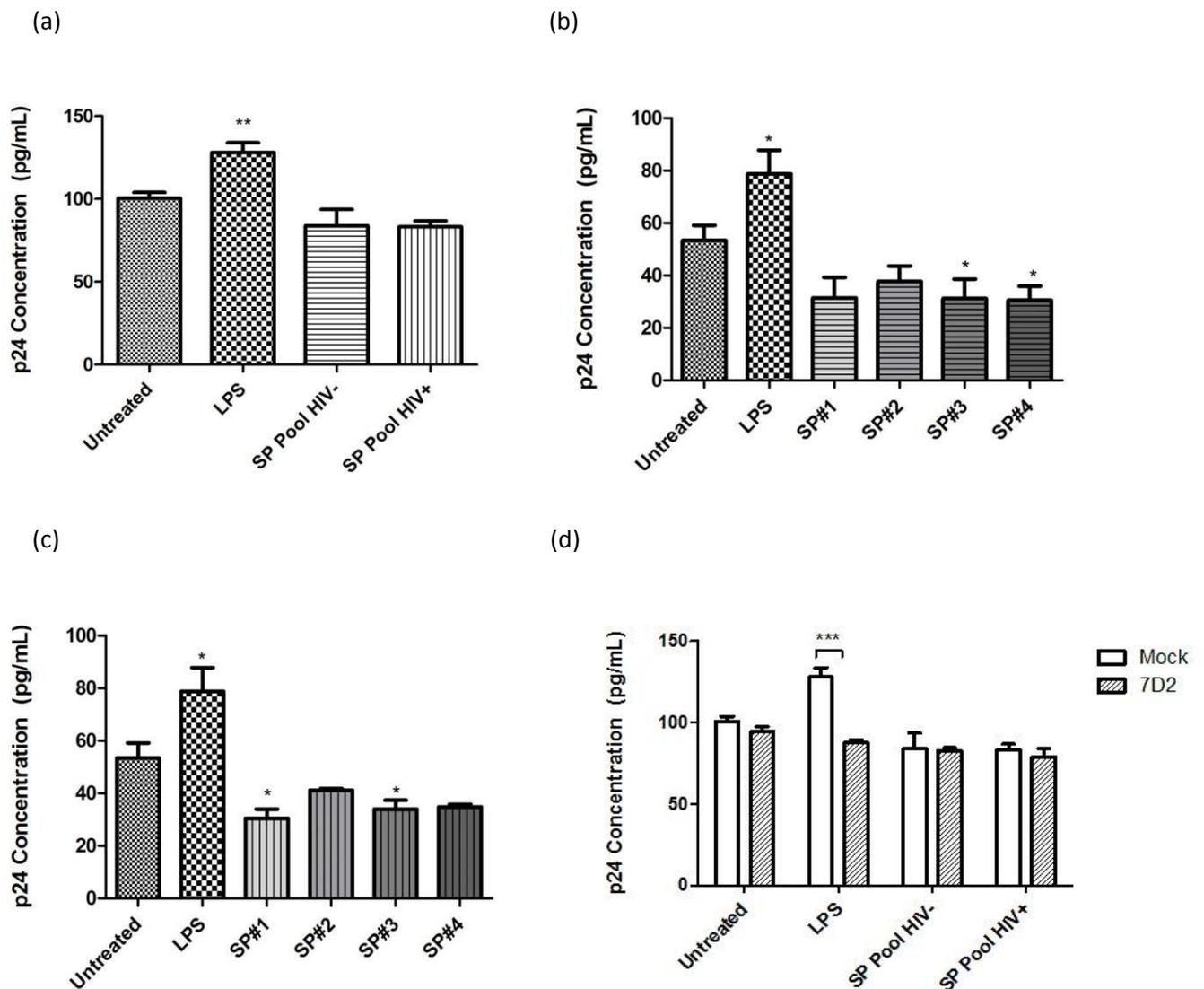
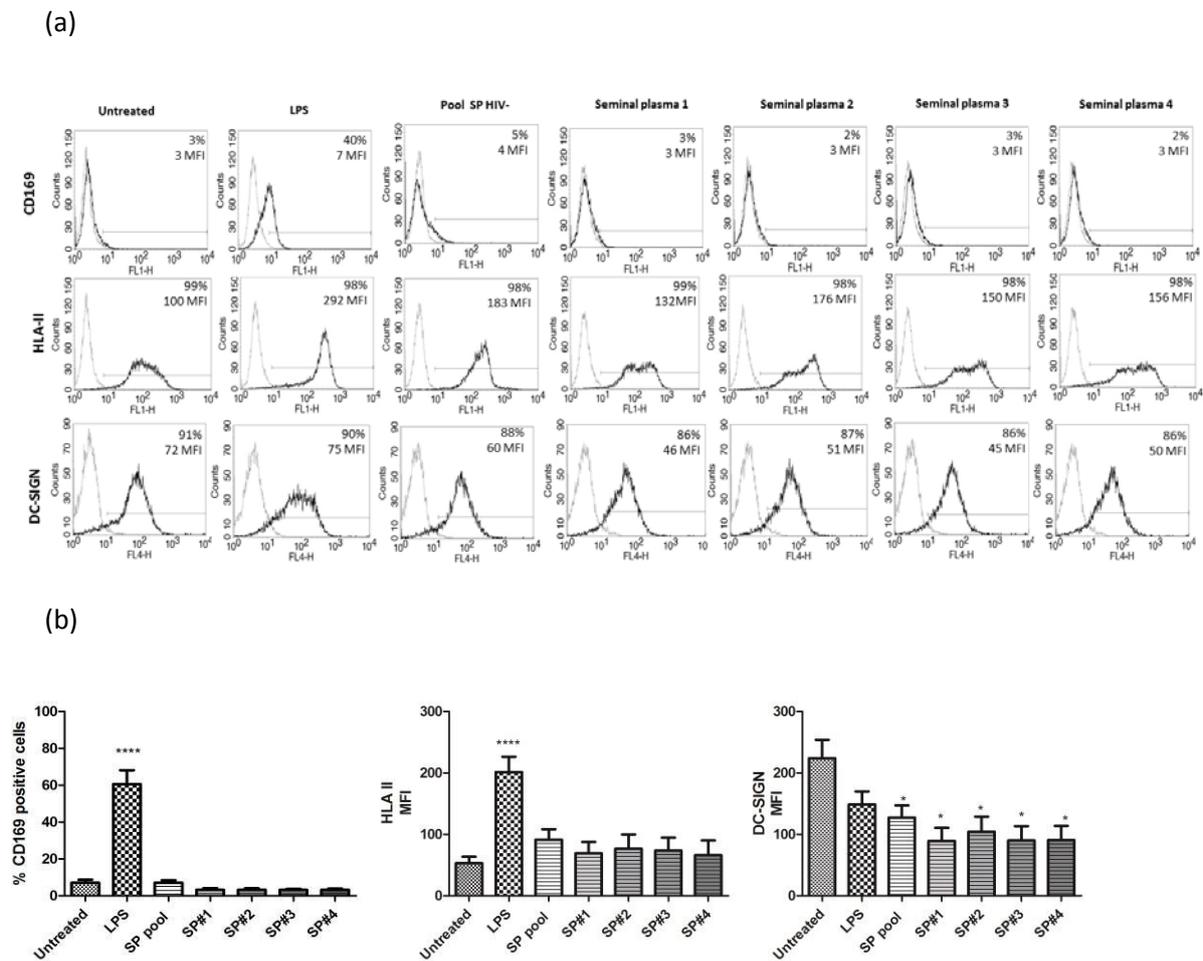


Fig. 2. Seminal plasma does not induce CD169 expression on MDDC.

Cells were cultured for 24h in presence of LPS (200ng.mL⁻¹) or dilutions of seminal plasma (1:300). (a,b) Flow Cytometry experiments were done to analyze cell surface expression of CD169, HLA-II and DC-SIGN. Experiments were performed using pooled seminal plasmas or four individual seminal plasmas from VIH⁻ donors. (a) Black curves show specific antibody binding; grey curves show isotype control Ig staining. The results are representative of four independent experiments. (b) Expression of CD169, DC-SIGN and HLA-II was calculated as percentage of positive cells or mean fluorescence intensity (MFI) of cells stained with specific monoclonal antibodies. Mean \pm SEM from four independent experiments performed with height different donors are shown. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. (c) Western Blot was used to evaluate CD169 expression for each condition by using 7D2 monoclonal antibody. Actin detection was used as a control. MDDC: Monocyte-derived dendritic cells; SP: Seminal Plasma; LPS: Lipopolysaccharide.



(c)

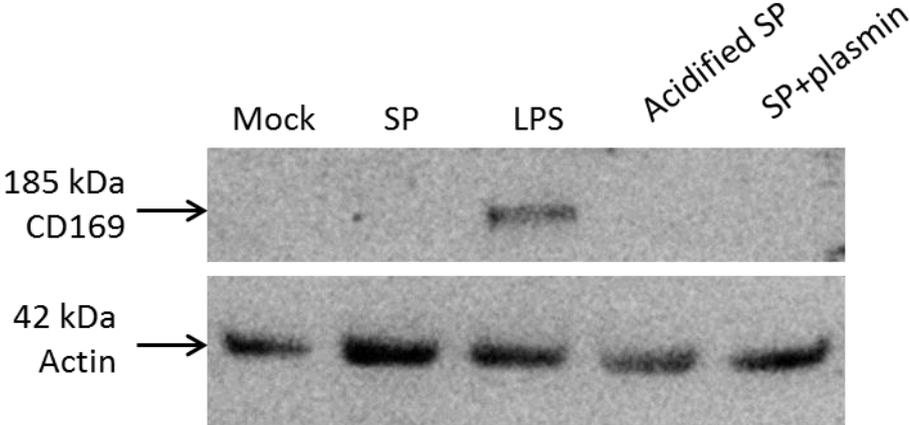
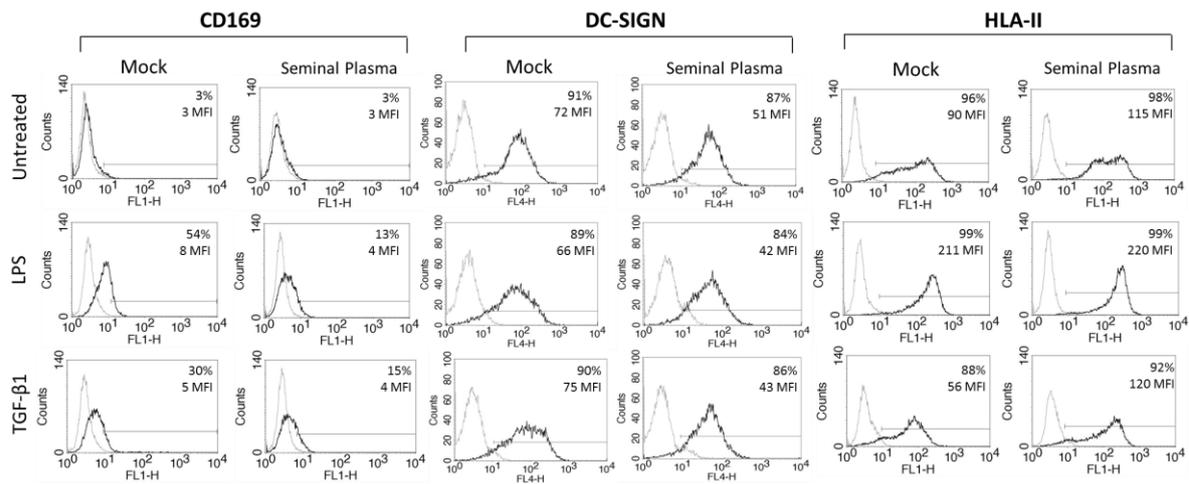


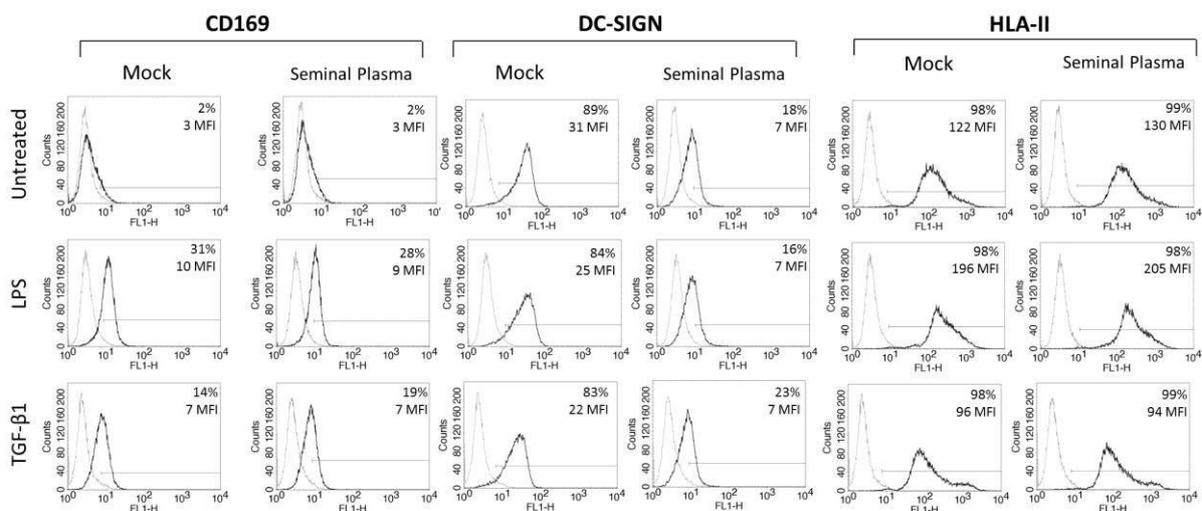
Fig. 3. Seminal plasma diminishes CD169 up-regulation by LPS and TGF- β 1.

(a) Immature MDDC were cultured for 24h with LPS (200 ng.mL⁻¹) or TGF- β 1 (100 ng.mL⁻¹) in presence or absence of VIH⁻ pooled seminal plasmas diluted 1:300. Cell surface expression of CD169, HLA-II and DC-SIGN were analyzed by FACS. (b) CD169 positive MDDC (24 h LPS or TGF- β 1 treated cells) were briefly incubated (30 min) with seminal plasma just before FACS experiments. Black curves show specific antibody binding; grey curves show isotype control Ig staining. The results are representative of four independent experiments. (c) Immature or LPS matured MDDC were incubated with different dilutions of seminal plasma for 30 min before performing an HIV-1 capture assay. The experiment was done in quadruplicate. Mean \pm SEM are shown. * p <0.05, *** p <0.0005, **** p <0.0001. iMDDC: Immature Monocyte-derived dendritic cells; LPS-mMDDC: LPS matured Monocyte-derived dendritic cells, LPS: Lipopolysaccharide; TGF- β 1: Transforming growth factor β 1.

(a)



(b)



(c)

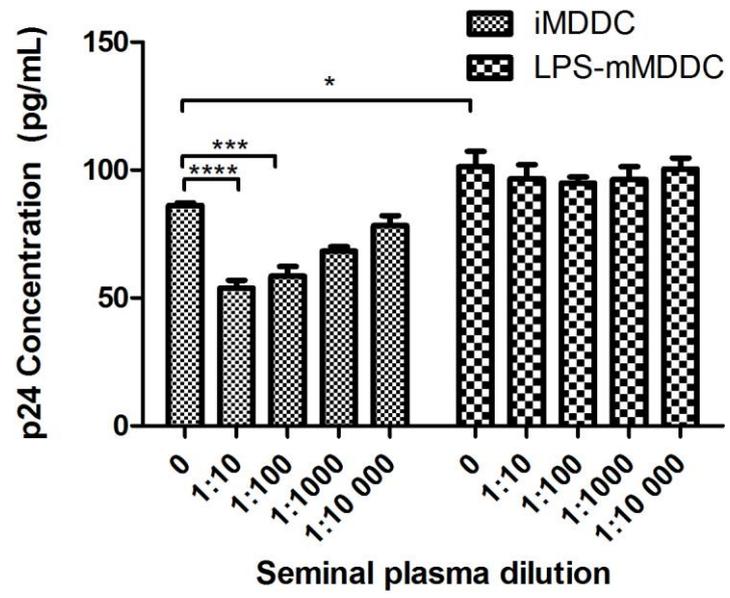
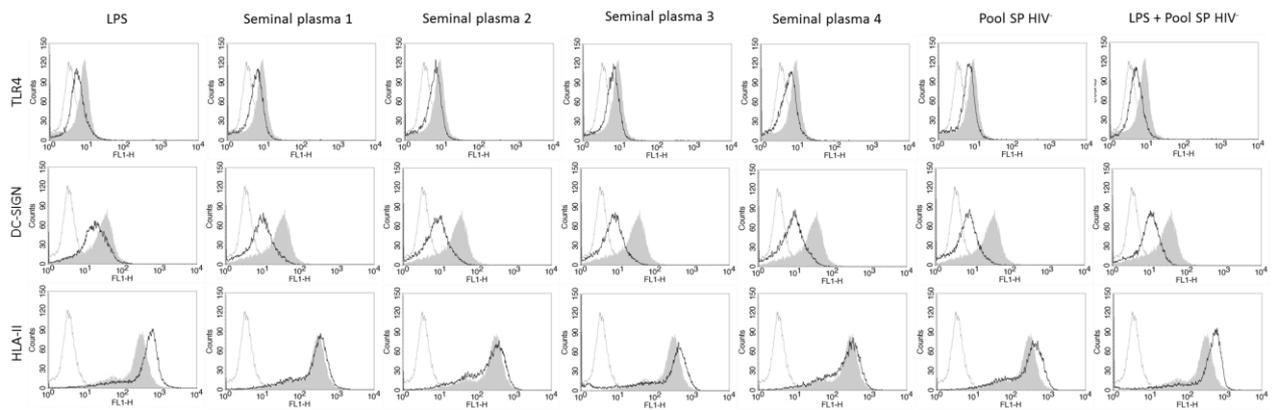


Fig. 4. Seminal plasma downregulates TLR4 expression at the MDDC cell surface.

(a-b) Cells were cultured for 24h with LPS (200 ng.mL⁻¹), individual or pooled HIV-1 negative seminal plasmas (1:300) or LPS and a pool of HIV-1 negative seminal plasmas simultaneously (200 ng.mL⁻¹ and 1:300 respectively). Flow Cytometry experiments were done to analyze cell surface expression of TLR4, DC-SIGN and HLA-II. The specific antibody binding for treated cells (black thick line) is compared to the specific antibody binding for untreated cells (grey filled area) and isotype control Ig staining (thin grey line). (b)The table presents the percentage of positive cells and MFI from the previous FACS experiment. (c) Cells were cultured for 24h in presence of LPS (200 ng.mL⁻¹) or several dilution of pooled HIV-1 negative seminal plasmas (1:300; 1:3 000; 1:30 000). Results indicate fold increase expression of these markers at the MDDC treated cell surface compared to untreated MDDC.

(a)



(b)

	Untreated Cells		LPS		Seminal Plasma 1		Seminal Plasma 2		Seminal Plasma 3		Seminal Plasma 4		Pool SP HIV-		LPS+Pool SP HIV-	
	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI
TLR4	18	8	6	6	5	6	6	7	6	7	6	6	6	7	3	5
DC-SIGN	93	32	80	19	43	10	36	9	26	8	39	10	25	8	49	11
HLA-II	100	294	100	533	100	337	100	319	100	362	100	308	100	414	100	509

(c)

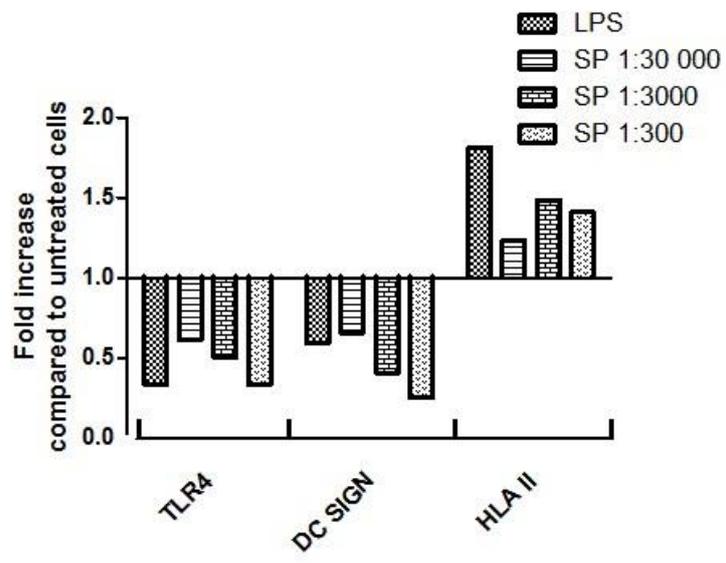
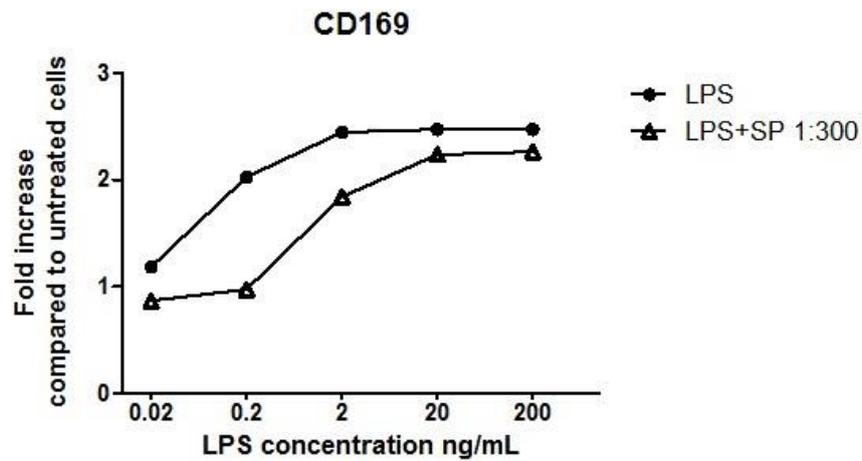


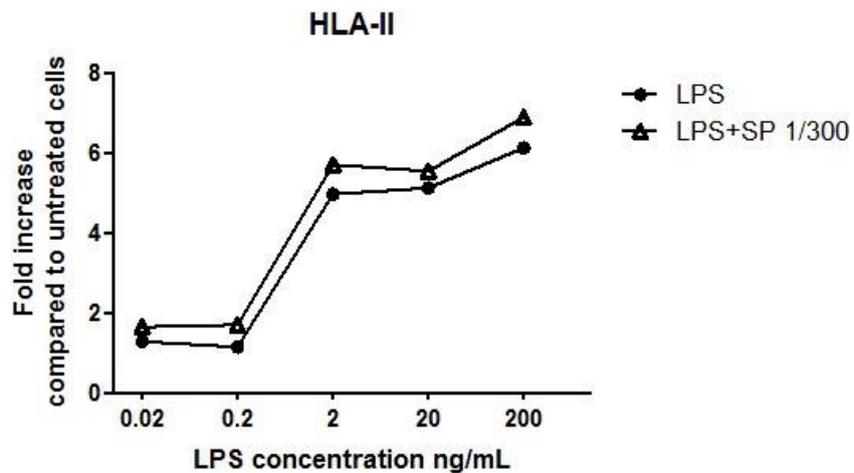
Fig. 5. Seminal plasma binds to TLR4 expressed at the MDDC cell surface.

Cells were cultured for 24h in presence of various concentrations of LPS (from 0.02 to 200 ng.mL⁻¹) in presence (triangles) or not (circles) of pooled HIV-1 negative seminal plasmas (1:300). Results indicate fold increase expression of CD169 (a) and HLA-II (b) by MDDC treated cells compared to untreated one.

(a)



(b)



E. Discussion

Le plasma séminal est un fluide complexe riche à la fois en facteurs facilitateurs ou inhibiteurs de l'infection par le VIH-1 (Doncel *et al.*, 2011; Sabatté *et al.*, 2011). Son rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1 demeure donc débattu et des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'influence de ce fluide. Cependant, la cytotoxicité du plasma séminal rend ce travail difficile. Plusieurs moyens permettant de s'affranchir de cette contrainte ont déjà été décrits comme (i) une dilution du plasma séminal, (ii) une incubation sur de courtes durées de concentrations plus importantes ou (iii) la dialyse du plasma séminal avant incubation avec les cellules (Remes Lenicov *et al.*, 2012; Sabatte *et al.*, 2007; Stax *et al.*, 2009). Introini *et al.*, (2013) extrapolent l'effet du plasma séminal en étudiant l'impact d'une de ses cytokines majoritaires, l'IL7. Cette dernière démarche a été suivie dans la première partie de cette thèse, qui s'est focalisée sur l'influence de certains composés du plasma séminal sur le phénotype et la capacité des MDDC à prendre en charge des particules virales VIH-1.

Afin de déterminer les facteurs à tester ainsi que les concentrations à utiliser, les concentrations de treize molécules ont été mesurées dans des pools ou des plasmas séminaux individuels provenant de donneurs VIH⁻ ou VIH⁺ ARV⁺. Quatre cytokines proinflammatoires ont été dosées : l'IL1 β , l'IL6, l'IL8 et du TNF α . Les chimiokines SDF-1 α et RANTES étant les ligands naturels des corécepteurs principaux du VIH-1, CXCR4 et CCR5 respectivement, ces molécules sont susceptibles d'influencer la transmission du VIH-1 *via* les DC. De ce fait, leur concentration a été mesurée. Le TGF- β 1 est déjà décrit comme étant une des cytokines majoritaires du plasma séminal dont la concentration au niveau du plasma séminal est cinq fois supérieure à la concentration plasmatique (Loras *et al.*, 1999; Nocera and Chu, 1995; Politch *et al.*, 2007). Le TGF- β 1 joue un rôle prépondérant dans la modulation de la réponse immunitaire du tractus génital féminin conditionnant la fécondation (Robertson *et al.*, 2002a). La concentration en TGF- β 1 a donc été mesurée. L'IL7 fait également partie des cytokines majoritairement présentes dans le plasma séminal. Récemment, Introini *et al.*, (2013) ont montré que l'IL7 utilisée à des concentrations similaires à celles mesurées dans le plasma séminal favorise la transmission du VIH-1 sur un modèle d'explants. Cette cytokine a donc été dosée. La lactoferrine et la cathélicidine (LL-37) sont deux peptides antimicrobiens présents dans le sperme (Andersson *et al.*, 2002; Buckett *et al.*, 1997). Ces deux molécules ont été décrites comme capables d'influencer le phénotype des DC et notamment d'induire leur maturation (Ogawa *et al.*, 2013; Spadaro *et al.*, 2008). De ce fait, leur concentration a été mesurée. Le CCL20, chimiokine jouant un rôle dans l'attraction des DC au niveau de la muqueuse, a également été dosée. Cette molécule a déjà fait l'objet d'études au sein du laboratoire, permettant ainsi d'avoir un élément de référence (Berlier *et al.*, 2006a; Lourenço *et al.*, 2014). Enfin, les concentrations en TSLP et HMGB1 ont également été

mesurées. Leur présence dans le sperme n'est pas mentionnée dans la littérature. En revanche, ces molécules sont déjà décrites comme capables d'influencer le comportement des DC (Fontenot *et al.*, 2009; Gougeon *et al.*, 2012). La TSLP est sécrétée par les cellules épithéliales, les fibroblastes ou certaines cellules stromales alors que l'alarmine HMGB1 est sécrétée par les monocytes, les macrophages et les DC.

Nos résultats montrent la présence de fortes concentrations de lactoferrine dans le plasma séminal (>200µg/mL quel que soit le statut des donneurs) comme cela a déjà été décrit auparavant (Buckett *et al.*, 1997; Lourenço *et al.*, 2014). Le TGF-β1 est également présent à des concentrations importantes (>350 ng/mL). Cependant, le TGF-β peut être présent sous deux formes, sa proforme inactive, et sa forme mature sous laquelle il est biologiquement actif. La technique de luminex utilisée pour ce dosage ne permet pas de distinguer ces deux formes. Selon Robertson *et al.* (2002b) la forme active représente 25% du TGF-β présent dans le compartiment séminal. Le peptide antimicrobien LL-37 est présent dans tous les échantillons à une concentration de l'ordre de 5ng/mL. Le LL-37 est un peptide correspondant à la partie C-terminale de la protéine hCAP-18, qui est la seule cathélicidine produite chez l'Homme. La présence d'hCAP-18 dans le plasma séminal avait déjà été décrite par Andersson *et al.* en 2002. Dans cette étude, bien que la concentration en hCAP-18 varie fortement en fonction du donneur, celle-ci demeure très élevée avec en moyenne 48 µg/mL. Bien que les valeurs ne soient pas exactement comparables puisqu'il s'agit dans un cas de la proforme et dans l'autre de la protéine clivée, il est surprenant d'observer un tel écart.

HMGB1 est également présent dans tous les plasmas séminaux individuels et dans les pools à des concentrations de l'ordre de 30ng/mL. La présence d'HMGB1 dans le plasma séminal n'a jamais été décrite dans la littérature. Compte-tenu du rôle d'HMGB1 dans les interactions entre les NK et les DC mais également de son influence sur la réplication du VIH-1 dans les cellules myéloïdes, la présence de cette molécule au niveau du compartiment séminal pourrait moduler la transmission sexuelle du VIH-1 (Gougeon *et al.*, 2012).

Seule la concentration de RANTES varie significativement en fonction du statut aussi bien dans les pools que dans les plasmas séminaux individuels. Celle-ci est plus élevée dans les plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺ en accord avec plusieurs études déjà publiées (Lisco *et al.*, 2012a; Storey *et al.*, 1999). Plusieurs études mettent en évidence une différence de concentrations en TGF-β1 entre les plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ (Kafka *et al.*, 2012; Lisco *et al.*, 2012b), ce que nous avons nous même observé avec les pools mais pas avec les plasmas séminaux individuels. Des différences de concentrations en fonction du statut virologique sont également observées pour l'IL1β, l'IL6, l'IL7, l'IL8 et le TNF-α par Lisco *et al.* (2012b) et Kafka *et al.* (2012). Cependant, ces derniers ont montré que

les concentrations en cytokines variaient également en fonction du stade de l'infection, les plasmas séminaux de patients en primo-infection contenant généralement plus de cytokines proinflammatoires que ceux des patients au stade chronique et des donneurs sains, par exemple. Dans notre étude, tous les donneurs VIH⁺ ARV⁺ sont au stade chronique sous-traitements antirétroviraux et possèdent des charges virales séminales inférieures à 40 copies/mL, ce qui pourrait expliquer le peu de différences observées entre les plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺.

La mise en évidence de certaines variations interindividuelles souligne les avantages et inconvénients de l'utilisation de ces pools. Si ces derniers permettent de travailler à partir d'un matériel plus homogène, ils ne reflètent pas l'hétérogénéité de la composition des plasmas séminaux individuels testés.

Suite au criblage des plasmas séminaux, nous nous sommes intéressés aux effets des molécules majoritairement détectées (la lactoferrine, le TGF- β 1, HMGB1 et le LL-37) sur le phénotype des DC. Cette étude préliminaire, réalisée à partir de protéines recombinantes ou purifiées, a permis de mettre en évidence que l'incubation des MDDC en présence de TGF- β 1 provoquait une augmentation de l'expression de CD169, un récepteur récemment décrit comme capable de capter les particules virales VIH-1. Cette modification phénotypique s'accompagne d'une augmentation de la capture des particules virales pouvant jouer un rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1. Cependant, ni l'augmentation de la capture des particules virales ni celle de l'expression de CD169 ne sont observées lorsque les MDDC sont incubées en présence de plasma séminal. Au contraire, le plasma séminal semble avoir tendance à diminuer la capture des particules virales par les MDDC et s'avère même être capable de diminuer l'induction de l'expression de CD169 par le TGF- β 1 ou le LPS. Contrairement à son effet sur la capture des particules virales par DC-SIGN, le plasma séminal ne bloque pas le site de liaison du virus au niveau du CD169. En revanche, il semblerait qu'un ou plusieurs composés du plasma séminal soient capables de se fixer de façon compétitive au TLR4, le récepteur du LPS pouvant empêcher l'induction de l'expression de CD169. Cette hypothèse est renforcée par une récente étude sur le modèle murin indiquant que des composés endogènes du plasma séminal pourraient se lier au TLR4 et provoquer une diminution de son expression au niveau génital (Schjenken *et al.*, 2015). Les ou les composés du plasma séminal responsables de cet effet n'ont pas encore été identifiés. Compte-tenu de la composition de ce fluide biologique, plusieurs protéines pourraient jouer ce rôle comme l'angiotensine II, les β -défensines, la fibronectine...

En plus de cette inhibition compétitive de la liaison entre le LPS et son récepteur, il n'est pas exclu que d'autres mécanismes expliquent également la moindre induction de l'expression de CD169 par le LPS en présence de plasma séminal. Il a par exemple été décrit que la lactoferrine, molécule

présente en forte concentration dans le plasma séminal, était capable de former un complexe avec le LPS, neutralisant ainsi son effet (Drago-Serrano *et al.*, 2012).

Cependant, la lactoferrine ne semble pas jouer ce rôle puisque des expériences complémentaires indiquent que l'incubation des MDDC en présence de LPS et de lactoferrine (testées à des concentrations de 0,1 à 100µg/mL) simultanément n'affecte pas l'induction de l'expression de CD169 (Figure 26).

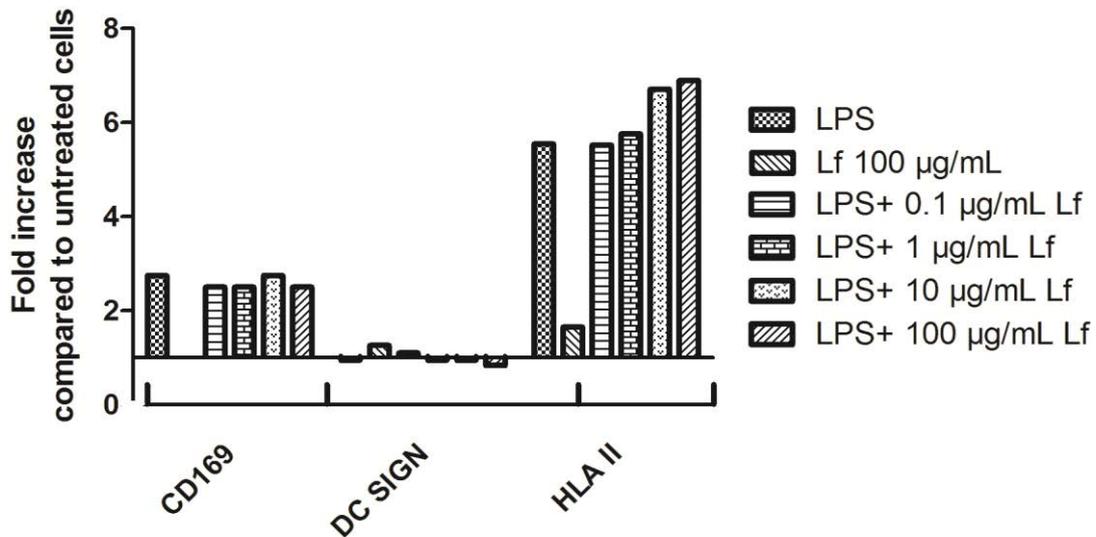


Figure 26 : Effet de la lactoferrine sur l'induction de l'expression de CD169 par le LPS. Les MDDC ont été incubées pendant 24h en présence de LPS (20ng/mL) en présence ou non de lactoferrine (0,1 à 100 µg/mL) pendant 24h. L'expression de CD169, DC-SIGN et HLA-II a été mesurée par cytométrie en flux. Lf : Lactoferrine

Concernant l'effet du TGF-β1, le mécanisme d'inhibition de l'induction de l'expression de CD169 par le plasma séminal demeure inconnu. Il est envisageable que certains des composés du plasma séminal se lient au récepteur de cette cytokine. Ainsi, il a été récemment montré que la lactoferrine était capable de se lier au récepteur du TGF-β de type III (β-glycan ou TβRIII) (Jang *et al.*, 2015).

Si dans cette première partie nous nous sommes intéressés au rôle direct du plasma séminal sur les DC, bien d'autres cellules présentes au niveau des muqueuses sont exposées à ce fluide au cours d'un rapport sexuel non protégé. Les cellules épithéliales sont, en particulier, les premières cellules à être en contact avec le plasma séminal. Ainsi, en plus de son rôle direct sur les DC, le plasma séminal pourrait avoir un effet indirect *via* la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés au rôle indirect du plasma séminal sur les DC *via* les cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH-1 par voie muqueuse.

2. Influence indirecte du plasma séminal sur les cellules dendritiques via les cellules épithéliales

A. Contexte

Lors de la transmission sexuelle du VIH-1, les cellules épithéliales sont les premières cellules en contact avec le sperme contaminé. Compte-tenu du faible risque de transmission du VIH-1 par acte, elles forment des barrières efficaces bien qu'imparfaites. En plus de ce rôle mécanique, les cellules épithéliales sécrètent un grand nombre de molécules, comme des peptides antimicrobiens, (cathélicidines, défensines), des cytokines (TNF- α , IL6) ou encore des chimiokines (RANTES, SDF-1, IL8) pouvant influencer la transmission sexuelle du VIH-1. Ces sécrétions sont modulées par certains facteurs qu'ils soient endogènes tel que le cycle menstruel ou exogènes tels que la prise de contraceptifs hormonaux, l'infection par des agents sexuellement transmissibles dont le VIH-1 ou encore le sperme. Il a été précédemment montré au laboratoire GIMAP que le plasma séminal induisait la sécrétion de CCL20 (aussi appelé MIP-3 α) par une lignée de cellules vaginale (SiHa) favorisant ainsi le recrutement des cellules de Langerhans, ce qui pourrait jouer un rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1. En plus de son rôle direct sur les DC, le plasma séminal pourrait donc influencer de façon indirecte la transmission sexuelle du VIH-1 en induisant la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales modulant l'activité des DC. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du plasma séminal sur les interactions entre les cellules épithéliales, endocervicales ou rectales, et les DC pouvant jouer un rôle dans la transmission sexuelle du VIH-1. Dans le cadre de cette thématique, une revue sur le rôle des cellules épithéliales de la muqueuse génitale féminine a été rédigée et publiée en août 2015 dans Current VIH Research.

B. Rôle des cellules épithéliales dans la transmission sexuelle du VIH-1 (Revue)

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

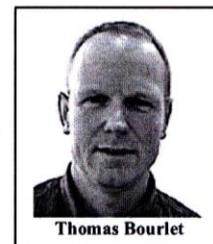
Current HIV Research, 2015, 13, 000-000

1

Pivotal Role of the Genital Epithelial Cells in HIV-1 Transmission

Amélie De Saint Jean¹, Thomas Bourlet^{*,1,2,§} and Olivier Delézay^{1,§}

¹GIMAP Research Unit, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, Université Jean Monnet, COMUE de Lyon, Saint-Etienne, France; ²Service des Agents Infectieux et Hygiène, CHU de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France



Abstract: AIDS remains one of the world's most serious health challenges, with 35 million people living with HIV worldwide at the end of 2013. HIV sexual transmission accounts for the overwhelming majority of people newly infected, making genital and rectal mucosal tissues the major sites of infection. This review focuses on the role of the female genital epithelial cells in the establishment of HIV infection.

Keywords: Epithelial cells, female genital tract, HIV-1, innate immunity, microbicides, semen, sexually transmitted agents.

1. INTRODUCTION

Women represent half of the 35 million people currently living with HIV [1]. Male-to-female HIV-1 transmission occurs when infectious seminal cell-free or cell-associated virions are deposited on the surface of the cervicovaginal mucosa and infect permissive cells through various mechanisms [2,3]. Epithelial cells of the female genital tract may play an important role in HIV transmission as they are the first in contact with HIV-1. However, their involvement in the contamination process is complex. On one hand, they play an important role in the prevention of the HIV transmission as (i) they constitute a physical barrier to pathogens and (ii) they secrete natural antimicrobial peptides or anti-infectious factors. On the other hand, they can facilitate HIV-1 crossing (in case of breaches or by transcytosis phenomenon for example) or by secreting immunomodulatory factors that enhance HIV-1 infection. The aim of the present review is to summarize the current data on the role of the female genital epithelial cells on HIV-1 transmission and its modulation by external factors, especially the seminal fluid and sexually-transmitted diseases agents (STDa).

2. THE FEMALE GENITAL EPITHELIUM: AN IMPERFECT BARRIER

Vaginal intercourse leads to low, but non negligible, HIV transmission probability per exposure, estimated at 1 in 200 to 1 in 2000 (contrary to 1 in 20 to 1 in 300 for anal intercourse) [4]. These figures indicate that the genital epithelium constitutes an effective but not perfect physical barrier that remains sometimes a vulnerable spot.

The female genital tract that may be exposed to virus containing semen can be divided in two parts according to their anatomical position and their histological structure. The upper genital tract, including the body of the uterus, is lined by a simple epithelium whereas the lower genital tract including vagina and ectocervix, is lined by a stratified epithelium (Fig. 1). For both epithelia, intercellular proteins are crucial components for the integrity of the barrier. They form desmosomes in the multilayered squamous epithelium [5] or tight junctions in the single-layer columnar epithelium [6] that decrease tissue permeability and block macromolecules penetration including virions. The anatomical site of infection by HIV-1 within the female reproductive tract is heavily debated. Infection may take place in the vagina, the cervix and the uterus. The multilayered squamous epithelium of the vaginal and ectocervical *mucosae* can be more than 25 cell layers thick and constitute the largest area that comes in contact with seminal fluid containing viruses.

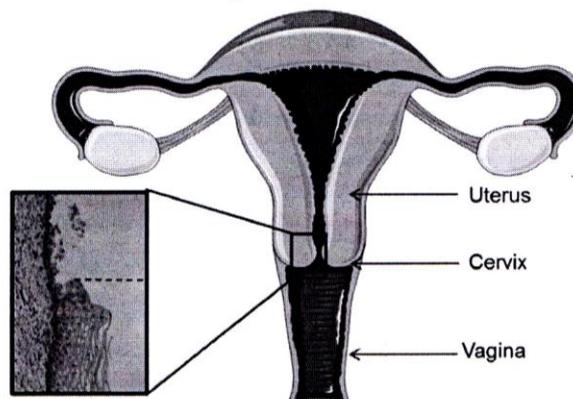


Fig. (1). Female genital tract histology. The upper genital tract is lined by a simple epithelium whereas the lower genital tract is lined by a stratified epithelium. In frame, a histological slide of the squamocolumnar junction called transformation zone.

*Address correspondence to this author at the GIMAP, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc, 42023 Saint-Etienne, Cedex 02, France; Tel/Fax: +3-347-742-1467; +3-347-742-1486 E-mail: thomas.bourlet@chu-st-etienne.fr

§Participated equally to this review.

However, an undamaged multilayered squamous epithelium offers a better physical barrier against pathogen invasion than a 10 to 30µm thick single-layer columnar endocervical epithelium. The transformation zone between the stratified epithelium of ectocervix and the simple columnar epithelium of endocervix is particularly vulnerable to HIV infection since it contains a high density of HIV target T cells. Moreover, it has been suggested that sites of initial infection are not restricted to specific domains within the female genital tract but rather correspond to hotspots of vulnerability that may differ between individuals [7].

The different hypotheses of female genital mucosa crossing of HIV cell-free or cell-associated particles leading to infection are depicted on Fig. (2). In the absence of breaches, free particles may penetrate by transcytosis phenomenon [8-10], and/or may be captured by intra or submucosal dendritic cells [11], and/or infect intraepithelial leukocytes and genital epithelial cells (GEC), productively or not [12-17]. Cell-associated HIV particles are present in non spermatozoal mononuclear cells (NSMC) that are able to

rather transmigrate through the female epithelium [15]. In each case, the direct or indirect role of GEC has to be taken into consideration.

3. ROLE OF THE EPITHELIAL CELLS ON MUCOSAL HIV-1 CROSSING

3.1. Direct Role

Whether GEC are permissive to HIV-1 infection or not remains a matter of debate. Previous reports indicate that GEC do not express the receptor CD4 and express the fusion coreceptors CXCR4 and CCR5 at very low levels [8,12,18-21].

However, it has been demonstrated that HIV-1 may use several alternative receptors to enter GEC such as salivary agglutinin (SAG/gp340) [22,23], glycosphingolipid galactosylceramide (GalCer) [9,20,24] or heparan sulphate proteoglycans (HSPG) [8,12,25].

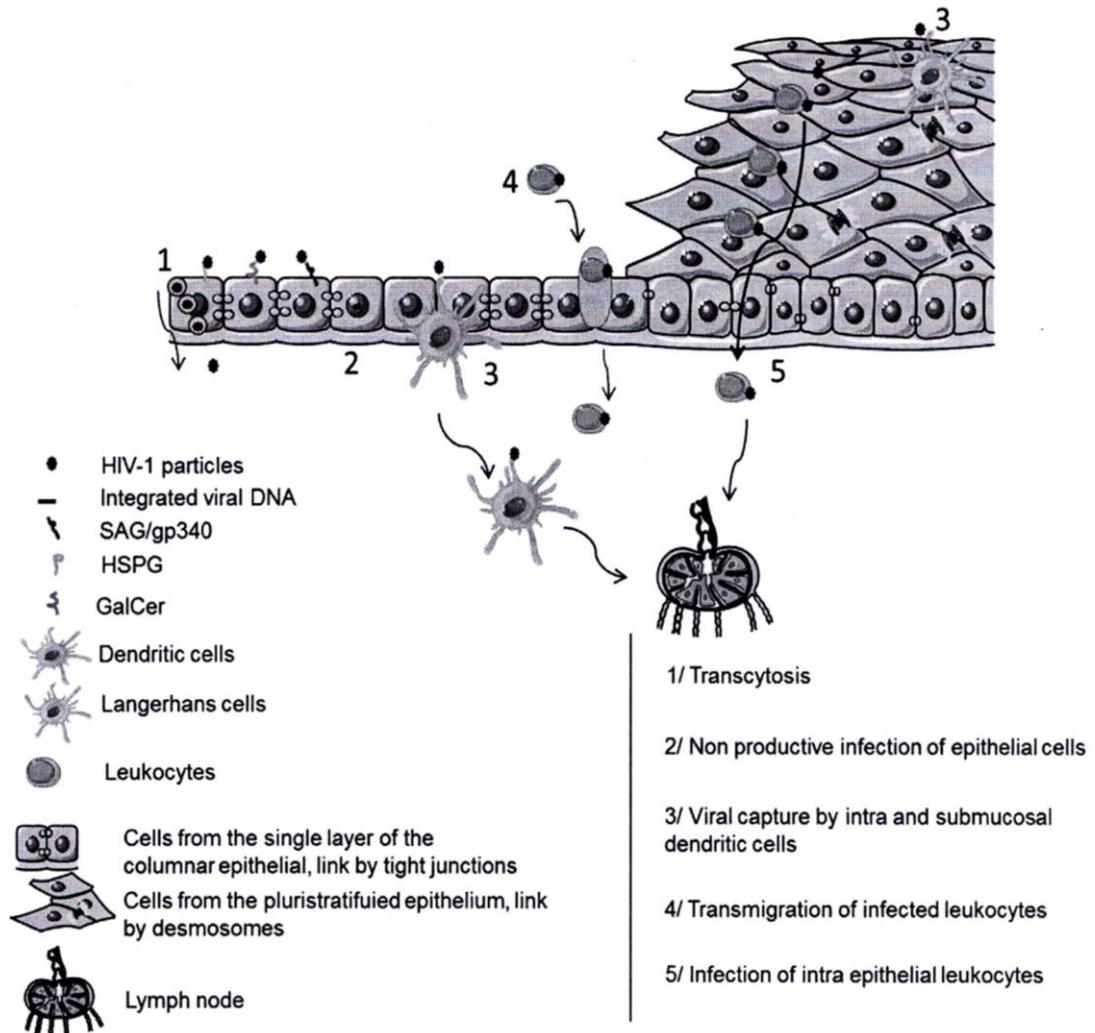


Fig. (2). HIV-1 epithelial cells crossing in absence of breaches: Main hypotheses.

Some investigators have suggested that this entry of HIV-1 into GEC may lead to an incomplete replication cycle cells including integration step but rarely production and release of viral particles [12-15,20,26-28]. Other authors did observe a sequestration of free viral particles by epithelial cells followed by an infection of permissive cells in the submucosae after cell to cell contact through a virological synapse. Others failed to demonstrate infection of epithelial cells [24,25,29,30]. Another suggested hypothesis is the ability of viral particles to migrate inside GEC by transcytosis and then to be transmitted to immune permissive cells at the submucosal level [8-10,23,24,31,32]. This mechanism is increased under acidic conditions and may involve the neonatal Fc receptor as well as Env-specific IgG present in cervicovaginal and seminal fluids [33].

Other mechanisms allowing HIV-1 to cross the mucosal epithelium have been described. Notably, it has been established that direct interaction between HIV-1 particles and epithelial cells might influence permeability of the genital epithelia by disruption of tight junction proteins (claudin 1, 2, 4, occluding and zonula occludens 1 (ZO-1)) allowing viral penetration into sub-epithelial layers [34,35]. A perturbation of the epithelial layer organization may also occur following the interaction between gp120 and mannose receptors expressed on vaginal cells leading to the production of matrix metalloproteinase 9, that may degrade the junctional proteins and/or the extracellular matrix in general [36]. The infection of intra-epithelial leukocytes [16,17] or the capture of virions in the lumen by mucosal dendritic and Langerhans cells [11] are phenomena that may also facilitate HIV-1 transmission. The transmigration of donor infected leukocytes through the mucosa has been suggested to play a major role in HIV transmission [15]. To do so, HIV-1 infected leukocytes may adhere to the cervicovaginal epithelium, through interactions between LFA-1 expressed by leukocytes and ICAM-2 and 3 expressed by epithelial cells [37] and, as a consequence, penetrate between epithelial cells while secreting virus in a polarized manner. (Fig. 2).

GEC are also able to sense the virus and express at their surface various pattern recognition receptors (PRR), which may contribute to the innate immune response.

3.2. Expression of Pattern Recognition Receptor

GEC express a variety of PRR allowing the recognition of certain conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that initiate immune response against invading pathogens. They notably express the Toll-Like Receptors (TLR) 1 to 3, and 5 to 9 [38-45], the nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NOD) 1 and 2 [42] and the retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I), a member of the RNA helicases like receptors family (RLR) [46]. The expression of TLR4 is also detected in the upper tissue (endocervix, endometrium and uterine tubes) but not in vagina and ectocervix [35,40,41,43,44]. The expression of TLR10 appears to be restricted to fallopian tube [42]. Among these PRR, TLR3, 7/8, 9 and RLR are able to recognize viral components. Their activation promotes the production of chemokines and cytokines by GEC that may modulate HIV-1 transmission process.

3.3. Epithelial cells secretions

3.3.1. Mucus Production

GEC are covered by glycocalyx, formed by a hydrophilic layer of glycoproteins and glycolipids, and mucus, a dense hydrophobic layer essentially composed of mucins secreted by glandular endocervical cells [47]. The viscoelastic network formed by mucus can trap HIV-1 free particles and impede its diffusion in an envelope glycoprotein independent way [48]. Regular movements of mucus leads to the clearance of the trapped material, contributing to HIV transmission prevention [49].

3.3.2. Secretion of Soluble Factors

GEC secrete a large array of soluble factors playing an important role in reproduction process and immunity. These factors can be classified in several categories: (i) antimicrobial peptides considered as natural microbicides, (ii) chemokines that regulate the immune cells traffic and (iii) cytokines that modulate the immune cells activity.

- Numerous antimicrobial peptides, such as defensins, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), cathelicidin, lactoferrin or lysozyme have been identified in the female genital tract. These peptides have a broad range of actions against microorganisms including bacteria, fungi and viruses [50,51]. Their levels are particularly elevated in genital fluids of individuals infected by STDA [52-55]. While the majority of the antimicrobial peptides exhibit anti-HIV activities *in vitro* (see details in Table 1), conflicting results have been observed for cathelicidin [56-59] and defensins 5 and 6 [60,61]. However, little is known about their *in vivo* biological ability to prevent or facilitate HIV acquisition. Further *in vivo* investigations are needed in order to better understand the exact role of antimicrobial peptides on HIV-1 transmission.
- In addition to antimicrobial peptides, GEC constitutively secrete cytokines and chemokines participating to the innate immune response against pathogens [62]. Some of these factors play a protective role against HIV-1 such as SDF-1 and RANTES that are the natural ligands for the HIV-1 co-receptors CXCR4 and CCR5, respectively [63,64]. Other factors such as interferons directly reduce HIV-1 replication at an early step of the virus life cycle. Numerous chemokines, namely IL8, MCP1, MIP-3 α and TNF- α , play an indirect role by attracting and activating various immune cells such as lymphocytes, polynuclear neutrophil cells, dendritic cells or monocytes. The recognition of PAMP through TLR stimulation leads to an increased secretion of numerous factors including IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES, CCL2, prostaglandin E2 (PGE2) and GM-CSF [38,41,43,46,65-67]. Thus, GEC are able to modulate inflammation at the mucosal level and so play a key role as initiators of both innate and adaptive immune responses in the genital tract. Unfortunately, HIV-1 may take advantages of this host immune response since it has been demonstrated that immune activation directly drives HIV-1

Table 1. Effects of antimicrobial peptides on HIV-1.

Factors	Mechanisms	References
Cathelicidin	Inhibits HIV-1 reverse transcriptase and protease.	Bergman <i>et al.</i> , 2007 [56]; Wang <i>et al.</i> , 2008 [58]; Wong <i>et al.</i> , 2011 [59]
	Increases HIV-1 transmission from Langerhans cells to CD4+ T cells.	Ogawa <i>et al.</i> , 2013[57]
Lactoferrin	Blocks HIV-1 attachment to epithelial cells and inhibits dendritic cells to T cells viral particles transfer.	Carthagen <i>et al.</i> , 2011 [73]; Saidi <i>et al.</i> , 2006 [74]
Serpins and Cystatins	Inhibit HIV-1 binding, replication and reduce local inflammation.	Aboud <i>et al.</i> , 2014 [75]
SLPI	Impairs annexin V mediated stabilization of fusion.	Ma <i>et al.</i> , 2004 [76]
Trappin/elafin	Reduces virus attachment and transcytosis through GEC. Reduces IL-8 and TNF- α secretion and activation of NF- κ B.	Drannik <i>et al.</i> , 2012 [77,78]; Ghosh <i>et al.</i> , 2010 [71]
α -defensin-5	Interferes with the reciprocal interaction between gp120 and CD4.	Furci <i>et al.</i> , 2012 [60]
	Promotes HIV attachment to target cells.	Rapista <i>et al.</i> , 2011 [61]
β -defensins	Interact directly with virus, favor CXCR4 internalization [78] and inhibit HIV-1 replication	Feng <i>et al.</i> , 2006 [79]; Klotman and Chang, 2006 [80]

replication [68,69] and induces a proinflammatory response associated with an increased viral shedding [70]. Indeed, HIV-1 is able to induce proinflammatory cytokines production by interaction of the gp120 with the epithelial cells, leading to the disruption of tight junctions, increasing tissue permeability and enhancing chances for HIV-1 to cross the mucosal barrier and initiate an infection of submucosal target cells [71]. Numerous proinflammatory cytokines also favor transmigration of HIV-1 infected monocytes across mucosa, by triggering overexpression of ICAM 2 and 3 (CD102, CD50) that interact with LFA-1 on monocytes [37].

Moreover, the recruitment and the activation of HIV-1 susceptible cells *via* cytokines and chemokines secreted by GEC also favor HIV-1 contamination at the mucosal level. Fontenot *et al.* have previously demonstrated that HIV-1 triggers TSLP secretion by epithelial cells, leading to recruitment and activation of dendritic cells. This favors CD4 T lymphocytes proliferation and promotes HIV replication in these activated T cells [72].

Other chemokines play an ambivalent role. For example, CCL20 has been described, on the one hand, as an anti-HIV-1 molecule [71] and, on the other hand, is also chemotactic for dendritic cells that are known to be involved in HIV-1 spread. Dendritic cells recruited at the mucosal site by CCL20 secrete CCR5+ attracting chemokines (notably MIP-1 α and MIP-1 β) creating an environment rich in target cells at the site of infection [81].

As a whole, soluble factors secreted by GEC appear to play an important role in the early stages of infection. They can have a direct antiviral activity or act as danger signals that activate and recruit various immune effector cells. However, HIV-1 transmission also depends on several endogenous and exogenous factors that may influence the genital barrier integrity and/or the secretion of soluble factors by GEC.

4. INFLUENCE OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS FACTORS

4.1. Sex Hormones

4.1.1. Menstrual Cycle and Endogenous Sex Hormones

The consequent fluctuations in the circulating levels of estradiol and progesterone occurring during the menstrual cycle have been associated with important changes of the immune system in the female genital tract [82]. At the time of ovulation, sex hormones suppress several aspects of innate, humoral and cell-mediated immunity creating favorable conditions for procreation but also a potential "window of vulnerability" to viral infection [83]. Regarding HIV-1, sex hormones may modulate the cellular expression of CXCR4, CCR5 and GalCer. For example, during the proliferative phase, the CCR5 expression is enhanced at the surface of uterine epithelial cells due to an elevated blood level of estradiol. In contrast, CXCR4 expression increases gradually throughout this phase. During the secretory phase, when both estradiol and progesterone are elevated, CCR5 levels decrease whereas CXCR4 expression remains high. Moreover, the expression of GalCer receptor in endometrial glands is higher during the secretory than the proliferative phase of the menstrual cycle [21]. Using a mouse model, Ochiel *et al.* demonstrated that estradiol also decreases the expression of MHC class II molecules at the surface of uterine and vaginal cells [84]. Other experiments using mouse uterine cells found that physiological concentrations of estradiol decrease the transepithelial resistance of the monolayer in a way dependent of matrix metalloproteinases [85]. Sex hormones may thus influence the genital barrier integrity and more generally induce anatomical changes that may favor STD acquisition [86].

Sex hormones may also modulate the secretion of various soluble factors by the genital epithelial cells. For example, the secretion of TGF- β 1 by endometrial cells is higher in the mid and the late secretory phase of the cycle. This cytokine plays an important role in mucosal HIV-1 transmission by up

regulating the expression of CXCR4, CCR5 and Siglec-1 on dendritic cells [87,88]. Conversely, estradiol displays a protective role by stimulating the secretion of SLPI by uterine epithelial cells [89]. Another study also demonstrated that uterine epithelial cells from premenopausal, but not postmenopausal, women exhibit antibacterial activity partially due to SLPI secretion [90]. Estradiol also suppresses the expression of pro-inflammatory mediators by epithelial cells by inhibiting the constitutive and TLR-agonist-induced secretion of TNF α and MIP3 α by uterine epithelial cells [91]. Estradiol also indirectly decrease the NF κ B expression by SLPI [92]. At the opposite, estradiol may inhibit SLPI and Human β defensin 2 secretion by vaginal epithelial cells [93]. Wira *et al.* hypothesized that these contrasting responses to estradiol stimulation between the uterine and vaginal epithelial cells may be due to mechanistic changes arising from their differing embryonic origins [92].

Overall, these data demonstrate that sex hormones influence the behavior of GEC. Thus, the use of hormonal contraception should be considered as an external factor that may influence HIV-1 susceptibility.

4.1.2. Hormonal Contraception

Whether hormonal contraception affects HIV risk acquisition is an ongoing debate that has critical implications for women's health [94-96]. Existing evidence suggests an increased risk of HIV acquisition associated with use of depot medroxyprogesterone acetate (DMPA), specifically in women at high risk [97]. Among the mechanisms proposed to explain the increased HIV acquisition risk linked to hormonal contraception, some directly affect the GEC barriers [98]. Studies performed on non-human primates (NHP) indicate that DMPA and progesterone thin the epithelial barrier [99,100]. However, it is not clear whether a similar phenomenon is observed in women as several studies described no difference in vaginal epithelial thickness following injectable contraceptive use [101-104]. Conversely, it was recently reported that progesterone delivered by an intrauterine device was associated with a thinner apical layer of the human ectocervical epithelium and a lower ZO-1 mRNA expression [105]. Moreover, the use of hormonal contraceptives increases the viscosity of the cervicovaginal fluids by decreasing its protein content [106]. A decreased of mucin concentration is especially observed and may impact the critical role of mucus in the defense of the female reproductive tract [107]. Hormonal contraceptive drugs also enhance HIV transcytosis across the epithelium and their uptake into GEC, but not replication [108]. Another role played by DMPA at the mucosal level is the modulation of the expression of soluble immune mediators [107,109]. Indeed, DMPA administrated by IV route leads to a substantial inhibition of endometrial SLPI expression [110] whereas combined oral contraceptive or intrauterine system use decreases expression of β -defensins 1 and 2 but not SLPI [111]. Lower concentrations of IL6, IL8, CXCL10, CXCL11, MIF, CCL1 and IL17 have also been detected in cervicovaginal fluids from women using DMPA. By contrast, IL4, IFN γ and CCL22 have been detected in higher concentration [107]. Finally, a third hypothesis is that hormonal contraceptives use promotes genital herpes infection which is an important cofactor of HIV transmission

(see dedicated chapter) [112,113]. By using mouse models it was demonstrated that DMPA thins the epithelium and increases the vaginal expression of nectin 1, the primary receptor for HSV entry [114]. Another study suggests that hormonal contraception may facilitate HSV infection by interfering with soluble mucosal defense [115].

A better understanding of the role of hormonal contraception on HIV-1 transmission is of high importance to guide contraceptive policies in high-risk settings. New drugs are under evaluation in order to overcome the adverse effects of DMPA on female genital barrier.

4.2. Semen

During heterosexual intercourse with an HIV-1 seropositive male partner, female GEC are exposed to infected semen. It is largely admitted that semen is more than just a carrier of cell-free or cell-associated HIV particles and plays an active role in HIV-1 transmission. We will focus here only on the modulator role of semen on GEC behavior in the course of HIV-1 sexual transmission. Several reviews on the global influence of semen on HIV-1 transmission are already published [2,116-119].

Human semen is composed by an acellular fraction so called seminal plasma and cells, mainly represented by spermatozoa but also germ cells, leukocytes and epithelial cells. The seminal plasma is a complex fluid containing a broad array of molecules that regulate immune tolerance within the female genital tract in order to facilitate fertilization. Seminal plasma elicits cytokine production of IL-6, IL-8, GM-CSF, CCL2 and CCL20 by GEC through the activation of the NF- κ B pathways [118,120-122]. Semen also stimulates the expression of COX-2, the rate-limiting enzyme for prostanoid synthesis, in vaginal cells [123]. Thus, female genital tract response to semen results in local inflammation and recruitment of activated HIV target cells that can lead to an increased risk of HIV-1 infection. Moreover, GEC responses to seminal plasma can activate HIV-1 LTR in CD4⁺ T cells affecting viral local replication [124].

Semen is also known to be an alkaline fluid that raises the acidic pH of healthy vaginal secretions for several hours after semen deposition. This phenomenon impairs the direct inactivation of virus particles by acidic environment [125,126] and weakens the action of mucus [48,127].

Finally, it has been demonstrated that semen is able to modulate mucosal crossing of HIV-1. The binding of seminal complement components to virus particles may increase the infection rate of colorectal epithelial cells [128]. However, this mechanism has not been investigated using female genital cells. At the opposite, semen seems to play a protective role by increasing the genital epithelial tightness leading to a reduction of the transmigration faculty of HIV-1 infected leukocytes [129]. HIV-1 epithelial crossing may also be influenced by another factor identified as SEVI (semen-derived enhancer of virus). SEVI is a peptide fragment of the abundant seminal protein prostatic acid phosphatase that forms amyloid fibrils in the seminal plasma [130,131]. SEVI fibrils appears to serve as a polycationic bridge that neutralizes negative charges between HIV-1 virions and target cells facilitating viral envelope

attachment and fusion [132,133]. In particular, it has been recently described that SEVI enhance HIV-1 infection of cervical epithelial cells [12]. A recent study suggests that the role of SEVI is dependent on the anatomical context. Allen *et al.* found that SEVI binds and sequesters more virions at the luminal surface of the stratified squamous epithelium than in the simple columnar epithelium [134]. However, controversial data were recently reported in rhesus macaques. In this model, no significant enhancement of SIV transmission mediated by either SEVI or seminal plasma was observed [135].

Thus, semen appears to be largely able to influence GEC behavior in ways that both mediate enhancement and inhibition of HIV-1 infection and transmission. Further animal *in vivo* studies are needed to better define the global role of semen in HIV-1 sexual transmission.

4.3. Vaginal Microbiome and STD Agents

4.3.1. Vaginal Microbiome

The lower female genital tract is colonized by commensal bacteria that can affect the local immune response. In healthy reproductive-age women, the genital microbiota is dominated by *Lactobacilli* species which interact with the glycolipid receptors of epithelial cells *via* their pili [136,137]. *Lactobacilli* produce large amounts of lactic acid that create an acidic environment preventing colonization by pathogens and potentially inhibit HIV-1 [138,139]. *Lactobacilli* may also contribute to the health of the vagina by producing H₂O₂, that displays *in vitro* virucidal activity, and by competing against pathogenic microorganisms [140]. Disequilibrium in the microbiota has been associated with increased risks of HIV and other STD acquisition [141-144]. In particular, bacterial vaginosis may influence HIV transmission, because of the replacement of the vaginal *Lactobacilli* by bacteria such as *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* or *peptostreptococcus* species [145,146]. It was hypothesized that increased risk of HIV-1 acquisition in the presence of bacterial vaginosis may be explained by the reduction of *Lactobacilli* in the vaginal microflora and consequently of hydrogen peroxide production [147]. However, other studies also indicated that the production of hydrogen peroxide by *Lactobacilli* is dramatically decreased under the hypoxic environment of the vagina and that both vaginal secretions and seminal plasma have a potent antioxidant activity against hydrogen peroxide, abolishing pathogens inactivation [148]. Furthermore, bacterial vaginosis induces the production of IL-1 β , IL-8, TNF- α and CCL20 as well as human defensin 5 and decrease SLPI secretion [149-154]. As a whole, bacterial vaginosis probably predisposes women to HIV-1 infection by inducing a pro-inflammatory reaction in the cervicovaginal mucosa, that favors the recruitment of activated target cells, suppresses the mucosal innate immunity, weakens the epithelial barrier and annihilates the protective effect of normal vaginal pH and microflora [116].

4.3.2. Co-Infections by Other STD Agents

Sexually transmitted diseases are associated with an increased risk for HIV-1 infection [155,156]. An increased risk of HIV-1 acquisition was estimated to sevenfold and

threefold in case of concomitant ulcerative genital diseases or cervicitis/urethritis, respectively [157]. Ulcerative sexually transmitted diseases obviously influence HIV-1 transmission as they cause physical breaches in the mucosal barrier and subsequent local inflammation [158]. However, non-ulcerative infections may also degrade the quality of the mucosal barrier. Notably, *C. trachomatis* may disrupt N-cadherin dependent cell junctions, sequester β -catenin [159] and down regulate the expression of nectin-1 [160,161] leading to a decrease of the epithelium tightness. *C. trachomatis* infection also promote the over expression of the GalCer HIV-1 receptor and CXCR4 and CCR5 co-receptors at the surface of GEC facilitating HIV-1 particles binding on cells [162]. *N. Gonorrhoeae* triggers IL-8, IL6 and ICAM1 up regulation by GEC that may favor HIV-1 infection [147].

A symptomatic or asymptomatic HSV-2 infection, increases the relative risk for HIV-1 acquisition by threefold in both men and women because of epithelial damaging and immune activation [163]. Genital epithelial cells infected by HSV-2 release HMGB1, a soluble factor that contribute to HIV-1 activation [164-166]. Additionally, HSV-1 and 2 down regulate SLPI secretion [167]. This down regulation overcomes the antiviral activity of SLPI in mucosal secretion and is associated with an activation of NF κ B signaling pathways and an up regulation of proinflammatory cytokines. Finally, in response to HSV-1/2 and *N. Gonorrhoea* infection, GEC secrete immune factors that could indirectly activate the HIV LTR by NF κ B and AP-1 dependent pathways.

In conclusion, STD agents greatly influence HIV-1 transmission notably by affecting the epithelial barrier integrity, modulating the HIV-1 epithelial crossing and stimulating the secretion of soluble factors that induce local inflammation favoring recruitment of HIV-1 target cells. These observations underline the importance to include STD agents treatment in the global HIV-1 prevention strategy [168].

The development of other preventive strategies against HIV-1 such as protective vaccine and pre-exposure prophylaxis (by oral or mucosal route) is also of high importance.

5. DEVELOPMENT OF MICROBICIDES: GEC IN THE HEART OF PREVENTING STRATEGIES

Microbicides are compounds that can be applied at the vaginal or rectal surface in order to protect against STD including HIV. They can be formulated as gels, creams, films, rings or suppositories. In order to be efficient, these compounds must (i) not modify the barrier integrity and/or enhance local inflammation; (ii) preserve innate immunity and (iii) avoid inducing anti-retroviral resistance. Several clinical trials evaluating the protective effect against HIV transmission of compounds like detergents, surfactants or polyanionic compounds have failed, mainly because of their proinflammatory properties and their toxic effect on epithelial cells [169,170]. The encouraging success of the phase II clinical trial CAPRISA 004 using tenofovir-based gel to prevent man-to-woman HIV transmission showed that antiretroviral drugs can be used as effective topical

microbicides [171]. However, more recent failures in other antiretroviral microbicide clinical trials, such as the Vaginal and Oral Interventions to Control the Epidemic (VOICE) study [172-174], suggest that improvements are needed in the field of microbicides-based strategies development. Performant animal models providing efficacy and pharmacologic information have been developed and will help to progress in the field of microbicides development [175-179].

CONCLUSION

More than thirty years after the beginning of HIV epidemic, heterosexual intercourse remains the main route of HIV transmission. In the past years, major scientific advances have been obtained leading to a better understanding of HIV mucosal transmission mechanisms. This very complex phenomenon depends on numerous parameters influencing the mono and/or multilayer mucosal barrier crossing by HIV. At this level, epithelial cells play a pivotal and ambivalent role as they offer an effective but not perfect protection against HIV-1 infection. However, further studies are needed to better define the respective role of factors involved in the cross-talk between GEC and HIV immune target cells, in order to develop more effective and safe microbicides-based preventive strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Great thanks to SIDACTION and ARC I santé for their financial support.

Thanks to The Servier Medical Art for providing image database.

REFERENCES

- [1] UNAIDS. Epi slides. AIDS epidemic update. Available at <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/>; 2014.
- [2] Southern PJ. Missing out on the biology of heterosexual HIV-1 transmission. *Trends Microbiol* 2013; 21: 245-52.
- [3] Milma G, Sharma O. Mechanisms of HIV/SIV Mucosal Transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; Volume 10.
- [4] Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* 2009; 6: 20-8.
- [5] Shattock RJ, Griffin GE, Gorodeski GI. *In vitro* models of mucosal HIV transmission. *Nat Med* 2000; 6: 607-607.
- [6] Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 25-34.
- [7] Stieh DJ, Maric D, Kelley ZL, *et al*. Vaginal Challenge with an SIV-Based Dual Reporter System Reveals That Infection Can Occur throughout the Upper and Lower Female Reproductive Tract. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004440.
- [8] Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, *et al*. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol* 2007; 81: 395-405.
- [9] Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997; 3: 42-7.
- [10] Hocini H, Becquart P, Bouhlal H, *et al*. Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J Virol* 2001; 75: 5370-4.
- [11] Wu L. Biology of HIV mucosal transmission. *Curr Opin HIV AIDS* 2008; 3: 534-40.
- [12] Micsenyi AM, Zony C, Alvarez RA, Durham ND, Chen BK, Klotman ME. Postintegration HIV-1 infection of cervical epithelial cells mediates contact-dependent productive infection of T cells. *J Infect Dis* 2013; 208: 1756-67.
- [13] Asin SN, Fanger MW, Wildt-Perinic D, Ware PL, Wira CR, Howell AL. Transmission of HIV-1 by Primary Human Uterine Epithelial Cells and Stromal Fibroblasts. *J Infect Dis* 2004; 190: 236-45.
- [14] Howell AL, Edkins RD, Rier SE, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J Virol* 1997; 71: 3498-506.
- [15] Tan X, Phillips DM. Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. *Arch Virol* 1996; 141: 1177-89.
- [16] Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, *et al*. Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity* 2007; 26: 257-70.
- [17] Gupta P, Collins KB, Ratner D, *et al*. Memory CD4+ T Cells Are the Earliest Detectable Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Cells in the Female Genital Mucosal Tissue during HIV-1 Transmission in an Organ Culture System. *J Virol* 2002; 76: 9868-76.
- [18] Dezzutti CS, Russo J, Wang L, *et al*. Development of HIV-1 Rectal-Specific Microbicides and Colonic Tissue Evaluation. *PLoS ONE*, 2014; 9: e102585.
- [19] Kohli A, Islam A, Moyes DL, Murciano C, *et al*. Oral and Vaginal Epithelial Cell Lines Bind and Transfer Cell-Free Infectious HIV-1 to Permissive Cells but Are Not Productively Infected. *PLoS ONE* 2014; 9: e98077.
- [20] Berlier W, Bourlet T, Lawrence P, *et al*. Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* 2005; 77: 465-74.
- [21] Yeaman GR, Howell AL, Weldon S, *et al*. Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. *Immunology* 2003; 109: 137-46.
- [22] Stoddard E, Cannon G, Ni H, *et al*. gp340 Expressed on Human Genital Epithelia Binds HIV-1 Envelope Protein and Facilitates Viral Transmission. *J Immunol* 2007; 179: 3126-32.
- [23] Stoddard E, Ni H, Cannon G, Zhou C, *et al*. gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue. *J Virol* 2009; 83: 8596-603.
- [24] Dezzutti CS, Guenther PC, Cummins JE, *et al*. Cervical and Prostate Primary Epithelial Cells Are Not Productively Infected but Sequester Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis* 2001; 183: 1204-13.
- [25] Wu Z, Chen Z, Phillips DM. Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis* 2003; 188: 1473-82.
- [26] Furuta Y, Eriksson K, Svennerholm B, *et al*. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12559-63.
- [27] Iversen AK, Larsen AR, Jensen T, *et al*. Distinct determinants of human immunodeficiency virus type 1 RNA and DNA loads in vaginal and cervical secretions. *J Infect Dis* 1998; 177: 1214-20.
- [28] Tan X, Phillips DM. CAT-transfected epithelial cells provide evidence for a CD4 independent pathway of HIV infection. *J Reprod Immunol* 1998; 41: 307-19.
- [29] Greenhead P, Hayes P, Watts PS, Laing KG, Griffin GE, Shattock RJ. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J Virol* 2000; 74: 5577-86.
- [30] Spira AI, Marx PA, Patterson BK, *et al*. Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* 1996; 183: 215-25.
- [31] Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 447-57.
- [32] Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl 3: S448-53.

- [33] Gupta S, Gach JS, Becerra JC, *et al.* The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transcytosis across Epithelial Cells. *PLoS Pathog* 2013; 9.
- [34] Carias A, McCoombe S, McRaven M, *et al.* Defining the Interaction of HIV-1 with the Mucosal Barriers of the Female Reproductive Tract. *J Virol* 2013.
- [35] Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, *et al.* Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation. *PLoS Pathog* 2010; 6.
- [36] Fanibunda SE, Modi DN, Gokral JS, Bandivdekar AH. HIV gp120 Binds to Mannose Receptor on Vaginal Epithelial Cells and Induces Production of Matrix Metalloproteinases. *PLoS ONE* 2011; 6: e28014.
- [37] Carreno M-P, Krieff C, Irinopoulou T, Kazatchkine MD, Belec L. Enhanced transcytosis of R5-tropic human immunodeficiency virus across tight monolayer of polarized human endometrial cells under pro-inflammatory conditions. *Cytokine* 2002; 20: 289-94.
- [38] Andersen JM, Al-Khairy D, Ingalls RR. Innate Immunity at the Mucosal Surface: Role of Toll-Like Receptor 3 and Toll-Like Receptor 9 in Cervical Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Biol Reprod* 2006; 74: 824-31.
- [39] Creml M, Hamzeh-Cognasse H, Genin C, Delézay O. Female genital tract immunization: evaluation of candidate immunoadjuvants on epithelial cell secretion of CCL20 and dendritic/Langerhans cell maturation. *Vaccine* 2006; 24: 5744-54.
- [40] Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod* 2005; 20: 1372-8.
- [41] Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol Baltim Md 1950* 2002; 168: 2424-32.
- [42] Hart KM, Murphy AJ, Barrett KT, Wira CR, Guyre PM, Pioli PA. Functional Expression of Pattern Recognition Receptors in Tissues of the Human Female Reproductive Tract. *J Reprod Immunol* 2009; 80: 33-40.
- [43] Herbst-Kralovetz MM, Quayle AJ, Ficarra M, *et al.* Quantification and Comparison of Toll-Like Receptor Expression and Responsiveness in Primary and Immortalized Human Female Lower Genital Tract Epithelia. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 212-24.
- [44] Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, Connolly JE, Wira CR, Guyre PM. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infect Immun* 2004; 72: 5799-806.
- [45] Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL, Misfeldt ML. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am J Reprod Immunol N Y N 1989* 2004; 52: 67-73.
- [46] Sathe A, Reddy KVR. TLR9 and RIG-I Signaling in Human Endocervical Epithelial Cells Modulates Inflammatory Responses of Macrophages and Dendritic Cells *In Vitro*. *PLoS ONE* 2014; 9: e83882.
- [47] Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 183-97.
- [48] Shukair SA, Allen SA, Cianci GC, Stieh DJ, Anderson MR, Baig SM, *et al.* Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal Immunol* 2013; 6: 427-34.
- [49] Miller CJ, Li Q, Abel K, *et al.* Propagation and Dissemination of Infection after Vaginal Transmission of Simian Immunodeficiency Virus. *J Virol* 2005; 79: 9217-27.
- [50] Audie J-P, Tetaert D, Pigny P, *et al.* Mucin gene expression in the human endocervix. *Hum Reprod* 1995; 10: 98-102.
- [51] Cole AM, Cole AL. Antimicrobial Polypeptides are Key Anti-HIV-1 Effector Molecules of Cervicovaginal Host Defense. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 27-34.
- [52] Levinson P, Kaul R, Kimani J, *et al.* Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS Lond Engl* 2009; 23: 309-17.
- [53] Simhan HN, Anderson BL, Krohn MA, *et al.* Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 59.e1-5.
- [54] Valore EV, Wiley DJ, Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infect Immun* 2006; 74: 5693-702.
- [55] Wiesenfeld HC, Heine RP, Krohn MA, *et al.* Association between elevated neutrophil defensin levels and endometritis. *J Infect Dis* 2002; 186: 792-7.
- [56] Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Söderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res* 2007; 5: 410-5.
- [57] Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, *et al.* Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host Microbe* 2013; 13: 77-86.
- [58] Wang G, Watson KM, Buckheit RW. Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activities of Antimicrobial Peptides Derived from Human and Bovine Cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3438-40.
- [59] Wong JH, Legowska A, Rolka K, *et al.* Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides* 2011; 32: 1117-22.
- [60] Furci L, Tolazzi M, Sironi F, Vassena L, Lusso P. Inhibition of HIV-1 infection by human α -defensin-5, a natural antimicrobial peptide expressed in the genital and intestinal mucosae. *PLoS One* 2012; 7: e45208.
- [61] Rapista A, Ding J, Benito B, *et al.* Human defensins 5 and 6 enhance HIV-1 infectivity through promoting HIV attachment. *Retrovirology* 2011; 8: 45.
- [62] Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* 2005; 20: 1439-46.
- [63] Agace WW, Amara A, Roberts AI, *et al.* Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol CB* 2000; 10: 325-8.
- [64] Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8+ T Cells. *Science* 1995; 270: 1811-5.
- [65] Joseph T, Zalenskaya IA, Yousefieh N, *et al.* Induction of Cyclooxygenase (COX)-2 in Human Vaginal Epithelial Cells in Response to TLR ligands and TNF- α . *Am J Reprod Immunol* 2012; 67: 482-90.
- [66] Nazli A, Kafka JK, Ferreira VH, *et al.* HIV-1 gp120 Induces TLR2- and TLR4-Mediated Innate Immune Activation in Human Female Genital Epithelium. *J Immunol Baltim Md 1950* 2013.
- [67] Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* 2004; 112: 428-36.
- [68] Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 753-77.
- [69] Rollenhagen C, Asin SN. Enhanced HIV-1 replication in ex vivo ectocervical tissues from post-menopausal women correlates with increased inflammatory responses. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 671-81.
- [70] Abel K, Rocke DM, Chohan B, Fritts L, Miller CJ. Temporal and Anatomic Relationship between Virus Replication and Cytokine Gene Expression after Vaginal Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* 2005; 79: 12164-72.
- [71] Ghosh M, Shen Z, Schaefer TM, Fahey JV, Gupta P, Wira CR. CCL20/MIP3 α is a Novel Anti-HIV-1 Molecule of the Human Female Reproductive Tract. *Am J Reprod Immunol* 2009; 62: 60-71.
- [72] Fontenot D, He H, Hanabuchi S, *et al.* TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 16776-81.
- [73] Carthagen L, Becquart P, Hocini H, Kazatchkine MD, Boulhal H, Belec L. Modulation of HIV Binding to Epithelial Cells and HIV Transfer from Immature Dendritic Cells to CD4 T Lymphocytes by Human Lactoferrin and its Major Exposed LF-33 Peptide. *Open Virol J* 2011; 5: 27-34.
- [74] Saidi H, Eslaphazir J, Carbonneil C, *et al.* Differential Modulation of Human Lactoferrin Activity against Both R5 and X4-HIV-1 Adsorption on Epithelial Cells and Dendritic Cells by Natural Antibodies. *J Immunol* 2006; 177: 5540-9.
- [75] Aboud L, Ball TB, Tjernlund A, Burgener A. The Role of Serpin and Cystatin Antiproteases in Mucosal Innate Immunity and their Defense against HIV. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71: 12-23.

- [76] Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, *et al.* Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Binds to Annexin II, a Cofactor for Macrophage HIV-1 Infection. *J Exp Med* 2004; 200: 1337-46.
- [77] Drannik AG, Nag K, Yao X-D, *et al.* Anti-HIV-1 activity of elafin is more potent than its precursor's, trappin-2, in genital epithelial cells. *J Virol* 2012; 86: 4599-610.
- [78] Drannik AG, Nag K, Yao X-D, Henrick BM, Sallenave J-M, Rosenthal KL. Trappin-2/Elafin Modulate Innate Immune Responses of Human Endometrial Epithelial Cells to PolyI:C. *PLoS ONE* 2012; 7: e35866.
- [79] Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006; 177: 782-6.
- [80] Klotman ME, Chang TL. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 447-56.
- [81] Li Q, Estes JD, Schlievert PM, *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 2009; 458: 1034-8.
- [82] Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 217-30.
- [83] Wira CR, Fahey JV. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *AIDS Lond Engl* 2008; 22: 1909-17.
- [84] Ochiel DO, Rossoll RM, Schaefer TM, Wira CR. Effect of oestradiol and pathogen-associated molecular patterns on class II-mediated antigen presentation and immunomodulatory molecule expression in the mouse female reproductive tract. *Immunology* 2012; 135: 51-62.
- [85] Grant-Tschudy KS, Wira CR. Effect of Estradiol on Mouse Uterine Epithelial Cell Transepithelial Resistance (TER). *Am J Reprod Immunol* 2004; 52: 252-62.
- [86] Venkataraman N, Cole AL, Svoboda P, Pohl J, Cole AM. Cationic Polypeptides Are Required for Anti-HIV-1 Activity of Human Vaginal Fluid. *J Immunol* 2005; 175: 7560-7.
- [87] Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, *et al.* TGF-beta 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells *via* chemokine receptors. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000; 164: 2285-95.
- [88] De Saint Jean A, Lucht F, Bourlet T, Delézay O. Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission. *AIDS* 2014; 28: 2375-80.
- [89] Fahey JV, Wright JA, Shen L, *et al.* Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 317-25.
- [90] Fahey JV, Wira CR. Effect of Menstrual Status on Antibacterial Activity and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Production by Human Uterine Epithelial Cells in Culture. *J Infect Dis* 2002; 185: 1606-13.
- [91] Grant-Tschudy KS, Wira CR. Effect of oestradiol on mouse uterine epithelial cell tumour necrosis factor- α release is mediated through uterine stromal cells. *Immunology* 2005; 115: 99-107.
- [92] Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 544-65.
- [93] Patel MV, Fahey JV, Rossoll RM, Wira CR. Innate immunity in the vagina (part I): estradiol inhibits HBD2 and elafin secretion by human vaginal epithelial cells. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2013; 69: 463-74.
- [94] Morrison CS, Chen P-L, Kwok C, *et al.* Hormonal Contraception and the Risk of HIV Acquisition: An Individual Participant Data Meta-analysis. *PLoS Med* 2015; 12: e1001778.
- [95] Polis CB, Phillips SJ, Curtis KM, *et al.* Hormonal contraceptive methods and risk of HIV acquisition in women: a systematic review of epidemiological evidence. *Contraception* 2014; 90: 360-90.
- [96] Heffron R, Donnell D, Rees H, *et al.* Use of hormonal contraceptives and risk of HIV-1 transmission: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 19-26.
- [97] Ralph LJ, McCoy SI, Shiu K, Padian NS. Hormonal contraceptive use and women's risk of HIV acquisition: a meta-analysis of observational studies. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 181-9.
- [98] Murphy K, Irvin SC, Herold BC. Research Gaps in Defining the Biological Link between HIV Risk and Hormonal Contraception. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2014; 72: 228-35.
- [99] Marx PA, Spira AI, Gettie A, *et al.* Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat Med* 1996; 2: 1084-9.
- [100] Vishwanathan SA, Guenther PC, Lin CY, *et al.* High Susceptibility to Repeated, Low-Dose, Vaginal SHIV Exposure Late in the Luteal Phase of the Menstrual Cycle of Pigtail Macaques: JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr 2011; 57: 261-4.
- [101] Mauck CK, Callahan MM, Baker J, *et al.* The effect of one injection of Depo-Provera on the human vaginal epithelium and cervical ectopy. *Contraception* 1999; 60: 15-24.
- [102] Bahamondes L, Trevisan M, Andrade L, *et al.* The effect upon the human vaginal histology of the long-term use of the injectable contraceptive Depo-Provera®. *Contraception* 2000; 62: 23-7.
- [103] Bahamondes MV, Castro S, Marchi NM, *et al.* Human vaginal histology in long-term users of the injectable contraceptive depot-medroxyprogesterone acetate. *Contraception* 2014; 90: 117-22.
- [104] Mitchell CM, McLemore L, Westerberg K, *et al.* Long-term Effect of Depot Medroxyprogesterone Acetate on Vaginal Microbiota, Epithelial Thickness and HIV Target Cells. *J Infect Dis* 2014; 210: 651-5.
- [105] Tjernlund A, Carias AM, Andersson S, *et al.* Progesterone-Based Intrauterine Device Use Is Associated with a Thinner Zonal Layer of the Human Ectocervical Epithelium and a Lower ZO-1 mRNA Expression. *Biol Reprod* 2015; biolreprod.114.122887.
- [106] Chappell CA, Rohan LC, Moncla BJ, Wang L, Meyn LA, Bunge K, *et al.* The Effects of Reproductive Hormones on the Physical Properties of Cervicovaginal Fluid. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 211: 226.e1-226.e7.
- [107] Goode D, Aravantinou M, Jarl S, *et al.* Sex Hormones Selectively Impact the Endocervical Mucosal Microenvironment: Implications for HIV Transmission. *PLoS ONE* 2014; 9: e97767.
- [108] Ferreira VH, Nazli A, Kafka JK, *et al.* Medroxyprogesterone Acetate Enhances HIV-1 Uptake and Transcytosis, but not Replication, in Primary Human Genital Epithelial Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014; 30: A53-4.
- [109] Africander D, Louw R, Verhoog N, Noeth D, Haggood JP. Differential regulation of endogenous pro-inflammatory cytokine genes by medroxyprogesterone acetate and norethisterone acetate in cell lines of the female genital tract. *Contraception* 2011; 84: 423-35.
- [110] Li A, Felix JC, Yang W, Jain JK. Effect of mifepristone on the expression of endometrial secretory leukocyte protease inhibitor in new medroxyprogesterone acetate users. *Fertil Steril* 2008; 90: 872-5.
- [111] Fleming DC, King AE, Williams ARW, Critchley HOD, Kelly RW. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 79: 856-63.
- [112] Smith JS, Herrero R, Muñoz N, *et al.* Prevalence and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among middle-age women in Brazil and the Philippines. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 187-94.
- [113] Chernes TL, Marrazzo JM, Cosentino LA, Meyn LA, Murray PJ, Hillier SL. Hormonal contraceptive use modulates the local inflammatory response to bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2008; 84: 57-61.
- [114] Linehan MM, Richman S, Krummenacher C, Eisenberg RJ, Cohen GH, Iwasaki A. *In Vivo* Role of Nectin-1 in Entry of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) and HSV-2 through the Vaginal Mucosa. *J Virol* 2004; 78: 2530-6.
- [115] Shust GF, Cho S, Kim M, *et al.* Female Genital Tract Secretions Inhibit Herpes Simplex Virus Infection: Correlation with Soluble Mucosal Immune Mediators and Impact of Hormonal Contraception. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 110-9.
- [116] Doncel GF, Joseph T, Thurman AR. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? *Am J Reprod Immunol* 2011; 65: 292-301.
- [117] Doncel GF, Anderson S, Zalenskaya I. Role of Semen in Modulating the Female Genital Tract Microenvironment - Implications for HIV Transmission. *Am J Reprod Immunol* 2014 2014; 71: 564-74.
- [118] Rametse CL, Olivier AJ, Masson L, Barnabas S, McKinnon LR, Ngcapu S, *et al.* Role of Semen in Altering the Balance Between

- Inflammation and Tolerance in the Female Genital Tract: Does it Contribute to HIV Risk? *Viral Immunol* 2014; 27: 200-6.
- [119] Sabatté J, Lenciov FR, Cabrini M, *et al.* The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. *Microbes Infect* 2011; 13: 977-82.
- [120] Berlier W, Cremel M, Hamzeh H, *et al.* Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells *via* the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum Reprod* 2006; 21: 1135-42.
- [121] Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J Immunol Baltim Md* 1950 2012; 188: 2445-54.
- [122] Lourenço AG, Komesu MC, Machado AA, *et al.* Semen lactoferrin promotes CCL20 production by epithelial cells: Involvement in HIV transmission. *World J Virol* 2014; 3: 11-7.
- [123] Joseph T, Zalenskaya IA, Sawyer LC, Chandra N, Doncel GF. Seminal Plasma Induces Prostaglandin-Endoperoxide Synthase (PTGS) 2 Expression in Immortalized Human Vaginal Cells: Involvement of Semen Prostaglandin E2 in PTGS2 Upregulation. *Biol Reprod* 2013; 88: 13.
- [124] Kafka JK, Sheth PM, Nazli A, *et al.* Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat. *AIDS Lond Engl* 2012; 26: 27-36.
- [125] Bouvet J-P, Grésenguet G, Bélec L. Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 19-23.
- [126] Ongradi J, Ceccherini-Nelli L, Pistello M, Specter S, Bendinelli M. Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1: clinical implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6: 1433-6.
- [127] Lai SK, Hida K, Shukair S, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J Virol* 2009; 83: 11196-200
- [128] Bouhlal H, Chomont N, Haeflner-Cavaillon N, Kazatchkine MD, Belec L, Hocini H. Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2002; 169: 3301-6.
- [129] Lawrence P, Portran D, Terrasse R, *et al.* Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. *AIDS Lond Engl* 2012; 26: 785-96.
- [130] Olsen JS, DiMaio JTM, Doran TM, Brown C, Nilsson BL, Dewhurst S. Seminal plasma accelerates semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) fibril formation by the prostatic acid phosphatase (PAP248-286) peptide. *J Biol Chem* 2012; 287: 11842-9.
- [131] Kim K-A, Yolamanova M, Zirafi O, *et al.* Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 2010; 7: 55.
- [132] Münch J, Rücker E, Ständker L, Ademann K, Goffinet C, Schindler M, *et al.* Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 2007; 131: 1059-71.
- [133] Roan NR, Chu S, Liu H, Neidleman HJ, Witkowska HE, Greene WC. The interaction of fibronectin with semen amyloids synergistically enhances HIV infection. *J Infect Dis* 2014; jiu220.
- [134] Allen SA, Carias AM, Anderson MR, *et al.* Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues. *J Virol* 2015; 89: 5569-80.
- [135] Münch J, Sauermaun U, Yolamanova M, Raue K, Stahl-Hennig C, Kirchhoff F. Effect of semen and seminal amyloid on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Retrovirology* 2013; 10: 148.
- [136] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 2006; 124: 837-48.
- [137] Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1230: 48-58.
- [138] Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard M, *et al.* The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 2011; 65: 190-5.
- [139] Aldunate M, Tyssen D, Johnson A, *et al.* Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2015-25.
- [140] Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of Lactobacillus acidophilus on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J Exp Med* 1991; 174: 289-92.
- [141] Sharma H, Tal R, Clark NA, Segars JH. Microbiota and Pelvic Inflammatory Disease. *Semin Reprod Med* 2014; 32: 43-9.
- [142] Mirmonsef P, Spear GT. The Barrier to HIV Transmission Provided by Genital Tract Lactobacillus Colonization. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71: 531-6.
- [143] Borgdorff H, Tsvitivadze E, Verhelst R, *et al.* Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J* 2014; 8: 1781-93.
- [144] Petrova MI, Broek M van den, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 762-92.
- [145] Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, *et al.* Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999; 180: 1863-8.
- [146] Taha TE, Hoover DR, Dallabetta GA, *et al.* Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS Lond Engl* 1998; 12: 1699-706.
- [147] Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, Genco CA. Distinct Proinflammatory Host Responses to Neisseria gonorrhoeae Infection in Immortalized Human Cervical and Vaginal Epithelial Cells. *Infect Immun* 2001; 69: 5840-8.
- [148] O'Hanlon DE, Lanier BR, Moeckel TR, Cone RA. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 120.
- [149] Fan SR, Liu XP, Liao QP. Human defensins and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis. *Int J Gynecol Obstet* 2008; 103: 50-4.
- [150] Cauci S, Culhane JF. Modulation of vaginal immune response among pregnant women with bacterial vaginosis by Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and yeast. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 133.e1-7.
- [151] Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, Costello CE, Hayes GR, Lucas JJ, *et al.* Trichomonas vaginalis lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun* 2006; 74: 5773-9.
- [152] Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwelbe JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 2006; 193: 556-62.
- [153] Sturm-Ramirez K, Gaye-Diallo A, Eisen G, Mboup S, Kanki PJ. High levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in bacterial vaginosis may increase susceptibility to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2000; 182: 467-73.
- [154] Novak RM, Donoval BA, Graham PJ, *et al.* Cervicovaginal Levels of Lactoferrin, Secretory Leukocyte Protease Inhibitor, and RANTES and the Effects of Coexisting Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Seronegative Women with a High Risk of Heterosexual Acquisition of HIV Infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1102-7.
- [155] Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 1999; 75: 3-17.
- [156] Sexton J, Garnett G, Röttingen J-A. Metaanalysis and meta-regression in interpreting study variability in the impact of sexually transmitted diseases on susceptibility to HIV infection. *Sex Transm Dis* 2005; 32: 351-7.
- [157] Mehendale SM, Rodrigues JJ, Brookmeyer RS, *et al.* Incidence and Predictors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Seroconversion in Patients Attending Sexually Transmitted Disease Clinics in India. *J Infect Dis* 1995; 172: 1486-91.
- [158] Horbul JE, Schmechel SC, Miller BRL, Rice SA, Southern PJ. Herpes Simplex Virus-Induced Epithelial Damage and Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Human Cervical Organ Culture. *PLoS ONE* 2011; 6.
- [159] Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, Pearson CA, Sigar I, Ramsey KH. Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. *Infect Immun* 2002; 70: 2605-13.
- [160] Sun J, Schoborg RV. The host adherens junction molecule nectin-1 is degraded by chlamydial protease-like activity factor (CPAF) in

- Chlamydia trachomatis-infected genital epithelial cells. *Microbes Infect Inst Pasteur* 2009; 11: 12-9.
- [161] Sun J, Kintner J, Schoborg RV. The host adherens junction molecule nectin-1 is downregulated in Chlamydia trachomatis-infected genital epithelial cells. *Microbiol Read Engl* 2008; 154: 1290-9.
- [162] Schust DJ, Ibane JA, Buckner LR, *et al.* Potential mechanisms for increased HIV-1 transmission across the endocervical epithelium during *C. trachomatis* infection. *Curr HIV Res* 2012; 10: 218-27.
- [163] Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS Lond Engl* 2006; 20: 73-83.
- [164] Nowak P, Barqasho B, Treutiger CJ, *et al.* HMGB1 activates replication of latent HIV-1 in a monocytic cell-line, but inhibits HIV-1 replication in primary macrophages. *Cytokine* 2006; 34: 17-23.
- [165] Thierry S, Gozlan J, Jaumes A, *et al.* High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *AIDS Lond Engl* 2007; 21: 283-92.
- [166] Borde C, Barnay-Verdier S, Gaillard C, Hocini H, Maréchal V, Gozlan J. Stepwise Release of Biologically Active HMGB1 during HSV-2 Infection. *PLoS ONE* 2011; 6.
- [167] Fakioglu E, Wilson SS, Mesquita PMM, *et al.* Herpes Simplex Virus Downregulates Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: a Novel Immune Evasion Mechanism. *J Virol* 2008; 82: 9337-44.
- [168] Hayes RJ, Watson-Jones D, Celum C, van de Wijgert J, Wasserheit J. Treatment of sexually transmitted infections for hiv prevention: end of the road or new beginning? *AIDS Lond Engl* 2010; 24.
- [169] Van Damme L, Ramjee G, Alary M, *et al.* Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 971-7.
- [170] Fichorova RN, Tucker LD, Anderson DJ. The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 2001; 184: 418-28.
- [171] Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 2010; 329: 1168-74.
- [172] MTN, microbicide trials network. Microbicide Trials Network Statement on Decision to Discontinue Use of Tenofovir Gel in VOICE, a Major HIV Prevention Study in Women 2011.
- [173] Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, *et al.* Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med* 2015; 372: 509-18.
- [174] Van Damme L, Corneli A, Ahmed K, *et al.* Preexposure Prophylaxis for HIV Infection among African Women. *N Engl J Med* 2012; 367: 411-22.
- [175] Garcia-Lerma JG, Heneine W. Animal models of antiretroviral prophylaxis for HIV prevention. *Curr Opin HIV AIDS* 2012; 7: 505-13.
- [176] Parikh UM, Dobard C, Sharma S, *et al.* Complete Protection from Repeated Vaginal Simian-Human Immunodeficiency Virus Exposures in Macaques by a Topical Gel Containing Tenofovir Alone or with Emtricitabine. *J Virol* 2009; 83: 10358-65.
- [177] Tsegaye TS, Butler K, Luo W, *et al.* Repeated vaginal SHIV challenges in macaques receiving oral or topical Pre-Exposure Prophylaxis induce virus-specific T cell responses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2015.
- [178] Denton PW, Estes JD, Sun Z, *et al.* Antiretroviral Pre-exposure Prophylaxis Prevents Vaginal Transmission of HIV-1 in Humanized BLT Mice. *PLoS Med* 2008; 5: e16.
- [179] Cranage M, Sharpe S, Herrera C, *et al.* Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS Med* 2008; 5: e157; discussion e157.

Received: May 16, 2014

Revised: May 11, 2015

Accepted: June 23, 2015

C. Résultats

a. Cytotoxicité du plasma séminal et intégrité des épithéliums

Pour modéliser au mieux les épithéliums, des lignées CaCo-2 et HEC-1A ont été cultivées sur des inserts d'une porosité de 3µm permettant ainsi une séparation entre le compartiment apical et basal des cellules. L'impact d'une stimulation par du plasma séminal dilué au 1/10 sur l'étanchéité et l'intégrité des monocouches a été évalué. Pour cela, la résistance transépithéliale de la monocouche ainsi que la diffusion du dextran-fitc (4 kDa) à travers la monocouche ont été mesurées.

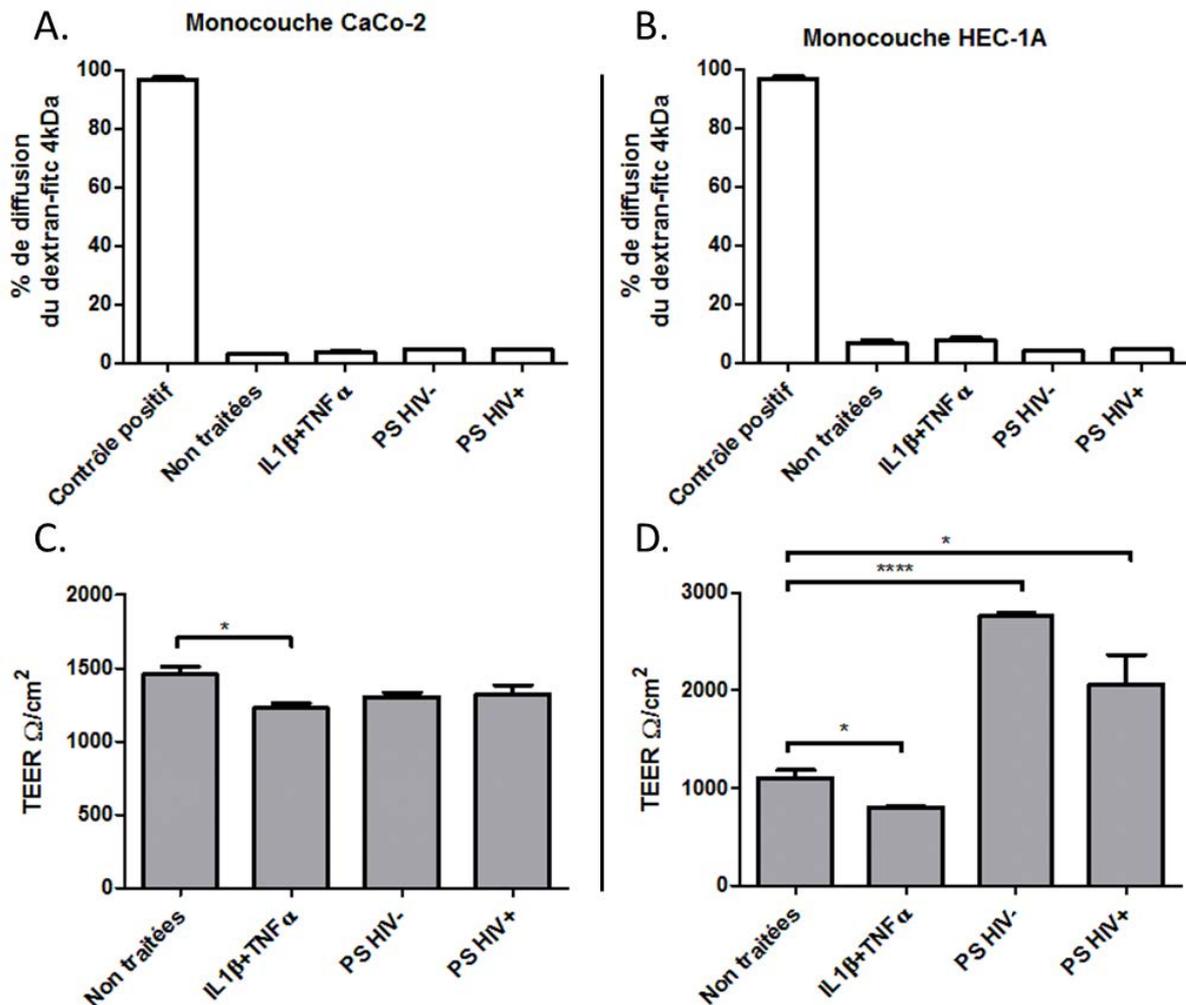


Figure 27 : Evaluation de l'étanchéité des monocouches cellulaires après contact avec du plasma séminal et des cytokines inflammatoires. Les cellules épithéliales ont été stimulées pendant 24h au niveau apical par des cytokines inflammatoires (100 ng/mL d'IL1-β et 50 ng/mL de TNF-α) ou des pools de plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ dilués au 1/10. La résistance trans-épithéliale (TEER) de la monocouche cellulaire (A-B) et la diffusion du dextran-fitc 4kDa (C-D) ont été mesurées (n=3). Les moyennes ±σ sont indiquées. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001 Contrôle positif : insert sans cellules.

Les résultats obtenus suggèrent que les différents traitements ne perturbent pas l'intégrité des monocouches, les taux de diffusion étant faibles et les TEER élevées (TEER > 1 000Ω/cm² pour les

cellules Caco-2 et $800 \Omega/\text{cm}^2$ pour les cellules HEC-1A, Figure 27). Cependant, des variations sont tout de même observables. Le pourcentage de diffusion du dextran-fitc 4kDa est de 3% pour les cellules CaCo-2 non traitées, 3,7% pour les cellules incubées en présence de cytokines proinflammatoires et enfin de 4,7% pour les cellules en présence de plasma séminal quel que soit le statut des donneurs. Dans le cas des cellules HEC-1A, le taux de diffusion est un peu plus important avec 6,5% pour les cellules non traitées, 7,9% pour les cellules traitées à l'IL1- β et au TNF- α et enfin 4 et 4,5% pour les cellules incubées en présence de plasma séminal VIH⁻ ou VIH⁺ ARV⁺ respectivement. Les taux de diffusion du dextran-fitc sont strictement corrélés aux variations de la résistance trans-épithéliale. Les cytokines proinflammatoires provoquent une diminution de la résistance trans-épithéliale pour les deux types d'épithéliums. La résistance trans-épithéliale diminue de $1\,460$ à $1\,228 \Omega/\text{cm}^2$ pour les cellules CaCo-2 et de $1\,104$ à $803 \Omega/\text{cm}^2$ pour les cellules HEC-1A. Le plasma séminal, qu'il provienne de donneurs VIH⁻ ou VIH⁺ ARV⁺, ne montre aucun effet significatif sur la monocouche de cellules CaCo-2, la TEER étant de $1\,460 \Omega/\text{cm}^2$ pour les cellules non traitées et de $1\,303$ et $1\,321$ pour les cellules traitées au plasma séminal VIH⁻ ou VIH⁺ ARV⁺. En revanche, une augmentation significative de la TEER est observée entre les cellules HEC-1A non traitées ($1\,104 \Omega/\text{cm}^2$) et celles incubées en présence de plasma séminal VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ ($2\,766 \Omega/\text{cm}^2$, $p < 0,0001$ et $2\,057 \Omega/\text{cm}^2$, $p < 0,05$ respectivement). Une cinétique de la mesure de la résistance trans-épithéliale des cellules HEC-1A (Figure 28) montre que l'effet du plasma séminal est rapide puisqu'il est observé dès 2h d'incubation alors que l'effet des cytokines inflammatoires n'est observé qu'au bout de 24h et n'est significatif qu'après 48h.

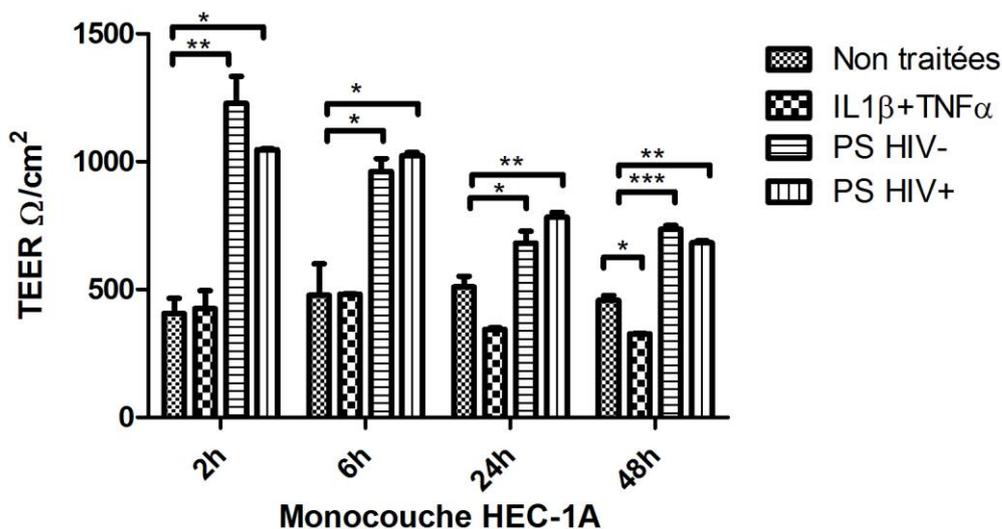


Figure 28 : Cinétique de mesure de la résistance trans-épithéliale d'une monocouche de cellules HEC-1A. Les cellules épithéliales ont été stimulées au niveau apical par des cytokines inflammatoires (100 ng/mL d'IL1- β et 50ng/mL de TNF- α) ou par des pools de plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ dilués au 1/10. La mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER) a été réalisée après 2h, 6h, 24h et 48h d'incubation. Les mesures ont été réalisées en duplicate. Les moyennes $\pm \sigma$ sont indiquées (n=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

b. Sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales

Le plasma séminal dilué au 1/10 n'altérant pas l'intégrité des monocouches de cellules épithéliales, cette dilution a été utilisée pour étudier la capacité de ce fluide à induire la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales. Ces dernières ont été stimulées au niveau apical par huit plasmas séminaux VIH⁻ et huit VIH⁺ ARV⁺ parmi ceux criblés dans la première partie. Après 24h d'incubation, la TEER est mesurée et les milieux basaux prélevés pour doser la concentration de quatre facteurs : le TGF- β 1, la TSLP, HMGB1 et le CCL20.

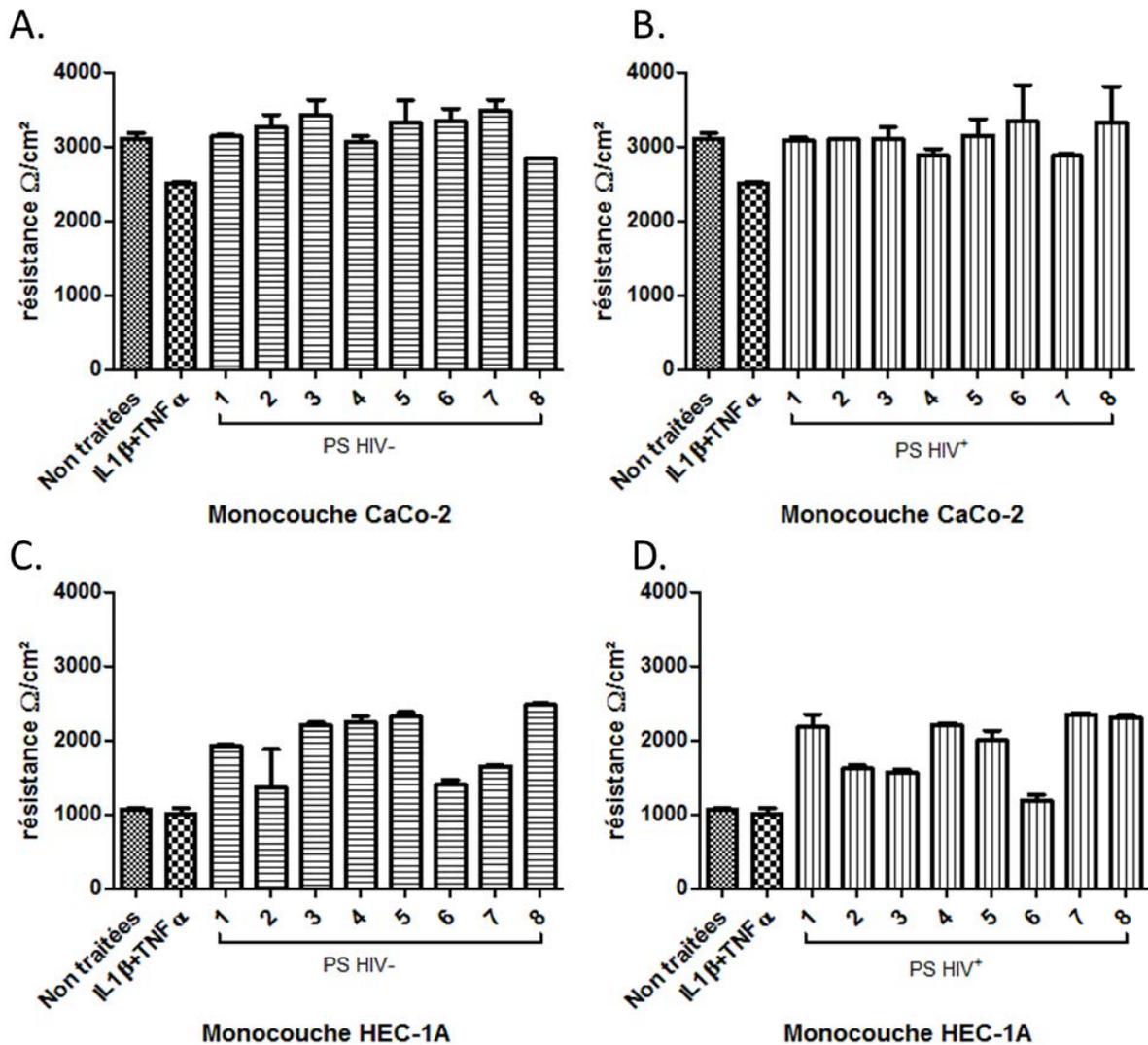


Figure 29 : Mesure de la résistance trans-épithéliale des monocouches de cellules CaCo-2 ou HEC-1A en présence de plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺. Les cellules épithéliales CaCo-2 et HEC-1A cultivées sur insert jusqu'à l'obtention d'une monocouche ont été incubées pendant 24h en présence de cytokines proinflammatoires (100 ng/mL d'IL1- β et 50ng/mL de TNF- α) ou de différents plasma séminaux VIH⁻ (A-C) ou VIH⁺ ARV⁺ (B-D) dilués au 1/10 au niveau du compartiment apical. Les moyennes $\pm \sigma$ sont indiquées (n=2).

Les différentes stimulations n'ont pas altéré l'intégrité des monocouches de cellules épithéliales (Figure 29). En raison du volume restreint des plasmas séminaux individuels, ces expériences n'ont

pu être réalisées qu'en duplicate. Aucun test statistique n'a donc été réalisé sur ces résultats. Dans l'ensemble, on remarque que si la TEER des monocouches de cellules CaCo-2 semble diminuée par les cytokines proinflammatoires, elle ne semble pas être affectée par les plasmas séminaux, ce qui est en accord avec les précédents résultats. Pour les cellules HEC-1A, la résistance de la monocouche n'est que très faiblement diminuée par les cytokines inflammatoires. En revanche, les plasmas séminaux provoquent une augmentation de la résistance dont l'intensité est variable en fonction des plasmas séminaux.

Afin d'évaluer si les plasmas séminaux sont capables de moduler la sécrétion de divers facteurs par les cellules épithéliales, les concentrations en TGF- β 1, HMGB1, TSLP et CCL20 ont été dosées dans les milieux basaux par ELISA ou Luminex™ (Figure 30). Le TGF- β 1 et HMGB1 sont présents dans le milieu basal des cellules CaCo-2 et HEC-1A. La TSLP n'est pas détectée quelles que soient les conditions de stimulation. Le CCL20 est lui détecté dans le milieu basal des cellules CaCo-2 mais pas dans ceux des cellules HEC-1A (à l'exception de la stimulation par les cytokines proinflammatoires).

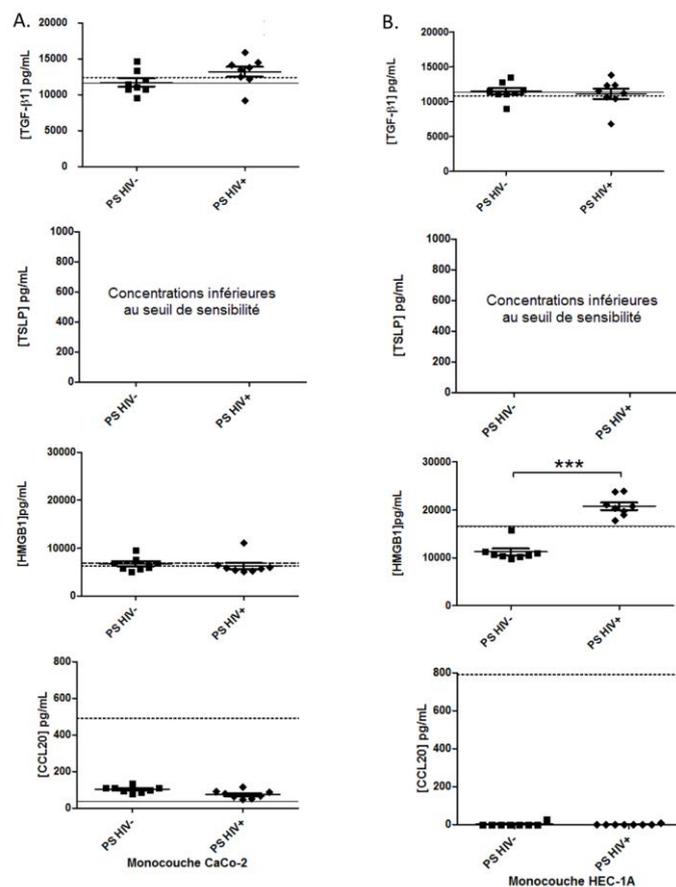


Figure 30 : Influence des plasmas séminaux sur la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales. Les concentrations en cytokines et chimiokines ont été mesurées par luminex ou ELISA et sont indiquées en pg/mL. Sécrétions par les cellules CaCo-2 (A) et HEC-1A (B). La sécrétion basale des cellules est représentée par une ligne continue alors que la sécrétion induite par des cytokines inflammatoires est indiquée en pointillé. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

L'incubation avec des cytokines inflammatoires ou différents plasmas séminaux ne provoque pas d'augmentation de la sécrétion TGF- β 1 par les cellules épithéliales. Ces différentes stimulations n'induisent pas non plus une sécrétion plus élevée d'HMGB1 par les cellules CaCo-2. En revanche, les cytokines inflammatoires ainsi que les différents plasmas séminaux provoquent une augmentation de la sécrétion de CCL20 par ces cellules. Enfin, la sécrétion d'HMGB1 par les cellules HEC-1A ne semble pas être modifiée de façon significative par les plasmas séminaux. Cependant, les plasmas séminaux VIH⁻ semblent avoir tendance à diminuer la sécrétion de ce facteur alors que les plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺ tendent à l'augmenter. Si les différences par rapport au niveau basal de sécrétion ne sont pas significatives, la différence de sécrétion en fonction du statut virologique des donneurs l'est.

L'ensemble des concentrations de ces quatre facteurs dans les plasmas séminaux et les milieux basaux des cellules épithéliales est regroupé dans la Figure 31.

N° Statut		Concentrations en pg/mL												
		TGF-β1				TSLP			HMGB1			CCL20		
		Contenu dans le plasma séminal		Sécrétée par		Contenu dans le plasma séminal	Sécrétée par		Contenu dans le plasma séminal	Sécrétée par		Contenu dans le plasma séminal	Sécrétée par	
		CaCo-2	HEC-1A		CaCo-2	HEC-1A		CaCo-2	HEC-1A		CaCo-2	HEC-1A		
1		574364,49	14659,72	13507,84	19,77	0	0	32090	6840	11320	971,2	113,1	0	
2		487373,21	10722,84	11696,69	0	0	0	126230	5140	10950	438,5	111,7	25,37	
3		496324,06	13372,98	11074,77	76,71	0	0	7290	5780	10310	92,47	88,06	0	
4	HIV-	529457,11	11048,04	9011,22	0	0	0	21950	7590	9780	2409	112,4	0	
5		483397,89	10807,74	11500,55	29,69	0	0	35560	9560	10630	397,1	135,3	0	
6		534119,38	9609,26	11102,5	0	0	0	23020	5720	10520	508,1	97,57	0	
7		531239	11432,94	11282,97	0	0	0	11020	6040	10260	353,1	80,66	0	
8		514094,44	12043,12	12852,45	19,77	0	0	60090	6900	15860	1595	94,75	0	
456		553576,02	12479,11	12318,53	29,69	0	0	9150	5080	17730	657,7	81,01	0	
466		555347,89	12150,19	10684,36	0	0	0	47820	5620	23860	822,4	61,64	8,814	
490		522999,06	9181,98	11502,54	19,77	0	0	15820	5350	20770	604,9	47,2	0	
517		505688,7	14134,75	6797,73	29,69	0	0	17690	5190	19700	110,1	89,82	0	
542	HIV+	484598,26	13471,32	10423,32	19,77	0	0	13150	5830	20290	459,6	65,87	0	
593		531794,31	14474,2	11242,28	0	0	0	57690	5940	18950	407,7	116,2	0	
600		539392,8	13759,78	12361,66	0	0	0	39290	6420	23750	934,2	88,41	0	
5		442260,81	15868,7	13803,52	67,51	0	0	8090	11110	21030	128,6	51,08	0	

Figure 31 : Criblage des milieux basaux des cellules épithéliales. Tableau récapitulatif des concentrations des facteurs contenus dans les plasmas séminaux ou sécrétés par les cellules épithéliales suite à leur stimulation pendant 24h en présence de plasmas séminaux individuels de donneurs VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺.

c. Effet des sécrétions par les cellules épithéliales sur le phénotype des cellules dendritiques

La mise en place de ce modèle cellulaire a pour objectif d'étudier l'effet des sécrétions basales des cellules épithéliales sur le phénotype des DC et leur capacité à prendre en charge les particules virales. Compte-tenu du faible volume recueilli pour chaque plasma séminal et de l'homogénéité des résultats de dosage des facteurs sécrétés par les cellules épithéliales, de premières expériences ont été réalisés en utilisant des pools de plasmas séminaux VIH⁻ et VIH⁺ ARV⁺ plutôt que les plasmas séminaux individuels. Les premiers résultats de cytométrie montrent que les sécrétions des cellules épithéliales que celles-ci soient constitutives ou induites par les plasmas séminaux n'induisent pas la maturation des DC. La Figure 32 montre les résultats obtenus pour le marquage du HLA-II mais des résultats similaires ont été obtenus pour le marquage du CD86. Clairement, l'expression de CD169 n'est pas induite par les sécrétions des cellules épithéliales que celles-ci soient stimulées ou non. En revanche, la détection de DC-SIGN est diminuée lorsque les cellules épithéliales sont stimulées en présence de plasma séminal. Cependant, étant donné que le plasma séminal en stimulation directe possède le même effet, même à des dilutions fortes, il est difficile de conclure à partir de ces résultats. En effet, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer s'il s'agit d'une régulation de l'expression de DC-SIGN par les sécrétions des cellules épithéliales ou bien d'un effet dû à la diffusion du plasma séminal.

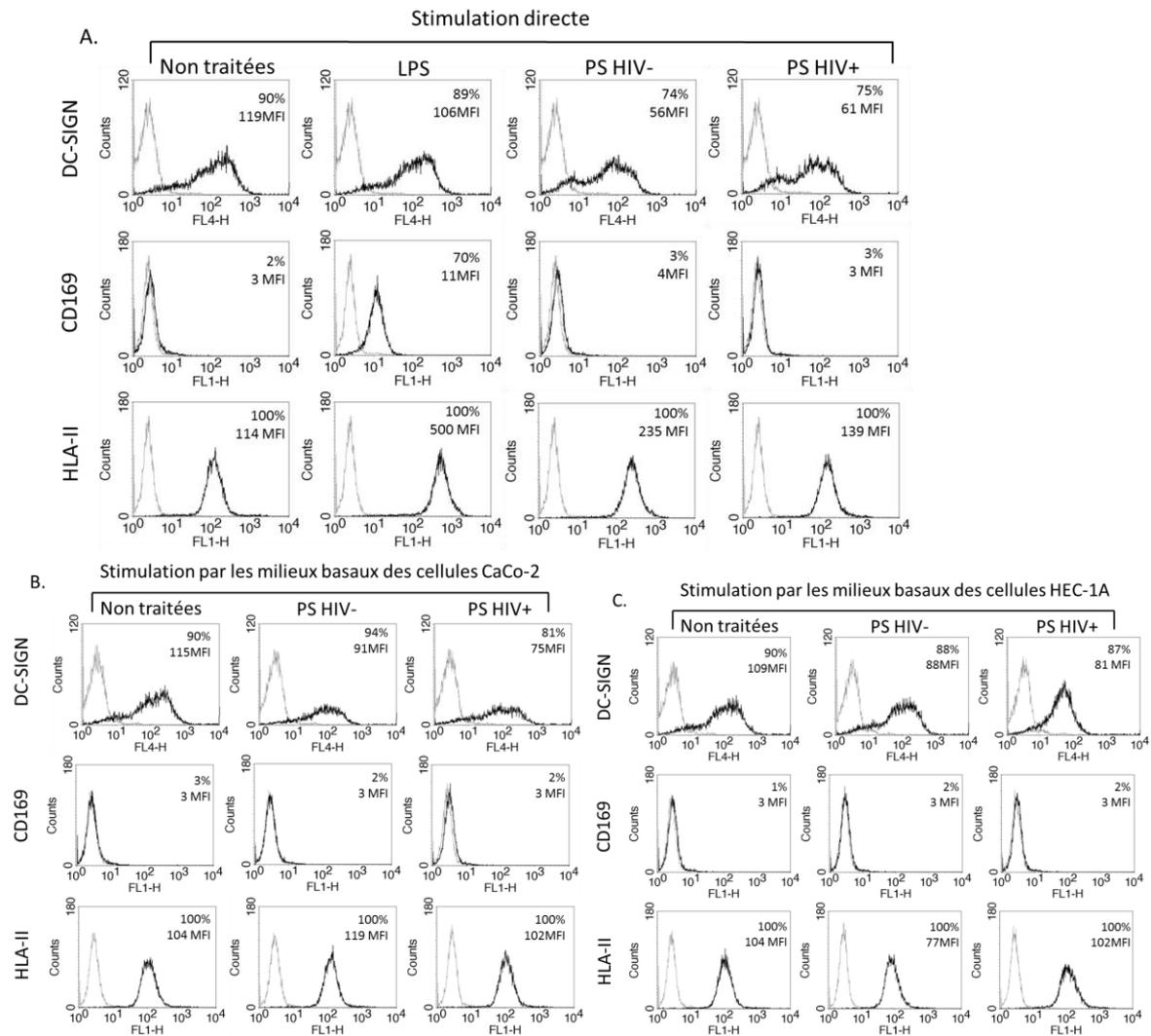


Figure 32 : Effets des sécrétions des cellules épithéliales sur le phénotype des cellules dendritiques. Les DC ont été incubées pendant 24h avec 200ng/mL de LPS, des pools de plasmas séminaux VIH- et VIH⁺ ARV⁺ (dilution 1/300) ou des milieux basaux de cellules épithéliales elles même stimulées ou non pendant 24h par des pools de plasmas séminaux VIH- et VIH⁺ ARV⁺ (dilution 1/10).

Le schéma présenté en Figure 33 résume les résultats obtenus pour cette seconde partie.

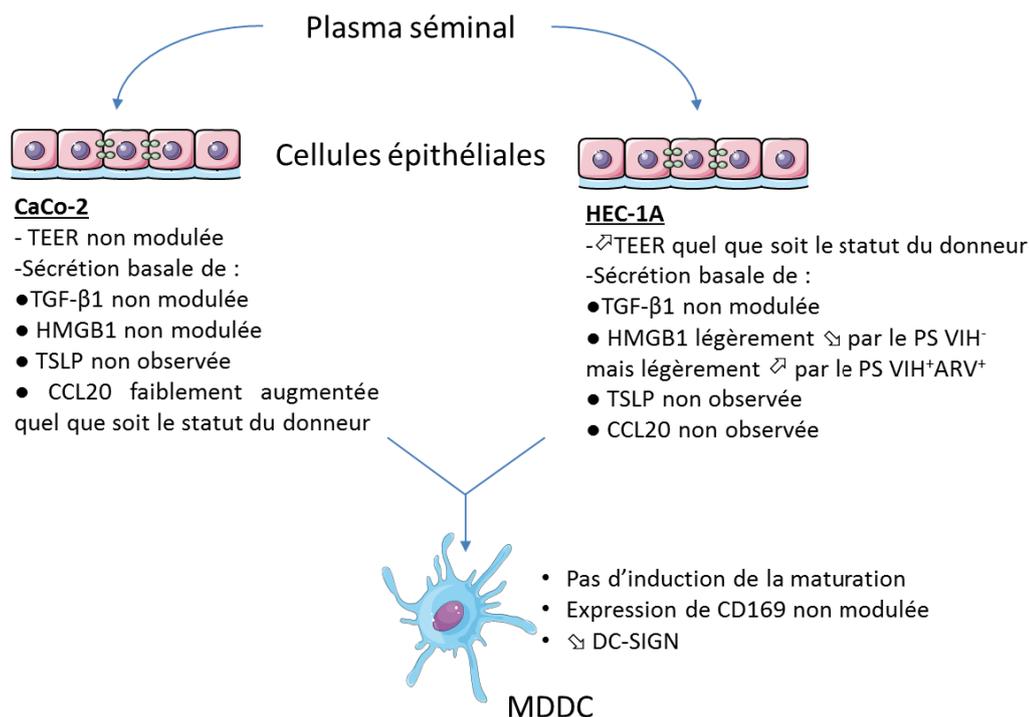


Figure 33 : Bilan des résultats de la deuxième partie de la thèse sur l'influence indirecte du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les cellules dendritiques

D. Discussion

Lors de la transmission sexuelle du VIH-1, les cellules épithéliales sont les premières cellules exposées au sperme contaminé. Plusieurs équipes ont montré que le plasma séminal était capable de moduler la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales (Kafka *et al.*, 2012; Sharkey *et al.*, 2007). Il se pourrait donc que le plasma séminal influence de façon indirecte la transmission sexuelle du VIH-1 par les DC *via* l'induction de la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales. De précédentes études réalisées au laboratoire ont déjà montré que le plasma séminal favorise la sécrétion de CCL20 par des lignées exo- et endocervicales favorisant le recrutement des DC (Berlier *et al.*, 2006a; Lourenço *et al.*, 2014). Dans le cadre de cette thèse, les réponses de deux types d'épithéliums simples, représentant les muqueuses endocervicale et colorectale, ont été étudiées *in vitro* grâce à des lignées cellulaires (respectivement HEC-1A et CaCo-2) cultivées sur insert.

Alors que le plasma séminal provoque une importante mortalité cellulaire lorsqu'il est incubé en présence de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4, les monocytes ou les DC, il n'altère pas l'intégrité des monocouches de cellules épithéliales. La mesure de la résistance transépithéliale des deux types de monocouches de cellules utilisés montre que ces cellules réagissent différemment au plasma séminal. Alors qu'une augmentation de la TEER est observée

pour les cellules HEC-1A, les cellules CaCo-2 ne semblent pas être affectées. En revanche, le statut virologique des donneurs n'influence pas la résistance transépithéliale. Les variations de la TEER induites par les cytokines inflammatoires ou par le plasma séminal ont déjà été décrites dans la littérature. Il a ainsi été montré que les cytokines proinflammatoires activent la voie NFκB provoquant une augmentation de l'expression de MLCK (myosin light-chain kinase), une protéine impliquée dans l'ouverture des jonctions serrées (Al-Sadi *et al.*, 2009). Dans le cas du plasma séminal, il semblerait que le mécanisme soit indépendant des récepteurs membranaires et des différentes voies de signalisations cellulaires. Il s'agirait plutôt d'une augmentation de la fluidité membranaire permettant ainsi une redistribution de la protéine ZO-1 impliquée dans la formation des jonctions serrées (Gorodeski and Goldfarb, 1998; Lawrence *et al.*, 2012). Cela concorde avec nos résultats de cinétique qui montrent que les variations induites par les plasmas séminaux sont observables rapidement (après 2h de contact) alors que celles induites par les cytokines inflammatoires nécessitent au moins 24h.

En plus de cet effet sur la TEER, le plasma séminal a aussi été décrit comme capable de moduler la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules épithéliales (Kafka *et al.*, 2012; Sharkey *et al.*, 2007). En plus de nos résultats sur la modulation de l'expression de CD169 par le TGF-β1, il a déjà été montré que la sécrétion de TGF-β1 par des cellules utérines maintenues en culture *ex vivo*, entraîne la diminution de l'expression de DC-SIGN à la surface de MDDC et inhibe ainsi la *trans*-infection des lymphocytes T et de cellules reportrices (De Saint Jean *et al.*, 2014; Ochiel *et al.*, 2010). Compte-tenu du caractère immunomodulateur du TGF-β1, la sécrétion de cette cytokine a été dosée. Fontenot *et al.* (2009) ont montré que la sécrétion de cette molécule par des lignées cellulaires cervicale et intestinale favorisait la *trans*-infection des lymphocytes T par les cellules dendritiques, ce qui nous a amené à doser également ce facteur. HMGB1 est une alarmine capable d'influencer le comportement de DC (Gougeon *et al.*, 2012). Sa sécrétion par les cellules épithéliales intestinales (CaCo-2 notamment) a déjà été décrite. Comme pour les autres facteurs, la concentration d'HMGB1 a donc été mesurée afin de savoir si sa sécrétion est modulée par le plasma séminal et si celle-ci diffère entre nos deux modèles. Le CCL20, chimiokine jouant un rôle dans l'attraction des DC au niveau de la muqueuse, a également été dosée. Cette molécule a déjà fait l'objet d'études au sein du laboratoire, permettant ainsi d'avoir un élément de référence (Berlier *et al.*, 2006a; Lourenço *et al.*, 2014)

Les premiers dosages réalisés montrent que les cellules CaCo-2 tout comme les cellules HEC-1A sécrètent du TGF-β1 et de l'HMGB1 de façon constitutive. Cependant, si la sécrétion d'HMGB1 par les CaCo-2 n'est pas du tout modulée par les plasmas séminaux, la sécrétion par les cellules HEC-1A

semble diminuée par les plasmas séminaux VIH⁻ et au contraire augmentée par les plasmas séminaux VIH⁺ ARV⁺. Les cellules épithéliales semblent donc répondre différemment à un même stimulus. Concernant CCL20, si la sécrétion par les cellules CaCo-2 est augmentée par les cytokines inflammatoires et dans une moindre mesure par les plasmas séminaux, la présence de cette chimiokine n'est pas détectée dans les milieux basaux des cellules HEC-1A stimulées par les plasmas séminaux. Cependant, cela ne signifie pas que les cellules HEC-1A ne sécrètent pas de CCL20. En effet, une précédente étude réalisée dans notre laboratoire montre bien la capacité du plasma séminal à stimuler la sécrétion de CCL20 par cette lignée cellulaire (Lourenço *et al.*, 2014). Nos résultats suggèrent que la sécrétion de CCL20 par les cellules HEC-1A induite par le plasma séminal est polarisée comme cela a déjà été publié pour la sécrétion de cette chimiokine par des cellules utérines primaires suite à différentes stimulations (Crane-Godreau and Wira, 2005; Soboll *et al.*, 2006). Dans le cadre de cette thèse, la polarisation de la sécrétion des facteurs n'a pas été évaluée, la concentration au niveau du compartiment apical n'ayant pas été dosée. Concernant la TSLP, cette molécule n'est jamais détectée dans les milieux basaux des cellules épithéliales, quelles que soient les conditions. Pourtant Fontenot *et al.* montrent une augmentation de l'expression de la TSLP par une lignée de cellules épithéliales cervicales suite à l'activation de la voie NFκB par des particules virales, de l'IL1-β ou d'un agoniste du TLR3. Cependant, les dosages ELISA présentés dans cet article ont été réalisés sur des lysats cellulaires alors que nous avons travaillé sur les milieux basaux de cellules épithéliales. La non détection de la TSLP dans nos conditions pourrait également être due à la polarisation de la sécrétion de TSLP vers le milieu apical plutôt que basal comme cela a déjà été montré avec des cellules épithéliales bronchiques (Nino *et al.*, 2014). Le TGF-β1, HMGB1 et le CCL20 étant présents dans le plasma séminal à des concentrations moyennes de 500ng/mL, 30ng/mL et 800pg/mL, la détection de ces molécules au niveau du compartiment basal pourrait être due à la diffusion passive du plasma séminal à travers la monocouche cellulaire. Cependant, ces facteurs sont aussi sécrétés à l'état basal par les cellules épithéliales, montrant bien la capacité de sécrétion des cellules épithéliales. De plus, les concentrations mesurées sont supérieures à celles théoriquement obtenues en cas de diffusion du plasma séminal (le plasma séminal étant dilué au 1/10 pour la stimulation avec un taux de diffusion inférieur à 10% selon les estimations obtenues avec le dextran-fitc). En plus d'HMGB1, CCL20, TGF-β1 et d'HMGB1, il serait intéressant de cribler d'autres facteurs, tels que MCP-1, RANTES, SDF-1 ou les IFN-α et β. Par ailleurs, les DC étant également capables de sécréter des facteurs, la sécrétion d'IL10, d'IL2 ou encore d'IL12p70 par ces cellules incubées 24h avec les milieux basaux des cellules épithéliales pourrait être mesurée.

L'influence des cellules épithéliales sur les DC a ensuite été étudiée d'un point de vue phénotypique. Nos premiers résultats de cytométrie indiquent que les sécrétions issues du pôle basal

des cellules épithéliales cultivées sur insert (que celles-ci soient constitutives ou induites par les plasmas séminaux) ne provoquent pas la maturation des DC ni l'induction de l'expression de CD169 malgré la présence de TGF- β 1. La concentration en TGF- β 1 biologiquement actif est-elle trop faible ou existe-t-il un facteur non dosé et/ou un mécanisme bloquant l'expression de CD169 ? Des expériences complémentaires permettraient d'en savoir plus sur les modifications phénotypiques des DC provoquées par les sécrétions des cellules épithéliales et de les corrélérer avec une éventuelle modulation de la capture des particules virales. Il serait intéressant d'étudier en particulier, la modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs du VIH-1 (CD4, CXCR4 et CCR5) mais également d'autres lectines comme le récepteur au mannose ou DCIR. L'étude des effets indirects du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les DC est rendu difficile du fait de la diffusion potentielle du plasma séminal. Même si cette diffusion est très faible (moins de 10%), le plasma séminal fortement dilué conserve la capacité d'influencer la capture des particules virales *via* le DC-SIGN (Sabatte *et al.*, 2007). Il faut donc réussir à faire la part entre un effet du fluide biologique et des sécrétions qu'il provoque. Le traitement des cellules par un inhibiteur de la synthèse protéique pourrait apporter de premiers éléments de réponse. D'autre part, le modèle utilisé permet d'étudier les interactions entre les cellules épithéliales et les DC indépendamment de tout contact cellulaire. Hors, il a été montré que l'activation de DC plasmacytoïdes par une lignée de cellules colorectales (HT-29) était dépendante du contact entre les cellules épithéliales et les DC (Rodriguez Rodrigues *et al.*, 2011). Ce paramètre pourrait donc également modifier le comportement des DC.

Discussion générale et perspectives

Cette thèse est consacrée à l'étude de l'influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 par les DC, suite à un contact direct ou indirect *via* l'induction de la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales. La composition complexe du plasma séminal rend cette étude délicate. La stimulation des DC par certains de ses composés afin de s'affranchir de la cytotoxicité a permis de mettre en évidence un effet du TGF- β 1 sur le phénotype des DC et leur capacité à prendre en charge les particules virales. Le TGF- β 1 provoque l'induction de l'expression de CD169 qui s'accompagne d'une augmentation de la capacité des cellules à prendre en charge les particules virales VIH-1 sans pour autant provoquer la maturation des DC. Cependant, il s'avère que ce mécanisme ne reflète pas l'effet du plasma séminal sur les DC puisque nous avons mis en évidence un mécanisme bloquant l'augmentation de l'expression CD169 induite par le LPS et le TGF- β 1. Il semblerait d'une part que certains composés du fluide biologique soient capables de se lier au TLR4 exerçant une compétition avec la liaison du LPS à son récepteur. En revanche, le mécanisme concernant le TGF- β 1 demeure inconnu. Il se pourrait que certains composés du plasma séminal se complexent, devenant ainsi inactifs. Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant de fractionner le plasma séminal afin de décomposer l'action du plasma séminal et de découvrir si certaines fractions favorisent l'apparition du CD169, la bloquent ou ne font rien. Le fractionnement du plasma séminal pourrait également s'avérer intéressant pour déterminer quels éléments du plasma séminal induisent la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales. Il a déjà été montré que le TGF- β 1 et la lactoferrine du plasma séminal pourraient être des molécules modulant la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales (Kafka *et al.*, 2012; Lourenço *et al.*, 2014). Ce fractionnement permettrait peut-être de mettre en évidence des interactions entre différents composés du plasma séminal.

L'étude des effets du plasma séminal est également rendu difficile du fait de l'hétérogénéité des prélèvements. La composition d'un donneur à l'autre peut varier, en témoigne la présence non systématique de certaines cytokines comme le SDF1- α ou les cytokines inflammatoires, entraînant des variations des réponses. Ainsi, si tous les plasmas séminaux testés dans le second article semblent diminuer la capture des particules virales par les DC seuls quatre des huit testés ont un effet significatif. De la même façon, si tous les plasmas séminaux limitent l'induction de l'expression de CD169 à la surface des MDDC, certains ont un pouvoir inhibiteur plus important que les autres. Ces variabilités sont également observables au niveau des réponses des cellules épithéliales puisque certains plasmas séminaux provoquent de plus fortes augmentations de la TEER que les autres. Ces distinctions entre plasmas séminaux laissent envisager l'existence de différents profils. Certains plasmas séminaux pourraient se révéler plutôt facilitateurs vis-à-vis de la transmission du VIH-1 (plasmas séminaux riches en cytokines inflammatoires, en SEVI, inhibant peu la capture des particules virales par les DC) alors que d'autres pourraient se révéler protecteurs (plasmas séminaux

masquant fortement DC-SIGN, bloquant l'expression de CD169, augmentant fortement la TEER, diminuant l'expression de CD4). Enfin certains pourraient avoir des profils plutôt neutres, les effets favorisants s'équilibrant avec les effets protecteurs. Il serait intéressant de parvenir à définir des biomarqueurs participant à définir les personnes à risque.

En plus de cette variabilité interindividuelle, la composition au sein même d'un éjaculat est variable et la récolte artificielle induit d'ores et déjà un biais. En effet, lors d'un rapport sexuel, l'éjaculation est séquentielle. Les différentes fractions déposées sur la muqueuse ne sont donc pas mélangées comme c'est le cas lorsque le sperme est collecté de façon artificielle (Caballero *et al.*, 2012). Dans nos modèles, il est donc possible que les cellules épithéliales tout comme les DC soient en contact simultanément avec des facteurs ayant des actions antagonistes, situation ne se produisant probablement pas dans des conditions physiologiques.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé des DC dérivées de monocytes. Les DC constituent une famille extrêmement hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Les sous-populations présentent des caractéristiques phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles bien différentes qui peuvent également varier en fonction de leur localisation dans l'organisme. L'obtention d'un grand nombre de ces cellules à partir de prélèvements est délicate compte tenu de leur rareté. Au niveau du sang, les DC ne représentent que 0,2 à 0,9 % des leucocytes. Bien qu'un peu plus abondantes au niveau tissulaire, les DC myéloïdes ne représentent que 0,3 à 2,3 % des cellules CD45⁺ au niveau cervical et 0,9 à 4% pour les DC plasmacytoïdes. Les monocytes en revanche constituent 10% des PBMC. L'obtention *in vitro* de DC à partir de monocytes permet donc de s'affranchir de cette contrainte numérique. Les cellules obtenues sont phénotypiquement proches des cellules myéloïdes CD1a⁺, CD14⁻ présentes au niveau de la *lamina propria* des muqueuses. Cependant, les cellules plasmacytoïdes et des cellules de Langerhans sont également présentes ou peuvent être recrutées au niveau des muqueuses. Il serait donc intéressant de comparer les réponses de ces divers sous-types de DC. Cela d'autant plus que plusieurs études mettent en évidence des réponses différentes en fonction du sous-type de DC. Ainsi, il a été montré que des lignées de cellules colorectales HT-29 ou Caco-2 induisent l'activation de cellules plasmacytoïdes, effet non observé avec des DC myéloïdes (Rodriguez Rodrigues *et al.*, 2011). Ogawa *et al.* (2013) montrent eux que le peptide antimicrobien LL-37 augmente la sensibilité à l'infection par le VIH-1 de cellules de Langerhans dérivées de monocytes probablement *via* une augmentation de l'expression de CD4 et CCR5 alors que ce peptide provoque l'effet inverse sur des MDDC dont l'infectabilité est amoindrie probablement suite à une diminution de l'expression de DC-SIGN et de CCR5.

D'autre part, des lignées cellulaires, endocervicale et colorectale, ont été utilisées afin de modéliser les épithéliums simples. Ces modèles ont l'avantage d'être peu onéreux et reproductibles. La culture sur insert permet de se rapprocher du modèle muqueux avec la polarisation de la culture cellulaire et la compartimentalisation. Le pôle apical correspond à la lumière de la muqueuse où le plasma séminal est déposé alors que le pôle basal correspond au compartiment sous-muqueux où les cellules immunitaires sont présentes. La simplicité de ce modèle est à la fois une force puisqu'elle permet de bien identifier les éléments impliqués dans les mécanismes décrits et une faiblesse du fait de sa simplification sur le plan physiologique. Le développement de culture d'explants permet de reproduire un environnement muqueux plus complexe, comprenant à la fois les cellules épithéliales et les cellules immunitaires du donneur (Collins *et al.*, 2000; Fletcher *et al.*, 2006; Merbah *et al.*, 2011). Cependant, ces modèles possèdent un certain nombre de défauts dont un maintien en culture délicat, avec une mortalité cellulaire importante, parfois une dédifférenciation des cellules épithéliales et une perte de l'intégrité de l'épithélium (Michelini *et al.*, 2004; Southern *et al.*, 2011, Anderson *et al.*, 2010a; K. Arien *et al.*, 2012). De plus, les résultats obtenus avec ces modèles sont dépendants du donneur, ce qui peut compliquer l'interprétation des données. Enfin, tout comme les modèles *in vitro* ces modèles ne permettent pas l'étude d'un système intégré accessible seulement *in vivo*. Les études *in vivo* permettent d'étudier les interactions entre les différents acteurs (cellules épithéliales, particules virales, cellules immunitaires) ainsi que l'influence de divers facteurs tels que le cycle menstruel, le microbiome ou le sperme. Le modèle simien constitue le modèle animal le plus adapté pour étudier la transmission sexuelle du VIH-1 (Fennessey and Keele, 2013; Miller *et al.*, 1989). Ce modèle possède tout de même certaines limites. Outre le prix et les difficultés éthiques, ce modèle ne reflète pas tout à fait la physiologie de l'appareil génital féminin. Chez le macaque rhésus, la flore vaginale est majoritairement colonisée par des bactéries du genre *Streptococcus*, *Gardnerella* et *Corynebacterium*. Le microbiome s'apparente donc plutôt à celui d'une vaginose bactérienne que de la flore vaginale d'une personne saine dominée par des *Lactobacillus*. Probablement en lien avec cela, l'environnement vaginal est moins acide chez le modèle simien avec des valeurs de pH de 6 à 8 contre 4 à 6 chez l'humain ce qui pourrait faciliter l'infection virale. Les capacités du plasma séminal à tamponner le milieu vaginal pourraient notamment être plus importantes dans ce modèle, faussant ainsi l'étude des effets du sperme sur la transmission sexuelle du virus (Bernard-Stoecklin *et al.*, 2014).

Malgré leurs limites, l'utilisation de modèles *ex vivo* ou *in vivo* serait nécessaire afin de vérifier l'implication des interactions DC/sperme/cellules épithéliales dans les mécanismes de transmission sexuelle du VIH-1. En particulier, il paraît pertinent d'analyser le rôle de CD169. En effet, l'expression de CD169 par les DC n'a jamais été mise en évidence au niveau muqueux. Le CD169 aussi appelé

Siglec-1 ou sialoadhésine est un membre de la famille des Siglecs. Cette lectine n'est exprimée qu'à la surface de cellules myéloïdes telles que les monocytes, les macrophages ou les DC (Crocker *et al.*, 2007; Hartnell *et al.*, 2001). Le CD169 n'est pas exprimé par les monocytes CD14⁺ du sang périphérique à l'état de base. Par contre, son expression est induite en présence d'IFN de type I (Hartnell *et al.*, 2001; Rempel *et al.*, 2008). L'augmentation de l'expression de CD169 par les monocytes du sang périphérique est également observée chez les personnes primo-infectées par le VIH-1 ainsi que chez les macaques rhésus infectés par le virus SIV_{mac} (Jaroenpool *et al.*, 2007; van der Kuyl *et al.*, 2007). Cette expression perdure au cours de l'infection par le SIV. Au contraire, chez le mangabey couronné (sooty mangabey, *Cercocebus atys*, hôte naturel du virus), si l'expression de CD169 par les monocytes est également augmentée lors de l'infection non pathogénique par SIV_{sm}, elle est ensuite diminuée lors de la phase chronique. Chez l'Homme, la prise de traitements antirétroviraux permet une diminution de l'expression de CD169 à des niveaux similaires à ceux des personnes non-infectées (Pino *et al.*, 2015). Ces données suggèrent un rôle potentiel de CD169 dans la pathogénicité du VIH-1. Par ailleurs, l'expression de CD169 se révèle plus importante sur les cellules myéloïdes résidentes notamment au niveau des tissus lymphoïdes secondaires. Il a déjà été montré que les macrophages de la *lamina propria* du colon exprimaient de façon significative le CD169 (Crocker *et al.*, 2007; Gummuluru *et al.*, 2014; Hartnell *et al.*, 2001). L'induction de l'expression de CD169 par les MDDC suite à différents traitements comme l'IFN α , le LPS ou le TGF- β 1 et l'augmentation de la capture du VIH-1 et de la *trans*-infection des lymphocytes T CD4 qui en découle, laisse envisager un rôle primordial de CD169 dans la transmission sexuelle du VIH-1. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de CD169 par les DC au niveau des muqueuses génitales ou colorectales. L'expression de CD169 par les MDDC étant modulée par le LPS, il serait intéressant de savoir si l'accroissement de la perméabilité intestinale au cours de l'infection par le VIH-1, qui s'accompagne d'une augmentation de la translocation microbienne, influence l'expression de CD169 par les cellules myéloïdes environnantes (Brenchley *et al.*, 2006). De la même façon, il serait intéressant de savoir si la présence de coinfections bactériennes influence l'expression de CD169. Lors d'un rapport contaminant par un homme ayant une coinfection bactérienne, le plasma sérial joue-t-il un rôle protecteur en inhibant l'expression de CD169 ? L'utilisation d'un antagoniste du TLR4 peut-il protéger de l'infection ?

Enfin, notre étude s'est focalisée sur la capture des particules virales libres par les DC. Il a cependant été montré que la transmission de cellule à cellule pouvait également permettre la capture des particules virales par les DC (Anderson and Le Grand, 2014; Izquierdo-Useros *et al.*, 2011). Les DC pourraient être en contact avec le virus suite à la formation de synapse virologique avec d'autres cellules infectées telles que les cellules immunitaires du sperme contaminé ayant

transmigrées ou des lymphocytes intra-épithéliaux infectés. Il serait intéressant d'étudier l'impact du plasma séminal sur la transmission de cellule à cellule. Le CD169 ayant déjà été impliqué dans la formation de la synapse infectieuse, les mécanismes de régulation de son expression par le plasma séminal pourrait influencer l'efficacité de la transmission (Izquierdo-Useros *et al.*, 2009; Puryear *et al.*, 2013).

Conclusion

Cette étude fournit de nouvelles données concernant l'implication du sperme dans la transmission sexuelle du VIH-1 par les DC. Les résultats obtenus sont en faveur d'un rôle « protecteur » du plasma séminal sur la capture des particules virales par les DC. Déjà décrit pour son effet sur DC-SIGN, ce rôle « protecteur » pourrait également concerner la régulation de l'expression de CD169. De nombreux effets du plasma séminal ont été décrits. Toutefois, l'état des connaissances actuelles ne permet pas de conclure sur le rôle facilitateur ou inhibiteur de ce fluide. Son effet global résulte d'ailleurs probablement de la somme des activités favorisant ou inhibant la transmission de ces différents composés. Compte-tenu des variations interindividuelles observées, il se pourrait même que l'effet global soit variable en fonction du donneur. Il est également fort probable que les effets du plasma séminal varient en fonction de la souche virale. Prévenir l'infection par le VIH-1 constitue toujours un enjeu majeur de santé publique. Une meilleure compréhension des mécanismes précoces impliqués dans la transmission sexuelle du VIH-1 pourrait justement faciliter l'émergence de nouvelles stratégies afin de prévenir l'infection par le VIH-1.

Annexes

1. Figure supplémentaire

Concentrations en pg/mL à l'exception de la lactoferrine en µg/mL

N°	Statut	IL1β	IL6	IL7	IL8	Rantes	TNF-α	SDF-1	Lacto-ferrine	LL-37	TGF-b1	TSLP	HMGB1	CCL20	
1	HIV-	0	120,35	637,91	2279,65	686,86	0	0	233,15	7730	574364.49	19,77	32090	971,2	
2		151,94	28,51	634,34	2103,55	429,35	47,15	408,65	222,36	8440	487373.21	0	126230	438,5	
3		0	10,99	806,64	394,59	676,43	20,13	401,07	245,32	5055	496324.06	76,71	7290	92,47	
4		18,94	132,9	593,12	3483,51	444,08	36,76	170,08	243,25	3620	529457.11	0	21950	2409	
5		53,84	21,54	902,46	791,87	420,79	0	75,56	259,79	5210	483397.89	29,69	35560	397,1	
6		0	98,73	509,71	1094,58	1783,65	0	0	251,98	2835	534119.38	0	23020	508,1	
7		26,69	294,26	547,96	927,98	286,11	34,42	145,14	197,10	6755	531239.00	0	11020	353,1	
8		25,82	120,69	853,29	1474,25	493,96	29,71	318,1	229,48	3055	514094.44	19,77	60090	1595	
9		18,4	24,49	359,15	4945,06	453,98	0	361,42	270,35	3885					
10		0	12,14	357	865,61	849,32	20,13	192,1	289,64	4375					
11		7,78	42,51	424,61	1554,55	853,25	0	177,69	177,81	4025					
12		23	18,2	551,86	1181,88	292,16	0	153,86	170,92	4840					
13		29,99	165,83	1105,31	1367,84	403,84	102,65	524,95	199,39	6815					
14		0	21,73	366,08	745,98	334,14	27,34	103,79	182,63	6075					
15		9,34	26,32	1176,24	794,18	372,46	21,34	299,41	181,02	4080					
16		0	13,48	616,49	435,63	843,36	0	205,61	299,97	6170					
17		0	29,96	822,72	576,78	297,9	0	236,45	184,93	3230					
18		56,9	117,12	341,95	1092,1	454,94	27,34	205,61	208,12	3985					
19		0	13,1	1224,74	380,5	417,99	0	218,39	205,36	2860					
20		0	20,8	384,7	625,29	925,94	20,13	777,41	252,44						
21		0	36,63	623,8	557,08	443,89	0	318,1	257,49						
417	HIV+	87,21	41,8	362,78	1091,27	2046,82	34,42	145,14	232,47	4175					
456		0	9,44	326,04	389,66	571,26	0	279,73	203,30	5425	553576.02	29,69	9150	657,7	
457		0	6,48	1271,44	217,41	647,02	0	56,51	283,90	5350					
466		0	76,59	1162,49	1639,35	1779,86	29,71	56,51	319,50	4025	555347.89	0	47820	822,4	
490		8,45	38,24	404,1	1428,81	545,74	22,55	103,79	268,06	3215	522999.06	19,77	15820	604,9	
513		9,79	23,02	722,57	507,13	620,58	0	90,74	169,32						
517		0	10,6	559,01	438,47	397,5	0	230,56	228,10	3345	505688.70	29,69	17690	110,1	
542		0	29,05	407,22	710,38	661,94	0	0	284,59	4195	484598.26	19,77	13150	459,6	
588		92,3	56,96	853,12	3306,98	215,53	68,6	344,6	239,35						
593		21,35	13,67	324,72	1038,54	476,14	68,6	205,61	216,85	5300	531794.31	0	57690	407,7	
600		67,26	24,12	261,95	1107,89	2704,16	0	218,39	172,07	3470	539392.80	0	39290	934,2	
1		10,47	17,82	558,04	342,62	768,49	0	177,69	259,10						
2		0	107,6	777,41	1819,43	2658,98	0	103,79	243,61						
3		0	18,2	1243,57	404,47	624,33	34,42	486,17	191,82						
4		0	7,87	1284,65	359,43	629,1	0	308,86	193,75						
5		75,73	183,69	579,16	4183,56	1221,71	167,58	4741,4	251,76	6150	442260.81	67,51	8090	128,6	
6		0	8,06	607,73	434,21	467,98	0	0	239,93						
8	0	38,59	953,04	257,65	452,63	0	185,02	226,95	4960						
9	0	28,51	251,36	651,98	938,3	0	0	273,57							

Figure supplémentaire 1 : Criblage des plasmas séminaux. Tableau récapitulatif des concentrations de chaque cytokine pour chaque plasma séminal. Cf partie IV Résultats expérimentaux, 1. Influence directe B. Résultats préliminaires, Figure 21.

2. Publications acceptées

A. Sur le projet de thèse

- De Saint Jean, A., Lucht, F., Bourlet, T., and Delézay, O. (2014). Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in VIH sexual transmission. *AIDS* 28, 2375–2380.
- De Saint Jean, A., Bourlet, T., and Delézay, O. (2015). Pivotal role of the genital epithelial cells in HIV-1 transmission. *Curr. VIH Res.*

B. Sur des projets antérieures à la thèse

- Allantaz-Frager, F., Turrel-Davin, F., Venet, F., Monnin, C., De Saint Jean, A., Barbalat, V., Cerrato, E., Pachot, A., Lepape, A., and Monneret, G. (2013). Identification of biomarkers of response to IFN γ during endotoxin tolerance: application to septic shock. *PLoS One* 8, e68218.
- Medina, J., Boukhebza, H., De Saint Jean, A., Sodoyer, R., Legastelois, I., and Moste, C. (2015). Optimization of influenza A vaccine virus by reverse genetic using chimeric HA and NA genes with an extended PR8 backbone. *Vaccine*.

2. Communications orales et posters

- De Saint Jean, A. ; Pozzetto, B. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH, Journée scientifique « ARC-1 Santé » du 14 Juin 2013, Isle d’Abeau.
- Allegra, S. ; Barreto, S. ; Dagnelie, M.A ; Epalle, T. ; De Saint Jean, A. ; Ensinas, A., Girardot, F. ; Pozzetto, B. ; Riffard, S. La cytométrie en flux pour l’évaluation du pouvoir infectieux des légionelles VBNC sur monocytes de sang périphérique humain, 17^{ème} Congrès Annuel de l’Association Française de Cytométrie, Cytométrie 2013, Strasbourg.
- De Saint Jean, A. ; Bourlet, T. ; Pozzetto, B. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH, Université des Jeunes Chercheurs 2013, SIDACTION, Carry-le-Rouet.

- De Saint Jean, A. ; Bourlet, T. ; Pozzetto, B. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH, Journée de l'IFRESIS du 14 novembre 2013, Saint-Etienne.
- De Saint Jean, A. ; Lucht, F. ; Pozzetto, B. ; Bourlet, T. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH, 7e Conférence Internationale Francophone sur le VIH et les Hépatites AFRAVIH 2014, Montpellier.
- De Saint Jean, A. ; Bourlet, T. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales lors de la transmission sexuelle du VIH, Journée scientifique « ARC-1 Santé » du 19 septembre 2014, Isle d'Abeau.
- De Saint Jean, A. ; Cottier, M. ; Lucht, F. ; Bourlet, T. ; Delézay, O. Influence du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 *via* les cellules dendritiques, Journée Scientifique SIDACTION 2015, Paris.
- Boukhebza, H. ; Medina, J. ; De Saint Jean, A. ; Sodoyer, R. ; Legastellois, I. ; Moste, C. Optimization of influenza A vaccine virus by reverse genetic using chimeric HA and NA genes with an extended PR8 backbone, Influenza Vaccines for the World, Octobre 2015, Portugal.

3. Vulgarisation scientifique

- Stand LudoViro à la Fête de la science 2013 à Lyon
- Stand Gimap à la Fête de la science 2014 à Saint-Etienne
- Coordinatrice du festival Pint of Science Saint-Etienne 2015

Références

Aalberts, M., Stout, T.A.E., and Stoorvogel, W. (2014). Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction* 147, R1–R14.

Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S.S., Frohlich, J.A., Grobler, A.C., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B.M., Sibeko, S., Mlisana, K.P., Omar, Z., et al. (2010). Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 329, 1168–1174.

Abel, K., Rocke, D.M., Chohan, B., Fritts, L., and Miller, C.J. (2005). Temporal and Anatomic Relationship between Virus Replication and Cytokine Gene Expression after Vaginal Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* 79, 12164–12172.

Aboud, L., Ball, T.B., Tjernlund, A., and Burgener, A. (2014). The Role of Serpin and Cystatin Antiproteases in Mucosal Innate Immunity and their Defense against HIV. *Am J Reprod Immunol* 71, 12–23.

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10, 131–144.

Adachi, A., Koenig, S., Gendelman, H.E., Daugherty, D., Gattoni-Celli, S., Fauci, A.S., and Martin, M.A. (1987). Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol* 61, 209–213.

Agace, W.W., Amara, A., Roberts, A.I., Pablos, J.L., Thelen, S., Ugucioni, M., Li, X.Y., Marsal, J., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., et al. (2000). Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr. Biol.* 10, 325–328.

Agarwal, A., and Prabakaran, S.A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J. Exp. Biol.* 43, 963–974.

Agrawal, S., Agrawal, A., Doughty, B., Gerwitz, A., Blenis, J., Dyke, T.V., and Pulendran, B. (2003). Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. *J Immunol* 171, 4984–4989.

Alexander, N.J., Tarter, T.H., Fulgham, D.L., Ducsay, C.A., and Novy, M.J. (1987). Rectal Infusion of Semen Results in Transient Elevation of Blood Prostaglandins. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology* 15, 47–51.

Alfsen, A., and Bomsel, M. (2002). HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 25649–25659.

Alfsen, A., Iniguez, P., Bouguyon, E., and Bomsel, M. (2001). Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J. Immunol.* 166, 6257–6265.

Alfsen, A., Yu, H., Magérus-Chatinet, A., Schmitt, A., and Bomsel, M. (2005). HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol. Biol. Cell* 16, 4267–4279.

Allen, R. d., and Roberts, T. k. (1986). The Relationship Between the Immunosuppressive and Cytotoxic Effects of Human Seminal Plasma. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology* 11, 59–64.

- Allen, S.A., Carias, A.M., Anderson, M.R., Okocha, E.A., Benning, L., McRaven, M.D., Kelley, Z.L., Lurain, J., Veazey, R.S., and Hope, T.J. (2015). Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues. *J. Virol.* *89*, 5569–5580.
- Allers, K., Hütter, G., Hofmann, J., Loddenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E., and Schneider, T. (2011). Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood* *117*, 2791–2799.
- Almeida, M., Cordero, M., Almeida, J., and Orfao, A. (2006). Persistent abnormalities in peripheral blood dendritic cells and monocytes from HIV-1-positive patients after 1 year of antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *41*, 405–415.
- Al-Sadi, R., Boivin, M., and Ma, T. (2009). Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* *14*, 2765–2778.
- Alvarez, C.P., Lasala, F., Carrillo, J., Muñiz, O., Corbí, A.L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* *76*, 6841–6844.
- Amerongen, H.M., Weltzin, R., Farnet, C.M., Michetti, P., Haseltine, W.A., and Neutra, M.R. (1991). Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *4*, 760–765.
- Amico, K.R. (2014). The key role of adherence for the effectiveness of antiretroviral-based prevention: state of the science and implications for the Asia-Pacific region. *Sex. Health* *11*, 155–165.
- Andersen, J.M., Al-Khairi, D., and Ingalls, R.R. (2006). Innate Immunity at the Mucosal Surface: Role of Toll-Like Receptor 3 and Toll-Like Receptor 9 in Cervical Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Biol Reprod* *74*, 824–831.
- Anderson, D.J., and Le Grand, R.L. (2014). Cell-Associated HIV Mucosal Transmission: The Neglected Pathway. *J Infect Dis.* *210*, S606–S608.
- Anderson, D., Politch, J.A., and Pudney, J. (2011). HIV infection of the penis. *Am J Reprod Immunol* *65*, 220–229.
- Anderson, J.A., Ping, L.-H., Dibben, O., Jabara, C.B., Arney, L., Kincer, L., Tang, Y., Hobbs, M., Hoffman, I., Kazembe, P., et al. (2010). HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms. *PLoS Pathog* *6*.
- Andersson, E., Sørensen, O.E., Frohm, B., Borregaard, N., Egesten, A., and Malm, J. (2002). Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Hum. Reprod.* *17*, 2529–2534.
- Andersson, J., Boasso, A., Nilsson, J., Zhang, R., Shire, N.J., Lindback, S., Shearer, G.M., and Choungnet, C.A. (2005). The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J. Immunol.* *174*, 3143–3147.
- Arrighi, J.-F., Pion, M., Garcia, E., Escola, J.-M., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B., and Piguet, V. (2004a). DC-SIGN-mediated Infectious Synapse Formation Enhances X4 HIV-1 Transmission from Dendritic Cells to T Cells. *J Exp Med* *200*, 1279–1288.

- Arrighi, J.-F., Pion, M., Wiznerowicz, M., Geijtenbeek, T.B., Garcia, E., Abraham, S., Leuba, F., Dutoit, V., Ducrey-Rundquist, O., van Kooyk, Y., et al. (2004b). Lentivirus-Mediated RNA Interference of DC-SIGN Expression Inhibits Human Immunodeficiency Virus Transmission from Dendritic Cells to T Cells. *J Virol* 78, 10848–10855.
- Asin, S.N., Fanger, M.W., Wildt-Perinic, D., Ware, P.L., Wira, C.R., and Howell, A.L. (2004). Transmission of HIV-1 by Primary Human Uterine Epithelial Cells and Stromal Fibroblasts. *J Infect Dis* 190, 236–245.
- Auvert, B., Taljaard, D., Lagarde, E., Sobngwi-Tambekou, J., Sitta, R., and Puren, A. (2005). Randomized, Controlled Intervention Trial of Male Circumcision for Reduction of HIV Infection Risk: The ANRS 1265 Trial. *PLoS Med* 2.
- Baba, M. (2006). Recent status of HIV-1 gene expression inhibitors. *Antiviral Research* 71, 301–306.
- Baeten, J.M., Kahle, E., Lingappa, J.R., Coombs, R.W., Delany-Moretlwe, S., Nakku-Joloba, E., Mugo, N.R., Wald, A., Corey, L., Donnell, D., et al. (2011). Genital HIV-1 RNA predicts risk of heterosexual HIV-1 transmission. *Sci Transl Med* 3, 77ra29.
- Baeten, J.M., Donnell, D., Ndase, P., Mugo, N.R., Campbell, J.D., Wangisi, J., Tappero, J.W., Bukusi, E.A., Cohen, C.R., Katabira, E., et al. (2012). Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. *N. Engl. J. Med.* 367, 399–410.
- Bahamondes, L., Trevisan, M., Andrade, L., Marchi, N.M., Castro, S., Díaz, J., and Faúndes, A. (2000). The effect upon the human vaginal histology of the long-term use of the injectable contraceptive Depo-Provera® ☆1. *Contraception* 62, 23–27.
- Bahamondes, M.V., Castro, S., Marchi, N.M., Marcovici, M., Andrade, L.A.L.A., Fernandes, A., and Bahamondes, L. (2014). Human vaginal histology in long-term users of the injectable contraceptive depot-medroxyprogesterone acetate. *Contraception* 90, 117–122.
- Bailey, R.C., Moses, S., Parker, C.B., Agot, K., Maclean, I., Krieger, J.N., Williams, C.F.M., Campbell, R.T., and Ndinya-Achola, J.O. (2007). Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet* 369, 643–656.
- Bajtay, Z., Speth, C., Erdei, A., and Dierich, M.P. (2004). Cutting Edge: Productive HIV-1 Infection of Dendritic Cells via Complement Receptor Type 3 (CR3, CD11b/CD18). *J Immunol* 173, 4775–4778.
- Bakri, Y., Schiffer, C., Zennou, V., Charneau, P., Kahn, E., Benjouad, A., Gluckman, J.C., and Canque, B. (2001). The Maturation of Dendritic Cells Results in Postintegration Inhibition of HIV-1 Replication. *J Immunol* 166, 3780–3788.
- Balandya, E., Sheth, S., Sanders, K., Wieland-Alter, W., and Lahey, T. (2010). Semen Protects CD4+ Target Cells from HIV Infection but Promotes the Preferential Transmission of R5 Tropic HIV. *J Immunol* 185, 7596–7604.
- Balotta, C., Bagnarelli, P., Violin, M., Ridolfo, A.L., Zhou, D., Berlusconi, A., Corvasce, S., Corbellino, M., Clementi, M., Clerici, M., et al. (1997). Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 11, F67–F71.
- Barron, M.A., Blyveis, N., Palmer, B.E., MaWhinney, S., and Wilson, C.C. (2003). Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J. Infect. Dis.* 187, 26–37.

- Batruch, I., Lecker, I., Kagedan, D., Smith, C.R., Mullen, B.J., Grober, E., Lo, K.C., Diamandis, E.P., and Jarvi, K.A. (2011). Proteomic Analysis of Seminal Plasma from Normal Volunteers and Post-Vasectomy Patients Identifies over 2000 Proteins and Candidate Biomarkers of the Urogenital System. *J. Proteome Res.* *10*, 941–953.
- Bendvold, E., Svanborg, K., Eneroth, P., Gottlieb, C., and Bygdeman, M. (1984). The natural variations in prostaglandin concentration in human seminal fluid and its relation to sperm quality. *Fertil. Steril.* *41*, 743–747.
- Bergman, P., Walter-Jallow, L., Broliden, K., Agerberth, B., and Söderlund, J. (2007). The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr. HIV Res.* *5*, 410–415.
- Berlier, W., Bourlet, T., Lawrence, P., Hamzeh, H., Lambert, C., Genin, C., Verrier, B., Dieu-Nosjean, M.-C., Pozzetto, B., and Delézay, O. (2005). Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J. Med. Virol.* *77*, 465–474.
- Berlier, W., Cremel, M., Hamzeh, H., Lévy, R., Lucht, F., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delézay, O. (2006a). Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum. Reprod.* *21*, 1135–1142.
- Berlier, W., Bourlet, T., Lévy, R., Lucht, F., Pozzetto, B., and Delézay, O. (2006b). Amount of seminal IL-1 β positively correlates to HIV-1 load in the semen of infected patients. *Journal of Clinical Virology* *36*, 204–207.
- Bernard-Stoecklin, S., Gommet, C., Cavarelli, M., and Grand, R.L. (2014). Nonhuman Primate Models for Cell-Associated Simian Immunodeficiency Virus Transmission: The Need to Better Understand the Complexity of HIV Mucosal Transmission. *J Infect Dis.* *210*, S660–S666.
- Bernhard, O.K., Lai, J., Wilkinson, J., Sheil, M.M., and Cunningham, A.L. (2004). Proteomic Analysis of DC-SIGN on Dendritic Cells Detects Tetramers Required for Ligand Binding but No Association with CD4. *J. Biol. Chem.* *279*, 51828–51835.
- Biancotto, A., Grivel, J.-C., Iglehart, S.J., Vanpouille, C., Lisco, A., Sieg, S.F., Debernardo, R., Garate, K., Rodriguez, B., Margolis, L.B., et al. (2007). Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* *109*, 4272–4279.
- Biancotto, A., Grivel, J.-C., Lisco, A., Vanpouille, C., Markham, P.D., Gallo, R.C., Margolis, L.B., and Lusso, P. (2009). Evolution of SIV toward RANTES resistance in macaques rapidly progressing to AIDS upon coinfection with HHV-6A. *Retrovirology* *6*, 61.
- Biti, R., Ffrench, R., Young, J., Bennetts, B., Stewart, G., and Liang, T. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat. Med.* *3*, 252–253.
- Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2014). Finding a cure for human immunodeficiency virus-1 infection. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *28*, 633–650.
- Blauvelt, A., Asada, H., Saville, M.W., Klaus-Kovtun, V., Altman, D.J., Yarchoan, R., and Katz, S.I. (1997). Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J. Clin. Invest.* *100*, 2043–2053.
- Blish, C.A., and Baeten, J.M. (2011). Hormonal contraception and HIV-1 transmission. *Am J Reprod Immunol* *65*, 302–307.

- Bloch, N., O'Brien, M., Norton, T.D., Polsky, S.B., Bhardwaj, N., and Landau, N.R. (2014). HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *30*, 195–203.
- Bobardt, M.D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B., and Gallay, P.A. (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J. Virol.* *81*, 395–405.
- Boggiano, C., Manel, N., and Littman, D.R. (2007a). Dendritic Cell-Mediated trans-Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity Is Independent of DC-SIGN. *J Virol* *81*, 2519–2523.
- Boggiano, C., Manel, N., and Littman, D.R. (2007b). Dendritic Cell-Mediated trans-Enhancement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity Is Independent of DC-SIGN. *J. Virol.* *81*, 2519–2523.
- Bomsel, M. (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* *3*, 42–47.
- Borde, C., Barnay-Verdier, S., Gaillard, C., Hocini, H., Maréchal, V., and Gozlan, J. (2011). Stepwise Release of Biologically Active HMGB1 during HSV-2 Infection. *PLoS One* *6*.
- Borgdorff, H., Tsvitivadze, E., Verhelst, R., Marzorati, M., Jurriaans, S., Ndayisaba, G.F., Schuren, F.H., and van de Wijgert, J.H.H.M. (2014). Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J* *8*, 1781–1793.
- Bouhlal, H., Chomont, N., Réquena, M., Nasreddine, N., Saidi, H., Legoff, J., Kazatchkine, M.D., Bélec, L., and Hocini, H. (2007). Opsonization of HIV with Complement Enhances Infection of Dendritic Cells and Viral Transfer to CD4 T Cells in a CR3 and DC-SIGN-Dependent Manner. *J Immunol* *178*, 1086–1095.
- Bouvet, J.-P., Grésenguet, G., and Bélec, L. (1997). Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clinical Microbiology and Infection* *3*, 19–23.
- Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., et al. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* *12*, 1365–1371.
- Brown, K.N., Wijewardana, V., Liu, X., and Barratt-Boyes, S.M. (2009). Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog.* *5*, e1000413.
- Buckett, W.M., Luckas, M.J., Gazvani, M.R., Aird, I.A., and Lewis-Jones, D.I. (1997). Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J. Androl.* *18*, 302–304.
- Burleigh, L., Lozach, P.-Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2006). Infection of Dendritic Cells (DCs), Not DC-SIGN-Mediated Internalization of Human Immunodeficiency Virus, Is Required for Long-Term Transfer of Virus to T Cells. *J. Virol.* *80*, 2949–2957.
- Busch, M.P., and Satten, G.A. (1997). Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *The American Journal of Medicine* *102*, 117–124.

- Caballero, I., Parrilla, I., Almiñana, C., del Olmo, D., Roca, J., Martínez, E., and Vázquez, J. (2012). Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 12–21.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, I.J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.-J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 532–538.
- Cameron, P.U., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A., and Steinman, R.M. (1992a). During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clinical & Experimental Immunology* 88, 226–236.
- Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1992b). Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 257, 383–387.
- Campbell, S.M., Crowe, S.M., and Mak, J. (2001). Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* 22, 217–227.
- Campo, J., Perea, M., Del Romero, J., Cano, J., Hernando, V., and Bascones, A. (2006). Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Diseases* 12, 219–228.
- Cardona-Maya, W., Velilla, P., Montoya, C.J., Cadavid, A., and Rugeles, M.T. (2009). Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters. *Curr. HIV Res.* 7, 418–424.
- Cardona-Maya, W., Velilla, P.A., Montoya, C.J., Cadavid, Á., and Rugeles, M.T. (2011). In vitro human immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. *J. Reprod. Immunol.* 92, 1–7.
- Carreno, M.-P., Chomont, N., Kazatchkine, M.D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A.-S., Andreatti, L., Matta, M., and Belec, L. (2002a). Binding of LFA-1 (CD11a) to Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) Triggers Transmigration of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Monocytes through Mucosal Epithelial Cells. *J Virol* 76, 32–40.
- Carreno, M.-P., Krieff, C., Irinopoulou, T., Kazatchkine, M.D., and Belec, L. (2002b). Enhanced transcytosis of R5-tropic human immunodeficiency virus across tight monolayer of polarized human endometrial cells under pro-inflammatory conditions. *Cytokine* 20, 289–294.
- Carrington, M., and O'Brien, S.J. (2003). The Influence of HLA Genotype on AIDS*. *Annual Review of Medicine* 54, 535–551.
- Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K., and O'Brien, S.J. (1999). HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantage. *Science* 283, 1748–1752.
- Carthagen, L., Becquart, P., Hocini, H., Kazatchkine, M.D., Bouhhal, H., and Belec, L. (2011). Modulation of HIV Binding to Epithelial Cells and HIV Transfer from Immature Dendritic Cells to CD4 T Lymphocytes by Human Lactoferrin and its Major Exposed LF-33 Peptide. *Open Virol J* 5, 27–34.
- Casslén, B., Sandberg, T., Gustavsson, B., Willén, R., and Nilbert, M. (1998). Transforming growth factor beta1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and

progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biol. Reprod.* *58*, 1343–1350.

Cavarelli, M., Foglieni, C., Rescigno, M., and Scarlatti, G. (2013). R5 HIV-1 envelope attracts dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5. *EMBO Mol Med* *5*, 776–794.

Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J.F., Fenard, D., Callebaut, C., and Greene, W.C. (2006). Human Immunodeficiency Virus Fusion to Dendritic Cells Declines as Cells Mature. *J Virol* *80*, 1992–1999.

Ceballos, A., Remes Lenicov, F., Sabatte, J., Rodriguez Rodrigues, C., Cabrini, M., Jancic, C., Raiden, S., Donaldson, M., Agustin Pasqualini, R., Marin-Briggiler, C., et al. (2009). Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *J Exp Med* *206*, 2717–2733.

Centers for Disease Control and Prevention (2015). CDC Fact Sheet: Today's HIV/AIDS Epidemic - [TodaysEpidemic-508.pdf](#).

Chancey, C.J., Khanna, K.V., Seegers, J.F.M.L., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., and Markham, R.B. (2006). Lactobacilli-Expressed Single-Chain Variable Fragment (scFv) Specific for Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Blocks Cell-Associated HIV-1 Transmission across a Cervical Epithelial Monolayer. *J Immunol* *176*, 5627–5636.

Chappell, C.A., Rohan, L.C., Moncla, B.J., Wang, L., Meyn, L.A., Bunge, K., and Hillier, S.L. (2014). The Effects of Reproductive Hormones on the Physical Properties of Cervicovaginal Fluid. *Am J Obstet Gynecol* *211*, 226.e1–e226.e7.

Chen, B.A., Panther, L., Marzinke, M.A., Hendrix, C.W., Hoesley, C.J., van der Straten, A., Husnik, M.J., Soto-Torres, L., Nel, A., Johnson, S., et al. (2015). Phase 1 Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Dapivirine and Maraviroc Vaginal Rings: a Double-Blind Randomized Trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*

Cherpes, T.L., Marrazzo, J.M., Cosentino, L.A., Meyn, L.A., Murray, P.J., and Hillier, S.L. (2008). Hormonal contraceptive use modulates the local inflammatory response to bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* *84*, 57–61.

Chohan, B., Lang, D., Sagar, M., Korber, B., Lavreys, L., Richardson, B., and Overbaugh, J. (2005). Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycosylation Variants with Shorter V1-V2 Loop Sequences Occurs during Transmission of Certain Genetic Subtypes and May Impact Viral RNA Levels. *J Virol* *79*, 6528–6531.

Choi, J., Ryoo, J., Oh, C., Hwang, S., and Ahn, K. (2015). SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity. *Retrovirology* *12*.

Chomont, N., Hocini, H., Gody, J.-C., Bouhlal, H., Becquart, P., Krief-Bouillet, C., Kazatchkine, M., and Bélec, L. (2008). Neutralizing monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 do not inhibit viral transcytosis through mucosal epithelial cells. *Virology* *370*, 246–254.

Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C., and Lusso, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8⁺ T Cells. *Science* *270*, 1811–1815.

Cohen, J. (2011). Breakthrough of the year. HIV treatment as prevention. *Science* *334*, 1628.

- Cohen, M.S., Hoffman, I.F., Royce, R.A., Kazembe, P., Dyer, J.R., Daly, C.C., Zimba, D., Vernazza, P.L., Maida, M., Fiscus, S.A., et al. (1997). Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. *AIDSCAP Malawi Research Group. Lancet* 349, 1868–1873.
- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., et al. (2011). Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 493–505.
- Cole, A.M., and Cole, A.L. (2008). REVIEW ARTICLE: Antimicrobial Polypeptides are Key Anti-HIV-1 Effector Molecules of Cervicovaginal Host Defense. *American Journal of Reproductive Immunology* 59, 27–34.
- Coleman, C.M., Gelais, C.S., and Wu, L. (2013). Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 762, 109–130.
- Colić, M., Mojsilović, S., Pavlović, B., Vucićević, D., Majstorović, I., Bufan, B., Stojić-Vukanić, Z., Vasiljić, S., Vučević, D., Gasić, S., et al. (2004). Comparison of two different protocols for the induction of maturation of human dendritic cells in vitro. *Vojnosanit Pregl* 61, 471–478.
- Collins, K.B., Patterson, B.K., Naus, G.J., Landers, D.V., and Gupta, P. (2000). Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med* 6, 475–479.
- Com, E., Bourgeon, F., Evrard, B., Ganz, T., Colleu, D., Jégou, B., and Pineau, C. (2003). Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol. Reprod.* 68, 95–104.
- Cone, R.A. (2014). Vaginal Microbiota and Sexually Transmitted Infections That May Influence Transmission of Cell-Associated HIV. *J Infect Dis.* 210, S616–S621.
- Coombs, R.W., Reichelderfer, P.S., and Landay, A.L. (2003). Recent observations on HIV type-1 infection in the genital tract of men and women. *AIDS* 17, 455–480.
- Cranage, M., Sharpe, S., Herrera, C., Cope, A., Dennis, M., Berry, N., Ham, C., Heeney, J., Rezk, N., Kashuba, A., et al. (2008). Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS Med.* 5, e157; discussion e157.
- Crane-Godreau, M.A., and Wira, C.R. (2005). CCL20/Macrophage Inflammatory Protein 3 α and Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Primary Uterine Epithelial Cells in Response to Treatment with Lipopolysaccharide or Pam3Cys. *Infect Immun* 73, 476–484.
- Cremel, M., Hamzeh-Cognasse, H., Genin, C., and Delézay, O. (2006). Female genital tract immunization: evaluation of candidate immunoadjuvants on epithelial cell secretion of CCL20 and dendritic/Langerhans cell maturation. *Vaccine* 24, 5744–5754.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255–266.
- Cunningham, A.L., Harman, A., Kim, M., Najla, N., and Lai, J. (2013). Immunobiology of Dendritic Cells and the Influence of HIV Infection. In *HIV Interaction with Dendritic Cells: Infection and Immunity*,.

Curtis, B.M., Scharnowske, S., and Watson, A.J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 8356–8360.

David, S. a., Smith, M. s., Lopez, G. j., Adany, I., Mukherjee, S., Buch, S., Goodenow, M. m., and Narayan, O. (2001). Selective Transmission of R5-Tropic HIV Type 1 from Dendritic Cells to Resting CD4+ T Cells. *AIDS Research and Human Retroviruses* *17*, 59–68.

Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, M.W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Gomperts, E., et al. (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* *273*, 1856–1862.

Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 112–124.

Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* *15*, 691–701.

Delwart, E.L., Mullins, J.I., Gupta, P., Learn, G.H., Holodniy, M., Katzenstein, D., Walker, B.D., and Singh, M.K. (1998). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Populations in Blood and Semen. *J Virol* *72*, 617–623.

Deplancke, B., and Gaskins, H.R. (2001). Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* *73*, 1131S – 1141S.

Derdeyn, C.A., Decker, J.M., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J.L., Muldoon, M., Denham, S.A., Heil, M.L., Kasolo, F., Musonda, R., Hahn, B.H., et al. (2004). Envelope-Constrained Neutralization-Sensitive HIV-1 After Heterosexual Transmission. *Science* *303*, 2019–2022.

De Saint Jean, A., Lucht, F., Bourlet, T., and Delézay, O. (2014). Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission. *AIDS* *28*, 2375–2380.

De Saint Jean, A., Bourlet, T., and Delezay, O. (2015). Pivotal role of the genital epithelial cells in HIV-1 transmission. *Curr. HIV Res.*

Dezzutti, C.S., Guenther, P.C., Cummins, J.E., Cabrera, T., Marshall, J.H., Dillberger, A., and Lal, R.B. (2001). Cervical and Prostate Primary Epithelial Cells Are Not Productively Infected but Sequester Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis.* *183*, 1204–1213.

Dezzutti, C.S., Russo, J., Wang, L., Abebe, K.Z., Li, J., Friend, D.R., McGowan, I.M., and Rohan, L.C. (2014). Development of HIV-1 Rectal-Specific Microbicides and Colonic Tissue Evaluation. *PLoS One* *9*.

Di Fabio, S., Giannini, G., Lapenta, C., Spada, M., Binelli, A., Germinario, E., Sestili, P., Belardelli, F., Proietti, E., and Vella, S. (2001). Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: a new model for the evaluation of vaginal microbicides. *AIDS* *15*, 2231–2238.

Dillon, S.M., Robertson, K.B., Pan, S.C., Mawhinney, S., Meditz, A.L., Folkvord, J.M., Connick, E., Mccarter, M.D., and Wilson, C.C. (2008). Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells With a Partial

Activation Phenotype Accumulate in Lymphoid Tissue During Asymptomatic Chronic HIV-1 Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 48, 1–12.

Dinh, M.H., Anderson, M.R., McRaven, M.D., Cianci, G.C., McCoombe, S.G., Kelley, Z.L., Gioia, C.J., Fought, A.J., Rademaker, A.W., Veazey, R.S., et al. (2015). Visualization of HIV-1 interactions with penile and foreskin epithelia: clues for female-to-male HIV transmission. *PLoS Pathog.* 11, e1004729.

Doerner, R., McKeown, E., Nelson, S., Anderson, J., Low, N., and Elford, J. (2013). Circumcision and HIV infection among men who have sex with men in Britain: the insertive sexual role. *Arch Sex Behav* 42, 1319–1326.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Loss of blood CD11c+ myeloid and CD11c–plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574–2576.

Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F., and Patterson, S. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101, 4505–4511.

Doncel, G.F., Joseph, T., and Thurman, A.R. (2011). Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? *American Journal of Reproductive Immunology* 65, 292–301.

Doncel, G.F., Anderson, S., and Zalenskaya, I. (2014). Role of Semen in Modulating the Female Genital Tract Microenvironment – Implications for HIV Transmission. *Am J Reprod Immunol* n/a – n/a.

Dong, C., Janas, A.M., Wang, J.-H., Olson, W.J., and Wu, L. (2007). Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Immature and Mature Dendritic Cells Reveals Dissociable cis- and trans-Infection. *J. Virol.* 81, 11352–11362.

Donnell, D., Baeten, J.M., Kiari, J., Thomas, K.K., Stevens, W., Cohen, C.R., McIntyre, J., Lingappa, J.R., Celum, C., and Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team (2010). Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. *Lancet* 375, 2092–2098.

Donoval, B.A., Landay, A.L., Moses, S., Agot, K., Ndinya-Achola, J.O., Nyagaya, E.A., MacLean, I., and Bailey, R.C. (2006). HIV-1 target cells in foreskins of African men with varying histories of sexually transmitted infections. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 386–391.

Drago-Serrano, M.E., de la Garza-Amaya, M., Luna, J.S., and Campos-Rodríguez, R. (2012). Lactoferrin-lipopolysaccharide (LPS) binding as key to antibacterial and antiendotoxic effects. *International Immunopharmacology* 12, 1–9.

Drakesmith, H., and Prentice, A. (2008). Viral infection and iron metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 541–552.

Drannik, A.G., Nag, K., Yao, X.-D., Henrick, B.M., Jain, S., Ball, T.B., Plummer, F.A., Wachihi, C., Kimani, J., and Rosenthal, K.L. (2012a). Anti-HIV-1 activity of elafin is more potent than its precursor's, trappin-2, in genital epithelial cells. *J. Virol.* 86, 4599–4610.

Drannik, A.G., Nag, K., Yao, X.-D., Henrick, B.M., Sallenave, J.-M., and Rosenthal, K.L. (2012b). Trappin-2/Elafin Modulate Innate Immune Responses of Human Endometrial Epithelial Cells to PolyI:C. *PLoS ONE* 7, e35866.

- Duncan, M.W., and Thompson, H.S. (2007). Proteomics of semen and its constituents. *Prot. Clin. Appl.* *1*, 861–875.
- Dyer, J.R., Eron, J.J., Hoffman, I.F., Kazembe, P., Vernazza, P.L., Nkata, E., Costello Daly, C., Fiscus, S.A., and Cohen, M.S. (1998). Association of CD4 cell depletion and elevated blood and seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA concentrations with genital ulcer disease in HIV-1-infected men in Malawi. *J. Infect. Dis.* *177*, 224–227.
- Earp, B.D. (2015). Do the Benefits of Male Circumcision Outweigh the Risks? A Critique of the Proposed CDC Guidelines. *Front Pediatr* *3*, 18.
- Evans, V.A., Lal, L., Akkina, R., Solomon, A., Wright, E., Lewin, S.R., and Cameron, P.U. (2011). Thymic plasmacytoid dendritic cells are susceptible to productive HIV-1 infection and efficiently transfer R5 HIV-1 to thymocytes in vitro. *Retrovirology* *8*, 43.
- Fahey, J.V., and Wira, C.R. (2002). Effect of Menstrual Status on Antibacterial Activity and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Production by Human Uterine Epithelial Cells in Culture. *J Infect Dis.* *185*, 1606–1613.
- Fahey, J.V., Schaefer, T.M., Channon, J.Y., and Wira, C.R. (2005). Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum. Reprod.* *20*, 1439–1446.
- Fahey, J.V., Wright, J.A., Shen, L., Smith, J.M., Ghosh, M., Rossoll, R.M., and Wira, C.R. (2008). Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol* *1*, 317–325.
- Fahrback, K.M., Barry, S.M., Ayehunie, S., Lamore, S., Klausner, M., and Hope, T.J. (2007). Activated CD34-Derived Langerhans Cells Mediate Transinfection with Human Immunodeficiency Virus. *J Virol* *81*, 6858–6868.
- Fairman, P., and Angel, J.B. (2012). The effect of human immunodeficiency virus-1 on monocyte-derived dendritic cell maturation and function. *Clin Exp Immunol* *170*, 101–113.
- Fan, Y., and Bingro, L. (2015). Expression of Toll-like receptors in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Exp Ther Med* *9*, 1455–1459.
- Fantini, J., Cook, D.G., Nathanson, N., Spitalnik, S.L., and Gonzalez-Scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 2700–2704.
- Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., and Yahji, N. (2002). Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med* *4*, 1–22.
- Fazeli, A., Bruce, C., and Anumba, D.O. (2005). Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum. Reprod.* *20*, 1372–1378.
- Feinberg, H., Powlesland, A.S., Taylor, M.E., and Weis, W.I. (2010). Trimeric Structure of Langerin. *J. Biol. Chem.* *285*, 13285–13293.

- Feldblum, P.J., Adeiga, A., Bakare, R., Wevill, S., Lendvay, A., Obadaki, F., Olayemi, M.O., Wang, L., Nanda, K., and Rountree, W. (2008). SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PLoS ONE* 3, e1474.
- Feng, Z., Dubyak, G.R., Lederman, M.M., and Weinberg, A. (2006). Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J. Immunol.* 177, 782–786.
- Fennessey, C.M., and Keele, B.F. (2013). Using Nonhuman Primates to Model HIV Transmission. *Curr Opin HIV AIDS* 8, 280–287.
- Ferreira, V.H., Kafka, J.K., and Kaushic, C. (2014). Influence of Common Mucosal Co-Factors on HIV Infection in the Female Genital Tract. *American Journal of Reproductive Immunology* n/a – n/a.
- Ferreira, V.H., Dizzell, S., Nazli, A., Kafka, J.K., Mueller, K., Nguyen, P.V., Tremblay, M.J., Cochrane, A., and Kaushic, C. (2015). Medroxyprogesterone Acetate Regulates HIV-1 Uptake and Transcytosis but Not Replication in Primary Genital Epithelial Cells, Resulting in Enhanced T-Cell Infection. *J Infect Dis.* 211, 1745–1756.
- Fichorova, R.N., Tucker, L.D., and Anderson, D.J. (2001). The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J. Infect. Dis.* 184, 418–428.
- Fichorova, R.N., Cronin, A.O., Lien, E., Anderson, D.J., and Ingalls, R.R. (2002). Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J. Immunol.* 168, 2424–2432.
- Fidler, S.J., Dorrell, L., Ball, S., Lombardi, G., Weber, J., Hawrylowicz, C., and Rees, A.D. (1996). An early antigen-presenting cell defect in HIV-1-infected patients correlates with CD4 dependency in human T-cell clones. *Immunology* 89, 46–53.
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Adema, G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2, 77–84.
- Fischetti, L., Barry, S.M., Hope, T.J., and Shattock, R.J. (2009). HIV-1 infection of human penile explant tissue and protection by candidate microbicides. *AIDS* 23, 319–328.
- Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., de Saint-Vis, B., Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Lebecque, S., et al. (2006). Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J. Immunol.* 177, 7959–7967.
- Fleming, D.T., and Wasserheit, J.N. (1999). From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 75, 3–17.
- Fleming, D.C., King, A.E., Williams, A.R.W., Critchley, H.O.D., and Kelly, R.W. (2003). Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertility and Sterility* 79, 856–863.
- Fletcher, P.S., Elliott, J., Grivel, J.-C., Margolis, L., Anton, P., McGowan, I., and Shattock, R.J. (2006). Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides. *AIDS* 20, 1237–1245.

- Flynn, N.M., Forthal, D.N., Harro, C.D., Judson, F.N., Mayer, K.H., Para, M.F., and rgp120 HIV Vaccine Study Group (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* *191*, 654–665.
- Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N.W., Herndier, B.G., and Engleman, E.G. (2002). Productive Infection of Plasmacytoid Dendritic Cells with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Triggered by CD40 Ligation. *J Virol* *76*, 11033–11041.
- Fonteneau, J.-F., Larsson, M., Beignon, A.-S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.-J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Plasmacytoid Dendritic Cells and Concomitantly Induces the Bystander Maturation of Myeloid Dendritic Cells. *J Virol* *78*, 5223–5232.
- Fontenot, D., He, H., Hanabuchi, S., Nehete, P.N., Zhang, M., Chang, M., Nehete, B., Wang, Y.-H., Wang, Y.-H., Ma, Z., et al. (2009). TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 16776–16781.
- Fotopoulos, G., Harari, A., Michetti, P., Trono, D., Pantaleo, G., and Kraehenbuhl, J.-P. (2002). Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9410–9414.
- Fox, C.A., Meldrum, S.J., and Watson, B.W. (1973). Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. *J Reprod Fertil* *33*, 69–75.
- Frange, P., Meyer, L., Deveau, C., Tran, L., Goujard, C., Ghosn, J., Girard, P.-M., Morlat, P., Rouzioux, C., Chaix, M.-L., et al. (2012). Recent HIV-1 Infection Contributes to the Viral Diffusion over the French Territory with a Recent Increasing Frequency. *PLoS ONE* *7*, e31695.
- French, K.C., Roan, N.R., and Makhatadze, G.I. (2014). Structural Characterization of Semen Coagulum-derived SEM1(86-107) Amyloid Fibrils that Enhance HIV-1 Infection. *Biochemistry*.
- Frleta, D., Ochoa, C.E., Kramer, H.B., Khan, S.A., Stacey, A.R., Borrow, P., Kessler, B.M., Haynes, B.F., and Bhardwaj, N. (2012). HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *J. Clin. Invest.* *122*, 4685–4697.
- Fung, K.Y.C., Glode, L.M., Green, S., and Duncan, M.W. (2004). A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate* *61*, 171–181.
- Furci, L., Tolazzi, M., Sironi, F., Vassena, L., and Lusso, P. (2012). Inhibition of HIV-1 infection by human α -defensin-5, a natural antimicrobial peptide expressed in the genital and intestinal mucosae. *PLoS ONE* *7*, e45208.
- Furuta, Y., Eriksson, K., Svennerholm, B., Fredman, P., Horal, P., Jeansson, S., Vahlne, A., Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (1994). Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 12559–12563.
- Gaillard, P., Verhofstede, C., Mwanyumba, F., Claeys, P., Chohan, V., Mandaliya, K., Bwayo, J., Plum, J., and Temmerman, M. (2000). Exposure to HIV-1 during delivery and mother-to-child transmission. *AIDS* *14*, 2341–2348.

- Galvin, S.R., and Cohen, M.S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Micro* 2, 33–42.
- Ganesh, L., Leung, K., Loré, K., Levin, R., Panet, A., Schwartz, O., Koup, R.A., and Nabel, G.J. (2004). Infection of Specific Dendritic Cells by CCR5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promotes Cell-Mediated Transmission of Virus Resistant to Broadly Neutralizing Antibodies. *J Virol* 78, 11980–11987.
- Ganor, Y., and Bomsel, M. (2011). HIV-1 Transmission in the Male Genital Tract. *American Journal of Reproductive Immunology* 65, 284–291.
- Ganor, Y., Zhou, Z., Tudor, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.-C., Gibault, L., Thiounn, N., Tomasini, J., Wolf, J.-P., and Bomsel, M. (2010). Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. *Mucosal Immunol* 3, 506–522.
- Ganor, Y., Zhou, Z., Bodo, J., Tudor, D., Leibowitch, J., Mathez, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.-C., Revol, M., and Bomsel, M. (2013). The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages. *Mucosal Immunol* 6, 776–786.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J.-F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J.-M., Demarex, N., Marsh, M., et al. (2005). HIV-1 Trafficking to the Dendritic Cell–T-Cell Infectious Synapse Uses a Pathway of Tetraspanin Sorting to the Immunological Synapse. *Traffic* 6, 488–501.
- Gardner, M.R., Kattenhorn, L.M., Kondur, H.R., Schaewen, M. von, Dorfman, T., Chiang, J.J., Haworth, K.G., Decker, J.M., Alpert, M.D., Bailey, C.C., et al. (2015). AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature*.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575–585.
- Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., and van Kooyk, Y. (2000c). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1, 353–357.
- Ghanem, K.G., Shah, N., Klein, R.S., Mayer, K.H., Sobel, J.D., Warren, D.L., Jamieson, D.J., Duerr, A.C., Rompalo, A.M., and HIV Epidemiology Research Study Group (2005). Influence of sex hormones, HIV status, and concomitant sexually transmitted infection on cervicovaginal inflammation. *J. Infect. Dis.* 191, 358–366.
- Ghosh, M. (2014). Secreted mucosal antimicrobials in the female reproductive tract that are important to consider for HIV prevention. *Am. J. Reprod. Immunol.* 71, 575–588.
- Ghosh, M., Shen, Z., Schaefer, T.M., Fahey, J.V., Gupta, P., and Wira, C.R. (2009). ORIGINAL ARTICLE: CCL20/MIP3 α is a Novel Anti-HIV-1 Molecule of the Human Female Reproductive Tract. *American Journal of Reproductive Immunology* 62, 60–71.

- Ghys, P.D., Fransen, K., Diallo, M.O., Ettiègne-Traoré, V., Coulibaly, I.M., Yeboué, K.M., Kalish, M.L., Maurice, C., Whitaker, J.P., Greenberg, A.E., et al. (1997). The associations between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS* *11*, F85–F93.
- Gianella, S., Morris, S.R., Vargas, M.V., Young, J.A., Callahan, B., Richman, D.D., Little, S.J., and Smith, D.M. (2013). Role of Seminal Shedding of Herpesviruses in HIV Type 1 Transmission. *J Infect Dis* *207*, 257–261.
- Gianella, S., Massanella, M., Richman, D.D., Little, S.J., Spina, C.A., Vargas, M.V., Lada, S.M., Daar, E.S., Dube, M.P., Haubrich, R.H., et al. (2014). Cytomegalovirus Replication in Semen is Associated with Higher Levels of Proviral HIV DNA and CD4+ T cell Activation during Antiretroviral Treatment. *J. Virol.* JVI.00831–14.
- Givan, A.L., White, H.D., Stern, J.E., Colby, E., Guyre, P.M., Wira, C.R., and Gosselin, E.J. (1997). Flow Cytometric Analysis of Leukocytes in the Human Female Reproductive Tract: Comparison of Fallopian Tube, Uterus, Cervix, and Vagina. *American Journal of Reproductive Immunology* *38*, 350–359.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 333–337.
- Gompels, M., Patterson, S., Roberts, M.S., Macatonia, S.E., Pinching, A.J., and Knight, S.C. (1998). Increase in dendritic cell numbers, their function and the proportion uninfected during AZT therapy. *Clin. Exp. Immunol.* *112*, 347–353.
- Goode, D., Aravantinou, M., Jarl, S., Truong, R., Derby, N., Guerra-Perez, N., Kenney, J., Blanchard, J., Gettie, A., Robbiani, M., et al. (2014). Sex Hormones Selectively Impact the Endocervical Mucosal Microenvironment: Implications for HIV Transmission. *PLoS ONE* *9*, e97767.
- Goodreau, S.M., Carnegie, N.B., Vittinghoff, E., Lama, J.R., Fuchs, J.D., Sanchez, J., and Buchbinder, S.P. (2014). Can male circumcision have an impact on the HIV epidemic in men who have sex with men? *PLoS ONE* *9*, e102960.
- Gorodeski, G.I., and Goldfarb, J. (1998). Seminal fluid factor increases the resistance of the tight functional complex of cultured human cervical epithelium CaSki cells. *Fertility and Sterility* *69*, 309–317.
- Gougeon, M.-L., Melki, M.-T., and Saidi, H. (2012). HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. *Cell Death Differ* *19*, 96–106.
- Gough, P.J., and Gordon, S. (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and Infection* *2*, 305–311.
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R.M. (1998). Immature Dendritic Cells Selectively Replicate Macrophagetropic (M-Tropic) Human Immunodeficiency Virus Type 1, while Mature Cells Efficiently Transmit both M- and T-Tropic Virus to T Cells. *J Virol* *72*, 2733–2737.
- Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F.P., and Steinman, R.M. (2004). HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *PNAS* *101*, 7669–7674.

- Granelli-Piperno, A., Shimeliovich, I., Pack, M., Trumpfheller, C., and Steinman, R.M. (2006). HIV-1 selectively infects a subset of nonmaturing BDCA1-positive dendritic cells in human blood. *J. Immunol.* *176*, 991–998.
- Grant, R.M., Lama, J.R., Anderson, P.L., McMahan, V., Liu, A.Y., Vargas, L., Goicochea, P., Casapía, M., Guanira-Carranza, J.V., Ramirez-Cardich, M.E., et al. (2010). Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2587–2599.
- Grant-Tschudy, K.S., and Wira, C.R. (2004). Effect of Estradiol on Mouse Uterine Epithelial Cell Transepithelial Resistance (TER). *American Journal of Reproductive Immunology* *52*, 252–262.
- Grassi, F., Hosmalin, A., McIlroy, D., Calvez, V., Debré, P., and Autran, B. (1999). Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS* *13*, 759–766.
- Gray, R.H., Kigozi, G., Serwadda, D., Makumbi, F., Watya, S., Nalugoda, F., Kiwanuka, N., Moulton, L.H., Chaudhary, M.A., Chen, M.Z., et al. (2007). Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* *369*, 657–666.
- Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P.S., Laing, K.G., Griffin, G.E., and Shattock, R.J. (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J. Virol.* *74*, 5577–5586.
- Grivel, J.-C., Shattock, R.J., and Margolis, L.B. (2011). Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med* *9*, S6.
- Gummuluru, S., Rogel, M., Stamatatos, L., and Emerman, M. (2003). Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Immature Dendritic Cells Can Occur Independently of DC-SIGN and Mannose Binding C-Type Lectin Receptors via a Cholesterol-Dependent Pathway. *J. Virol.* *77*, 12865–12874.
- Gummuluru, S., Ramirez, N.-G.P., and Akiyama, H. (2014). CD169-Dependent Cell-Associated HIV-1 Transmission: A Driver of Virus Dissemination. *J Infect Dis.* *210*, S641–S647.
- Gupta, S., Gach, J.S., Becerra, J.C., Phan, T.B., Pudney, J., Moldoveanu, Z., Joseph, S.B., Landucci, G., Supnet, M.J., Ping, L.-H., et al. (2013). The Neonatal Fc Receptor (FcRn) Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Transcytosis across Epithelial Cells. *PLoS Pathog* *9*.
- Haase, A.T. (2011). Early Events in Sexual Transmission of HIV and SIV and Opportunities for Interventions. *Annual Review of Medicine* *62*, 127–139.
- Hackstein, H., and Thomson, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* *4*, 24–35.
- Halioua, B., and Lobel, B. (2014). Controverses actuelles sur la circoncision. *La Presse Médicale* *43*, 1168–1173.
- Hankins, C. (2007). Roundtable: Male Circumcision: Implications for Women as Sexual Partners and Parents. *Reproductive Health Matters* *15*, 62–67.
- Harder, T., Rentero, C., Zech, T., and Gaus, K. (2007). Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 470–475.

- Harouse, J.M., Bhat, S., Spitalnik, S.L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D.H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 253, 320–323.
- Hart, K.M., Murphy, A.J., Barrett, K.T., Wira, C.R., Guyre, P.M., and Pioli, P.A. (2009). Functional Expression of Pattern Recognition Receptors in Tissues of the Human Female Reproductive Tract. *J Reprod Immunol* 80, 33–40.
- Hartnell, A., Steel, J., Turley, H., Jones, M., Jackson, D.G., and Crocker, P.R. (2001). Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations. *Blood* 97, 288–296.
- Hatch, S.C., Archer, J., and Gummuluru, S. (2009). Glycosphingolipid Composition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Particles Is a Crucial Determinant for Dendritic Cell-Mediated HIV-1 trans-Infection. *J Virol* 83, 3496–3506.
- Hayes, R.J., Watson-Jones, D., Celum, C., van de Wijgert, J., and Wasserheit, J. (2010). Treatment of sexually transmitted infections for hiv prevention: end of the road or new beginning? *AIDS* 24.
- Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., et al. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* 366, 1275–1286.
- He, N., Duan, S., Ding, Y., Rou, K., McGoogan, J.M., Jia, M., Yang, Y., Wang, J., Montaner, J.S.G., Wu, Z., et al. (2013). Antiretroviral therapy reduces HIV transmission in discordant couples in rural Yunnan, China. *PLoS ONE* 8, e77981.
- Heffron, R., Donnell, D., Rees, H., Celum, C., Mugo, N., Were, E., de Bruyn, G., Nakku-Joloba, E., Ngure, K., Kiarie, J., et al. (2012). Use of hormonal contraceptives and risk of HIV-1 transmission: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 12, 19–26.
- Hendel, H., Caillat-Zucman, S., Lebuane, H., Carrington, M., O'Brien, S., Andrieu, J.-M., Schächter, F., Zagury, D., Rappaport, J., Winkler, C., et al. (1999). New Class I and II HLA Alleles Strongly Associated with Opposite Patterns of Progression to AIDS. *J Immunol* 162, 6942–6946.
- Herbeuval, J.-P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 Immunopathogenesis: How Good Interferon Turns Bad. *Clin Immunol* 123, 121–128.
- Herbst-Kralovetz, M.M., Quayle, A.J., Ficarra, M., Greene, S., Rose, W.A., Chesson, R., Spagnuolo, R.A., and Pyles, R.B. (2008). ORIGINAL ARTICLE: Quantification and Comparison of Toll-Like Receptor Expression and Responsiveness in Primary and Immortalized Human Female Lower Genital Tract Epithelia. *American Journal of Reproductive Immunology* 59, 212–224.
- Herold, B.C., Mesquita, P.M., Madan, R.P., and Keller, M.J. (2011). Female Genital Tract Secretions and Semen Impact the Development of Microbicides for the Prevention of HIV and other Sexually Transmitted Infections. *Am J Reprod Immunol* 65, 325–333.
- Hirbod, T., Bailey, R.C., Agot, K., Moses, S., Ndinya-Achola, J., Murugu, R., Andersson, J., Nilsson, J., and Broliden, K. (2010). Abundant expression of HIV target cells and C-type lectin receptors in the foreskin tissue of young Kenyan men. *Am. J. Pathol.* 176, 2798–2805.
- Hirbod, T., Kong, X., Kigozi, G., Ndyababo, A., Serwadda, D., Prodger, J.L., Tobian, A.A., Nalugoda, F., Wawer, M.J., Shahabi, K., et al. (2014). HIV Acquisition Is Associated with Increased Antimicrobial

Peptides and Reduced HIV Neutralizing IgA in the Foreskin Prepuce of Uncircumcised Men. *PLoS Pathog* 10, e1004416.

Hirsch, V.M., Goldstein, S., Hynes, N.A., Elkins, W.R., London, W.T., Zack, P.M., Montefiori, D., and Johnson, P.R. (1994). Prolonged clinical latency and survival of macaques given a whole inactivated simian immunodeficiency virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 170, 51–59.

Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 8, 447–457.

Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., and McElrath, M.J. (2007). Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1. *Immunity* 26, 257–270.

Hocini, H., and Bomsel, M. (1999). Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl 3, S448–S453.

Hocini, H., Becquart, P., Bouhlal, H., Chomont, N., Ancuta, P., Kazatchkine, M.D., and Bélec, L. (2001). Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. *J. Virol.* 75, 5370–5374.

Hoffman, J.C., Anton, P.A., Baldwin, G., Elliott, J., Anisman-Posner, D., Tanner, K., Grogan, T., Elashoff, D., Sugar, C., Yang, O.O., et al. (2014). Seminal Plasma HIV-1 RNA Concentration is Strongly Associated with Altered Levels of Seminal Plasma IFN- γ , IL-17, and IL-5. *AIDS Research and Human Retroviruses*.

Hollingsworth, T.D., Anderson, R.M., and Fraser, C. (2008). HIV-1 Transmission, by Stage of Infection. *J Infect Dis.* 198, 687–693.

Hooper, L.V. (2009). Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Micro* 7, 367–374.

Horbul, J.E., Schmechel, S.C., Miller, B.R.L., Rice, S.A., and Southern, P.J. (2011). Herpes Simplex Virus-Induced Epithelial Damage and Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Human Cervical Organ Culture. *PLoS One* 6.

Houzet, L., Matusali, G., and Dejuqc-Rainsford, N. (2014). Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. *J. Infect. Dis.* 210 Suppl 3, S622–S630.

Howell, A.L., Edkins, R.D., Rier, S.E., Yeaman, G.R., Stern, J.E., Fanger, M.W., and Wira, C.R. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J Virol* 71, 3498–3506.

Huang, Y., Paxton, W.A., Wolinsky, S.M., Neumann, A.U., Zhang, L., He, T., Kang, S., Ceradini, D., Jin, Z., Yazdanbakhsh, K., et al. (1996). The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 2, 1240–1243.

Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3, 973–983.

Hussain, L.A., and Lehner, T. (1995). Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* 85, 475–484.

Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müßig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., et al. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* *360*, 692–698.

Iijima, N., Thompson, J.M., and Iwasaki, A. (2008). Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol* *1*, 451–459.

Introvini, A., Vanpouille, C., Lisco, A., Grivel, J.-C., and Margolis, L. (2013). Interleukin-7 Facilitates HIV-1 Transmission to Cervico-Vaginal Tissue ex vivo. *PLoS Pathog* *9*, e1003148.

Itescu, S., Mathur-Wagh, U., Skovron, M.L., Brancato, L.J., Marmor, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., and Winchester, R. (1992). HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *5*, 37–45.

Iversen, A.K., Larsen, A.R., Jensen, T., Fugger, L., Balslev, U., Wahl, S., Gerstoft, J., Mullins, J.I., and Skinhøj, P. (1998). Distinct determinants of human immunodeficiency virus type 1 RNA and DNA loads in vaginal and cervical secretions. *J. Infect. Dis.* *177*, 1214–1220.

Izquierdo-Useros, N., Blanco, J., Erkizia, I., Fernandez-Figueras, M.T., Borrás, F.E., Naranjo-Gomez, M., Bofill, M., Ruiz, L., Clotet, B., and Martinez-Picado, J. (2007). Maturation of Blood-Derived Dendritic Cells Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture and Transmission. *J Virol* *81*, 7559–7570.

Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Archer, J., Hatch, S.C., Erkizia, I., Blanco, J., Borrás, F.E., Puertas, M.C., Connor, J.H., Fernandez-Figueras, M.T., et al. (2009). Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* *113*, 2732–2741.

Izquierdo-Useros, N., Esteban, O., Rodriguez-Plata, M.T., Erkizia, I., Prado, J.G., Blanco, J., García-Parajo, M.F., and Martinez-Picado, J. (2011). Dynamic Imaging of Cell-Free and Cell-Associated Viral Capture in Mature Dendritic Cells. *Traffic* *12*, 1702–1713.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Contreras, F.-X., Rodriguez-Plata, M.T., Glass, B., Erkizia, I., Prado, J.G., Casas, J., Fabriàs, G., Kräusslich, H.-G., et al. (2012a). Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1. *PLoS Biol* *10*, e1001315.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., Puertas, M.C., Rodriguez-Plata, M.T., Zangger, N., Erikson, E., Pino, M., Erkizia, I., Glass, B., Clotet, B., et al. (2012b). Siglec-1 Is a Novel Dendritic Cell Receptor That Mediates HIV-1 Trans-Infection Through Recognition of Viral Membrane Gangliosides. *PLoS Biol* *10*, e1001448.

Izquierdo-Useros, N., Lorizate, M., McLaren, P.J., Telenti, A., Kräusslich, H.-G., and Martinez-Picado, J. (2014). HIV-1 Capture and Transmission by Dendritic Cells: The Role of Viral Glycolipids and the Cellular Receptor Siglec-1. *PLoS Pathog* *10*, e1004146.

Janas, A.M., Dong, C., Wang, J.-H., and Wu, L. (2008). Productive infection of human immunodeficiency virus type 1 in dendritic cells requires fusion-mediated viral entry. *Virology* *375*, 442–451.

Jang, Y.-S., Seo, G.-Y., Lee, J.-M., Seo, H.-Y., Han, H.-J., Kim, S.-J., Jin, B.-R., Kim, H.-J., Park, S.-R., Rhee, K.-J., et al. (2015). Lactoferrin causes IgA and IgG2b isotype switching through betaglycan binding and activation of canonical TGF- β signaling. *Mucosal Immunol* *8*, 906–917.

- Jaroenpool, J., Rogers, K.A., Pattanapanyasat, K., Villinger, F., Onlamoon, N., Crocker, P.R., and Ansari, A.A. (2007). Differences in the constitutive and SIV infection induced expression of Siglecs by hematopoietic cells from non-human primates. *Cellular Immunology* 250, 91–104.
- Jayathunge, P.H., McBride, W.J., MacLaren, D., Kaldor, J., Vallely, A., and Turville, S. (2014). Male Circumcision and HIV Transmission; What Do We Know? *Open AIDS J* 8, 31–44.
- Jolly, C., and Sattentau, Q.J. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J. Virol.* 79, 12088–12094.
- Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M., and Sattentau, Q.J. (2004). HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J Exp Med* 199, 283–293.
- Joseph, S.B., Swanstrom, R., Kashuba, A.D.M., and Cohen, M.S. (2015). Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 414–425.
- Joseph, T., Zalenskaya, I.A., Yousefieh, N., Schriver, S.D., Cote, L.C., Chandra, N., and Doncel, G.F. (2012). Induction of Cyclooxygenase (COX)-2 in Human Vaginal Epithelial Cells in Response to TLR ligands and TNF- α . *Am J Reprod Immunol* 67, 482–490.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.-J. (2001). Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. *J Exp Med* 194, 863–870.
- Kafka, J.K., Sheth, P.M., Nazli, A., Osborne, B.J., Kovacs, C., Kaul, R., and Kaushic, C. (2012). Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat. *AIDS* 26, 27–36.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. *J Immunol* 188, 21–28.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984–993.
- Kaslow, R.A., Dorak, T., and Tang, J. (Jianming) (2005). Influence of Host Genetic Variation on Susceptibility to HIV Type 1 Infection. *J Infect Dis.* 191, S68–S77.
- Kaur, G., and Mehra, N. (2009). Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection. *Tissue Antigens* 73, 289–301.
- Kawamura, T., Gulden, F.O., Sugaya, M., McNamara, D.T., Borris, D.L., Lederman, M.M., Orenstein, J.M., Zimmerman, P.A., and Blauvelt, A. (2003). R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8401–8406.
- Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-Gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., et al. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7552–7557.
- Keller, M.J., and Herold, B.C. (2009). Understanding basic mechanisms and optimizing assays to evaluate the efficacy of vaginal microbicides. *Sex Transm Dis* 36, S92–S95.

Keller, M.J., Mesquita, P.M.M., Torres, N.M., Cho, S., Shust, G., Madan, R.P., Cohen, H.W., Petrie, J., Ford, T., Soto-Torres, L., et al. (2010). Postcoital Bioavailability and Antiviral Activity of 0.5% PRO 2000 Gel: Implications for Future Microbicide Clinical Trials. *PLoS One* 5.

Kelly, R.W., Skibinski, G., and James, K. (1994). The immunosuppressive contribution of prostaglandin components of human semen and their ability to elevate cyclic adenosine monophosphate levels in peripheral blood mononuclear cells. *J. Reprod. Immunol.* 26, 31–40.

Kenya National AIDS Control Council (2009). KENYA HIV PREVENTION RESPONSE AND MODES OF TRANSMISSION ANALYSIS.

Keogan, S., Siegert, K., Wigdahl, B., and Krebs, F.C. (2015). Immunomodulation by seminal factors and implications for male-to-female HIV-1 transmission. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*

Khanna, K.V., Whaley, K.J., Zeitlin, L., Moench, T.R., Mehrazar, K., Cone, R.A., Liao, Z., Hildreth, J.E.K., Hoen, T.E., Shultz, L., et al. (2002). Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *J. Clin. Invest.* 109, 205–211.

Kim, K.-A., Yolamanova, M., Zirafi, O., Roan, N.R., Staendker, L., Forssmann, W.-G., Burgener, A., Dejucq-Rainsford, N., Hahn, B.H., Shaw, G.M., et al. (2010). Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 7, 55.

King, A.E., Fleming, D.C., Critchley, H.O.D., and Kelly, R.W. (2003). Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *Journal of Reproductive Immunology* 59, 1–16.

Kinlock, B.L., Wang, Y., Turner, T.M., Wang, C., and Liu, B. (2014). Transcytosis of HIV-1 through Vaginal Epithelial Cells Is Dependent on Trafficking to the Endocytic Recycling Pathway. *PLoS One* 9.

Klatt, N.R., and Brenchley, J.M. (2010). Th17 Cell Dynamics in HIV Infection. *Curr Opin HIV AIDS* 5, 135–140.

Klebanoff, S.J., and Coombs, R.W. (1991). Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J. Exp. Med.* 174, 289–292.

Klebanoff, S.J., and Kazazi, F. (1995). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the amine oxidase-peroxidase system. *J Clin Microbiol* 33, 2054–2057.

Klotman, M.E., and Chang, T.L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 447–456.

Knight, S.C., Patterson, S., and Macatonia, S.E. (1991). Stimulatory and suppressive effects of infection of dendritic cells with HIV-1. *Immunol. Lett.* 30, 213–218.

Kohli, A., Islam, A., Moyes, D.L., Murciano, C., Shen, C., Challacombe, S.J., and Naglik, J.R. (2014). Oral and Vaginal Epithelial Cell Lines Bind and Transfer Cell-Free Infectious HIV-1 to Permissive Cells but Are Not Productively Infected. *PLoS ONE* 9, e98077.

Kopp, Z.A., Jain, U., Van Limbergen, J., and Stadnyk, A.W. (2015). Do Antimicrobial Peptides and Complement Collaborate in the Intestinal Mucosa? *Front Immunol* 6.

- van der Kuyl, A.C., van den Burg, R., Zorgdrager, F., Groot, F., Berkhout, B., and Cornelissen, M. (2007). Sialoadhesin (CD169) Expression in CD14+ Cells Is Upregulated Early after HIV-1 Infection and Increases during Disease Progression. *PLoS ONE* 2.
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A., and Littman, D.R. (2002). DC-SIGN-Mediated Internalization of HIV Is Required for Trans-Enhancement of T Cell Infection. *Immunity* 16, 135–144.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Sattentau, Q.J., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (2000). Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 74, 1961–1972.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.
- Lai, J., Bernhard, O.K., Turville, S.G., Harman, A.N., Wilkinson, J., and Cunningham, A.L. (2009). Oligomerization of the macrophage mannose receptor enhances gp120-mediated binding of HIV-1. *J. Biol. Chem.* 284, 11027–11038.
- Laird, S.M., Widdowson, R., El-Sheikhi, M., Hall, A.J., and Li, T.C. (2011). Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells. *Hum. Reprod.* 26, 1144–1152.
- Lama, J., and Planelles, V. (2007). Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology* 4, 52.
- Lambert, A.A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A.D., and Tremblay, M.J. (2008). The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112, 1299–1307.
- Lambert, A.A., Azzi, A., Lin, S.-X., Allaire, G., St-Gelais, K.P., Tremblay, M.J., and Gilbert, C. (2013). Dendritic Cell Immunoreceptor Is a New Target for Anti-AIDS Drug Development: Identification of DCIR/HIV-1 Inhibitors. *PLoS ONE* 8, e67873.
- Lavine, C.L., Lao, S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Sodroski, J.G., Yang, X., and NIAID Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology (CHAVI) (2012). High-mannose glycan-dependent epitopes are frequently targeted in broad neutralizing antibody responses during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 86, 2153–2164.
- Lawn, S.D., Butera, S.T., and Folks, T.M. (2001). Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Clin Microbiol Rev* 14, 753–777.
- Lawrence, P., Zimmer, A., and Paul, S. (2009). Infection muqueuse par le virus VIH-1: mécanismes, conséquences, perspectives de vaccination. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2009, 45–54.
- Lawrence, P., Portran, D., Terrasse, R., Palle, S., Olivier, T., Fantini, J., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2012). Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. *AIDS* 26, 785–796.
- Lech, M., Avila-Ferrufino, A., Skuginna, V., Susanti, H.E., and Anders, H.-J. (2010). Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int. Immunol.* 22, 717–728.

- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D., and Doms, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 5215–5220.
- Lee, B., Leslie, G., Soilleux, E., O’Doherty, U., Baik, S., Levroney, E., Flummerfelt, K., Swiggard, W., Coleman, N., Malim, M., et al. (2001). cis Expression of DC-SIGN Allows for More Efficient Entry of Human and Simian Immunodeficiency Viruses via CD4 and a Coreceptor. *J. Virol.* *75*, 12028–12038.
- Le Grand, R., Nadal, M., Cheret, A., Roques, P., Vaslin, B., Matheux, F., Theodoro, F., Gras, G., Gauthier, L., and Aubertin, A.M. (1995). Infection of macaques after vaginal exposure to a primary isolate of SIVmac251. *AIDS* *9*, 308–309.
- Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fätkenheuer, G., Wolf, J.S., van Lunzen, J., and Romerio, F. (2010). Plasmacytoid Dendritic Cells Accumulate and Secrete Interferon Alpha in Lymph Nodes of HIV-1 Patients. *PLoS One* *5*.
- Lei, J.H., Liu, L.R., Wei, Q., Yan, S.B., Yang, L., Song, T.R., Yuan, H.C., Lv, X., and Han, P. (2015). Circumcision Status and Risk of HIV Acquisition during Heterosexual Intercourse for Both Males and Females: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* *10*, e0125436.
- Le Tortorec, A., and DeJucq-Rainsford, N. (2010). HIV infection of the male genital tract – consequences for sexual transmission and reproduction. *Int J Androl* *33*, e98–e108.
- Leupin, O., Zaru, R., Laroche, T., Müller, S., and Valitutti, S. (2000). Exclusion of CD45 from the T-cell receptor signaling area in antigen-stimulated T lymphocytes. *Current Biology* *10*, 277–280.
- Levine, W.C., Pope, V., Bhoomkar, A., Tambe, P., Lewis, J.S., Zaidi, A.A., Farshy, C.E., Mitchell, S., and Talkington, D.F. (1998). Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with nonulcerative sexually transmitted diseases. *J. Infect. Dis.* *177*, 167–174.
- Levinson, P., Kaul, R., Kimani, J., Ngugi, E., Moses, S., MacDonald, K.S., Broliden, K., Hirbod, T., and Kibera HIV Study Group (2009). Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS* *23*, 309–317.
- Leyva, F.J., Fuchs, E.J., Bakshi, R.P., Carballo-Diéguez, A., Ventuneac, A., Yue, C., Caffo, B.S., Du, Y., Torbenson, M.S., Li, L., et al. (2015). Simultaneous evaluation of safety, acceptability, peri-coital kinetics, and ex vivo pharmacodynamics comparing four rectal microbicide vehicle candidates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*.
- Li, Q., Estes, J.D., Schlievert, P.M., Duan, L., Brosnahan, A.J., Southern, P.J., Reilly, C.S., Peterson, M.L., Schultz-Darken, N., Brunner, K.G., et al. (2009). Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* *458*, 1034–1038.
- Linden, S.K., Sutton, P., Karlsson, N.G., Korolik, V., and McGuckin, M.A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol* *1*, 183–197.
- Lisco, A., Introini, A., Munawwar, A., Vanpouille, C., Grivel, J.-C., Blank, P., Singh, S., and Margolis, L. (2012a). HIV-1 imposes rigidity on blood and semen cytokine networks. *Am. J. Reprod. Immunol.* *68*, 515–521.
- Lisco, A., Munawwar, A., Introini, A., Vanpouille, C., Saba, E., Feng, X., Grivel, J.-C., Singh, S., and Margolis, L. (2012b). Semen of HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. *J. Infect. Dis.* *205*, 97–105.

- Lo Caputo, S., Trabattoni, D., Vichi, F., Piconi, S., Lopalco, L., Villa, M.L., Mazzotta, F., and Clerici, M. (2003). Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS* 17, 531–539.
- Londish, G.J., Templeton, D.J., Regan, D.G., Kaldor, J.M., and Murray, J.M. (2010). Minimal impact of circumcision on HIV acquisition in men who have sex with men. *Sex Health* 7, 463–470.
- Looker, K.J., Garnett, G.P., and Schmid, G.P. (2008). An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull World Health Organ* 86, 805–812.
- Loras, B., Vételé, F., Malki, A.E., Rollet, J., Soufir, J.-C., and Benahmed, M. (1999). Seminal transforming growth factor- β in normal and infertile men. *Hum. Reprod.* 14, 1534–1539.
- Loré, K., Sönnnerborg, A., Broström, C., Goh, L.-E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H.-J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L.A., et al. (2002). Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 16, 683–692.
- Louissaint, N.A., NIMMAGADDA, S., FUCHS, E.J., BAKSHI, R.P., CAO, Y., LEE, L.A., GOLDSMITH, J., CAFFO, B.S., DU, Y., KING, K.E., et al. (2012). Distribution of Cell-free and Cell-associated HIV surrogates in the Colon Following Simulated Receptive Anal Intercourse in Men who Have Sex with Men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 59, 10–17.
- Lourenço, A.G., Komesu, M.C., Machado, A.A., Quintana, S.M., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delézy, O. (2014). Semen lactoferrin promotes CCL20 production by epithelial cells: Involvement in HIV transmission. *World J Virol* 3, 11–17.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* 26, 503–517.
- Ma, G., Greenwell-Wild, T., Lei, K., Jin, W., Swisher, J., Hardegen, N., Wild, C.T., and Wahl, S.M. (2004). Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Binds to Annexin II, a Cofactor for Macrophage HIV-1 Infection. *J Exp Med* 200, 1337–1346.
- Maartens, G., Celum, C., and Lewin, S.R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet* 384, 258–271.
- Macatonia, S.E., Lau, R., Patterson, S., Pinching, A.J., and Knight, S.C. (1990). Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 71, 38–45.
- Madison, M.N., Roller, R.J., and Okeoma, C.M. (2014). Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 11, 102.
- Madison, M.N., Jones, P.H., and Okeoma, C.M. (2015). Exosomes in human semen restrict HIV-1 transmission by vaginal cells and block intravaginal replication of LP-BM5 murine AIDS virus complex. *Virology* 482, 189–201.
- Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., Ohmoto, Y., Gima, H., Thaler, C.J., and Aono, T. (2002). A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology* 54, 33–42.

Magérus-Chatinet, A., Yu, H., Garcia, S., Ducloux, E., Terris, B., and Bomsel, M. (2007). Galactosyl ceramide expressed on dendritic cells can mediate HIV-1 transfer from monocyte derived dendritic cells to autologous T cells. *Virology* 362, 67–74.

Mailliard, R.B., Son, Y.-I., Redlinger, R., Coates, P.T., Giermasz, A., Morel, P.A., Storkus, W.J., and Kalinski, P. (2003). Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J. Immunol.* 171, 2366–2373.

Malaysian AIDS Council & Malaysian AIDS foundation (2014). Annual-Report-2013_A4_FA_22052013-web.pdf.

Malm, J., Sørensen, O., Persson, T., Frohm-Nilsson, M., Johansson, B., Bjartell, A., Lilja, H., Ståhle-Bäckdahl, M., Borregaard, N., and Egesten, A. (2000). The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect. Immun.* 68, 4297–4302.

Mann, J.F.S., McKay, P.F., Arokiasamy, S., Patel, R.K., Tregoning, J.S., and Shattock, R.J. (2013). Mucosal application of gp140 encoding DNA polyplexes to different tissues results in altered immunological outcomes in mice. *PLoS ONE* 8, e67412.

Marañón, C., Desoutter, J.-F., Hoeffel, G., Cohen, W., Hanau, D., and Hosmalin, A. (2004). Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6092–6097.

Margolis, L., and Shattock, R. (2006). Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved? *Nat Rev Micro* 4, 312–317.

Marrazzo, J.M., Ramjee, G., Richardson, B.A., Gomez, K., Mgodhi, N., Nair, G., Palanee, T., Nakabiito, C., van der Straten, A., Noguchi, L., et al. (2015). Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N. Engl. J. Med.* 372, 509–518.

Martin, H.L., Richardson, B.A., Nyange, P.M., Lavreys, L., Hillier, S.L., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J.O., Bwayo, J., and Kreiss, J. (1999). Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 180, 1863–1868.

Martinson, J.A., Roman-Gonzalez, A., Tenorio, A.R., Montoya, C.J., Gichinga, C.N., Rugeles, M.T., Tomai, M., Krieg, A.M., Ghanekar, S., Baum, L.L., et al. (2007). Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell. Immunol.* 250, 75–84.

Marx, P.A., Spira, A.I., Gettie, A., Dailey, P.J., Veazey, R.S., Lackner, A.A., Mahoney, C.J., Miller, C.J., Claypool, L.E., Ho, D.D., et al. (1996). Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. *Nat. Med.* 2, 1084–1089.

Mauck, C.K., Callahan, M.M., Baker, J., Arbogast, K., Veazey, R., Stock, R., Pan, Z., Morrison, C.S., Chen-Mok, M., Archer, D.F., et al. (1999). The effect of one injection of Depo-Provera on the human vaginal epithelium and cervical ectopy. *Contraception* 60, 15–24.

Mbopi-Kéou, F.-X., Grésenguet, G., Mayaud, P., Weiss, H.A., Gopal, R., Matta, M., Paul, J.-L., Brown, D.W.G., Hayes, R.J., Mabey, D.C.W., et al. (2000). Interactions between Herpes Simplex Virus Type 2 and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in African Women: Opportunities for Intervention. *J Infect Dis.* 182, 1090–1096.

- McClelland, R.S., Wang, C.C., Mandaliya, K., Overbaugh, J., Reiner, M.T., Panteleeff, D.D., Lavreys, L., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J.J., and Kreiss, J.K. (2001). Treatment of cervicitis is associated with decreased cervical shedding of HIV-1. *AIDS* 15, 105–110.
- McClure, C.P., Tighe, P.J., Robins, R.A., Bansal, D., Bowman, C.A., Kingston, M., and Ball, J.K. (2005). HIV coreceptor and chemokine ligand gene expression in the male urethra and female cervix. *AIDS* 19, 1257–1265.
- McCoombe, S.G., and Short, R.V. (2006). Potential HIV-1 target cells in the human penis. *AIDS* 20, 1491–1495.
- McCormack, S., Dunn, D.T., Desai, M., Dolling, D.I., Gafos, M., Gilson, R., Sullivan, A.K., Clarke, A., Reeves, I., Schembri, G., et al. (2015). Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet*.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., and Hope, T.J. (2003). Recruitment of HIV and Its Receptors to Dendritic Cell-T Cell Junctions. *Science* 300, 1295–1297.
- Mcgowan, I., Cranston, R.D., Duffill, K., Siegel, A., Engstrom, J.C., Nikiforov, A., Jacobson, C., Rehman, K.K., Elliott, J., Khanukhova, E., et al. (2015). A Phase 1 Randomized, Open Label, Rectal Safety, Acceptability, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of Three Formulations of Tenofovir 1% Gel (the CHARM-01 Study). *PLoS ONE* 10, e0125363.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheyner, R., Wain-Hobson, S., Clauvel, J.P., Oksenhendler, E., Debré, P., and Hosmalin, A. (1995). Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 69, 4737–4745.
- Mehendale, S.M., Rodrigues, J.J., Brookmeyer, R.S., Gangakhedkar, R.R., Divekar, A.D., Gokhale, M.R., Risbud, A.R., Paranjape, R.S., Shepherd, M.E., Rompalo, A.E., et al. (1995). Incidence and Predictors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Seroconversion in Patients Attending Sexually Transmitted Disease Clinics in India. *J Infect Dis.* 172, 1486–1491.
- Mellors, J.W., Kingsley, L.A., Rinaldo, C.R., Todd, J.A., Hoo, B.S., Kokka, R.P., and Gupta, P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann. Intern. Med.* 122, 573–579.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272, 1167–1170.
- Melo, M.G., Santos, B.R., De Cassia Lira, R., Varella, I.S., Turella, M.L., Rocha, T.M., and Nielsen-Saines, K. (2008). Sexual transmission of HIV-1 among serodiscordant couples in Porto Alegre, southern Brazil. *Sex Transm Dis* 35, 912–915.
- Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M.T., Decker, J.M., Moldoveanu, Z., Orenstein, J.M., Graham, M.F., Kappes, J.C., Mestecky, J., et al. (2002). Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 8, 150–156.
- Merbah, M., Introini, A., Fitzgerald, W., Grivel, J.-C., Lisco, A., Vanpouille, C., and Margolis, L. (2011). Cervico-Vaginal Tissue Ex Vivo As A Model To Study Early Events In Hiv-1 Infection. *Am J Reprod Immunol* 65, 268–278.

Michael, N.L., Nelson, J.A.E., KewalRamani, V.N., Chang, G., O'Brien, S.J., Mascola, J.R., Volsky, B., Louder, M., White, G.C., Littman, D.R., et al. (1998). Exclusive and Persistent Use of the Entry Coreceptor CXCR4 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Subject Homozygous for CCR5 Δ 32. *J Virol* 72, 6040–6047.

Michelini, M., Rosellini, A., Papini, S., Revoltella, R.P., Michelini, M., Rosellini, A., Papini, S., and Simoncini, T. (2004). A three-dimensional organotypic culture of the human uterine exocervix for studying mucosal epithelial differentiation and migrating leukocytes. *Differentiation* 72, 138–149.

Micsenyi, A.M., Zony, C., Alvarez, R.A., Durham, N.D., Chen, B.K., and Klotman, M.E. (2013). Postintegration HIV-1 infection of cervical epithelial cells mediates contact-dependent productive infection of T cells. *J. Infect. Dis.* 208, 1756–1767.

Miedema, F. (2008). A brief history of HIV vaccine research: stepping back to the drawing board? *AIDS* 22, 1699–1703.

Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., et al. (2000). HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *PNAS* 97, 2709–2714.

Miller, C.J. (1998). Localization of Simian immunodeficiency virus-infected cells in the genital tract of male and female Rhesus macaques. *Journal of Reproductive Immunology* 41, 331–339.

Miller, C.J., Alexander, N.J., Sutjipto, S., Lackner, A.A., Gettie, A., Hendrickx, A.G., Lowenstine, L.J., Jennings, M., and Marx, P.A. (1989). Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. *J Virol* 63, 4277–4284.

Miller, C.J., Li, Q., Abel, K., Kim, E.-Y., Ma, Z.-M., Wietgreffe, S., La Franco-Scheuch, L., Compton, L., Duan, L., Shore, M.D., et al. (2005). Propagation and Dissemination of Infection after Vaginal Transmission of Simian Immunodeficiency Virus. *J Virol* 79, 9217–9227.

Mills, E.J., Nachega, J.B., and Ford, N. (2013). Can we stop AIDS with antiretroviral-based treatment as prevention? *Glob Health Sci Pract* 1, 29–34.

Mirmonsef, P., and Spear, G.T. (2014). The Barrier to HIV Transmission Provided by Genital Tract Lactobacillus Colonization. *Am J Reprod Immunol* 71, 531–536.

Mitchell, C.M., McLemore, L., Westerberg, K., Astronomo, R., Smythe, K., Gardella, C., Mack, M., Magaret, A., Patton, D., Agnew, K., et al. (2014). Long-term Effect of Depot Medroxyprogesterone Acetate on Vaginal Microbiota, Epithelial Thickness and HIV Target Cells. *J Infect Dis.* 210, 651–655.

Molina, J.-M., Capitant, C., Charreau, I., Meyer, L., Spire, B., Pialoux, G., Chidiac, C., Delfraissy, J.-F., and Tremblay, C. (2015). On Demand PrEP With Oral TDF-FTC in MSM: Results of the ANRS Ipergay Trial (CROI 2015, Seattle).

Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82–86.

Montaner, J.S.G., Lima, V.D., Harrigan, P.R., Lourenço, L., Yip, B., Nosyk, B., Wood, E., Kerr, T., Shannon, K., Moore, D., et al. (2014). Expansion of HAART coverage is associated with sustained

decreases in HIV/AIDS morbidity, mortality and HIV transmission: the “HIV Treatment as Prevention” experience in a Canadian setting. *PLoS ONE* 9, e87872.

Moris, A., Nobile, C., Buseyne, F., Porrot, F., Abastado, J.-P., and Schwartz, O. (2004). DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103, 2648–2654.

Moriyama, A., Shimoya, K., Kawamoto, A., Hashimoto, K., Ogata, I., Kunishige, I., Ohashi, K., Azuma, C., Saji, F., and Murata, Y. (1998). Secretory leukocyte protease inhibitor (SLP) concentrations in seminal plasma: SLPI restores sperm motility reduced by elastase. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 946–950.

Morris, H.H., Gatter, K.C., Stein, H., and Mason, D.Y. (1983). Langerhans’ cells in human cervical epithelium: an immunohistological study. *Br J Obstet Gynaecol* 90, 400–411.

Morrison, C.S., Chen, P.-L., Kwok, C., Baeten, J.M., Brown, J., Crook, A.M., Van Damme, L., Delany-Moretlwe, S., Francis, S.C., Friedland, B.A., et al. (2015). Hormonal Contraception and the Risk of HIV Acquisition: An Individual Participant Data Meta-analysis. *PLoS Med* 12, e1001778.

MTN, microbicide trials network (2011). Microbicide Trials Network Statement on Decision to Discontinue Use of Tenofovir Gel in VOICE , a Major HIV Prevention Study in Women.

MTN, microbicide trials network (2014). About Microbicides Fact Sheet | Microbicide Trials Network.

Muciaccia, B., Padula, F., Gandini, L., Lenzi, A., and Stefanini, M. (2005). HIV-1 chemokine co-receptor CCR5 is expressed on the surface of human spermatozoa. *AIDS* 19, 1424–1426.

Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., et al. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131, 1059–1071.

Münch, J., Sauermann, U., Yolamanova, M., Raue, K., Stahl-Hennig, C., and Kirchhoff, F. (2013). Effect of semen and seminal amyloid on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Retrovirology* 10, 148.

Musicco, M., Lazzarin, A., Nicolosi, A., Gasparini, M., Costigliola, P., Arici, C., and Saracco, A. (1994). Antiretroviral treatment of men infected with human immunodeficiency virus type 1 reduces the incidence of heterosexual transmission. Italian Study Group on HIV Heterosexual Transmission. *Arch. Intern. Med.* 154, 1971–1976.

Nachega, J.B., Uthman, O.A., Mills, E.J., and Quinn, T.C. (2013). Adherence to Antiretroviral Therapy for the Success of Emerging Interventions to Prevent HIV Transmission: A Wake up Call. *J AIDS Clin Res* 2012.

Naif, H.M., Cunningham, A.L., Alali, M., Li, S., Nasr, N., Buhler, M.M., Schols, D., de Clercq, E., and Stewart, G. (2002). A human immunodeficiency virus type 1 isolate from an infected person homozygous for CCR5Delta32 exhibits dual tropism by infecting macrophages and MT2 cells via CXCR4. *J. Virol.* 76, 3114–3124.

Narimatsu, R., Wolday, D., and Patterson, B.K. (2005). IL-8 increases transmission of HIV type 1 in cervical explant tissue. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 228–233.

Nascimbeni, M., Perié, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmann, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J., et al. (2009). Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from

chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* *113*, 6112–6119.

Nasr, N., Harman, A., Turville, S., and Cunningham, A.L. (2014). HIV infection of dendritic cells. *Methods Mol. Biol.* *1087*, 221–232.

Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., and Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation. *PLoS Pathog* *6*.

Nazli, A., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B.J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M.F., Ouellet, M., et al. (2013). HIV-1 gp120 Induces TLR2- and TLR4-Mediated Innate Immune Activation in Human Female Genital Epithelium. *J. Immunol.*

Neildez, O., Le Grand, R., Chéret, A., Caufour, P., Vaslin, B., Matheux, F., Théodoro, F., Roques, P., and Dormont, D. (1998). Variation in virological parameters and antibody responses in macaques after atraumatic vaginal exposure to a pathogenic primary isolate of SIVmac251. *Research in Virology* *149*, 53–68.

Nelson, R. (2015). New CDC guidelines recommend circumcision to cut HIV risk. *The Lancet Infectious Diseases* *15*, 269–270.

Neurath, A.R., Strick, N., and Li, Y.-Y. (2006). Role of seminal plasma in the anti-HIV-1 activity of candidate microbicides. *BMC Infect Dis* *6*, 150.

Neutra, M.R. (1999). Interactions of Viruses and Microparticles with Apical Plasma Membranes of M Cells: Implications for Human Immunodeficiency Virus Transmission. *J Infect Dis.* *179*, S441–S443.

Neutra, M.R., Frey, A., and Kraehenbuhl, J.-P. (1996). Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell* *86*, 345–348.

Ngcapu, S., Masson, L., Sibeko, S., Werner, L., McKinnon, L.R., Mlisana, K., Shey, M., Samsunder, N., Karim, S.A., Karim, Q.A., et al. (2015). Lower concentrations of chemotactic cytokines and soluble innate factors in the lower female genital tract associated with the use of injectable hormonal contraceptive. *Journal of Reproductive Immunology* *110*, 14–21.

Nino, G., Huseni, S., Perez, G.F., Pancham, K., Mubeen, H., Abbasi, A., Wang, J., Eng, S., Colberg-Poley, A.M., Pillai, D.K., et al. (2014). Directional Secretory Response of Double Stranded RNA-Induced Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and CCL11/Eotaxin-1 in Human Asthmatic Airways. *PLoS One* *9*.

Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.-P., Mammano, F., and Schwartz, O. (2005). Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J. Virol.* *79*, 5386–5399.

Nocera, M., and Chu, T.M. (1995). Characterization of latent transforming growth factor-beta from human seminal plasma. *Am. J. Reprod. Immunol.* *33*, 282–291.

Norvell, M.K., Benrubi, G.I., and Thompson, R.J. (1984). Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *J Reprod Med* *29*, 269–271.

Nunes, R., Sarmiento, B., and das Neves, J. (2014). Formulation and delivery of anti-HIV rectal microbicides: advances and challenges. *J Control Release* *194*, 278–294.

O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Baranda, S.J., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., et al. (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J. Clin. Invest.* *121*, 1088–1101.

O'Brien, T.R., Blattner, W.A., Waters, D., Eyster, E., Hilgartner, M.W., Cohen, A.R., Luban, N., Hatzakis, A., Aledort, L.M., Rosenberg, P.S., et al. (1996a). Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA* *276*, 105–110.

O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., and Hamilton, J.D. (1996b). Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N. Engl. J. Med.* *334*, 426–431.

Ochiel, D.O., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Ghosh, M., Fahey, J.V., and Wira, C.R. (2010). Uterine Epithelial Cell Regulation of DC-SIGN Expression Inhibits Transmitted/Founder HIV-1 Trans Infection by Immature Dendritic Cells. *PLoS ONE* *5*, e14306.

O'Connor, T.J., Kinchington, D., Kangro, H.O., and Jeffries, D.J. (1995). The activity of candidate virucidal agents, low pH and genital secretions against HIV-1 in vitro. *Int J STD AIDS* *6*, 267–272.

Ogawa, Y., Kawamura, T., Matsuzawa, T., Aoki, R., Gee, P., Yamashita, A., Moriishi, K., Yamasaki, K., Koyanagi, Y., Blauvelt, A., et al. (2013). Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host & Microbe* *13*, 77–86.

Ogbuagu, O., and Bruce, R.D. (2014). Reaching the unreachd: treatment as prevention as a workable strategy to mitigate HIV and its consequences in high-risk groups. *Curr HIV/AIDS Rep* *11*, 505–512.

Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I., and Pitha, P.M. (2006). Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1440–1445.

Olivier, A.J., Masson, L., Ronacher, K., Walzl, G., Coetzee, D., Lewis, D.A., Williamson, A.-L., Passmore, J.-A.S., and Burgers, W.A. (2013). Distinct cytokine patterns in semen influence local HIV shedding and HIV target cell activation. *J. Infect. Dis.*

Oliw, E.H., Sprecher, H., and Hamberg, M. (1986). Isolation of two novel E prostaglandins in human seminal fluid. *J. Biol. Chem.* *261*, 2675–2683.

Olmsted, S.S., Khanna, K.V., Ng, E.M., Whitten, S.T., Johnson, O.N., Markham, R.B., Cone, R.A., and Moench, T.R. (2005). Low pH immobilizes and kills human leukocytes and prevents transmission of cell-associated HIV in a mouse model. *BMC Infect. Dis.* *5*, 79.

Olsen, J.S., Brown, C., Capule, C.C., Rubinshtein, M., Doran, T.M., Srivastava, R.K., Feng, C., Nilsson, B.L., Yang, J., and Dewhurst, S. (2010). Amyloid-binding small molecules efficiently block SEVI (semen-derived enhancer of virus infection)- and semen-mediated enhancement of HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* *285*, 35488–35496.

Olsen, J.S., DiMaio, J.T.M., Doran, T.M., Brown, C., Nilsson, B.L., and Dewhurst, S. (2012). Seminal plasma accelerates semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) fibril formation by the prostatic acid phosphatase (PAP248-286) peptide. *J. Biol. Chem.* *287*, 11842–11849.

OMS (2015). OMS | Transmission du VIH de la mère à l'enfant.

- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* *13*, 453–460.
- Ongradi, J., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., Specter, S., and Bendinelli, M. (1990). Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1: clinical implications. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *6*, 1433–1436.
- Ono, A. (2010). Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell* *102*, 335–350.
- ONUSIDA (2013). Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida 2013.
- Owen, R.L. (1998). M cells as portals of entry for HIV. *Pathobiology* *66*, 141–144.
- Owen, D.H., and Katz, D.F. (2005). A Review of the Physical and Chemical Properties of Human Semen and the Formulation of a Semen Simulant. *Journal of Andrology* *26*, 459–469.
- Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., and Jones, P.P. (2013). *Kuby Immunology* 7th.
- Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., and Hosmalin, A. (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* *98*, 3016–3021.
- Parker, R., Aggleton, P., and Jr, K.R. de C. (2015). Circumcision and HIV prevention: Emerging debates in science, policies and programmes. *Global Public Health* *10*, 549–551.
- Patel, P., Borkowf, C.B., Brooks, J.T., Lasry, A., Lansky, A., and Mermin, J. (2014). Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS* *28*, 1509–1519.
- Patel, S., Hazrati, E., Cheshenko, N., Galen, B., Yang, H., Guzman, E., Wang, R., Herold, B.C., and Keller, M.J. (2007). Seminal Plasma Reduces the Effectiveness of Topical Polyanionic Microbicides. *J Infect Dis.* *196*, 1394–1402.
- Patterson, B.K., Landay, A., Andersson, J., Brown, C., Behbahani, H., Jiyamapa, D., Burki, Z., Stanislawski, D., Czerniewski, M.A., and Garcia, P. (1998). Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *Am. J. Pathol.* *153*, 481–490.
- Patterson, B.K., Landay, A., Siegel, J.N., Flener, Z., Pessis, D., Chaviano, A., and Bailey, R.C. (2002). Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. *Am. J. Pathol.* *161*, 867–873.
- Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., and Gotch, F. (2001). Plasmacytoid Dendritic Cells Are Highly Susceptible to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Release Infectious Virus. *J. Virol.* *75*, 6710–6713.
- Peressin, M., Proust, A., Schmidt, S., Su, B., Lambotin, M., Biedma, M.E., Laumond, G., Decoville, T., Holl, V., and Moog, C. (2014). Efficient transfer of HIV-1 in trans and in cis from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes. *AIDS* *28*, 667–677.
- Petrova, M.I., Broek, M. van den, Balzarini, J., Vanderleyden, J., and Lebeer, S. (2013). Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiology Reviews* *37*, 762–792.

- Pilch, B., and Mann, M. (2006). Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 7, R40.
- Pilcher, C.D., Tien, H.C., Eron, J.J., Vernazza, P.L., Leu, S.-Y., Stewart, P.W., Goh, L.-E., and Cohen, M.S. (2004). Brief but Efficient: Acute HIV Infection and the Sexual Transmission of HIV. *J Infect Dis.* 189, 1785–1792.
- Pilcher, C.D., Joaki, G., Hoffman, I.F., Martinson, F.E.A., Mapanje, C., Stewart, P.W., Powers, K.A., Galvin, S., Chilongozi, D., Gama, S., et al. (2007). Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *AIDS* 21, 1723–1730.
- Pillai, S.K., Good, B., Pond, S.K., Wong, J.K., Strain, M.C., Richman, D.D., and Smith, D.M. (2005). Semen-Specific Genetic Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env. *J Virol* 79, 1734–1742.
- Ping, L.-H., Joseph, S.B., Anderson, J.A., Abrahams, M.-R., Salazar-Gonzalez, J.F., Kincer, L.P., Treurnicht, F.K., Arney, L., Ojeda, S., Zhang, M., et al. (2013). Comparison of viral Env proteins from acute and chronic infections with subtype C human immunodeficiency virus type 1 identifies differences in glycosylation and CCR5 utilization and suggests a new strategy for immunogen design. *J. Virol.* 87, 7218–7233.
- Pino, M., Erkizia, I., Benet, S., Erikson, E., Fernández-Figueras, M.T., Guerrero, D., Dalmau, J., Ouchi, D., Rausell, A., Ciuffi, A., et al. (2015). HIV-1 immune activation induces Siglec-1 expression and enhances viral trans-infection in blood and tissue myeloid cells. *Retrovirology* 12.
- Pioli, P.A., Amiel, E., Schaefer, T.M., Connolly, J.E., Wira, C.R., and Guyre, P.M. (2004). Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infect. Immun.* 72, 5799–5806.
- Pion, M., Granelli-Piperno, A., Mangeat, B., Stalder, R., Correa, R., Steinman, R.M., and Piguet, V. (2006). APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med* 203, 2887–2893.
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, J.W., Choopanya, K., and Bangkok Vaccine Evaluation Group (2006). Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J. Infect. Dis.* 194, 1661–1671.
- Pöhlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77, 4070–4080.
- Poles, M.A., Elliott, J., Taing, P., Anton, P.A., and Chen, I.S. (2001). A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 75, 8390–8399.
- Polis, C.B., Phillips, S.J., Curtis, K.M., Westreich, D.J., Steyn, P.S., Raymond, E., Hannaford, P., and Turner, A.N. (2014). Hormonal contraceptive methods and risk of HIV acquisition in women: a systematic review of epidemiological evidence. *Contraception* 90, 360–390.
- Politch, J.A., Tucker, L., Bowman, F.P., and Anderson, D.J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.* 22, 2928–2935.

- Pope, M., and Haase, A.T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat. Med.* *9*, 847–852.
- Pope, M., Gezelter, S., Gallo, N., Hoffman, L., and Steinman, R.M. (1995). Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med* *182*, 2045–2056.
- Popov, S., Chenine, A.-L., Gruber, A., Li, P.-L., and Ruprecht, R.M. (2005). Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *J. Virol.* *79*, 602–608.
- Prozialeck, W.C., Fay, M.J., Lamar, P.C., Pearson, C.A., Sigar, I., and Ramsey, K.H. (2002). Chlamydia trachomatis disrupts N-cadherin-dependent cell-cell junctions and sequesters beta-catenin in human cervical epithelial cells. *Infect. Immun.* *70*, 2605–2613.
- Pruenster, M., Wilflingseder, D., Bánki, Z., Ammann, C.G., Muellauer, B., Meyer, M., Speth, C., Dierich, M.P., and Stoiber, H. (2005). C-type lectin-independent interaction of complement opsonized HIV with monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2691–2698.
- Pudney, J., and Anderson, D.J. (1995). Immunobiology of the human penile urethra. *Am J Pathol* *147*, 155–165.
- Pudney, J., and Anderson, D.J. (2011). Expression of Toll-like Receptors in Genital Tract Tissues from Normal and HIV-infected Men. *Am J Reprod Immunol* *65*, 28–43.
- Pudney, J., Quayle, A.J., and Anderson, D.J. (2005). Immunological Microenvironments in the Human Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity Are Concentrated in the Cervical Transformation Zone. *Biol Reprod* *73*, 1253–1263.
- Puryear, W.B., Yu, X., Ramirez, N.P., Reinhard, B.M., and Gummuluru, S. (2012). HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for capture by mature dendritic cells. *PNAS* *201201104*.
- Puryear, W.B., Akiyama, H., Geer, S.D., Ramirez, N.P., Yu, X., Reinhard, B.M., and Gummuluru, S. (2013). Interferon-Inducible Mechanism of Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Dissemination Is Dependent on Siglec-1/CD169. *PLoS Pathog* *9*, e1003291.
- Quinn, T.C., Wawer, M.J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.O., Lutalo, T., and Gray, R.H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N. Engl. J. Med.* *342*, 921–929.
- Ralph, L.J., McCoy, S.I., Shiu, K., and Padian, N.S. (2015). Hormonal contraceptive use and women’s risk of HIV acquisition: a meta-analysis of observational studies. *The Lancet Infectious Diseases* *15*, 181–189.
- Ramjee, G. (2010). Microbicide research: current and future directions. *Curr Opin HIV AIDS* *5*, 316–321.
- Rapista, A., Ding, J., Benito, B., Lo, Y.-T., Neiditch, M.B., Lu, W., and Chang, T.L. (2011). Human defensins 5 and 6 enhance HIV-1 infectivity through promoting HIV attachment. *Retrovirology* *8*, 45.
- Remes Lenicov, F., Rodrigues, C.R., Sabatté, J., Cabrini, M., Jancic, C., Ostrowski, M., Merlotti, A., Gonzalez, H., Alonso, A., Pasqualini, R.A., et al. (2012). Semen Promotes the Differentiation of Tolerogenic Dendritic Cells. *J Immunol* *189*, 4777–4786.

- Remes Lenicov, F., Varese, A., Merlotti, A., Geffner, J., and Ceballos, A. (2014). Prostaglandins in semen compromise the immune response against sexually transmitted pathogens. *Medical Hypotheses* 83, 208–210.
- Rempel, H., Calosing, C., Sun, B., and Pulliam, L. (2008). Sialoadhesin Expressed on IFN-Induced Monocytes Binds HIV-1 and Enhances Infectivity. *PLoS ONE* 3, e1967.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Prensri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine* 361, 2209–2220.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361–367.
- Rewari, B. (2013). Indian Experience with Treatment as Prevention :Key approaches & challenges (Kuala Lumpur, Malaysia).
- Reynolds, S.J. a, Makumbi, F. c, Nakigozi, G. d, Kagaayi, J. d, Gray, R.H. e, Wawer, M. e, Quinn, T.C. a, and Serwadda, D. c (2011). HIV-1 transmission among HIV-1 discordant couples before and after the introduction of antiretroviral therapy. *AIDS* 25, 473–477.
- Roan, N.R., and Greene, W.C. (2007). A seminal finding for understanding HIV transmission. *Cell* 131, 1044–1046.
- Roan, N.R., Münch, J., Arhel, N., Mothes, W., Neidleman, J., Kobayashi, A., Smith-McCune, K., Kirchhoff, F., and Greene, W.C. (2009). The Cationic Properties of SEVI Underlie Its Ability To Enhance Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* 83, 73–80.
- Roan, N.R., Müller, J.A., Liu, H., Chu, S., Arnold, F., Stürzel, C.M., Walther, P., Dong, M., Witkowska, H.E., Kirchhoff, F., et al. (2011). Peptides released by physiological cleavage of semen coagulum proteins form amyloids that enhance HIV infection. *Cell Host Microbe* 10, 541–550.
- Roan, N.R., Liu, H., Usmani, S.M., Neidleman, J., Müller, J.A., Avila-Herrera, A., Gawanbacht, A., Zirafi, O., Chu, S., Dong, M., et al. (2014). Liquefaction of semen generates and later degrades a conserved semenogelin peptide that enhances HIV infection. *J. Virol.* 88, 7221–7234.
- Roberts, M., Gompels, M., Pinching, A.J., and Knight, S.C. (1994). Dendritic cells from HIV-1 infected individuals show reduced capacity to stimulate autologous T-cell proliferation. *Immunol. Lett.* 43, 39–43.
- Robertson, S.A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 322, 43–52.
- Robertson, S.A., Ingman, W.V., O’Leary, S., Sharkey, D.J., and Tremellen, K.P. (2002a). Transforming growth factor β —a mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology* 57, 109–128.
- Robertson, S.A., Ingman, W.V., O’Leary, S., Sharkey, D.J., and Tremellen, K.P. (2002b). Transforming growth factor β —a mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology* 57, 109–128.

- Robertson, S.A., Guerin, L.R., Moldenhauer, L.M., and Hayball, J.D. (2009). Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy — the contribution of seminal fluid. *Journal of Reproductive Immunology* 83, 109–116.
- Robertson, S.A., Prins, J.R., Sharkey, D.J., and Moldenhauer, L.M. (2013). Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69, 315–330.
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., and Calvete, J.J. (2011). Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? *American Journal of Reproductive Immunology* 66, 11–22.
- Rodríguez-Plata, M.T., Puigdomènech, I., Izquierdo-Useros, N., Puertas, M.C., Carrillo, J., Erkizia, I., Clotet, B., Blanco, J., and Martínez-Picado, J. (2013). The infectious synapse formed between mature dendritic cells and CD4(+) T cells is independent of the presence of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Retrovirology* 10, 42.
- Rodríguez Rodrigues, C., Cabrini, M., Remes Lenicov, F., Sabatté, J., Ceballos, A., Jancic, C., Raiden, S., Ostrowski, M., Silberstein, C., and Geffner, J. (2011). Epithelial Cells Activate Plasmacytoid Dendritic Cells Improving Their Anti-HIV Activity. *PLoS ONE* 6, e28709.
- Rolland, A.D., Lavigne, R., Dauluy, C., Calvel, P., Kervarrec, C., Freour, T., Evrard, B., Rioux-Leclercq, N., Auger, J., and Pineau, C. (2013). Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum. Reprod.* 28, 199–209.
- Rollenhagen, C., and Asin, S.N. (2011). Enhanced HIV-1 replication in ex vivo ectocervical tissues from post-menopausal women correlates with increased inflammatory responses. *Mucosal Immunol* 4, 671–681.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, S., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P., Steinman, R.M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, 83–93.
- Romero, J.D., Castilla, J., Hernando, V., Rodríguez, C., and García, S. (2010). Combined antiretroviral treatment and heterosexual transmission of HIV-1: cross sectional and prospective cohort study. *BMJ* 340, c2205.
- Rotchford, K., Strum, A.W., and Wilkinson, D. (2000). Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis. *Sex Transm Dis* 27, 243–248.
- Røttingen, J.A., Cameron, D.W., and Garnett, G.P. (2001). A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: how much really is known? *Sex Transm Dis* 28, 579–597.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-Nunez, A., et al. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat Med* 20, 936–941.
- Saba, E., Origoni, M., Taccagni, G., Ferrari, D., Doglioni, C., Nava, A., Lisco, A., Grivel, J.-C., Margolis, L., and Poli, G. (2013). Productive HIV-1 infection of human cervical tissue ex vivo is associated with the secretory phase of the menstrual cycle. *Mucosal Immunol* 6, 1081–1090.

- Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V., et al. (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* *116*, 3839–3852.
- Sabatte, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomon, H., Amigorena, S., and Geffner, J. (2007). Human Seminal Plasma Abrogates the Capture and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to CD4+ T Cells Mediated by DC-SIGN. *J Virol* *81*, 13723–13734.
- Sabatté, J., Lenicov, F.R., Cabrini, M., Rodrigues, C.R., Ostrowski, M., Ceballos, A., Amigorena, S., and Geffner, J. (2011). The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. *Microbes and Infection* *13*, 977–982.
- Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodríguez Rodríguez, C., Remes Lenicov, F., Thépaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernández, M., et al. (2011). Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *J. Immunol.* *187*, 5299–5309.
- Sagar, M., Laeyendecker, O., Lee, S., Gamiel, J., Wawer, M.J., Gray, R.H., Serwadda, D., Sewankambo, N.K., Shepherd, J.C., Toma, J., et al. (2009). Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J. Infect. Dis.* *199*, 580–589.
- Saidi, H., Eslaphazir, J., Carbonneil, C., Carthagena, L., Requena, M., Nassreddine, N., and Belec, L. (2006). Differential Modulation of Human Lactoferrin Activity against Both R5 and X4-HIV-1 Adsorption on Epithelial Cells and Dendritic Cells by Natural Antibodies. *J Immunol* *177*, 5540–5549.
- Sakata, D., Yao, C., and Narumiya, S. (2010). Prostaglandin E2, an immunoactivator. *J. Pharmacol. Sci.* *112*, 1–5.
- Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Keele, B.F., Learn, G.H., Giorgi, E.E., Li, H., Decker, J.M., Wang, S., Baalwa, J., Kraus, M.H., et al. (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* *206*, 1273–1289.
- Sales, K.J., Katz, A.A., Millar, R.P., and Jabbour, H.N. (2002). Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells. *Mol Hum Reprod* *8*, 1065–1070.
- Sales, K.J., Adefuye, A., Nicholson, L., and Katz, A.A. (2014). CCR5 expression is elevated in cervical cancer cells and is up-regulated by seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod.* *20*, 1144–1157.
- Sallé, B., Brochard, P., Bourry, O., Mannioui, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejuq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* *202*, 337–344.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* *28*, 2760–2769.

- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* *382*, 722–725.
- Sandgren, K.J., Smed-Sörensen, A., Forsell, M.N., Soldemo, M., Adams, W.C., Liang, F., Perbeck, L., Koup, R.A., Wyatt, R.T., Karlsson Hedestam, G.B., et al. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently capture HIV-1 envelope glycoproteins via CD4 for antigen presentation. *J. Immunol.* *191*, 60–69.
- Sapp, M., Engelmayer, J., Larsson, M., Granelli-Piperno, A., Steinman, R., and Bhardwaj, N. (1999). Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol. Lett.* *66*, 121–128.
- Sathe, A., and Reddy, K.V.R. (2014). TLR9 and RIG-I Signaling in Human Endocervical Epithelial Cells Modulates Inflammatory Responses of Macrophages and Dendritic Cells In Vitro. *PLoS ONE* *9*, e83882.
- Schaefer, T.M., Desouza, K., Fahey, J.V., Beagley, K.W., and Wira, C.R. (2004). Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* *112*, 428–436.
- Schjenken, J.E., Glynn, D.J., Sharkey, D.J., and Robertson, S.A. (2015). TLR4 Signaling Is a Major Mediator of the Female Tract Response to Seminal Fluid in Mice. *Biol Reprod* *114*.125740.
- Schmitt, N., Nugeyre, M.-T., Scott-Algara, D., Cumont, M.-C., Barré-Sinoussi, F., Pancino, G., and Israël, N. (2006). Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *AIDS* *20*, 533–542.
- Schust, D.J., Ibane, J.A., Buckner, L.R., Ficarra, M., Sugimoto, J., Amedee, A.M., and Quayle, A.J. (2012). Potential mechanisms for increased HIV-1 transmission across the endocervical epithelium during *C. trachomatis* infection. *Curr HIV Res* *10*, 218–227.
- Scorza Smeraldi, R., Fabio, G., Lazzarin, A., Eisera, N., Uberti Foppa, C., Moroni, M., and Zanussi, C. (1988). HLA-associated susceptibility to AIDS: HLA B35 is a major risk factor for Italian HIV-infected intravenous drug addicts. *Hum. Immunol.* *22*, 73–79.
- Sellati, T.J., Wilkinson, D.A., Sheffield, J.S., Koup, R.A., Radolf, J.D., and Norgard, M.V. (2000). Virulent *Treponema pallidum*, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* *181*, 283–293.
- Sexton, J., Garnett, G., and Røttingen, J.-A. (2005). Metaanalysis and metaregression in interpreting study variability in the impact of sexually transmitted diseases on susceptibility to HIV infection. *Sex Transm Dis* *32*, 351–357.
- Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., and Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 491–501.
- Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Jasper, M.J., Gemzell-Danielsson, K., and Robertson, S.A. (2012a). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J. Immunol.* *188*, 2445–2454.

- Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., Mottershead, D.G., Gilchrist, R.B., and Robertson, S.A. (2012b). TGF- β Mediates Proinflammatory Seminal Fluid Signaling in Human Cervical Epithelial Cells. *J Immunol* 189, 1024–1035.
- Sharma, H., Tal, R., Clark, N.A., and Segars, J.H. (2014). Microbiota and Pelvic Inflammatory Disease. *Semin Reprod Med* 32, 43–49.
- Shen, R., Kappes, J.C., Smythies, L.E., Richter, H.E., Novak, L., and Smith, P.D. (2014). Vaginal Myeloid Dendritic Cells Transmit Founder HIV-1. *J. Virol.* JVI.00766–14.
- Sheth, P.M., Danesh, A., Shahabi, K., Rebbapragada, A., Kovacs, C., Dimayuga, R., Halpenny, R., Macdonald, K.S., Mazzulli, T., Kelvin, D., et al. (2005). HIV-specific CD8⁺ lymphocytes in semen are not associated with reduced HIV shedding. *J. Immunol.* 175, 4789–4796.
- Shiver, J.W., Fu, T.-M., Chen, L., Casimiro, D.R., Davies, M.-E., Evans, R.K., Zhang, Z.-Q., Simon, A.J., Trigona, W.L., Dubey, S.A., et al. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331–335.
- Shukair, S.A., Allen, S.A., Cianci, G.C., Stieh, D.J., Anderson, M.R., Baig, S.M., Gioia, C.J., Spongberg, E.J., Kauffman, S.M., McRaven, M.D., et al. (2013). Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal Immunol* 6, 427–434.
- Shust, G.F., Cho, S., Kim, M., Madan, R.P., Guzman, E.M., Pollack, M., Epstein, J., Cohen, H.W., Keller, M.J., and Herold, B.C. (2010). ORIGINAL ARTICLE: Female Genital Tract Secretions Inhibit Herpes Simplex Virus Infection: Correlation with Soluble Mucosal Immune Mediators and Impact of Hormonal Contraception. *American Journal of Reproductive Immunology* 63, 110–119.
- Simhan, H.N., Anderson, B.L., Krohn, M.A., Heine, R.P., Martinez de Tejada, B., Landers, D.V., and Hillier, S.L. (2007). Host immune consequences of asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 59.e1–e5.
- Smed-Sörensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.-L., and Koup, R.A. (2005). Differential Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Virol* 79, 8861–8869.
- Smith, J.S., Herrero, R., Muñoz, N., Eluf-Neto, J., Ngelangel, C., Bosch, F.X., and Ashley, R.L. (2001). Prevalence and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among middle-age women in Brazil and the Philippines. *Sex Transm Dis* 28, 187–194.
- Sobhani, I., Walker, F., Aparicio, T., Abramowitz, L., Henin, D., Cremieux, A.C., and Soule, J.C. (2002). Effect of anal epidermoid cancer-related viruses on the dendritic (Langerhans') cells of the human anal mucosa. *Clin. Cancer Res.* 8, 2862–2869.
- Soboll, G., Crane-Godreau, M.A., Lyimo, M.A., and Wira, C.R. (2006). Effect of oestradiol on PAMP-mediated CCL20/MIP-3 α production by mouse uterine epithelial cells in culture. *Immunology* 118, 185–194.
- Söderlund, J., Hirbod, T., Goh, L.-E., Andersson, J., and Broliden, K. (2004). Presence of HIV-1 neutralizing IgA antibodies in primary HIV-1 infected patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 36, 663–669.
- Sodora, D.L., Gettie, A., Miller, C.J., and Marx, P.A. (1998). Vaginal transmission of SIV: assessing infectivity and hormonal influences in macaques inoculated with cell-free and cell-associated viral stocks. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14 Suppl 1, S119–S123.

- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* *3*, 673–680.
- Southern, P.J., Horbul, J.E., Miller, B.R.L., and Maher, D.M. (2011). Coming of age: reconstruction of heterosexual HIV-1 transmission in human ex vivo organ culture systems. *Mucosal Immunol* *4*, 383–396.
- Spadaro, M., Caorsi, C., Ceruti, P., Varadhachary, A., Forni, G., Pericle, F., and Giovarelli, M. (2008). Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. *FASEB J.* *22*, 2747–2757.
- Sprenger, R., Toellner, K.M., Schmetz, C., Lüke, W., Stahl-Hennig, C., Ernst, M., Hunsmann, G., Schmitz, H., Flad, H.D., and Gerdes, J. (1995). Follicular dendritic cells productively infected with immunodeficiency viruses transmit infection to T cells. *Med. Microbiol. Immunol.* *184*, 129–134.
- Stambach, N.S., and Taylor, M.E. (2003). Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* *13*, 401–410.
- Stax, M.J., van Montfort, T., Sprenger, R.R., Melchers, M., Sanders, R.W., van Leeuwen, E., Repping, S., Pollakis, G., Speijer, D., and Paxton, W.A. (2009). Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4+ T-lymphocytes. *Virology* *391*, 203–211.
- Stax, M.J., Mouser, E.E.I.M., van Montfort, T., Sanders, R.W., de Vries, H.J.C., Dekker, H.L., Herrera, C., Speijer, D., Pollakis, G., and Paxton, W.A. (2015). Colorectal Mucus Binds DC-SIGN and Inhibits HIV-1 Trans-Infection of CD4+ T-Lymphocytes. *PLoS ONE* *10*, e0122020.
- Stewart, G.J., Ashton, L.J., Biti, R.A., Ffrench, R.A., Bennetts, B.H., Newcombe, N.R., Benson, E.M., Carr, A., Cooper, D.A., and Kaldor, J.M. (1997). Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* *11*, 1833–1838.
- Stief, T.W. (2003). Singlet oxygen (1O_2)-oxidizable lipids in the HIV membrane, new targets for AIDS therapy? *Med. Hypotheses* *60*, 575–577.
- Stoddard, E., Cannon, G., Ni, H., Karikó, K., Capodici, J., Malamud, D., and Weissman, D. (2007). gp340 Expressed on Human Genital Epithelia Binds HIV-1 Envelope Protein and Facilitates Viral Transmission. *J Immunol* *179*, 3126–3132.
- Stoddard, E., Ni, H., Cannon, G., Zhou, C., Kallenbach, N., Malamud, D., and Weissman, D. (2009). gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue. *J. Virol.* *83*, 8596–8603.
- Storey, D.F., Dolan, M.J., Anderson, S.A., Meier, P.A., and Walter, E.A. (1999). Seminal plasma RANTES levels positively correlate with seminal plasma HIV-1 RNA levels. *AIDS* *13*, 2169–2171.
- Sun, J., and Schoborg, R.V. (2009). The host adherens junction molecule nectin-1 is degraded by chlamydial protease-like activity factor (CPAF) in *Chlamydia trachomatis*-infected genital epithelial cells. *Microbes Infect.* *11*, 12–19.

- Sun, J., Kintner, J., and Schoborg, R.V. (2008). The host adherens junction molecule nectin-1 is downregulated in *Chlamydia trachomatis*-infected genital epithelial cells. *Microbiology (Reading, Engl.)* 154, 1290–1299.
- Svanborg, K., Gottlieb, C., Bendvold, E., and Bygdeman, M. (1989). Variation in, and inter-relationship between, prostaglandin levels and other semen parameters in normal men. *Int. J. Androl.* 12, 411–419.
- von Sydow, M., Sönnnerborg, A., Gaines, H., and Strannegård, O. (1991). Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7, 375–380.
- Taha, T.E., Hoover, D.R., Dallabetta, G.A., Kumwenda, N.I., Mtimavalye, L.A., Yang, L.P., Liomba, G.N., Broadhead, R.L., Chipangwi, J.D., and Miotti, P.G. (1998). Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS* 12, 1699–1706.
- Tan, X., and Phillips, D.M. (1996). Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. *Arch. Virol.* 141, 1177–1189.
- Tan, X., and Phillips, D.M. (1998). CAT-transfected epithelial cells provide evidence for a CD4 independent pathway of HIV infection. *Journal of Reproductive Immunology* 41, 307–319.
- Tang, J., Tang, S., Lobashevsky, E., Myracle, A.D., Fideli, U., Aldrovandi, G., Allen, S., Musonda, R., Kaslow, R.A., the Zambia-UAB HIV Research Project†Investigators on the Zambia-UAB HIV Research Project who contributed to this study were as follows: for Epidemiology and Clinical Studies, S.A., et al. (2002). Favorable and Unfavorable HLA Class I Alleles and Haplotypes in Zambians Predominantly Infected with Clade C Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 76, 8276–8284.
- Tarasova, N.I., Stauber, R.H., and Michejda, C.J. (1998). Spontaneous and Ligand-induced Trafficking of CXC-Chemokine Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 273, 15883–15886.
- Templeton, A.A., Cooper, I., and Kelly, R.W. (1978). Prostaglandin concentrations in the semen of fertile men. *J. Reprod. Fertil.* 52, 147–150.
- Tevi-Bénissan, C., Bélec, L., Lévy, M., Schneider-Fauveau, V., Si Mohamed, A., Hallouin, M.C., Matta, M., and Grésenguet, G. (1997). In vivo semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin Diagn Lab Immunol* 4, 367–374.
- Thigpen, M.C., Kebaabetswe, P.M., Paxton, L.A., Smith, D.K., Rose, C.E., Segolodi, T.M., Henderson, F.L., Pathak, S.R., Soud, F.A., Chillag, K.L., et al. (2012). Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. *N. Engl. J. Med.* 367, 423–434.
- Tjernlund, A., Carias, A.M., Andersson, S., Gustafsson-Sanchez, S., Röhl, M., Petersson, P., Introini, A., Hope, T.J., and Broliden, K. (2015). Progesterone-Based Intrauterine Device Use Is Associated with a Thinner Apical Layer of the Human Ectocervical Epithelium and a Lower ZO-1 mRNA Expression. *Biol Reprod* 114.122887.
- Tjomsland, V., Ellegård, R., Che, K., Hinkula, J., Lifson, J.D., and Larsson, M. (2011). Complement Opsonization of HIV-1 Enhances the Uptake by Dendritic Cells and Involves the Endocytic Lectin and Integrin Receptor Families. *PLoS ONE* 6, e23542.
- Trifonova, R.T., Lieberman, J., and van Baarle, D. (2014). Distribution of Immune Cells in the Human Cervix and Implications for HIV Transmission. *Am J Reprod Immunol* 71, 252–264.

Tsunetsugu-Yokota, Y., Akagawa, K., Kimoto, H., Suzuki, K., Iwasaki, M., Yasuda, S., Häusser, G., Hultgren, C., Meyerhans, A., and Takemori, T. (1995). Monocyte-derived cultured dendritic cells are susceptible to human immunodeficiency virus infection and transmit virus to resting T cells in the process of nominal antigen presentation. *J. Virol.* 69, 4544–4547.

Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3, 975–983.

Turville, S.G., Santos, J.J., Frank, I., Cameron, P.U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stössel, H., Romani, N., Michael Piatak, J., et al. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170–2179.

UNAIDS (2015). 2014 GLOBAL STATISTICS.

Usmani, S.M., Zirafi, O., Müller, J.A., Sandi-Monroy, N.L., Yadav, J.K., Meier, C., Weil, T., Roan, N.R., Greene, W.C., Walther, P., et al. (2014). Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen. *Nat Commun* 5.

Utleg, A.G., Yi, E.C., Xie, T., Shannon, P., White, J.T., Goodlett, D.R., Hood, L., and Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 56, 150–161.

Vajdy, M. (2008). *Immunity Against Mucosal Pathogens* (Springer Science & Business Media).

Valore, E.V., Wiley, D.J., and Ganz, T. (2006). Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infect. Immun.* 74, 5693–5702.

Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Mukenge-Tshibaka, L., Ettiègne-Traoré, V., Uaheowitchai, C., et al. (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 971–977.

Van Damme, L., Govinden, R., Mirembe, F.M., Guédou, F., Solomon, S., Becker, M.L., Pradeep, B.S., Krishnan, A.K., Alary, M., Pande, B., et al. (2008). Lack of Effectiveness of Cellulose Sulfate Gel for the Prevention of Vaginal HIV Transmission. *New England Journal of Medicine* 359, 463–472.

Van Damme, L., Corneli, A., Ahmed, K., Agot, K., Lombaard, J., Kapiga, S., Malahleha, M., Owino, F., Manongi, R., Onyango, J., et al. (2012). Preexposure Prophylaxis for HIV Infection among African Women. *N Engl J Med* 367, 411–422.

Van Howe, R.S. (2015). Circumcision as a primary HIV preventive: Extrapolating from the available data. *Glob Public Health* 10, 607–625.

Vasiliver-Shamis, G., Tuen, M., Wu, T.W., Starr, T., Cameron, T.O., Thomson, R., Kaur, G., Liu, J., Visciano, M.L., Li, H., et al. (2008). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope gp120 Induces a Stop Signal and Virological Synapse Formation in Noninfected CD4+ T Cells. *J. Virol.* 82, 9445–9457.

Vassena, L., Miao, H., Cimbri, R., Malnati, M.S., Cassina, G., Proschan, M.A., Hirsch, V.M., Lafont, B.A., Morre, M., Fauci, A.S., et al. (2012). Treatment with IL-7 Prevents the Decline of Circulating CD4+ T Cells during the Acute Phase of SIV Infection in Rhesus Macaques. *PLoS Pathog* 8, e1002636.

Vergnon-Miszczycha, D., Lucht, F., Roblin, X., Pozzetto, B., Paul, S., and Bourlet, T. (2015). Infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine : rôle majeur du tissu lymphoïde de la muqueuse digestive (GALT). *Médecine/sciences In press*.

- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29, 352–361.
- Vishwanathan, S.A., Guenther, P.C., Lin, C.Y., Dobard, C., Sharma, S., Adams, D.R., Otten, R.A., Heneine, W., Hendry, R.M., McNicholl, J.M., et al. (2011). High Susceptibility to Repeated, Low-Dose, Vaginal SHIV Exposure Late in the Luteal Phase of the Menstrual Cycle of Pigtail Macaques: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 57, 261–264.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Aricò, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106, 566–571.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupé, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nat Immunol* 9, 650–657.
- Waheed, A.A., and Freed, E.O. (2009). Lipids and Membrane Microdomains in HIV-1 Replication. *Virus Res* 143, 162–176.
- Wald, A., and Link, K. (2002). Risk of Human Immunodeficiency Virus Infection in Herpes Simplex Virus Type 2–Seropositive Persons: A Meta-analysis. *J Infect Dis.* 185, 45–52.
- Wamai, R.G., Morris, B.J., Bailey, R.C., Klausner, J.D., and Boedicker, M.N. (2015a). Male circumcision for protection against HIV infection in sub-Saharan Africa: The evidence in favour justifies the implementation now in progress. *Glob Public Health* 10, 639–666.
- Wamai, R.G., Morris, B.J., Bailey, R.C., Klausner, J.D., and Boedicker, M.N. (2015b). Debating male circumcision for HIV prevention: A one-sided argument does not represent a legitimate “controversy” analysis - Reply to de Camargo et al. *Glob Public Health* 10, 672–678.
- Wang, D., Sun, B., Feng, M., Feng, H., Gong, W., Liu, Q., and Ge, S. (2015a). Role of scavenger receptors in dendritic cell function. *Human Immunology*.
- Wang, G., Watson, K.M., and Buckheit, R.W. (2008). Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activities of Antimicrobial Peptides Derived from Human and Bovine Cathelicidins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3438–3440.
- Wang, H.-B., Mo, Q.-H., and Yang, Z. (2015b). HIV Vaccine Research: The Challenge and the Way Forward. *J Immunol Res* 2015.
- Wang, J.-H., Janas, A.M., Olson, W.J., and Wu, L. (2007). Functionally Distinct Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mediated by Immature and Mature Dendritic Cells. *J Virol* 81, 8933–8943.
- Wang, J.-H., Kwas, C., and Wu, L. (2009). Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), but Not ICAM-2 and -3, Is Important for Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission. *J Virol* 83, 4195–4204.
- Wang, M., Gao, Z., Zhang, Z., Pan, L., and Zhang, Y. (2014). Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 10, 3544–3551.
- Watts, C., West, M.A., and Zaru, R. (2010). TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 22, 124–130.

Wawer, M.J., Gray, R.H., Sewankambo, N.K., Serwadda, D., Li, X., Laeyendecker, O., Kiwanuka, N., Kigozi, G., Kiddugavu, M., Lutalo, T., et al. (2005). Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* *191*, 1403–1409.

Weiss, H.A., Hankins, C.A., and Dickson, K. (2009). Male circumcision and risk of HIV infection in women: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* *9*, 669–677.

White, R.G., Orroth, K.K., Glynn, J.R., Freeman, E.E., Bakker, R., Habbema, J.D.F., Terris-Prestholt, F., Kumaranayake, L., Buvé, A., and Hayes, R.J. (2008). Treating curable sexually transmitted infections to prevent HIV in Africa: still an effective control strategy? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *47*, 346–353.

WHO, and UNAIDS (2007). WHO | WHO and UNAIDS announce recommendations from expert consultation on male circumcision for HIV prevention.

WHO Media Centre (2014). Aide-Mémoire N°360.

Wiesenfeld, H.C., Heine, R.P., Krohn, M.A., Hillier, S.L., Amortegui, A.A., Nicolazzo, M., and Sweet, R.L. (2002). Association between elevated neutrophil defensin levels and endometritis. *J. Infect. Dis.* *186*, 792–797.

Wijewardana, V., Soloff, A.C., Liu, X., Brown, K.N., and Barratt-Boyes, S.M. (2010). Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog.* *6*, e1001235.

Wiley, R.D., and Gummuluru, S. (2006). Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 738–743.

Wilson, D., Taaffe, J., Fraser-Hurt, N., and Gorgens, M. (2014). The economics, financing and implementation of HIV treatment as prevention: What will it take to get there? *African Journal of AIDS Research* *13*, 109–119.

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 950–957.

Wira, C.R., and Fahey, J.V. (2008). A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *AIDS* *22*, 1909–1917.

Wira, C.R., Fahey, J.V., Ghosh, M., Patel, M.V., Hickey, D.K., and Ochiel, D.O. (2010). REVIEW ARTICLE: Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *American Journal of Reproductive Immunology* *63*, 544–565.

Wira, C.R., Fahey, J.V., Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., and Patel, M.V. (2014). Regulation of Mucosal Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Sex Hormones in Immune Protection Against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol* *72*, 236–258.

Wira, C.R., Rodriguez-Garcia, M., and Patel, M.V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol* *15*, 217–230.

- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007a). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* *13*, 367–371.
- de Witte, L., Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T.B.H., and Gallay, P. (2007b). Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 19464–19469.
- de Witte, L., Nabatov, A., and Geijtenbeek, T.B.H. (2008). Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in Molecular Medicine* *14*, 12–19.
- Wolters-Everhardt, E., Dony, J.M., Lemmens, W.A., Doesburg, W.H., and De Pont, J.J. (1986). Buffering capacity of human semen. *Fertil. Steril.* *46*, 114–119.
- Wong, J.H., Legowska, A., Rolka, K., Ng, T.B., Hui, M., Cho, C.H., Lam, W.W.L., Au, S.W.N., Gu, O.W., and Wan, D.C.C. (2011). Effects of cathelicidin and its fragments on three key enzymes of HIV-1. *Peptides* *32*, 1117–1122.
- Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology* *6*, 859–868.
- Wu, Z., Chen, Z., and Phillips, D.M. (2003). Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J. Infect. Dis.* *188*, 1473–1482.
- Xiao, X., Kinter, A., Broder, C.C., and Dimitrov, D.S. (2000). Interactions of CCR5 and CXCR4 with CD4 and gp120 in human blood monocyte-derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* *68*, 133–138.
- Yahi, N., Baghdiguian, S., Moreau, H., and Fantini, J. (1992). Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J. Virol.* *66*, 4848–4854.
- Yarbrough, V.L., Winkle, S., and Herbst-Kralovetz, M.M. (2015). Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. *Hum. Reprod. Update* *21*, 353–377.
- Yeaman, G.R., Howell, A.L., Weldon, S., Demian, D.J., Collins, J.E., O'Connell, D.M., Asin, S.N., Wira, C.R., and Fanger, M.W. (2003). Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. *Immunology* *109*, 137–146.
- Young, S.L., Lyddon, T.D., Jorgenson, R.L., and Misfeldt, M.L. (2004). Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.* *52*, 67–73.
- Yu, H.J., Reuter, M.A., and McDonald, D. (2008). HIV Traffics through a Specialized, Surface-Accessible Intracellular Compartment during trans-Infection of T Cells by Mature Dendritic Cells. *PLoS Pathog* *4*, e1000134.
- Zacharopoulos, V.R., Perotti, M.-E., and Phillips, D.M. (1997). A role for cell migration in the sexual transmission of HIV-1? *Current Biology* *7*, 534–537.

- Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C.K., Kias-Kovrun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J., and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: Implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3, 1369–1375.
- Zhang, Z., and Wang, F.S. (2005). Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* 2, 411–417.
- Zhang, L., He, T., Talal, A., Wang, G., Frankel, S.S., and Ho, D.D. (1998). In Vivo Distribution of the Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J. Virol.* 72, 5035–5045.
- Zhang, Z.-Q., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., et al. (1999). Sexual Transmission and Propagation of SIV and HIV in Resting and Activated CD4+ T Cells. *Science* 286, 1353–1357.
- Zhou, Z., Barry de Longchamps, N., Schmitt, A., Zerbib, M., Vacher-Lavenu, M.-C., Bomsel, M., and Ganor, Y. (2011). HIV-1 Efficient Entry in Inner Foreskin Is Mediated by Elevated CCL5/RANTES that Recruits T Cells and Fuels Conjugate Formation with Langerhans Cells. *PLoS Pathog* 7.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in. *Blood* 116, e74–e80.
- Zirafi, O., Kim, K.-A., Roan, N.R., Kluge, S.F., Müller, J.A., Jiang, S., Mayer, B., Greene, W.C., Kirchhoff, F., and Münch, J. (2014). Semen enhances HIV infectivity and impairs the antiviral efficacy of microbicides. *Sci Transl Med* 6, 262ra157–ra262ra157.
- Zuckerman, R.A., Lucchetti, A., Whittington, W.L.H., Sánchez, J., Coombs, R.W., Magaret, A., Wald, A., Corey, L., and Celum, C. (2009). HSV suppression reduces seminal HIV-1 levels in HIV-1/HSV-2 co-infected men who have sex with men. *AIDS* 23, 479–483.

Résumé

La transmission sexuelle du VIH-1 constitue le mode majeur de contamination à travers le monde. Au cours d'un rapport sexuel avec un homme séropositif vis-à-vis du VIH-1, le virus transporté par le sperme est déposé à la surface des muqueuses sous forme libre et/ou associée aux cellules mononuclées du sperme. Les particules virales peuvent alors être captées par les cellules dendritiques qui les transportent jusqu'aux lymphocytes T CD4 des ganglions lymphatiques favorisant ainsi la dissémination du virus. Plus qu'un simple véhicule, il semblerait que le plasma séminal, fraction acellulaire du sperme, puisse influencer la transmission sexuelle du VIH-1. Cependant, son rôle en tant que facilitateur ou inhibiteur de l'infection est largement débattu.

La première partie de cette thèse s'intéresse à l'influence directe du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1 via les cellules dendritiques. Nous avons montré que le TGF- β 1, une des cytokines majoritaires du sperme, favorise la capture du virus par les cellules dendritiques via l'induction de l'expression de CD169, un récepteur du VIH-1 récemment décrit. Cependant, ni l'augmentation de la capture du virus ni celle de l'expression de CD169 ne sont observées lorsque les cellules sont en présence de plasma séminal. Au contraire, le fluide semble avoir tendance à diminuer la capture des particules virales et s'avère même être capable de diminuer l'induction de l'expression de CD169 par le TGF- β 1 ou le LPS, suggérant un effet protecteur du plasma séminal sur la transmission sexuelle du VIH-1, même en cas de coinfection bactérienne localisée.

La seconde partie de cette thèse s'intéresse à l'effet indirect du plasma séminal sur les cellules dendritiques via l'induction de la sécrétion de facteurs par les cellules épithéliales de la muqueuse, premières cellules en contact avec le fluide. A partir de deux modèles *in vitro* d'épithéliums simples (colorectaux et endocervicaux), les résultats obtenus montrent que les sécrétions des cellules épithéliales induites par le plasma séminal ne provoquent pas l'expression de CD169 ni la maturation des cellules dendritiques.

Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes précoces impliqués dans la transmission sexuelle du VIH-1 et soulignent le rôle complexe du plasma séminal dans cette dernière.

Mots clés : Cellules dendritiques, transmission sexuelle, VIH-1, plasma séminal, CD169, cellules épithéliales