



HAL
open science

Etude des premiers évènements d'infection par le VIH-1 dans les tissus du tractus génital féminin : inhibition par les anticorps

Camille Ducloy

► **To cite this version:**

Camille Ducloy. Etude des premiers évènements d'infection par le VIH-1 dans les tissus du tractus génital féminin : inhibition par les anticorps. Virologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ103 . tel-01813438

HAL Id: tel-01813438

<https://theses.hal.science/tel-01813438>

Submitted on 12 Jun 2018

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.



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

UMR_S INSERM U1109

THÈSE

présentée par :

Camille DUCLOY

soutenue le : **5 décembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Virologie : aspects moléculaires et médicaux**

**Etude des premiers évènements
d'infection par le VIH-1 dans les tissus
du tractus génital féminin**

Inhibition par les anticorps

THÈSE dirigée par :

Mme MOOG Christiane

Directeur de Recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Mme MENU Elisabeth

M POZZETTO Bruno

Directeur de Recherche, INSERM U1184, CEA, Paris

Professeur (PUPH), GIMAP, Université de Saint-Etienne

EXAMINATEUR INTERNE :

M ROHR Olivier

Professeur des Universités, Université de Strasbourg

La connaissance, c'est partager le savoir qui nous fait grandir.

Olivier Lockert

Remerciements

L'ensemble de mes travaux de thèse ont été réalisés à l'institut de virologie dans l'équipe du Docteur Christiane MOOG.

Je remercie les membres de mon jury le docteur Elisabeth MENU, le professeur Bruno POZZETTO et le professeur Olivier ROHR qui m'ont fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je remercie l'association SIDACTION, de m'avoir accordé une bourse pour mener mon projet en finançant mes trois années de thèse.

Je remercie le Docteur Olivier GARBIN, Michel HUMMEL et Jeanine OHL, ainsi que leurs équipes au Centre Médico-Chirurgical Obstétrique de Strasbourg, de nous avoir fourni les différents tissus pour réaliser mes travaux de thèse.

Je remercie Mariangela CAVARELLI et Gabriella SCARLATTI de m'avoir permis d'obtenir l'expertise nécessaire pour développer mes modèles de tissus au sein de notre laboratoire.

Je remercie ma directrice de thèse Christiane MOOG de m'avoir accepté dans son équipe pendant mon master et permis d'obtenir mon financement pour ma thèse. Vous m'avez permis d'élaborer différents modèles au cours de cette thèse et avez partagé vos connaissances scientifiques me permettant de développer ce projet et soutenir ma thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe de Christiane MOOG : Luzia MAYR, Jérôme KLINGLER, Nathalie SALOME, Thomas DECOVILLE, Sylvie SCHMIDT, Géraldine LAUMOND et un ancien membre de l'équipe Bin SU pour m'avoir permis de m'intégrer au sein de l'équipe et partager l'ensemble de leurs connaissances pour développer mes travaux de thèse et soutenue tout au long de ma thèse. J'ai une attention particulière pour Sylvie SCHMIDT. Ensemble, nous avons élaboré les différents protocoles sur les tissus. Un grand merci à toi, pour ton

soutien, ta disponibilité et ton grand cœur. Je remercie également Nathalie SALOME de m'avoir soutenue et accompagnée les soirs où je finissais très tard.

Je remercie également l'ensemble des collègues et amis du bâtiment de l'institut de virologie pour m'avoir soutenue et offert des petits gâteaux les longues journées de travail.

Enfin je remercie l'ensemble des membres de ma famille et mes amis pour m'avoir supportée et soutenue tout au long de mon travail de thèse.

Table des matières

INTRODUCTION.....	0
CHAPITRE 1 : LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH).....	1
1. <i>Le VIH : de sa découverte à ses origines.....</i>	<i>1</i>
2. <i>Distribution globale du VIH.....</i>	<i>3</i>
3. <i>Structure de la particule virale.....</i>	<i>4</i>
4. <i>Cycle viral du VIH.....</i>	<i>5</i>
5. <i>Physiopathologie du VIH.....</i>	<i>8</i>
6. <i>Les traitements antirétroviraux et leurs limites.....</i>	<i>11</i>
CHAPITRE 2 : LE VIH DANS LES MUQUEUSES.....	15
1. <i>Transmission hétérosexuelle du VIH.....</i>	<i>15</i>
2. <i>Le tractus génital féminin (FGT).....</i>	<i>15</i>
3. <i>Les facteurs associés à la muqueuse génitale.....</i>	<i>18</i>
3.1. <i>Le microenvironnement du tractus.....</i>	<i>18</i>
3.2. <i>Le mucus.....</i>	<i>20</i>
3.3. <i>Les hormones.....</i>	<i>21</i>
4. <i>Inflammation et activation de la réponse immune dans les muqueuses.....</i>	<i>23</i>
5. <i>Dissémination du VIH-1 dans le tractus génital féminin.....</i>	<i>25</i>
5.1. <i>Le fluide séminal : véhicule du VIH-1.....</i>	<i>25</i>
5.2. <i>Entrée du VIH-1 dans les muqueuses.....</i>	<i>27</i>
5.2.1. <i>Brèche de la barrière épithéliale.....</i>	<i>28</i>
5.2.2. <i>Infection des cellules épithéliales.....</i>	<i>28</i>
5.2.3. <i>Transcytose.....</i>	<i>29</i>
5.2.4. <i>Transmigration.....</i>	<i>29</i>
5.2.5. <i>Diffusion passive.....</i>	<i>30</i>
5.2.6. <i>Capture du VIH par les cellules intra-épithéliales ou sous-muqueuses</i>	
30	
5.3. <i>Une sélection virale dans les muqueuses.....</i>	<i>31</i>
5.4. <i>Les cibles du VIH-1 dans les muqueuses : infection par du virus libre</i>	<i>32</i>
5.4.1. <i>Les lymphocytes T CD4.....</i>	<i>32</i>
5.4.2. <i>Les macrophages.....</i>	<i>33</i>

5.4.3. Les cellules dendritiques (DC).....	36
6. <i>Dissémination du VIH-1 dans l'organisme : transmission de cellule à cellule</i>	
41	
6.1. Transmission du virus de lymphocytes T aux lymphocytes T.....	41
6.2. Transmission du virus de macrophages aux lymphocytes T	42
6.3. Transmission du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T ..	43
6.4. Transmission allogénique : des cellules séminales infectées aux cellules des muqueuses.....	45
CHAPITRE 3 : LES ANTICORPS ANTI-VIH ET LA VACCINATION	47
1. <i>Réponse humorale contre le VIH-1</i>	47
2. <i>Les anticorps anti-VIH-1 : les épitopes viraux</i>	48
2.1. La glycoprotéine d'enveloppe : gp120.....	49
2.2. La glycoprotéine de fusion : gp41	50
3. <i>Les anticorps anti-VIH-1 : de multiples activités antivirales.....</i>	51
3.1. La neutralisation du virus libre.....	53
3.2. Les mécanismes médiés par la partie Fc des Immunoglobulines	53
3.2.1. ADCP.....	54
3.2.2. ADCC	55
3.2.3. ADCVI.....	56
3.3. Inhibition de la transmission cellule à cellule.....	56
3.4. Le système du complément	58
4. <i>Immunité humorale dans les muqueuses.....</i>	59
5. <i>Etude du rôle des anticorps in vivo.....</i>	61
6. <i>Les essais vaccinaux</i>	62
7. <i>Les microbicides.....</i>	64
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	65
MATERIEL ET METHODES :	69
1. <i>Le modèle de co-culture allogénique.....</i>	69
1.1. Préparation des cellules	69
1.2. Préparation de stock de virus.....	69
<i>Amplification du virus :</i>	70
1.3. Modèle de transmission allogénique	70
2. <i>Modèle de culture de cellules isolées de tissus.....</i>	72

2.1.	Isolement des cellules immunitaires des muqueuses	72
2.2.	Infection des cellules.....	72
3.	<i>Immunophénotypage et analyse</i>	73
	<i>Immunophénotypage</i> :.....	74
	<i>Analyse par cytométrie en flux</i> :	74
4.	<i>Analyses statistiques</i>	75
5.	<i>Modèle de culture de tissus</i>	75
5.1.	Préparation des tissus et infection	75
5.2.	Congélation des tissus	76
RESULTATS	78
1.	<i>Infection et inhibition des DC et des LT CD4 dans un modèle de co-culture</i> 79	
1.1.	Infection des DC par du virus libre et inhibition de la transmission aux LT CD4 (co-culture autologue) (Publication 1 et 2).....	79
	Publication 1	81
	L'anticorps neutralisant à large spectre VRC01 empêche la transmission du VIH-1 des cellules dendritiques plasmacytoïdes aux lymphocytes T CD4 .	81
	Publication 2.....	88
	Détermination des anticorps potentiels en tant que stratégie prophylactique/thérapeutique lors de l'infection précoce au VIH dans les muqueuses.....	88
1.2.	Infection des DC et des LT CD4 par des cellules infectées et inhibition de la transmission (co-culture allogénique) (Publication 3).....	93
	Publication 3.....	94
	La transmission du VIH-1 des cellules T CD4 infectés aux cellules T CD4 et aux cellules dendritiques allogéniques est inhibée par les anticorps neutralisants à large spectre	94
2.	<i>Inhibition de l'infection par le biais d'une activité ADCC (Publication 4)...</i>	105
	Publication 4.....	106
	Les anticorps non-neutralisants ciblant la région V1/V2 du VIH-1 présente une importante activité à médiation cellulaire dépendante des anticorps.	106
3.	<i>Infection et inhibition du VIH-1 dans des cellules issues des muqueuses du tractus génital féminin par du virus libre</i>	117

Liste des figures

Figure 1 : Mise en évidence du VIH-1 dans les lymphocytes.	1
Figure 2 : Répartition globale du VIH dans le monde.	3
Figure 3 : Schéma détaillé de la structure de la particule virale du VIH-1.	5
Figure 4 : Schéma du cycle viral du VIH-1.....	6
Figure 5 : Physiopathologie du VIH-1.....	9
Figure 6 : Les cibles des molécules antirétrovirales.	12
Figure 7 : Représentation schématique du tractus génital féminin.	16
Figure 8 : Répartition des différents groupes bactériens en fonction des ethnies.....	18
Figure 10 : Les différents mécanismes d'entrée du VIH-1.....	28
Figure 11 : Mécanismes de transmission du VIH-1 des DC aux LT.	43
Figure 12 : La réponse humorale contre l'infection au VIH-1 au cours du temps.	48
Figure 13 : Les différents épitopes reconnus par les anticorps neutralisants à large spectre. (modifié à partir de (Mouquet, 2014)).	49
Figure 14 : Les différentes activités inhibitrices des anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs.....	52
Figure 15 : Représentation schématique du modèle de transmission allogénique...	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents phénotypes des cellules dendritiques.....	39
Tableau 2 : Marqueurs cellulaire étudiés par cytométrie en flux.....	74

Liste des annexes

Annexe 1 : Détection des cellules immunes par cytométrie en flux	160
Annexe 2 : Participation à une étude collaborative	161
Le Vpr du VIH-1 neutralise la réponse cellulaire médiée par CTIP2 pour l'infection virale.....	161

Abréviations

AcN :	Anticorps neutralisant
Ac NoNI :	Anticorps non neutralisant inhibiteur
ADCC :	Antibody dependent cellular cytotoxicity (activité cytotoxique à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
ADCP :	Antibody dependent cell phagocytosis (activité phagocytose à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
ADCVI :	Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition (activité inhibitrice à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARV :	Antirétroviral
AZT :	Azidothymidine
bNAb :	broadly neutralizing antibody (anticorps neutralisant à large spectre)
BV :	Bacterial vaginosis (vaginose bactérienne)
CA :	Capside
CDC :	Center for disease control and prevention
cDC :	Conventional dendritic cell (cellule dendritique conventionnelle)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Cytomegalovirus
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CRF :	Circulating recombinant form (forme circulaire recombinante)
CST :	Community state types
CT :	Cervico-types
DC :	Dendritic cell (cellule dendritique)
DC-SIGN :	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin
Flt3-L :	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FcRn :	Récepteur Fc néonatal
FGT :	Female genital tract (tractus génital féminin)
GALT :	Gut associated lymphoid tissue
GB :	Granules de Birbeck
GM-CSF :	Granulocyte macrophage colony stimulating factor

Gp :	Glycoprotéine
HBD2 :	Human beta-defensin-2
HESN :	HIV exposed seronegative individuals
HPV :	Human papillomavirus
HSPG :	Heparan sulfate proteoglycan
HSV :	Herpes simplex virus (virus de l'herpès)
HTLV :	Human T Lymphotropic Virus
ICAM :	Intercellular adhesion molecule
iDC :	Interstitial dendritic cells (cellule dendritique interstitielle)
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
IN :	Intégrase
InVS :	Institut de veille sanitaire
LAV :	Lymphadenopathy associated virus
LB :	Lymphocyte B
LC :	Langerhans cell (cellule de Langerhans)
LFA :	Lymphocyte function-associated antigen
LT :	Lymphocyte T
LTNP :	Long term non-progressor
LTR :	Long terminal repeat
LT reg :	Lymphocyte T régulateur
MA :	Matrice
MIP :	Macrophage inflammatory protein
MoDC :	monocyte derived dendritic cells (monocyte dérivé en cellule dendritique)
MPER :	Membrane external proximal region
MR :	Mannose receptor (Récepteur au mannose)
MST :	Maladie sexuellement transmissible
MUC :	Mucine
MCV :	Corps multi-vésiculaire
NC :	Nucléocapside
NHP :	Non human primate (primate non-humain)
NK :	Natural Killer

NRTI :	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (inhibiteurs nucléos(t)idiques)
NNRTI :	Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (inhibiteurs non nucléos(t)idiques)
PAMP :	Pathogen-associated molecular pattern
PAP :	Prostatic acidic phosphatase
PBMC :	Peripheral blood mononuclear cell (cellule mononuclée du sang périphérique)
pDC :	Plasmacytoid dendritic cell (cellule dendritique plasmacytoïde)
PIC :	Pre-integration complex (complexe de pré-intégration)
pIgR :	Récepteur Ig polymérique
PR :	Protéase
PRR :	Pattern recognition receptor
RFC :	Récepteur Fc
RT :	Reverse transcriptase (transcriptase inverse)
RTC :	Reverse transcription complex (complexe de rétro-transcription)
SAG :	Salivary agglutinin
SCF :	Stem Cell Factor
SEM :	Dérivés de séménogélines
SEVI :	Semen-derived enhancer of virus infection
SG :	Séménogéline
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIV :	Simian immunodeficiency virus (Virus de l'immunodéficience simienne)
SLPI :	Secretory leucocyte protease inhibitor
SNC :	Système nerveux central
SR :	StemRegenin
SVF :	Sérum de veau foetal
T/F :	Transmitted founder virus (virus fondateur)
TGF :	Transforming growth factor
TLR :	Toll like receptor
TME :	Transmission de la mère à l'enfant
TNF :	Tumor necrosis factor
TPE :	Traitement post-exposition
TPO :	Thrombopoïétine

VCC : virus-containing compartment
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VHC : Virus de l'hépatite C

Contexte générale :

Trente-quatre ans après la découverte du VIH-1, les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de ce virus ont considérablement progressé. Cependant, il n'existe pas encore de traitement curatif ou de vaccin permettant d'endiguer l'épidémie.

Fin 2016, l'ONUSIDA recense 1,8 million de nouvelles infections dans le monde. Certaines populations restent très sensibles à l'infection par le VIH-1 et notamment les femmes qui représentent 58% des cas nouvellement infectés (UNAIDS: Global AIDS Update, 2017). La « féminisation » de l'épidémie du VIH-1 est particulièrement retrouvée en Afrique subsaharienne et peut s'expliquer par des facteurs biologiques (présence d'un grand nombre de sites potentiels à l'infection par le VIH-1 dans le tractus génital féminin) mais également des facteurs sociaux (précocité des rapports sexuels, prostitutions, violences ...). La nécessité de développement d'un vaccin capable de prévenir les transmissions du VIH-1 par voie sexuelle est clairement établie. Afin de répondre à ces attentes, il est donc primordial de bien connaître les mécanismes de transmission et d'infection du VIH-1 dans les muqueuses.

Le tractus génital féminin représente une importante voie d'entrée dans l'infection du VIH-1 lors des événements précoces. Cependant de nombreux facteurs endogènes et exogènes peuvent influencer le pouvoir infectieux du VIH-1 et sa capacité de réplication au sein de ces muqueuses. Ainsi, les études entreprises sur l'entrée du VIH-1, l'infection des cellules cibles et les capacités inhibitrices des anticorps dans ces muqueuses sont très controversées.

Le but de cette thèse est de déterminer les premières cellules cibles du VIH-1 et la capacité des anticorps à inhiber leurs infections.

Introduction

Chapitre 1 : Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1. Le VIH : de sa découverte à ses origines

Les premiers travaux de recherche sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) débutèrent au cours des années 80. A partir de l'année 1981, le centre de contrôle des maladies ou « *center for disease control and prevention* » (CDC) recensa aux Etats-Unis de nombreux cas de jeunes patients infectés par des maladies opportunistes et ce, notamment dans la communauté homosexuelle (pneumonie rare (*Pneumocystis carinii*) ou syndrome de Kaposi) (1981; 1982; Gottlieb et al., 1981). La particularité commune à ces différents patients était l'apparition d'une déficience généralisée du système immunitaire. Cette pathologie fut baptisée, par la suite, de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). En 1982, des cas similaires furent également recensés en Europe. L'agent pathogène responsable de ce syndrome fut dans un premier temps, apparenté au HTLV (*Human T Lymphotropic Virus*), un rétrovirus identifié un an avant l'apparition des premiers cas d'infection, par l'équipe américaine de Robert Gallo (Greene, 2007; Poiesz et al., 1980). Mais en 1983, cinquante ans après l'invention du premier microscope électronique, l'équipe française de Luc Montagnier fut la première à isoler, produire et mettre en évidence par microscopie, l'agent responsable du SIDA (Barre-Sinoussi et al., 1983) (Figure 1). Dénommé LAV (*Lymphadenopathy associated virus*), il fut rebaptisé par la suite VIH pour virus de l'immunodéficience humaine (HIV en anglais). Pour cette découverte, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier seront récompensés par un prix Nobel de médecine en 2008.

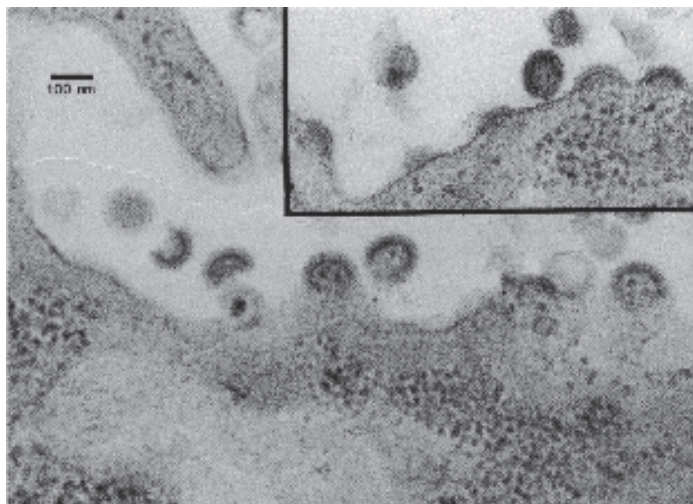


Figure 1 : Mise en évidence du VIH-1 dans les lymphocytes.

Première image de microscopie électronique à transmission représentant la production virale dans un lymphocyte T CD4 (Barre-Sinoussi et al., 1983).

Trois ans après la découverte du VIH (VIH de type 1 ou VIH-1), un rétrovirus similaire, dénommé VIH-2, fut isolé à partir de patients atteints de SIDA en Afrique de l'ouest (Guinée Bissau et île du Cap vert) (Clavel et al., 1986). Le VIH-2 possède des caractéristiques génétiques, structurales et antigéniques similaires au VIH-1. Ce virus possède entre 30 et 60% d'homologie avec le VIH-1 (Guyader et al., 1987). Cependant, sa charge virale dans le sang est faible voire indétectable, sa transmission est moins efficace et la progression vers le syndrome d'immunodéficience est beaucoup plus lente comparée à celle retrouvée chez les patients infectés par le VIH-1 (Leligdowicz et al., 2010; Makvandi-Nejad and Rowland-Jones, 2015). La répartition géographique de l'infection par le VIH-2 est limitée à l'Afrique de l'ouest, avec un taux d'incidence plus élevé en Guinée Bissau, et aux pays partageant des liens socio-économiques avec ces pays tels que la France et le Portugal (Azevedo-Pereira and Santos-Costa, 2016; Marlink, 1996). Le VIH-1, quant à lui, s'est répandu sur l'ensemble du globe.

Le VIH est apparenté au virus de l'immunodéficience simienne SIV (ou *simian immunodeficiency virus*), l'équivalent du VIH chez les singes. Les multiples transmissions de singe à singe ont généré différents types de SIV. Les transmissions de SIV de chimpanzé à l'homme ont engendré différents clades viraux du VIH-1: le groupe M (pour Majeur), le groupe O (pour *outlier*) et le groupe N (pour non M et non O). Le VIH-1 du groupe P, et peut-être le groupe O, proviendrait d'une zoonose du SIV du Gorille (D'Arc et al., 2015). Le VIH-1 du groupe M, responsable de la pandémie, est subdivisé en neuf sous-types génétiques (A, B, C, D, F, G, H, J et K). Les phénomènes de recombinaisons entre ses différents sous-types ont donné naissance aux formes de recombinaisons circulantes (CRF) (Hemelaar, 2012). Cette grande diversité génétique montre la rapide adaptation et évolution du VIH-1 dans son nouvel hôte.

Avec l'évolution des nouvelles technologies, des analyses phylogénétiques, moléculaires et statistiques ont permis d'identifier les derniers ancêtres communs du VIH-1 du groupe M apparu dans les années 1920, ainsi que les premières diversifications de ces souches en différents sous-types isolés à partir de prélèvement sanguin en 1959. Le début de l'épidémie aurait donc débuté à Léopoldville, rebaptisé Kinshasa en République Démocratique du Congo, puis se

serait disséminé dans le monde, grâce aux déplacements favorisés par les divers échanges commerciaux (Sharp and Hahn, 2011).

2. Distribution globale du VIH

Depuis la découverte du VIH, 78 millions de personnes ont été infectées et 35 millions sont décédés des suites d'une maladie liée au SIDA dans le monde (ONUSIDA Rapport 2017). Fin 2016, l'ONUSIDA recense 36,7 millions de personnes vivant avec le VIH avec 1,8 million de nouvelles infections dans le monde (Figure 2). L'Afrique subsaharienne (Afrique noire) est considérée comme étant l'épicentre de l'épidémie avec 25,6 millions d'individus infectés. Cette région concentre près des deux tiers des nouveaux cas d'infection, la grande majorité provenant de transmission par voie hétérosexuelle.

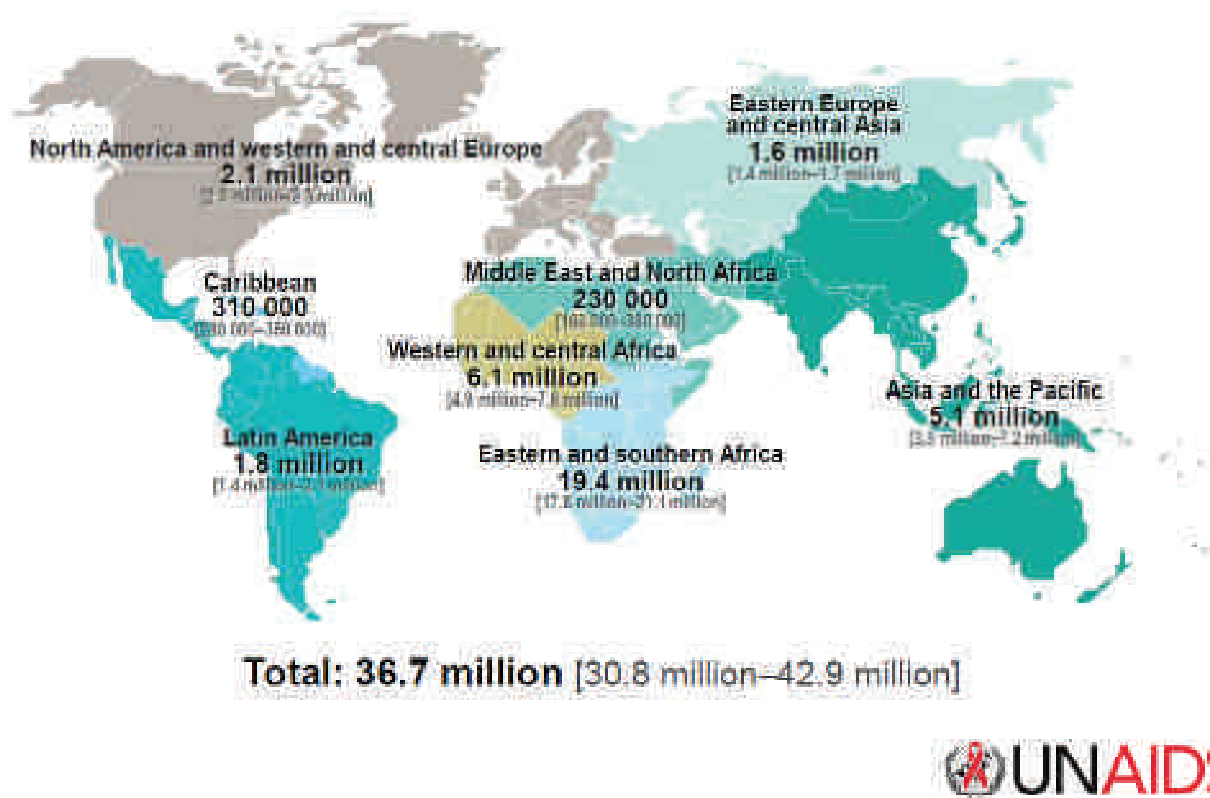


Figure 2 : Répartition globale du VIH dans le monde.

(UNAIDS Report 2017)

Le développement de nouveaux traitements et l'accès aux traitements antirétroviraux dans les pays en voie de développement ont permis de diminuer le nombre de décès liés au SIDA de 48% depuis 2005. Cependant, on compte encore 1 million de mort chaque année.

Le dépistage obligatoire des femmes enceintes et leurs prises en charge lors de l'allaitement (76% sous traitement antirétroviral dans le monde) ont permis de réduire considérablement le nombre de transmission de la mère à l'enfant (TME) (diminution de 70% des TME depuis 2000).

Malgré l'ensemble des progrès réalisés, certaines populations restent très sensibles à l'infection par le VIH et notamment les femmes. A l'échelle mondiale, 17,8 millions de femmes (de plus de 15 ans) sont infectées par le VIH et elles représentent 58% des cas nouvellement infectés, retrouvés principalement en Afrique subsaharienne (UNAIDS: Global AIDS Update, 2017).

En France, 150 000 personnes vivent avec le VIH dont 6000 nouvelles infections déclarées par l'institut de veille sanitaire (InVS) en 2015. Cette estimation reste stable depuis 2011. Les femmes nées à l'étranger représentent une part importante des nouveaux cas diagnostiqués. Le dépistage obligatoire des femmes enceintes et leurs prises en charge lors de l'allaitement ont permis d'éliminer très significativement la TME en France.

En 2016, l'Alsace recensait 1240 individus diagnostiqués et suivis par le Trait d'Union (Centre de soins de l'infection par le VIH) dont 27% de femmes (Rapport d'activité du Trait d'union 2016).

3. Structure de la particule virale

Appartenant à la famille des *Retroviridae*, le VIH-1 est un *Lentivirus* (incubation longue et évolution lente de la maladie).

Le VIH-1 est un rétrovirus constitué de deux copies identiques d'acide ribonucléique (ARN) simple-brin de polarités positives associées par des liaisons non covalentes. Le génome ARN de 9,2kb, entouré à ses extrémités par des séquences répétées LTR (*Long Terminal Repeat*), est composé de trois gènes principaux : *env* (pour *envelope glycoprotein*) codant pour les protéines de l'enveloppe, *gag* (pour

group-specific antigen) codant pour les protéines structurales (capside, matrice et nucléocapside) et *pol* (pour *polymerase*) codant pour les enzymes virales (protéase, intégrase et transcriptase inverse). Ces gènes sont classiquement retrouvés dans l'ensemble des rétrovirus. Au sein de ce génome, des gènes supplémentaires, caractérisant les lentivirus, sont également présents codant pour les protéines régulatrices (*tat*, *rev*) et les protéines auxiliaires (*nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*). Le matériel génétique du VIH-1 est associé aux protéines de la nucléocapside (NC, p7), à la transcriptase inverse (RT, p51/p66) et à l'intégrase (IN, p32). L'ensemble est entouré par les protéines de capsid (CA, p24) formant un cœur conique. La capsid est recouverte d'une couche de protéines de matrice (MA, p17) contenant la protéase virale (PR, p10). Enfin, une bicouche lipidique d'origine cellulaire, comportant des spicules viraux composés de trimères de glycoprotéines de surface (gp120, SU) et transmembranaire (gp41, TM) englobe l'ensemble de la structure formant ainsi la particule du VIH-1 (Briggs and Krausslich, 2011) (Figure 3).

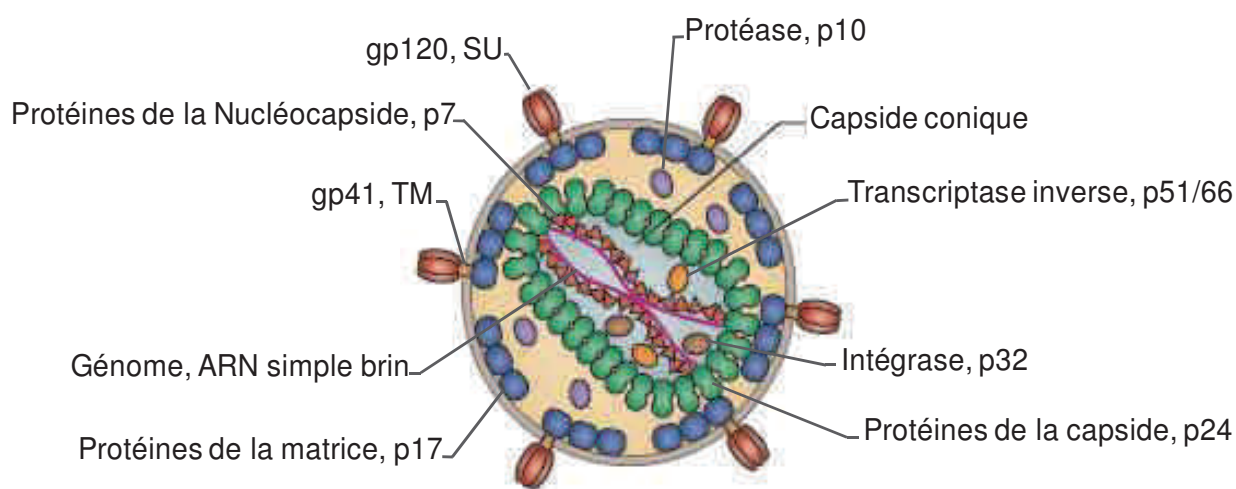


Figure 3 : Schéma détaillé de la structure de la particule virale du VIH-1.

(modifié d'après (Freed, 2015))

4. Cycle viral du VIH

Le cycle viral du VIH-1 peut être subdivisé en deux phases : la phase précoce correspondant à l'entrée du virus jusqu'à l'intégration de son génome viral dans sa cellule hôte et la phase tardive impliquée dans l'expression des gènes viraux jusqu'à la libération des nouveaux virions (Figure 4).

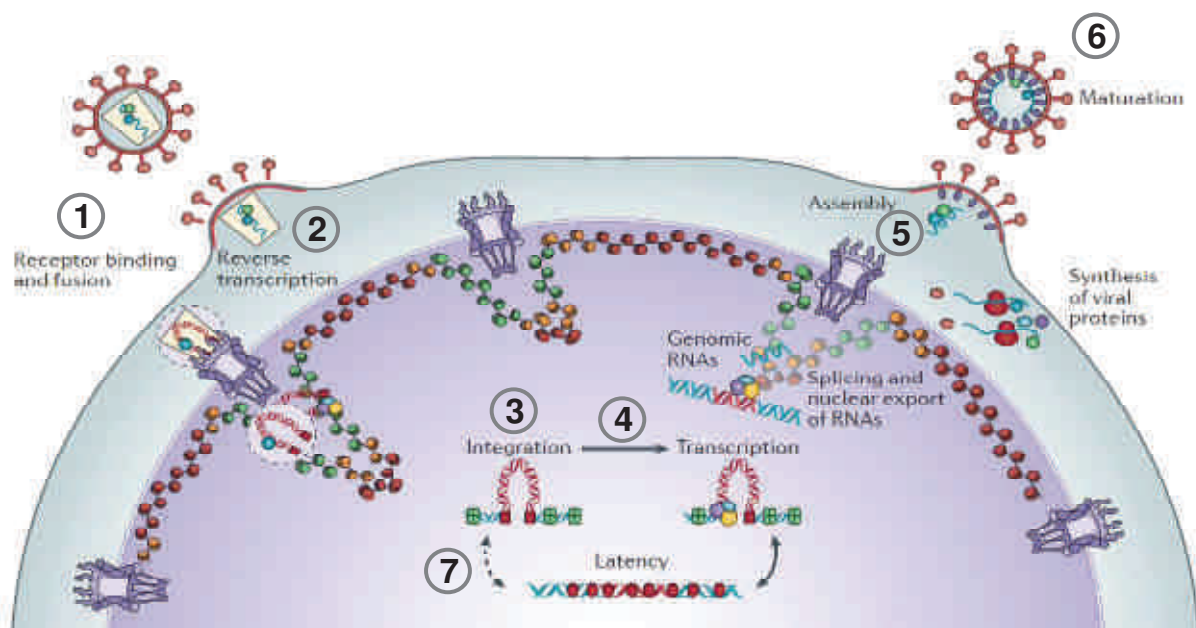


Figure 4 : Schéma du cycle viral du VIH-1.

La numérotation correspond aux différentes étapes du cycle viral du VIH-1 jusqu'à sa production virale. L'étape numéro 7 correspond la phase de latence. L'ADN viral peut rester silencieux au sein du génome cellulaire (Lusic and Siliciano, 2017).

Le processus d'entrée du virus repose sur la reconnaissance spécifique du récepteur CD4 de la cellule hôte par la glycoprotéine d'enveloppe : gp120 (Dalgleish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Cette interaction induit un changement conformationnel de la gp120, permettant un renforcement de la liaison par une double fixation à un corécepteur situé à proximité du récepteur CD4.

Dans le cas du VIH-1, il existe deux corécepteurs majoritaires déterminant le tropisme viral : le CCR5, présent à la surface des macrophages, des cellules dendritiques (DC) et des lymphocytes T CD4 mémoires (LT CD4), reconnu par les virus de type R5 (tropisme R5), et le CXCR4, présent à la surface des LT CD4 naïfs et mémoires reconnu par les virus de type X4 (tropisme X4). Le VIH-1 peut également utiliser les deux corécepteurs. Ce virus est alors de type X4R5 ou également désigné de « *dual-tropic* ». Les virus de type R5 sont majoritairement impliqués dans les premiers événements de l'infection par le VIH-1 lors d'une transmission par voie sexuelle (Keele et al., 2008). De plus, certains individus caucasiens possèdent une délétion de 32 paires de base ($\Delta 32$) dans le gène codant pour le CCR5 (CCR5 $\Delta 32$). Ce CCR5 tronqué empêche l'infection des cellules par le

VIH-1 de type R5. Ainsi, la protection observée chez les individus $\Delta 32$ démontre l'importance du corécepteur CCR5 lors des événements précoces de l'infection par le VIH-1 (Samson et al., 1996).

La fixation de la gp120 à son corécepteur déclenche un changement conformationnel de la gp41 permettant la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte. Ce phénomène crée un pore de fusion, libérant la capsid dans le cytoplasme cellulaire (Blumenthal, Durell, and Viard, 2012; Melikyan, 2008). Le désassemblage de la capsid après la fusion reste très controversé. En effet, trois hypothèses ont été proposées : 1) une décapsidation rapide après la fusion, libérant l'ensemble de son contenu dans le cytoplasme, 2) un désassemblage progressif de la capsid pendant son transport vers le noyau ou 3) une décapsidation au niveau du pore nucléaire (Arhel, 2010). L'ensemble de ces hypothèses suggèrent le rôle important et limitant de la décapsidation dans la préservation de l'intégrité du génome viral, le transport vers les pores nucléaires et l'activité de la RT dans le cytoplasme cellulaire. La décapsidation génère un complexe de rétro-transcription (RTC), contenant les protéines MA, NC, IN, RT, Vpr et le matériel génétique, responsable de l'étape de transcription inverse par le biais de la RT (conversion de l'ARN en ADN double brin). L'entrée de l'ADN viral dans le noyau est effectuée par le complexe de pré-intégration (PIC). Ce complexe est principalement formé par l'ADN viral et les protéines de CA et d'IN. La présence des protéines MA, NC, RT et Vpr dans le PIC est très controversé (Bukrinsky et al., 1993; Farnet and Haseltine, 1991; Miller, Farnet, and Bushman, 1997). L'intégration du génome viral est catalysée par l'IN. Cette protéine clive quelques nucléotides aux deux extrémités et intègre l'ADN viral linéaire dans le génome de la cellule hôte. L'ADN viral intégré porte le nom de provirus. Le provirus peut rester silencieux par le biais de différents mécanismes pendant plusieurs années, créant la phase de latence (Nisole and Saib, 2004). Lors d'une infection productive, l'ADN proviral est transcrit en ARN messager (ARNm) et exporté dans le cytoplasme. Dans le réticulum endoplasmique, l'ARNm est traduit en protéines. Ces protéines nouvellement synthétisées s'assemblent près de la membrane plasmique pour former les nouvelles particules virales immatures. La maturation de ces particules s'effectue par le biais de la protéase. Les particules virales matures sont ensuite libérées dans le surnageant (Freed, 2015).

Le VIH-1 possède une grande capacité répliquative qui, associée au taux élevé de mutation suite aux erreurs de la RT, génère une grande hétérogénéité de variants (Chun et al., 1997; Haase et al., 1996). Ce phénomène est impliqué dans l'échappement du virus à la réponse immunitaire de l'hôte, ainsi que dans le développement de résistances contre les traitements antirétroviraux.

5. Physiopathologie du VIH

Le VIH-1 est présent dans de nombreux fluides biologiques (sang, salive, larmes, sécrétions vaginales, sperme, urines et fluides cérébro-spinaux). Le virus se transmet lors de rapports sexuels non protégés, par voie sanguine (échange de seringues des drogués, exposition au sang contaminé) et de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement (transmission verticale).

Actuellement la transmission du VIH-1 par voie sexuelle représente le mode de contamination le plus fréquent à travers le monde.

La chronologie de l'infection par le VIH-1 est divisée en trois phases : la primo-infection (ou phase aigüe), la phase chronique (dite silencieuse ou asymptomatique) et la phase SIDA (Figure 5).

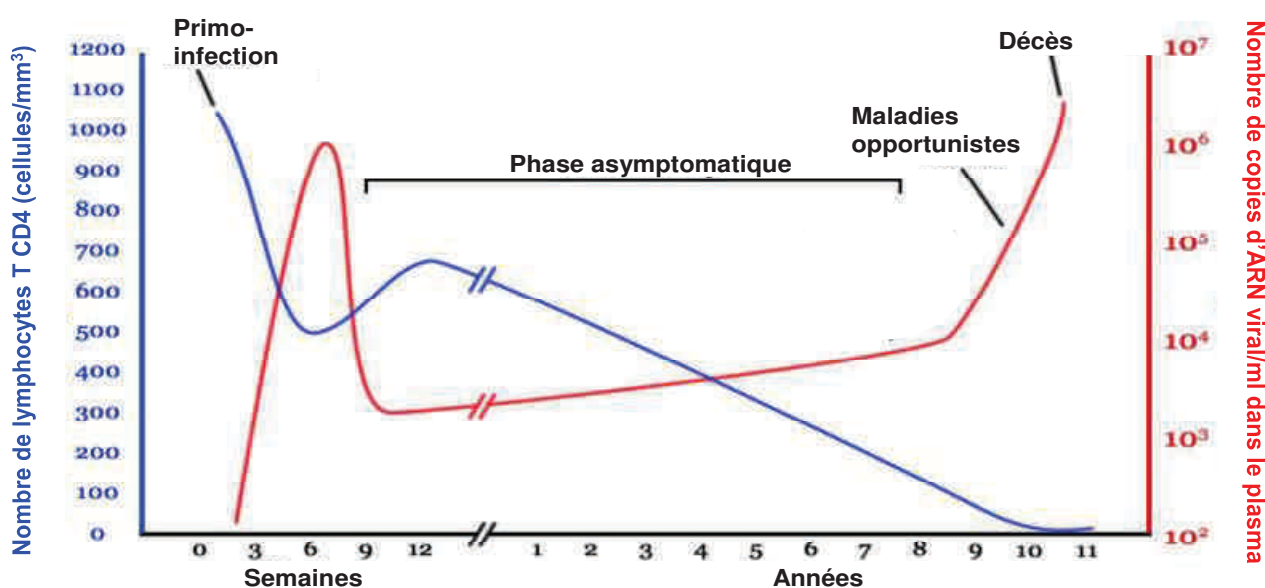


Figure 5 : Physiopathologie du VIH-1.

Le nombre de LT CD4 (courbe en bleu) et la charge virale (courbe en rouge) dans le plasma (virémie) sont représentés aux différents stades de l'évolution de la maladie. (modifié d'après Sanao/Licence Creative Commons)

A la suite d'un rapport sexuel non protégé, la contamination par le VIH-1 intervient dans les 48h après exposition. Un traitement post-exposition (TPE) a été mis en place afin de prévenir les risques de contamination. Ce traitement, qui consiste à la prise d'antirétroviraux dans les 4 à 48h après la prise de risque, est efficace à 90%.

En absence de traitement la phase de primo-infection se met en place. Cette étape représente la première phase de production et de libération massive de nouveaux virions pendant les premières semaines post-exposition (3 à 6 semaines). L'infection et la réplication du VIH-1 dans ses cellules cibles s'effectuent, en premier lieu, localement au niveau des muqueuses. L'ARN viral n'est pas détecté dans le plasma, c'est la phase d'éclipse. Les premiers virus transmis sont dénommés virus fondateurs ou « *transmitted founder virus* » (Abrahams et al., 2009; Keele et al., 2008; Salazar-Gonzalez et al., 2009). En fin de la phase éclipse, les cellules infectées et les virions se propagent, via la circulation sanguine, vers les organes lymphoïdes secondaires et particulièrement dans les tissus lymphoïdes digestifs (GALT : *gut associated lymphoid tissue*) où résident la majorité des LT CD4

mémoires. La réplication rapide du virus dans l'ensemble des organes lymphoïdes induit une augmentation exponentielle de la virémie plasmatique (1×10^6 copies d'ARN viral/ml de sang). Celle-ci est suivie d'une déplétion massive des LT CD4 après libération des nouveaux virions. La diminution du pic de virémie et la restauration du taux de LT CD4 dans ces tissus résultent de l'activation des éléments de la réponse immunitaire : induction de cellules cytotoxiques comme les lymphocytes T CD8 et les cellules NK et production d'anticorps dirigés contre les antigènes viraux à la surface des cellules cibles (McMichael et al., 2010). Au cours des premières semaines de l'infection, les premiers réservoirs du VIH-1 se mettent en place dans les différents organes lymphoïdes mais également dans les compartiments génitaux (Le Tortorec and Dejuq-Rainsford, 2010 ; Cu-Uvin et al., 2010). Pendant la primo-infection, certains individus développent des symptômes comme des syndromes grippaux, des éruptions cutanées ou une lymphadénopathie. Cependant ces symptômes ne sont pas spécifiques d'une infection par le VIH-1 et peuvent également être associés à d'autres maladies telles que la mononucléose infectieuse (Ho et al., 1985).

Des études réalisées, notamment sur la cohorte ANRS PRIMO, ont démontré qu'une prise de la trithérapie au stade de la primo-infection permet de : 1) diminuer le nombre de cellules ayant intégrées l'ADN viral, 2) réduire l'activation immunitaire précoce, limitant ainsi l'inflammation chronique au niveau des muqueuses et 3) limiter l'établissement des réservoirs viraux cellulaires et tissulaires (Robb and Ananworanich, 2016 ; Crowell et al., 2016 ; Deleage C et al., 2016 ; Laanani et al., 2015 ; Ananworanich et al., 2015 ; Schuetz et al., 2014).

La phase chronique ou asymptomatique (dite cliniquement latente) représente la phase d'homéostasie entre une réplication virale persistante et la réponse immunitaire face à cette infection. Une réplication résiduelle a lieu dans les différents réservoirs viraux permettant une production virale continue de virus. La diversification des souches virales et l'apparition de multiples variants induisent un échappement immunitaire, un renouvellement continu de la réponse immunitaire et le déclin progressif des différentes populations de LT CD4 (McDonald et al., 1997; Simon, Ho, and Abdool Karim, 2006). La phase asymptomatique peut durer plusieurs années selon les individus (3 à 10 ans). L'administration d'un traitement antirétroviral durant cette phase permet de stabiliser l'évolution de l'infection par le VIH-1, de maintenir le

taux de LT CD4 et de diminuer considérablement la charge virale jusqu'à devenir indétectable.

La phase SIDA est détectée lorsque le taux de LT CD4 plasmatiques passe sous le seuil de 200 cellules/ μ l. Le virus est alors principalement de tropisme X4 (issu ou non d'un changement de tropisme). Le développement de maladies opportunistes bactériennes, fongiques et virales (*Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, CMV, ou sarcome de Kaposi...) apparaisse. En absence de traitement, le développement des maladies opportunistes et l'affaiblissement des réponses immunitaires entraînent le décès du patient.

La prise de traitement permet de diminuer la charge virale, restaurer le taux de LT CD4 et ainsi réduire l'apparition des pathologies opportunistes et augmenter l'espérance de vie des patients.

A l'heure actuelle, les stratégies de prévention et l'accès aux traitements ont permis de réduire nettement le taux de nouvelles infections ainsi que le taux de morbidité et de mortalité de patients déjà infectés par le VIH-1 dans le monde.

6. Les traitements antirétroviraux et leurs limites

Le traitement par différents antirétroviraux (ARV) a pour objectif de réduire la charge virale plasmatique afin d'empêcher les risques de transmission du VIH-1 et de maintenir le taux de LT CD4.

Les molécules antirétrovirales disponibles agissent à différentes étapes du cycle viral et sont classées en différents groupes (Figure 6) :

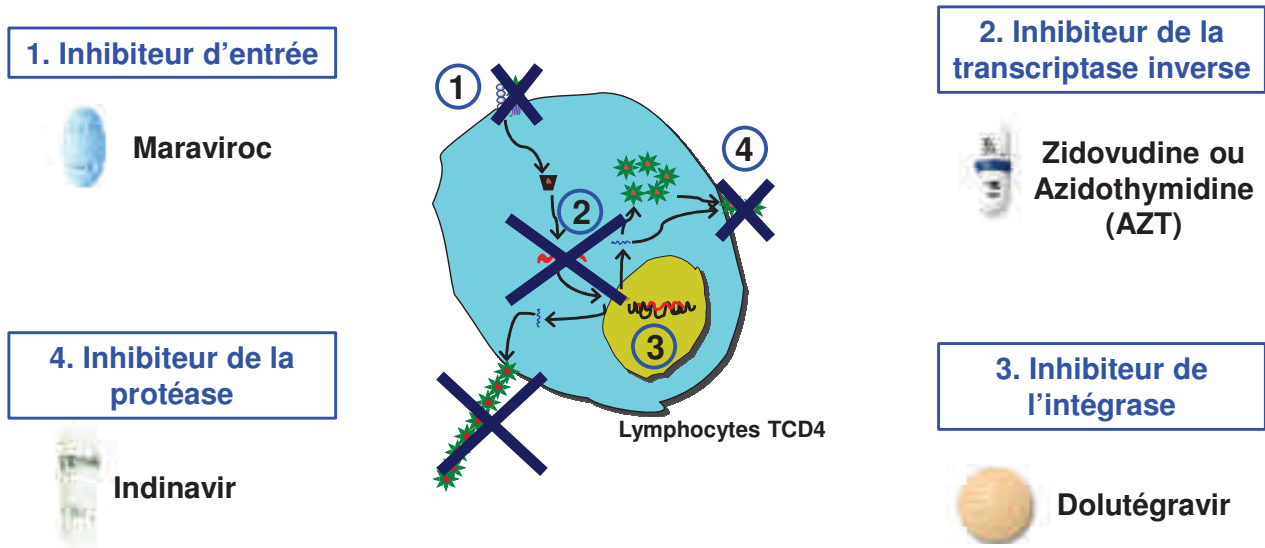


Figure 6 : Les cibles des molécules antirétrovirales.

Schéma simplifié montrant les différentes étapes du cycle viral ciblées par différentes molécules antirétrovirales dans un lymphocyte T CD4.

- Les inhibiteurs d'entrée comprenant les inhibiteurs du CCR5 (maraviroc, aplaviroc, vicriviroc) et l'inhibiteur de fusion (enfuvirtide, peptide T20). Les inhibiteurs du CCR5 sont des antagonistes du corécepteur CCR5 et inhibent la fixation du VIH-1 à ce corécepteur. La prise de ces molécules antirétrovirales est dépendante du tropisme viral. Ces molécules ne bloquent pas l'entrée des souches virales de tropisme X4 dans la cellule hôte. Le peptide T20 ou enfuvirtide empêche le changement de conformation associé à la fusion des membranes virales et cellulaires en se fixant à la protéine virale gp41.
- Les inhibiteurs de la RT empêchent l'étape de transcription inverse de l'ARN en ADN viral. Deux familles de molécules sont disponibles : des inhibiteurs nucléos(t)idiques (NRTI) et non nucléos(t)idiques (NNRTI): Les NRTIs sont des dérivés des nucléos(t)ides naturels. Ils entrent en compétition avec les nucléos(t)ides naturels, provoquant l'arrêt prématuré de l'élongation de l'ADN viral. La zidovudine ou azidothymidine (AZT) est le premier antirétroviral mis sur le marché en 1987 dans le traitement contre l'infection par le VIH-1. Depuis, d'autres molécules ont été introduites sur le marché comme

lamivudine (3TC), abacavir ou tenofovir. Les NNRTIs (efavirenz, névirapine, rilpivirine) sont des inhibiteurs non compétitifs de la RT. Ces molécules inhibent directement la RT en se fixant dans une poche hydrophobe située à proximité du site actif de l'enzyme. Cette fixation provoque un changement conformationnel de la RT la rendant inactive.

- Les inhibiteurs de l'intégrase (raltégravir, elvitégravir, dolutégravir) : ces molécules bloquent l'action de l'enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte, en se fixant soit au complexe de pré-intégration (raltégravir, elvitégravir) soit au site actif de l'intégrase (dolutégravir).
- Les inhibiteurs de la protéase (indinavir, ritonavir, lopinavir) : ces molécules se fixent au niveau du site actif de l'enzyme et bloquent son activité protéolytique. Ainsi, les nouveaux virions produits sont immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules cibles.

Depuis l'introduction de la trithérapie en 1996, l'espérance de vie des patients infectés s'est considérablement améliorée. La trithérapie, constituée de trois ARV, permet d'agir à plusieurs étapes du cycle viral et ainsi limiter l'échappement viral aux ARV. Cependant, ce traitement ne permet pas d'obtenir une guérison totale. La persistance du virus chez les patients infectés sous ARV, peut s'expliquer par la présence de réservoirs du VIH-1 constitués de cellules infectées quiescentes ou latentes (Bui et al., 2017 ; Chun et al., 1997). Ces cellules peuvent être retrouvées dans : les différents tissus lymphoïdes, le système nerveux central (SNC) ou encore les compartiments génitaux (Haase, 1999 ; van Marle et al., 2007 ; Takahashi et al., 1996 ; Pudney and Anderson, 1991 ; Gupta et al., 2002 ; Le Tortorec and Dejucq-Rainsford, 2010 ; Cu-Uvin et al., 2010). Il est à noter que les ARV disponibles sont administrés principalement par voie orale ou intraveineuse. Le passage de certains ARV de la circulation sanguine vers certains sites anatomiques peut être limité, c'est le cas par exemple du passage à travers la barrière hémato-génitale (Taylor and Davies 2010). D'autres limites des ARV ont également été démontrées. Un traitement antirétroviral à long terme peut provoquer des effets secondaires entraînant parfois l'arrêt de ces traitements. Ces effets secondaires

peuvent être des atteintes digestives (hépatite médicamenteuse), cardiovasculaire (accident vasculaire cérébral), métabolique (lipodystrophie), ou hématologiques (thrombopénie). Le développement de souches virales résistantes aux ARV peut également être observé chez certains patients à la suite d'un arrêt prématuré du traitement ou de la pression antirétrovirale (Nijhuis et al., 2009 ; Politch et al., 2012).

Au vu des limitations des traitements antirétroviraux, il est donc nécessaire d'établir de nouvelles stratégies permettant d'empêcher l'infection des premières cellules cibles du VIH-1 après exposition afin d'empêcher l'établissement des premiers réservoirs viraux.

Afin de pouvoir proposer de nouvelles stratégies permettant de prévenir l'infection des premières cellules cibles, il est primordial de connaître les mécanismes d'infection et de transmission du VIH-1. La transmission par voie sexuelle représente le mode de contamination majoritaire et les femmes sont les plus touchées. Les muqueuses génitales sont, de ce fait, des portes d'entrée privilégiées du virus. Comprendre les interactions du virus avec les cellules cibles du VIH-1 dans les muqueuses et l'environnement du tractus génital féminin constitue donc un enjeu de taille.

Chapitre 2 : Le VIH dans les muqueuses

1. Transmission hétérosexuelle du VIH

Actuellement, l'ONUSIDA dénombre 17,8 millions de femmes vivant avec le VIH dans le monde. La majorité des nouveaux cas de contamination, principalement retrouvés en Afrique (64%), sont des jeunes femmes âgées entre 15 et 24 ans et issus de transmission par voie hétérosexuelle (UNAIDS : Global AIDS Update, 2016). Cette tendance peut être influencée par des inégalités sociales (difficulté d'accès à l'éducation, précocité des relations sexuelles souvent non consenties, violences envers les femmes, prostitutions...) et des coïnfections principalement VIH/tuberculose (Ramjee G et al., 2012 ; Evan et al., 2016 ; Shenoï et al., 2017). Par exemple, les risques de transmission du VIH-1 chez les travailleuses du sexe sont 12 fois plus élevés comparé à la population générale (UNAIDS 2014. The gap report 2014 : Sex workers). D'autre part, les actes sexuels répétés et les produits d'hygiène (tampons, savons non-hygiéniques) sont également des facteurs influençant les risques de transmission du VIH-1 chez l'ensemble de la population féminine (McClelland et al., 2007). Les femmes représentent donc une population hautement à risque dans la transmission du VIH-1.

Le risque de transmission du VIH-1 d'un homme à une femme est de 0.08-0.3% pour des rapports sexuels non protégés (Boily et al., 2009). Il est 2 fois plus élevé que le risque de transmission d'un homme à une femme (Hughes et al., 2012). Le risque de transmission augmente, lorsque la femme présente une maladie sexuellement transmissible (MST) (Powers et al., 2008).

Le tractus génital féminin représente donc une voie d'entrée importante du VIH-1 lors des événements précoces d'infection.

L'ensemble de ces données démontre la vulnérabilité du tractus génital féminin face à l'infection par le VIH-1.

2. Le tractus génital féminin (FGT)

Le tractus génital féminin (FGT pour *female genital tract*) est un système complexe compartimenté en deux parties bien distinctes : la partie supérieure (ovaires, trompes de Fallope et utérus) impliquée dans le processus de conception et

la partie inférieure (col de l'utérus et vagin) responsable des mécanismes de défenses (Figure 7).

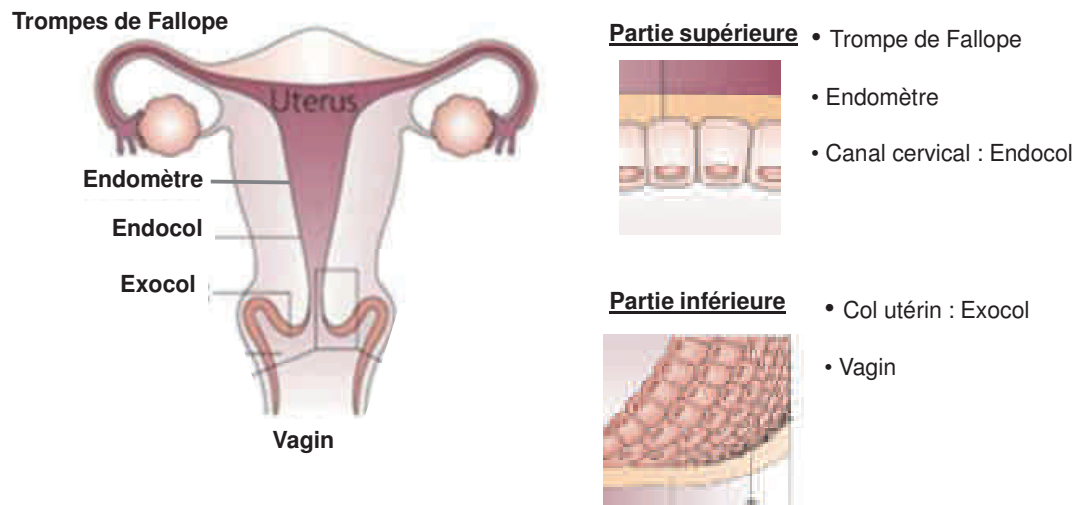


Figure 7 : Représentation schématique du tractus génital féminin.

Caractérisation des différentes parties du tractus génital féminin en fonction de leurs caractéristiques histologiques (couche épithéliale représentée par les schémas à droite)

(modifié d'après Iwasaki, 2010)

L'environnement des muqueuses du tractus permet donc, à la fois une tolérance semi-allogénique pour le sperme et le développement du fœtus mais également une activation du système immunitaire contre divers agents pathogènes.

Les muqueuses sont constituées d'un épithélium au contact du lumen (milieu extérieur) et d'un tissu conjonctif sous-jacent vascularisé (milieu intérieur) appelé couche sous-muqueuse. Ces deux structures sont séparées par une lame basale. L'épithélium est formé d'une ou plusieurs couches de cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées (ou *tight junctions*), des jonctions d'ancrage et des jonctions communicantes (ou *gap junctions*). Cet attachement solide des cellules entre elles représente un des premiers mécanismes de défenses contre les divers pathogènes.

Les trompes de Fallope et l'utérus (ou endomètre) représentent la partie supérieure du tractus. Les muqueuses de ces tissus constituées d'une monocouche de cellules épithéliales forment un épithélium cylindrique monostratifié.

Le col de l'utérus est constitué de l'endocol et de l'exocol. L'endocol, canal reliant la cavité utérine au vagin, est recouvert d'un épithélium monostratifié composé de cellules ciliées et de cellules glandulaires sécrétant le mucus (ou glaire cervicale). La portion intra-vaginale du col (exocol) et le vagin sont constitués d'un épithélium pluristratifié squameux non-kératinisé. De plus, cet ensemble arbore une microflore vaginale. Ainsi, les nombreuses couches de cellules épithéliales et la flore commensale forment une barrière imperméable bloquant l'entrée de divers agents infectieux (Quayle, 2002).

La partie reliant l'endocol à l'exocol où l'épithélium monostratifié devient pluristratifié est appelée zone de transformation.

Les sites privilégiés à l'infection par le VIH-1 dans le FGT ne sont pas encore clairement établis. La partie inférieure du tractus représente la première zone exposée en contact direct avec le liquide séminal infecté. Les études réalisées sur le modèle de singe ont démontré l'infection par le SIV au niveau des tissus du vagin, de l'exocol et de l'endocol (Li Q et al., 2009 ; Miller and Shattock, 2003). La zone de transformation, particulièrement abondante en cellules immunitaires, représente une zone fortement sensible à l'infection pour le papillomavirus (HPV pour *human papilloma virus*) (Yang et al., 2015) et est également décrite comme étant une zone très vulnérable à l'infection par le VIH-1. L'environnement des muqueuses de l'endomètre, régulé par des hormones, est soumis à de nombreux changements histologiques et immunologiques pendant les différentes phases du cycle menstruel (Wira, Rodriguez-Garcia, and Patel, 2015). Ces changements pourraient impacter sur la réplication du VIH-1 dans ces tissus. La partie supérieure du tractus (trompes de Fallope, endomètre) pourraient donc représenter des sites vulnérables à l'infection par le VIH-1. Ces sites pourraient ensuite participer à l'établissement des réservoirs viraux et, de ce fait, induire une persistance du virus au niveau des muqueuses du FGT.

3. Les facteurs associés à la muqueuse génitale

3.1. Le microenvironnement du tractus

La flore vaginale ou flore Döderlein est constituée principalement d'une grande diversité de bactéries de type lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus vaginalis*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*...) mais également d'autres bactéries issues de la flore digestive et oropharyngée (*Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*...) ainsi que des levures (*Candida albicans*).

Les analyses phylogénétiques de sécrétions cervico-vaginales (10^8 à 10^9 bactéries/ml), provenant de femmes séronégatives, ont mis en évidence l'existence de cinq communautés bactériennes différentes au sein d'un même microbiote. Ces communautés, dénommées CST pour « *community state types* » (classées de I à V), sont formées de plusieurs espèces de bactéries différentes. La plupart de ces CST (CST I-III, V) est dominée par la présence d'une ou plusieurs espèces de *Lactobacillus*. Le CST IV, quant à lui, représente un groupe très hétérogène avec une proportion importante de bactéries anaérobies comme *Gardnerella vaginalis*. La répartition de ces CST peut varier en fonction des ethnies (Ravel et al., 2011) (Figure 8).

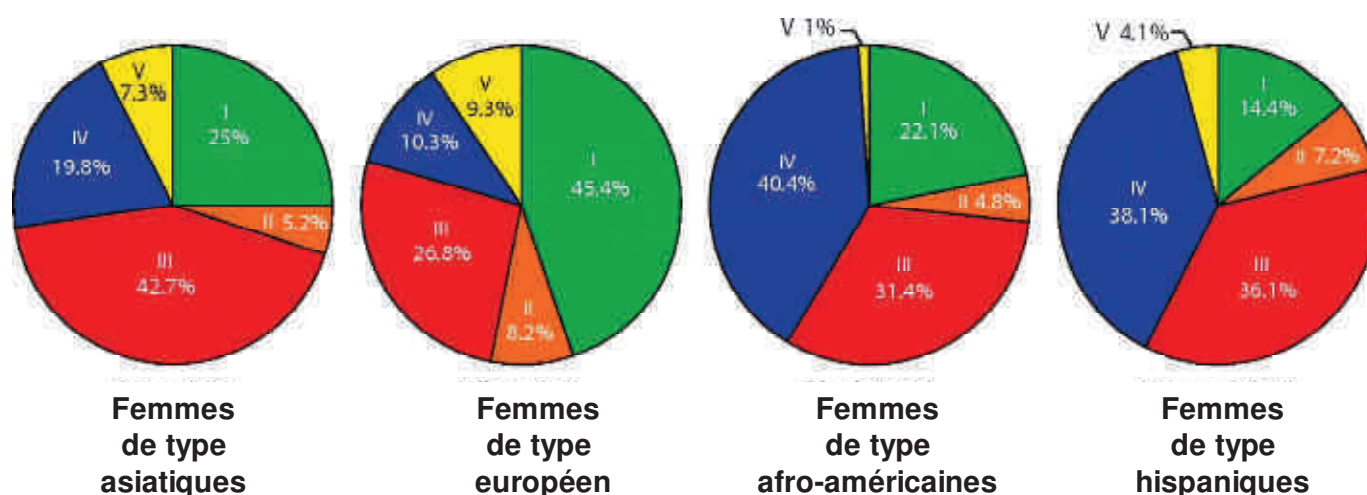


Figure 8 : Répartition des différents groupes bactériens en fonction des ethnies.

Les diagrammes montrent la répartition des 5 communautés bactériennes retrouvée dans chaque ethnie (exprimée en pourcentage). Les 5 CST sont désignées CST I (en vert), CST II (en orange), CST III (en rouge), CST IV (en bleu) et CST V (en jaune) (modifié d'après Ravel et al., 2011).

D'autre part, la caractérisation du microbiote, provenant de femmes africaines séronégatives (cohorte FRESH pour *Females Rising through Education, Support, and Health*), a mis en évidence l'existence de 4 groupes bactériens distincts dénommés « *cervico-types* » (CT) : CT1 (faible diversité bactérienne et prédominance de *Lactobacillus crispatus*), CT2 (faible diversité bactérienne et prédominance *Lactobacillus iners*), CT3 (flore variée pauvre en lactobacilles et prédominance de *Gardnerella vaginalis*) et CT4 (flore variée pauvre en lactobacilles et prédominance d'autres espèces bactérienne) (Anahtar et al., 2016 ; Anahtar et al., 2015). L'ensemble de ces études démontre une grande diversité et variabilité du microbiote vaginal entre les différentes ethnies mais également au sein d'une même ethnie (Anahtar et al., 2016 ; Anahtar et al., 2015 ; Chaban et al., 2014 ; Ravel et al., 2011). De plus, l'hygiène de vie, l'influence hormonale ou encore la ménopause peuvent également impacter sur la variation de la composition de la flore vaginal (Jespers et al., 2017; Petrova et al., 2017 Benning et al., 2014). Le microenvironnement vaginal représente donc un ensemble très dynamique et très complexe, pouvant influencer les risques de transmission par le VIH-1.

De manière générale, une flore vaginale saine est majoritairement composée d'une prédominance d'espèce de *Lactobacillus* (Ravel et al., 2011; Chaban et al., 2014). Les lactobacilles représentent les premières lignes de défenses contre les divers pathogènes. En effet, ces bactéries sécrètent des acides lactiques, issus de la métabolisation de sucres, responsables de l'acidification vaginale (pH : 3.8 et 4.4) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Danielsson, Teigen, and Moi, 2011).

La forte présence de lactobacilles dans la microflore vaginale permet une résistance à l'infection par le VIH-1. En effet, la production de H_2O_2 possède un effet virucide et le pH acide inhibe l'activation des LT CD4, diminuant ainsi le nombre de ces cellules cibles dans les muqueuses (Fontaine and Taylor-Robinson, 1990; Hill and Anderson, 1992; Klebanoff and Coombs, 1991; Nahui Palomino et al., 2017; Sha et al., 2005). La présence de lactobacilles représente donc un facteur protecteur vis-à-vis de l'infection par le VIH-1. Les femmes, présentant une flore appauvrie en lactobacilles, seraient donc plus vulnérables aux risques d'infection par le VIH-1, comme par exemple les femmes africaines et hispaniques. Par ailleurs, un déséquilibre de la flore vaginale peut également être associé à une augmentation du risque d'infection par le VIH-1. C'est le cas par exemple de la vaginose bactérienne (BV). BV, souvent

asymptomatique, représente la pathologie la plus fréquente chez la femme. Cette pathologie entraîne une diminution des lactobacilles et la croissance d'autres bactéries telles que *Gardnerella vaginalis*. Ce bouleversement bactérien provoque une élévation du pH vaginal devenant alcalin et une augmentation des signaux pro-inflammatoires (TNF, IL-1 β) impliquant une activation du système immunitaire notamment des LT CD4. Ainsi, BV augmente les facteurs de risques pour une infection au VIH-1 (Schellenberg and Plummer, 2012; Sewankambo et al., 1997; Sharma et al., 2014).

Dans l'étude CAPRISA 004, l'application d'un gel vaginal contenant 1% de ténofovir (molécule antirétrovirale) dans le cadre de la prévention a démontré une efficacité protectrice d'environ 39% chez les femmes (Abdool Karim et al., 2010). L'étude de leurs microbiotes vaginaux a montré que la prédominance de lactobacilles induit une augmentation de l'efficacité de cette molécule. Au contraire, une abondance de bactéries *Gardnerella vaginalis* entraîne une métabolisation rapide du ténofovir, diminuant son efficacité (Klatt et al., 2017).

L'influence du microbiote vaginal sur l'infection par le VIH-1 et l'efficacité des traitements antirétroviraux représente donc des facteurs primordiaux à prendre en compte dans le développement de nouvelles stratégies vaccinales.

3.2. Le mucus

Le mucus ou glaire cervicale est produit par les cellules glandulaires provenant de l'endocol. Cette glaire induit la lubrification du col de l'utérus, le maintien de l'hydratation de l'épithélium, mais constitue également une barrière contre l'invasion de divers pathogènes. La composition du mucus varie en fonction du cycle menstruel. Le mucus est composé de 95 % d'eau, de 3% de mucines, constituants majeurs dans la glaire cervicale, ainsi que d'autres macromolécules telles que des lipides, des enzymes, des anticorps, des cellules mortes et des bactéries. Les mucines, de nature hydrophobe, sont impliquées dans la viscosité et les propriétés élastiques du mucus. Elles sont capables de s'agréger pour former un gel plus ou moins dense. Différents types de mucines sont présents dans le mucus : les mucines sécrétées comme les mucines 5B et 5AC (MUC5B, MUC5AC) et les mucines transmembranaires telles que les mucines 16 (MUC16) (Mall et al., 2017).

La sécrétion de ce mucus pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance au VIH-1. En effet, les particules virales libres sont rapidement piégées au

sein de cette glaire. Les mouvements du virus dans ce gel sont 200 fois plus lents que ceux piégés dans une solution aqueuse (Boukari et al., 2016; Boukari et al., 2009). Cependant, une infection des tissus de l'endocol par du virus libre ou des leucocytes infectés après 4 à 6 jours, montre une migration des différents éléments infectés à travers le mucus au contact des cellules épithéliales. Par ailleurs, la présence de ce mucus pourrait également permettre l'accumulation d'éléments anti-VIH-1. En effet, une récente étude a montré que les immunoglobulines de type G (IgG) anti-VIH-1 étaient capables d'interagir avec les MUC16. Cette interaction permettrait le maintien d'une concentration élevée d'anticorps anti-VIH-1 au sein de cette glaire. La formation des complexes immuns (antigène-anticorps) dans le mucus et leurs rôles suite à cette interaction n'ont pas été démontrés (Gunn et al., 2016). Ils pourraient soit 1) favoriser la protection en limitant le passage du virus à travers la barrière épithéliale dans les muqueuses, soit 2) favoriser l'infection des cellules résidentes des muqueuses par transfert du virus à travers cette barrière.

La compréhension des propriétés mécaniques et des différentes interactions possibles entre le VIH-1 et les différentes protéines du mucus reste encore incomplète.

3.3. Les hormones

Les modifications hormonales du FGT permettent d'induire à la fois une tolérance pour le sperme et le développement du fœtus mais également l'activation de la réponse immune contre les divers pathogènes. Cet équilibre est hautement régulé par deux hormones principales : les œstrogènes et la progestérone.

Le cycle menstruel, d'une durée moyenne de 28 jours, est divisé en 4 phases : une phase menstruelle (ou règles) corrélée à la chute de progestérone, une phase proliférative (ou folliculaire) à dominance oestrogénique, une phase d'ovulation et une phase sécrétoire (ou lutéale) régulée à la fois par les œstrogènes et la progestérone (Figure 9).

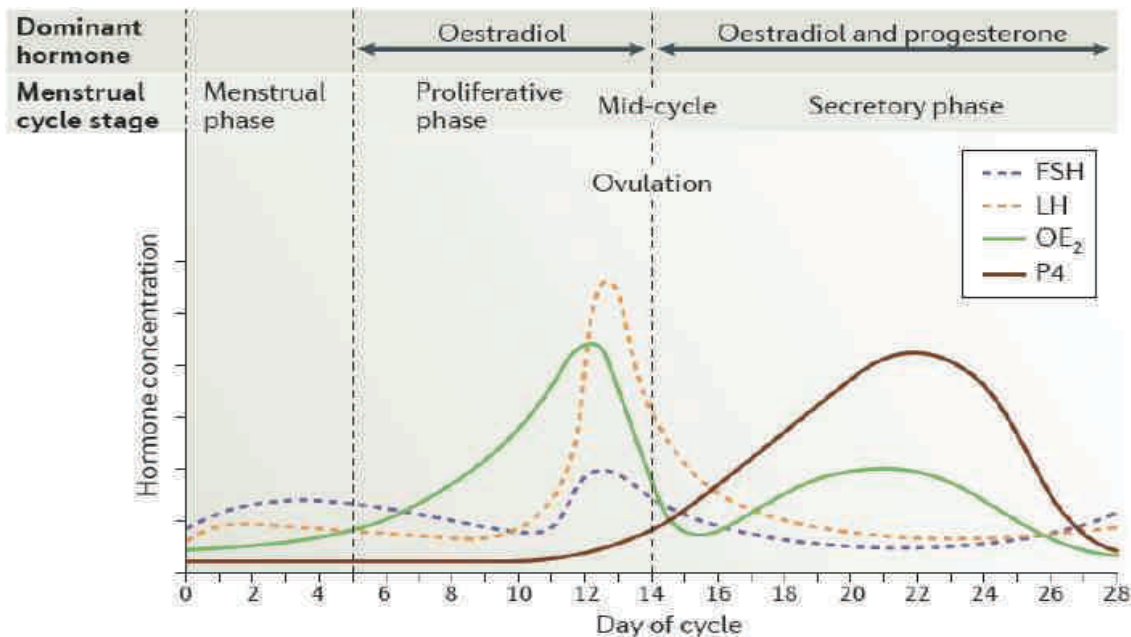


Figure 9 : Cycle menstruel.

Les différentes courbes représentent la concentration d'œstrogène (OE₂) et de progestérone (P4) en fonction du cycle menstruel. LH est l'hormone lutéinisante et FSH est une hormone follico-stimulante (modifié d'après (Wira, Rodriguez-Garcia, and Patel, 2015))

Au cours du cycle menstruel, ces deux hormones induisent des changements physico-chimiques et histologiques dans l'ensemble du FGT.

La phase proliférative correspond, comme son nom l'indique, à la prolifération de l'endomètre. L'œstrogène augmente la prolifération des cellules épithéliales, la production de protéines antimicrobiennes telles que SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) et la β -défensine (HBD2) mais également d'un ensemble de cytokines et de chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules immunes. Au cours de cette phase, les lymphocytes vont se regrouper afin de former un foyer constitué de lymphocytes B (LB) au cœur, de LT CD4 et de LT CD8. Cette agrégation permet le maintien des LT CD4 mémoires au sein de la muqueuse. Dans la partie inférieure du tractus, le mucus peu visqueux abondant en eau dans le vagin facilite l'entrée du sperme dans la cavité utérine.

La phase sécrétoire permet de fertiliser l'ovule. Au cours de cette phase, l'épithélium endométrial devient mature. Le foyer lymphocytaire atteint sa taille maximum et persiste. L'influence progestéronique induit une diminution des activités cytotoxiques des LT CD8 et des cellules NK, recrutés abondamment dans l'endomètre. Les activités cytotoxiques de ces cellules sont maintenues dans la

partie inférieure du tractus. Le mucus sécrété est beaucoup plus visqueux (Coombs, Reichelderfer, and Landay, 2003; Fahey et al., 2011; Wira, Rodriguez-Garcia, and Patel, 2015).

L'ensemble de ces changements cellulaires et environnementaux suggère des différences de vulnérabilité à l'infection par le VIH-1 au cours du cycle.

Les études de l'influence hormonale sur l'infection par le VIH-1 restent très controversées. Plusieurs études ont montré une résistance à l'infection par le VIH-1 pendant la phase proliférative et une vulnérabilité plus importante pour le VIH-1 pendant la phase sécrétoire. La sécrétion des œstrogènes, en phase proliférative, induit une diminution de la susceptibilité des LT CD4 et des macrophages pour le VIH-1 (Rodriguez-Garcia et al., 2013). Tandis que la sécrétion de progestérone en phase sécrétoire, favorise l'infection productive des LT CD4 maintenue lors des menstruations (Kersh et al., 2014; Saba et al., 2013). De plus, l'administration exogène de progestérone, par le biais des contraceptifs, augmente le risque d'infection au VIH-1 (Ferreira, Kafka, and Kaushic, 2014). D'autres, au contraire, n'ont pas détecté de différence d'infection entre les deux phases (Thurman et al., 2016; Villanueva et al., 2002). Il est à noter que l'administration de ces hormones sur des cellules provenant du sang périphérique (PBMC) induit des effets inverses : les œstrogènes augmentent la réplication virale et la progestérone diminue la réplication (Asin et al., 2008). L'ensemble de ces résultats démontre la complexité des mécanismes d'infection et de réplication du VIH-1 dans le FGT.

4. Inflammation et activation de la réponse immune dans les muqueuses

Les muqueuses du FGT sont en contact avec un environnement riche en microorganismes. De ce fait, différents mécanismes de défenses sont mis en place créant un environnement hostile pour les pathogènes potentiels, et permettent de limiter l'incidence d'infection dans le tractus.

Une ligne de défense physique, formée par les cellules épithéliales, reliées par des jonctions serrées, constitue une barrière séparant le milieu extérieur de la couche sous-muqueuse. Ces cellules épithéliales expriment également des récepteurs particuliers : les PRR (Pattern recognition receptors) situés sur/dans les cellules. Ces PRR reconnaissent de manière non spécifique des motifs moléculaires

conservés associés aux pathogènes : les PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Cette reconnaissance entraîne l'activation des PRR tels que les TLR (Toll like receptors) induisant ainsi une cascade inflammatoire locale. L'activation des TLR induit la sécrétion de cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales. La sécrétion des ligands naturels SDF-1 ou RANTES des corécepteurs du CCR5 et du CXCR4 possède un rôle protecteur contre l'infection par le VIH-1 (Agace et al., 2000). Par ailleurs, la sécrétion de cytokines et chimiokines telles que MIP-3 α (*macrophage inflammatory protein-3 α* ou CCL20), l'interleukine-8 (IL-8) ou le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) va recruter et activer les cellules immunitaires (monocytes, LT, neutrophiles, DC) à la surface des muqueuses, notamment les cibles du VIH-1. Le recrutement des cellules cibles facilite leurs infections par le VIH-1 dans les muqueuses (Burgener, McGowan, and Klatt, 2015; Introini et al., 2017). La sécrétion de CCL20 par les cellules épithéliales induit le recrutement des cellules dendritiques (DC) telles que les cellules de Langerhans (LC), favorisant de ce fait, la capture du VIH-1 et l'entrée du virus dans la couche sous-muqueuse (Berlier et al., 2006). De plus, les DC recrutées peuvent sécréter des cytokines, notamment MIP-1 α et MIP-1 β , impliquées dans le chimiotactisme de cellules CCR5 positives (Haase, 2011; Li et al., 2009). Ainsi, la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales augmente par 3 le facteur de risque à l'infection par le VIH-1 (Masson et al., 2015). Par ailleurs, le CCL20 a également été décrit comme une chimiokine possédant des activités anti-VIH-1 (Ghosh et al., 2009). Le CCL20 aurait donc un double rôle au cours d'une infection par le VIH-1.

La présence d'agents responsables de MST comme *herpes simplex virus* de type 2 (HSV-2), *Chlamydia trachomatis* ou *Neisseria gonorrhoeae* est également impliquée dans l'induction d'un environnement inflammatoire et associée à une augmentation des facteurs de risques à l'infection et la transmission du VIH-1 (Freeman et al., 2006; Galvin and Cohen, 2004).

Les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales et l'induction d'une inflammation locale au niveau des muqueuses en absence ou en présence de MST représentent des facteurs influençant l'infection locale par le VIH-1 dans le FGT.

5. Dissémination du VIH-1 dans le tractus génital féminin

5.1. Le fluide séminal : véhicule du VIH-1

Le fluide séminal ou sperme est un acteur majeur lors de la transmission hétérosexuelle du VIH-1.

Le sperme est un fluide complexe et dynamique, impliqué dans le transport et la préservation des spermatozoïdes dans le FGT. Les composants du fluide séminal proviennent essentiellement de la prostate et des vésicules séminales.

Les composants cellulaires prédominants du fluide séminal sont les spermatozoïdes. Ce fluide est également constitué de cellules germinales et de leucocytes (10^5 cellules leucocytaires/ml). Les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les LT CD4 activés composent la population leucocytaire séminale.

Dans le FGT, le sperme agit comme un médiateur de l'inflammation. Cette fonction permet de préparer l'utérus à la future grossesse. Le fluide séminal contient de nombreuses chimiokines pro-inflammatoires telles des IL-1, 6, 7 et 8, MIP-1 α et β et RANTES. La sécrétion de ces différentes molécules induit le recrutement, la prolifération et la maturation des cellules immunitaires (DC, macrophages, LT CD4, cellules NK) dans les muqueuses du FGT en contact avec le sperme (Sharkey et al., 2012). Ce recrutement est impliqué dans l'élimination de divers débris pathogènes et résidus de sperme. La présence du facteur de croissance TGF- β (*Transforming growth factor-beta*) dans le liquide séminal induit une tolérance semi-allogénique pour la fécondation et l'implantation de l'embryon. Le TGF- β supprime la réponse des cellules NK et oriente la réponse immunitaire adaptative vers une réponse de type Th17 et T régulateurs (LT CD4 Th17, LT reg) (Robertson et al., 2005). Cependant, le sperme peut également avoir des impacts négatifs sur le FGT en induisant des risques de cancer ou en augmentant les risques d'infection par le VIH-1 (Adefuye et al., 2016; Coombs, Reichelderfer, and Landay, 2003; Keogan et al., 2015).

Le fluide séminal provenant d'un homme séropositif transporte, en plus de ses différents composants, des particules virales libres (10^7 copies d'ARN/ml) et/ou associées à des cellules, ainsi que des cellules infectées (21 à 65% de cellules contenant de l'ADN proviral intégré) (Dulioust et al., 1998; Houzet, Matusali, and Dejuq-Rainsford, 2014; Politch, Marathe, and Anderson, 2014). Les virus contenus

dans le sperme présentent les différents tropismes : R5, X4 et R5/X4. Lors d'une éjaculation, le liquide séminal est capable de disséminer les différents éléments infectieux dans le FGT. Le rôle du sperme dans la transmission du VIH-1 peut être considéré comme un agent à la fois facilitateur et inhibiteur (Doncel, Joseph, and Thurman, 2011). En effet, celui-ci est capable de diluer le mucus, d'augmenter le pH vaginal, favorisant la survie et l'activation du VIH-1. L'augmentation des facteurs pro-inflammatoires dans le fluide séminal infecté entraîne le recrutement des cellules cibles du VIH-1 et favorise la réplication virale dans les muqueuses (Introini et al., 2017). La présence du fluide séminal induit notamment une augmentation du CCL20 sécrété par les cellules épithéliales vaginales, favorisant l'infection des DC dans les muqueuses (Lourenço et al., 2014; Berlier et al., 2006). Les DC pourraient donc jouer un rôle important dans l'établissement de l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses du FGT. Par ailleurs, de récentes études ont montré que certains éléments contenus dans le sperme sont capables d'augmenter la réplication virale. Ces éléments sont des peptides dérivés de la phosphatase acide prostatique soluble (PAP) et de la séménogéline. La PAP est une protéine sécrétée par la prostate, abondante dans le plasma séminal (1-2mg/ml). Cette protéine peut être détectée pendant 24h après un rapport sexuel dans le vagin. La protéolyse de la PAP libère des dérivés peptidiques, qui s'organisent en fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles dénommées SEVI (*semen-derived enhancer of virus infection*), augmentent la pénétration du virus à travers la barrière épithéliale pluristratifiée dans l'exocol et l'infection des cellules cibles par le virus (Allen et al., 2015; Munch et al., 2007; Roan et al., 2009). Cependant, le mucus, sécrété dans l'endocol, altère les fibrilles induisant des changements de leurs propriétés et la perte de l'association avec les particules virales. Ce déséquilibre est provoqué par la nature hydrophobe du mucus altérant les SEVI (Allen et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les mécanismes d'entrée et la persistance du VIH-1 diffèrent selon les tissus du FGT. Une deuxième substance amyloïde facilite également l'infection par le VIH-1 : les dérivés de séménogéline (SEM). Ces protéines, sécrétées par les vésicules séminales, forment un gel avec la fibronectine emprisonnant les spermatozoïdes lors de l'éjaculation. Le VIH-1, via la gp120, est capable de se lier à la fibronectine. Cette interaction favoriserait la survie des particules virales au cours de l'éjaculation.

Cependant, le fluide séminal contient également des facteurs inhibiteurs, bloquant la transmission du VIH-1. Les polypeptides cationiques dérivés des lactoferrines, des défensines et de la séménogéline 1 (SG1) possèdent une activité antivirale inhibant l'infection au VIH-1 (Martellini et al., 2009). *In vitro*, le sperme est capable de bloquer l'interaction du VIH-1 au récepteur situé à la surface des DC (DC-SIGN) par le biais de la mucine 6. Cette inhibition prévient la transmission du VIH-1 aux LT CD4 (Sabatte et al., 2007; Stax et al., 2009). De plus, ce fluide module l'expression des récepteurs situés à la surface des cellules résidentes des muqueuses : diminution d'expression du CD4 et du corécepteur CXCR4 et augmentation du CCR5 (Balandya et al., 2010). Cette modulation pourrait expliquer la sélection des variants R5 lors d'une transmission par voie sexuelle.

L'ensemble des études démontre que le sperme représente un agent actif à la fois inhibiteur et facilitant au cours de la transmission hétérosexuelle du VIH-1. Cependant, la plupart de ces études ont été réalisées avec des particules virales libres. Les différentes interactions des constituants du liquide séminal sur les cellules infectées, contenus dans ce sperme, restent encore à déterminer.

5.2. Entrée du VIH-1 dans les muqueuses

Les particules virales libres ou associées aux cellules interagissent avec la barrière épithéliale et pénètrent dans les muqueuses des tissus du FGT. Différents mécanismes d'entrée ont été décrits (Figure 10).

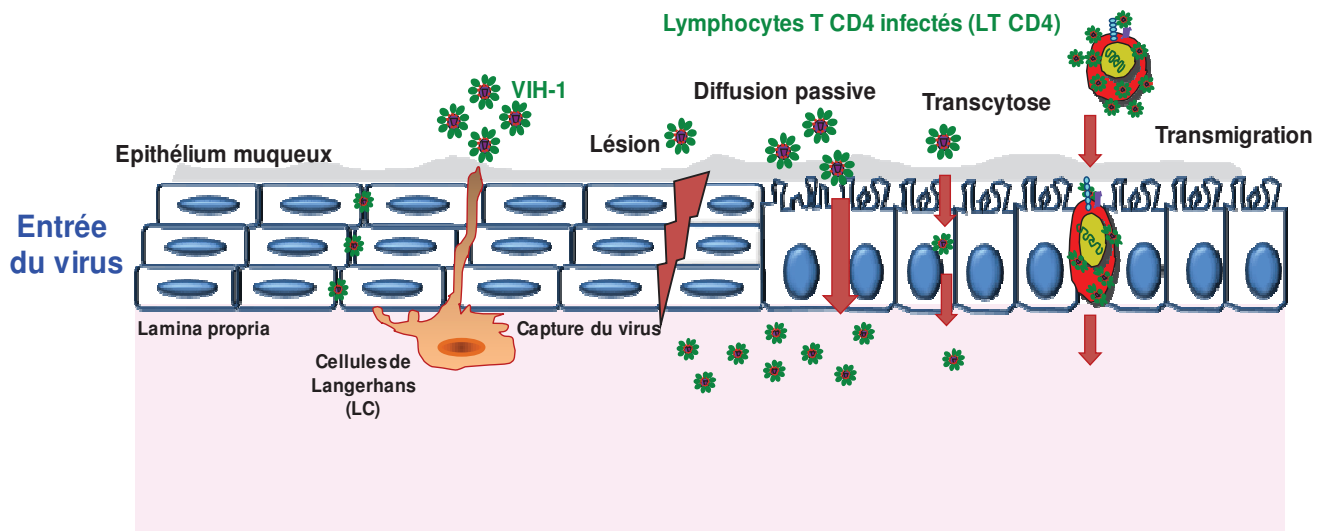


Figure 10 : Les différents mécanismes d'entrée du VIH-1.

Schéma décrivant les différents mécanismes d'entrée du virus libre ou associé aux cellules, contenus dans le fluide sérial, dans la couche sous-muqueuse du tractus génital féminin (modifié d'après Su and Moog, 2014).

5.2.1. Brèche de la barrière épithéliale

L'un des mécanismes de pénétration proposé est dû à un phénomène physique, provoquant des brèches sur l'épithélium ou micro-traumas. Ces micro-traumas ou microlésions résultent le plus souvent d'actes sexuels répétés, de produits d'hygiène (tampons, savons non-hygiéniques) ou à la suite d'une MST. L'infection la plus fréquemment impliquée dans la formation de ces microlésions est provoquée par le virus de l'herpès (HSV-2) qui crée ainsi des brèches à travers la barrière épithéliale (Celum, 2004; Freeman et al., 2006). Ce mécanisme entraîne l'entrée du virus directement dans la couche sous-muqueuse où résident les cellules cibles du VIH-1. Ainsi, une infection à HSV-2 augmente de 3 fois les risques de transmission du VIH-1.

5.2.2. Infection des cellules épithéliales

L'interaction des virus libres ou associées aux cellules avec les cellules épithéliales peut induire l'infection de ces cellules épithéliales génitales. Elles représentent donc des cibles du VIH-1. Cependant, cette hypothèse reste très controversée. Les cellules épithéliales expriment des récepteurs alternatifs pouvant

interagir avec la gp120 du VIH-1 tels le galactoside-céramide (GalCer), les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) ou la gp340 (dérivé de la glycoprotéine agglutinine salivaire (SAG)) (Yeaman et al., 2004 ; Bomsel, 1997 ; Micsenyi et al., 2013 ; Bobardt et al., 2007 ; Stoddard et al., 2009). Après internalisation ou entrée du virus dans les cellules épithéliales, deux hypothèses ont été proposées : l'infection productive des cellules épithéliales (Micsenyi et al., 2013 ; Berlier et al., 2005 ; Pang et al., 2000) ou la séquestration du virus au sein des cellules épithéliales (Wu et al., 2003 ; Dezzutti et al., 2001). L'ensemble de ces deux hypothèses induit la persistance du virus au sein du FGT.

5.2.3. Transcytose

La transcytose du VIH-1 permet également le passage du virus à travers la barrière épithéliale. Ce mécanisme a été mis en évidence *in vitro* à partir d'une lignée cellulaire intestinale et de cellules primaires infectées provenant du sang périphérique isolées de patients séropositifs. La fixation entre les récepteurs GalCer situés sur la surface apicale des cellules épithéliales et la gp120 de l'enveloppe virale exprimée à la surface des cellules infectées, permet le passage du VIH-1 à travers ces cellules épithéliales (Bomsel, 1997; Hocini and Bomsel, 1999; Alfsen et al., 2005). Ce mécanisme est facilité par la formation de synapses virales entre les cellules infectées et les cellules épithéliales (Alfsen et al., 2005). Dans des modèles d'explants de tissus provenant d'endocol, d'exocol et de vagin, la transcytose ne représente pas la voie d'entrée majoritaire du VIH-1. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes d'entrée sont impliqués dans ces tissus (Greenhead et al., 2000).

5.2.4. Transmigration

La transmigration correspond au passage du virus associé aux cellules présentes dans le fluide séminal à travers la barrière épithéliale. Les cellules infectées s'infiltrant entre les cellules épithéliales (Lawrence et al., 2012; Anderson et al., 2010). Ce mécanisme peut être induit par l'interaction de protéines d'adhésion comme LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*) situés sur les macrophages et les LT séminales et les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) de l'épithélium muqueux (Bernard-Stoecklin et al., 2013; Carreno et al., 2002; Peled et al., 2000). Ce mode de transmission a été démontré *in vitro* mais également *in*

vivo sur le modèle de souris et de singe (Sallé et al., 2010 ; Di Fabio et al., 2001). La transmigration représente un mécanisme particulièrement intéressant. En effet, une fois la barrière épithéliale franchie, la transmission du virus dans la couche sous-muqueuse peut se dérouler : soit par la libération de particules virales nouvellement produites par les cellules infectées du donneur, soit via un contact de cellule à cellule entre les cellules infectées du donneur et les cellules cibles du receveur.

5.2.5. Diffusion passive

Un autre mécanisme d'entrée a été observé *ex vivo* : la diffusion passive (Carias et al., 2013). Les virus pénètrent à une profondeur de 2µm de la surface apicale. Il a été proposé que cette diffusion passive s'effectue dans les épithéliums squameux dépourvus de jonctions serrées, présents dans le vagin et l'exocol. Les jonctions serrées constitueraient un frein dans la progression des virus au même titre que la présence de mucus dans l'endocol. Cependant, ce mécanisme favoriserait également la persistance des virus dans la muqueuse (Carias et al., 2013). Il est à noter que la présence de SEVI dans le sperme permet d'augmenter l'efficacité de pénétration du virus à travers cette barrière (Allen et al., 2015).

5.2.6. Capture du VIH par les cellules intra-épithéliales ou sous-muqueuses

D'autre part, le virus libre peut être endocyté par des cellules présentes dans l'épithélium telles que les DC de type Langerhans, les macrophages ou les lymphocytes T CD4. Lors d'une infection précoce, les cellules de Langerhans (LC) intra-épithéliales vaginales ont été proposées comme étant les premières cibles du VIH-1 (Greenhead et al., 2000). En effet, ces cellules sont capables d'émettre des prolongements cytoplasmiques à travers l'épithélium et capturer divers pathogènes présents dans le milieu extérieur (Miller, McChesney, and Moore, 1992). L'interaction du VIH-1 avec les LC favorise son passage dans les muqueuses. Récemment, sur la base d'études d'explants de tissus de côlon, Cavarelli et al. ont montré que les DC présentes dans la couche sous-muqueuse sont capables de migrer à travers l'épithélium après capture du VIH-1 à la surface apicale (Cavarelli et al., 2013). Ce mécanisme de transport, à travers la surface épithéliale, permet ainsi l'entrée du VIH-1 dans la couche sous-muqueuse.

Les différents mécanismes d'entrée du VIH-1 à travers la barrière épithéliale proposés permettent l'infection des cellules cibles du VIH-1 dans la couche sous-muqueuse mais également la persistance du virus dans les tissus du FGT.

5.3. Une sélection virale dans les muqueuses

Les virus présents dans le sperme sont de type R5, X4 et X4R5 (Delwart et al., 1998). Les premiers virus transmis sont dénommés virus fondateurs ou *transmitted founder virus* (T/F). L'analyse des virus transmis par voie sexuelle provenant de patients infectés a montré que l'infection des muqueuses résultait de la sélection de variants capable de pénétrer à travers la barrière épithéliale dans les différents tissus du FGT (Ochsenbauer et al., 2012; Sagar et al., 2009). Les virus transmis sont en majorité de tropisme R5 (98%) (Keele et al., 2008; Liu et al., 1996). En effet, ces virus possèdent à leur surface une gp120 faiblement glycosylée (Derdeyn et al., 2004). De plus, la majorité des cellules résident dans le FGT expriment à leur surface le corécepteur CCR5 (Patterson et al., 1998). La restriction pour les virus de type X4 peut s'expliquer par une abondance de charges cationiques présentes dans la boucle variable V3 de la gp120 (Moore et al., 2004). Ce nombre important de charges positives à la surface de la membrane virale entrainerait la capture rapide du virus dans le mucus ainsi que son inactivation et/ou son élimination (Margolis and Shattock, 2006). D'autre part, la sécrétion du ligand naturel du récepteur CXCR4 (SDF-1) par les cellules endocervicales entraîne une diminution des récepteurs CXCR4 à la surface des cellules cibles après son interaction avec son ligand SDF-1 (Agace et al., 2000). La transmigration des cellules infectées à travers la barrière épithéliale, dans un modèle *in vitro*, démontre également une sélection préférentiellement pour les variants de type R5. Les virus de type X4, quant à eux, seraient séquestrés dans les cellules épithéliales (Lawrence et al., 2012). La séquestration des variants X4 suggère donc que ces variants pourraient être impliqués dans des étapes plus tardives de l'infection par le VIH-1, comme la mise en place des réservoirs viraux au niveau des muqueuses.

Ces résultats soulignent l'importance d'utiliser du virus R5 pour analyser les premiers évènements de l'infection par le VIH-1.

5.4. Les cibles du VIH-1 dans les muqueuses : infection par du virus libre

Les premières cibles du VIH-1 dans les muqueuses du FGT ont été initialement décrites sur le modèle de primates non-humain (NHP pour *non human primates*) (Spira et al., 1996). Actuellement, différents modèles d'études d'infection sur des explants humains *ex vivo* ont été proposés : infection directe sur les tissus, préalablement scellés dans de l'agarose (Collins et al., 2000) ou infection par immersion des tissus dans un milieu contenant du virus libre ou des cellules infectées (Greenhead et al., 2000).

Ainsi, selon les modèles, les premières cellules cibles du VIH-1 sont très controversées. Actuellement de nouvelles techniques sont en cours de développement afin d'identifier les premières cellules cibles du VIH-1 dans des tissus polarisés.

5.4.1. Les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 (LT CD4) (ou LT *helper*) sont des cellules responsables de l'activation de l'immunité spécifique (activation des lymphocytes B) dirigée contre divers pathogènes.

Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4

Les LT CD4 représentent la proportion la plus abondante des leucocytes dans les muqueuses : environ 40% des leucocytes dans le tractus supérieur et 50% dans le tractus inférieur (Givan et al., 1997; Rodriguez-Garcia et al., 2014; Rodriguez-Garcia, Patel, and Wira, 2013). Cependant, une grande abondance de LT CD4 est observée dans la zone de transformation, la désignant comme site préférentiel pour l'infection par le VIH-1 (Pudney, Quayle, and Anderson, 2005). Dans les tissus, les LT CD4 sont principalement localisés sous la lame basale à l'intérieur de la couche sous-muqueuse (Hickey et al., 2011).

La majorité des LT CD4 présente un phénotype de type mémoire (CD45RO) regroupé en foyer (Lee et al., 2015; Saba et al., 2010). Ces cellules expriment également le corécepteur CCR5 (Hladik et al., 2007; Miller and Shattock, 2003), permettant leur infection par du virus R5. De plus, les LT CD4 possèdent à leur surface des intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 4\beta 1$ (Cicala et al., 2009; Tjomsland et al., 2013). Ces deux récepteurs sont impliqués respectivement dans la mobilisation des LT CD4 du site d'infection vers les GALT et inversement (Arthos et al., 2008). Récemment, la

présence de LT CD4 produisant de l'IL-17 a été détectée dans les différents tissus du FGT (Rodriguez-Garcia et al., 2014). Ces cellules dénommées LT CD4 Th17 expriment un autre corécepteur du VIH-1 : le CCR6 et sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles et dans l'immunité antibactérienne.

L'ensemble de ces études montrent une grande variabilité de sous-populations de LT CD4 présentes dans les différents tissus.

Infection des lymphocytes TCD4

Les LT CD4 sont les cibles principales du VIH-1. Du fait de leur abondance dans les tissus, les LT CD4 sont très souvent décrits comme étant des cibles privilégiées du VIH-1 dans les muqueuses (Collins et al., 2000; Merbah et al., 2012; Zhang et al., 1999). En effet, de nombreuses études ont montré une infection productive dans les LT CD4 suivie d'une déplétion de ces cellules après plusieurs jours d'infection (Gupta et al., 2002; Haase, 2010; Hladik et al., 2007; Shen, Richter, and Smith, 2011; Veazey, Marx, and Lackner, 2003). Au cours d'une infection, les intégrines $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 4\beta 1$ favorisent la fixation du VIH-1 à la surface membranaire et augmentent la réplication virale des LT CD4 dans les muqueuses (Arthos et al., 2008; Cicala et al., 2009; Tjomsland et al., 2013). Les intégrines pourraient également jouer un rôle dans la dissémination du virus vers les GALT. Au cours d'une infection précoce, les LT Th17 sont infectés puis déplétés dans les muqueuses (Cecchinato and Franchini, 2010; Klatt and Brenchley, 2010; Rodriguez-Garcia et al., 2014). En effet, une forte réponse Th17 induit une protection efficace dans l'infection du VIH-1 et vers l'évolution rapide de la maladie (Brandt et al., 2011; Ciccone et al., 2011; Thibodeau et al., 2017). Les cellules Th17 représenteraient des cibles privilégiées dans l'infection par le VIH-1 dans les tissus (Rodriguez-Garcia et al., 2014; Stieh et al., 2016).

Ainsi, l'infection des LT CD4 CD45RO+ constituerait un foyer de réplication local au sein de ces muqueuses. Différentes populations de LT sont infectées mais les études ne permettent pas de déterminer lesquelles sont les premières cellules cibles du VIH-1 dans les muqueuses.

5.4.2. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires résidentes des tissus, principalement issues de la différenciation des monocytes circulants. Une fois

activées, ces cellules participent à la réponse immunitaire innée, par élimination de débris cellulaires et pathogènes, mais également à l'homéostasie tissulaire. Ce sont aussi des cellules présentatrices d'antigène (CPA) capable d'apprêter et de présenter les peptides antigéniques aux LT (Haldar and Murphy, 2014).

Les différentes sous-populations de macrophages

Dans le tractus, les macrophages sont principalement localisés dans la couche sous-muqueuse proche de la lame basale et représentent 10 à 20% de la population leucocytaire (Givan et al., 1997; Pudney, Quayle, and Anderson, 2005; Rodriguez-Garcia, Patel, and Wira, 2013; Wira et al., 2005).

Ces cellules phagocytaires possèdent des caractéristiques phénotypiques et des fonctions définies en fonction de leur environnement. De plus, en réponse aux différentes cytokines sécrétées dans l'environnement, la différenciation des monocytes induit deux types de macrophages bien distincts : les macrophages M1 désignés comme « classiques » et les macrophages M2 dits « alternatifs ». La polarisation en macrophages M1 est dépendante de la sécrétion d'interféron- γ (IFN- γ) et de facteur de nécrose tumorale (TNF- α). La production de cytokines pro-inflammatoires IL-12 et TNF- α sécrétée par les macrophages M1 induit une résistance aux pathogènes. Les macrophages M1 expriment à leur surface des récepteurs fixant la partie Fc des immunoglobulines de type 1 (RFc γ 1 ou CD64) ainsi que les marqueurs d'activation CD80 et CD86. Au contraire, la polarisation des macrophages en sous-type M2 est induite par la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4. Ce profil anti-inflammatoire participe au remodelage tissulaire. Les M2 sont caractérisés par l'expression du récepteur au mannose (MR ou CD206) et du CD163 (*hemoglobin scavenger molecule*), ainsi que l'expression de la glycoprotéine transmembranaire CD68 (Biswas and Mantovani, 2010; Herbein and Varin, 2010; Martinez and Gordon, 2014). Dans l'endomètre non gestant comme la décidua (Quillay et al., 2015 ; El Costa et al., 2016), le phénotype des macrophages est majoritairement M2-like, c'est-à-dire qu'ils expriment des marqueurs de M2 (CD163 et CD206) mais également certains marqueurs de M1 (CD64, CD80, CD86). La distinction entre ces deux sous-types de macrophages est parfois difficile car *in vivo*, des profils intermédiaires M1/M2 sont souvent détectés (Cassetta, Cassol, and Poli, 2011).

L'ensemble de ces macrophages expriment à leur surface les récepteurs CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4.

Cette variabilité phénotypique dans les tissus démontre une grande diversité de la population macrophagique et définit également la sensibilité et le rôle des macrophages dans l'infection par le VIH-1. La caractérisation des différents sous-types de macrophages dans les tissus reste à déterminer.

Infection des macrophages

Des études ont montré que les macrophages dans les intestins étaient réfractaires au VIH-1, tandis que les macrophages vaginaux et utérins étaient permissifs (Shattock and Griffin, 1994; Shen et al., 2011; Shen et al., 2009). Cette différence de sensibilité à l'infection par le VIH-1 pourrait être due à une différence de production de cytokines dans l'environnement tissulaire. Par exemple, la sécrétion de TGF- β dans les intestins diminue l'expression du CD4 et du CCR5, ce qui limiterait l'infection des macrophages dans ces tissus (Shen et al., 2011). De plus, le rôle des macrophages dans l'infection précoce au VIH-1 reste sujet à débat. Si certaines études montrent une rapide capture du VIH-1 ou des cellules infectées par les macrophages dans les tissus vaginaux-utérins (Miller and Shattock, 2003; Sattentau and Stevenson, 2016; Shen et al., 2009), d'autres, au contraire, proposent la restriction des macrophages à l'infection par le VIH-1 (El Costa et al., 2016; Ochsenbauer et al., 2012; Peters et al., 2015). Cette restriction des macrophages peut dépendre de leur phénotype. Les M1 ne sont pas (ou peu) permissifs à l'infection alors que les M2 le sont.

Suite à l'entrée du VIH-1 dans les macrophages, les particules virales peuvent s'accumuler au sein des macrophages. Ces cellules sont beaucoup plus résistantes aux effets cytopathogènes du VIH-1 et possèdent un temps de demi-vie beaucoup plus long comparé à celui de LT CD4 naïfs (Chun et al., 1997; Embretson et al., 1993; Igarashi et al., 2001; Reynoso et al., 2012). De ce fait, ces cellules sont souvent décrites comme étant des cellules réservoirs responsables de la persistance du VIH-1 et de la progression de la maladie. L'accumulation des particules virales peut se faire dans des corps multi-vésiculaires endosomaux (MCV) enrichis en CD81, CD9, CMH-II, et CD63 (Nydegger et al., 2003 ; Raposo et al., 2002 ; Sherer et al., 2003). La formation de ces compartiments est liée à la voie d'endocytose. Par

ailleurs, les particules virales peuvent s'accumuler dans des compartiments dénommés VCC ou « *Virus-Containing Compartments* » (Welsch et al., 2007 ; Gaudin et al., 2013). L'origine de ces compartiments reste sujet à débat. Les VCC contiennent de nombreux marqueurs présents dans l'endosome mais également dans le trafic vers la membrane plasmique (CD9, CD81, CD44 and CD18) (Pelchen-Matthews et al., 2011 ; 2003). La formation de ces VCC dans les macrophages est induite par l'accumulation de la polyprotéine de p55 Gag nouvellement synthétisée dans des compartiments intracellulaires préexistants exprimant le CD36 (récepteur responsable dans l'internalisation des lipoprotéines oxydées). Dans l'attente d'une transmission du virus des macrophages aux cellules avoisinantes (décrit au paragraphe 6.2), l'accumulation des particules virales au sein de ses différents compartiments suggère un échappement du VIH-1 à la réponse immunitaire et aux molécules antirétrovirales.

Alors que la fonction des macrophages lors de la phase tardive de l'infection par le VIH-1 a clairement été établie, le rôle des macrophages lors des premiers évènements d'infection reste à définir.

5.4.3. Les cellules dendritiques (DC)

Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse produisent continuellement des cellules dendritiques (DC) qui migrent par la suite dans les différentes surfaces muqueuses où elles résident sous forme immature. Les DC possèdent un rôle essentiel dans l'induction et la régulation de la réponse immune et représentent les sentinelles de l'immunité. Ces cellules sont d'importantes CPA spécialisées dans la capture, le transport et la présentation des antigènes aux LT.

Les différentes sous-populations de cellules dendritiques

Basée sur la caractérisation phénotypique des DC chez la souris, ces cellules peuvent être classées en deux catégories selon l'expression de l'intégrine- αX (ou CD11c). Les DC classiques ou conventionnelles (cDC) (CD11c+) sont préférentiellement localisées dans les tissus en contact avec le milieu extérieur. Les DC plasmacytoïdes (pDC) (CD11c-) sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires ou le sang (Iwasaki, 2007).

En fonction de leur localisation, les DC présenteraient des phénotypes, ainsi que des caractéristiques bien distinctes. De plus, ces cellules possèdent des marqueurs de

surfaces communs à ceux retrouvés sur les macrophages. Les DC représentent une population minoritaire au sein des muqueuses (1 à 5%) (Trifonova, Lieberman, and van Baarle, 2014). Le faible pourcentage de DC ainsi que leurs différentes sous-populations compliquent l'étude de ces cellules dans les tissus.

Méthodes alternatives d'études des cellules dendritiques

Pour pallier la difficulté de purification des DC dans les muqueuses et dans le sang, des techniques ont été mises en place afin de générer des DC *in vitro*. Les cDC peuvent être différenciées à partir de monocytes (CD14+) provenant de sang (10% de la population leucocytaire). La différenciation s'effectue dans un milieu de culture contenant des cytokines telles que le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) et de l'interleukine 4 (IL-4) pendant 5 à 7 jours (Romani et al., 1994). Ces cellules différenciées sont dénommées « cellules dendritiques dérivées de monocytes » (MoDC ou MDDC) et expriment le DC-SIGN, le CD11b, CD11c et le CD83. Différents sous-types de DC peuvent également être générés à partir de cellules hématopoïétiques (CD34+) provenant de sang de cordon ombilical. Les cellules CD34+ sont placées en culture pendant 3 semaines dans un milieu contenant différentes cytokines : thrombopoïétine (TPO), le SCF (*Stem Cell Factor*), le Flt3-L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*), l'IL-6 et un antagoniste du AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) le SR1 (*StemRegenin 1*). La présence de cet antagoniste promeut la différenciation des CD34+ en sous-types de DC CD11c+ et CD11c-. L'ensemble des DC générées sont capables de remplir leur fonction de CPA et produisent des interférons (Thordardottir et al., 2014), mais leurs phénotypes et leurs fonctions restent distincts de celles isolées à partir de tissus.

Les cellules dendritiques dans les muqueuses

Parmi les DC conventionnelles, les cellules de Langerhans (LC) (CD11c+ CD1a) sont principalement retrouvées dans les épithéliums pluristratifiés (vagin et l'exocol) et ont des phénotypes proches de celles retrouvées dans la peau (Hussain and Lehner, 1995; Pudney, Quayle, and Anderson, 2005). Les LC sont les DC des muqueuses les mieux caractérisées et les plus étudiées. Ces LC expriment spécifiquement une lectine de type C : la langerine (CD207) et le CD1a (Turville et al., 2002). Ces cellules contiennent des granules de Birbeck correspondant à des compartiments cytoplasmiques (Cunningham et al., 2013).

Les DC conventionnelles résidentes dans la couche sous-muqueuse sont en majorité (CD14+, CD11c+, CD11b+) et expriment d'autres récepteurs alternatifs appartenant à la famille des ICAM comme le DC-SIGN (CD209) ou des récepteurs aux mannoses (MR) (Trifonova, Lieberman, and van Baarle, 2014). De récentes études ont identifié des sous-populations de DC (CD11c+) présentes dans certains tissus du FGT : les DC CD103+ et DC CX3CR1+.

Le CD103 est une intégrine $\alpha E\beta 7$, impliquée dans la différenciation des LT en LT reg et LT Th17. Ces LT sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles et participent à la régénération des épithéliums muqueux (Coombes et al., 2007; Persson et al., 2013; Stary et al., 2015). Récemment, les cDC CD103+ ont été détectées dans l'endomètre et faiblement dans l'endocol et l'exocol (Rodriguez-Garcia et al., 2017).

Le CX3CR1 est un récepteur à la fractalkine (CX3CL1). L'expression de CX3CR1 induit une polymérisation de l'actine et la réorganisation du cytosquelette, induisant la migration des DC (Dichmann et al., 2001). Les DC CX3CR1+ ont été décrites dans l'endocol et l'exocol (Trifonova, Lieberman, and van Baarle, 2014). Des études ont montré que les DC CX3CR1+ peuvent migrer vers la lame basale et émettre des prolongements cytoplasmiques à travers l'épithélium afin de capturer les pathogènes présents à la surface épithéliale (Niess et al., 2005). La présence des DC CD103+ et CX3CR1+ n'a pas été recherchée dans les trompes de Fallope et le vagin.

Les pDC (CD11c- CD123+) peuvent également être détectées dans le tractus génital. Cependant ces cellules représentent une population très minoritaire. Les pDC sont capables de migrer vers le site d'infection ou d'inflammation et sécrètent une grande quantité de cytokines antivirales : l'interféron- α de type 1 (IFN- α) (Banchereau and Steinman, 1998; Colonna, Trinchieri, and Liu, 2004; Merad et al., 2013) (Tableau 1).

Cellules	Antigènes					
Cellules de langerhans	CD11c+		CD1a+	CD207+		
DC conventionnelles	CD14+	CD11c+	CD11b+	CD103-	CX3CR1+	CD209
	CD14+	CD11c+	CD11b+	CD103+		
	CD14-	CD11c+		HLA-DR+		
DC plasmacytoïdes	CD14-	CD11c-		HLA-DR+	CD123+	

Tableau 1 : Les différents phénotypes des cellules dendritiques.

L'ensemble de ces DC expriment à leur surface, les complexes majeurs d'histocompatibilités de classes I et II (CMHI et II) permettant de remplir leur fonction de CPA mais également les récepteurs CD4 et CCR5, nécessaires à l'entrée du VIH-1 dans ces cellules (Cameron et al., 1992; Wu and KewalRamani, 2006).

Le rôle des DC et leur infection productive dans les muqueuses restent cependant très controversés.

Infection des cellules dendritiques

Les LC ont été proposées comme étant les premières cibles du VIH-1, capables de capturer et transmettre le VIH-1 aux LT avoisinants dans les muqueuses (de Witte et al., 2007; Ribeiro et al., 2016). Les conséquences de la capture du VIH-1 par les LC sont très controversées. La langerine est capable d'interagir avec la gp120 du VIH-1 (de Witte et al., 2007; Hladik et al., 2007; Turville et al., 2002). Cette interaction induit une endocytose rapide du VIH-1 qui s'accumule dans les vésicules endosomales. L'endocytose du VIH-1 dans les LC ne conduit pas à l'infection productive de ces cellules. Les particules virales accumulées peuvent être conservées pendant plusieurs jours avant d'être transmises aux cellules cibles avoisinantes dans la couche sous-muqueuse et les ganglions lymphatiques après migration des LC vers ses sites. Ces cellules représentent donc des cellules réservoirs du VIH-1 (Hladik et al., 2007). D'autre part l'internalisation du VIH-1 au niveau des granules de Birbeck induit la dégradation des particules virales au sein de ces granules, donnant un rôle protecteur aux LC (de Witte et al., 2008).

Les DC résidentes dans la couche sous-muqueuse sont également capables de capturer le VIH-1 et faciliter l'infection des LT CD4. L'interaction des récepteurs

alternatifs avec la gp120 virale entraînent l'internalisation et l'accumulation des particules virales dans les DC conventionnelles (Jameson et al., 2002; Klechevsky and Banchereau, 2013). Dans l'endomètre humain, une récente étude a démontré que les DC exprimant le marqueur CD103 ne sont pas capables de capturer le virus de type R5 (Rodriguez-Garcia et al., 2017). Dans les tissus de côlon de singe, la diminution d'expression du CD103 sur les DC est corrélée à la déplétion des LT Th17 (responsable du maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale) (Klatt et al., 2012). Ces résultats suggèrent que les DC CD103+ ont un rôle dans le maintien des LT Th17 et, de ce fait, le maintien de l'intégrité de l'épithélium muqueux. L'interaction des DC CD103 avec les différents sous-types de LT présents dans les muqueuses restent encore à déterminer. Le polymorphisme du gène CX3CR1 (homozygote) représente un marqueur prédictif dans l'évolution rapide vers la maladie (Foussat et al., 2001). Cependant l'implication des DC CX3CR1+, au cours d'une infection au VIH-1, dans le FGT n'a pas encore été définie, tout comme celle des pDC.

Les DC posséderaient un rôle stratégique au cours des premiers événements de l'infection par le VIH-1 dans le col de l'utérus et le vagin (Mayr, Su, and Moog, 2017). Les LC, cDC et pDC sont capables d'être infectées par le VIH-1. Cependant la réplication virale au sein de ces cellules est faible comparée à la réplication virale retrouvée dans les LT CD4 (Cameron et al., 1992 ; Pope et al., 1995 ; Mcllroy et al., 1995). De plus, la permissivité de l'infection des DC par le VIH-1 varie en fonction des différents sous-types de DC (Smed-Sørensen et al., 2005). Cette restriction peut s'expliquer par la présence de nombreux facteurs de restrictions notamment APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing complex), une cytidine déaminase, capable d'introduire un grand nombre de mutations dans l'ADN viral (Pion et al., 2006) et SAMHD1 (*Sterile Alpha Motif and histidine-aspartic domain (HD) containing protein 1*), diminuant le pool de désoxyribonucléotides par son activité phosphorylase (Bloch et al., 2014; Choi et al., 2015; Laguette et al., 2011).

La maturation des DC peut influencer la capacité d'infection de ces cellules. La maturation des DC est associée à une diminution de la réplication virale pouvant s'expliquer par la diminution de l'expression du CCR5 (Sallusto *et al.*, 1998), ou encore une augmentation de l'expression d'APOBEC (Pion et al., 2006). L'activation des DC peut influencer la capture du VIH-1 et l'infection de ces cellules. Les DC matures sont plus aptes à endocyter les particules virales, induisant une transmission

directe aux cellules voisines. D'autre part, les DC immatures peuvent donner lieu à une infection productive par le VIH-1 (Wang et al., 2007). L'implication des DC au cours des premiers événements de l'infection dans les muqueuses est sujet à débat.

Les études entreprises pour déterminer les premiers événements de l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses restent limitées par les modèles expérimentaux utilisés (DC générées *in vitro*, co-culture de cellules provenant du sang). L'infection des premières cibles du VIH-1 dans les tissus du FGT est très controversée.

6. Dissémination du VIH-1 dans l'organisme : transmission de cellule à cellule

Dans le FGT, les cellules immunes forment un réseau dense d'interaction et de communication cellulaire.

La transmission du virus de cellule à cellule peut s'effectuer à deux niveaux : 1) la transmission du virus des cellules infectées contenues dans le fluide séminal aux cellules résidentes des muqueuses, impliquant les événements précoces de l'infection (transmission allogénique) et 2) la transmission du virus des cellules résidentes infectées aux cellules avoisinantes, induisant la dissémination du virus dans l'organisme (transmission autologue).

La transmission du VIH-1 de cellule à cellule a majoritairement été décrite dans des modèles *in vitro*.

Deux modes de transmission ont pu être mis en évidence dans le modèle de transmission cellule-cellule: un transfert en *trans* dit direct impliqué dans les premières 24 heures et un transfert en *cis*, impliquant la production de nouveaux virions et apparaissant plus tardivement (Turville et al., 2004). Le contact étroit entre les cellules requiert la formation de synapses immunologiques ou virologiques dans le cas d'un contact entre une cellule infectée et une cellule non infectée.

6.1. Transmission du virus de lymphocytes T aux lymphocytes T

In vitro, les études décrivant la transmission du VIH-1 de cellule à cellule ont été réalisées sur des lignées de cellules LT modifiées infectées (Jurkat, MT4) en contact avec des LT CD4 primaires ou d'autres lignées non infectées (Dale, Alvarez, and Chen, 2013; Jolly et al., 2004). La transmission du VIH-1 de cellule à cellule est 100

à 1000 fois plus efficace que la transmission effectuée par du virus libre et a été largement décrite (Chen et al., 2007; Mazurov et al., 2010). En effet, le contact étroit entre les cellules permet une transmission efficace du virus suite à la formation de synapses immunologiques. Différents récepteurs tels que LFA-1 et ICAM-1 contribuent à stabiliser la jonction lors du contact cellule-cellule. Au cours d'une transmission du VIH-1 de cellule à cellule, l'accumulation de protéines virales env et gag au point de jonction forment alors une synapse dite virologique. Le recrutement de ces protéines virales est induit par la réorganisation du cytosquelette d'actine, facilitant ainsi la transmission du virus à la cellule voisine non infectée (Jolly et al., 2004).

La transmission du virus de cellules T à T serait principalement impliquée pendant la phase chronique d'infection dans les organes lymphoïdes secondaires. En effet, ces organes sont riches en LT CD4 organisés en foyer, facilitant ainsi la transmission, la réplication massive de nouveaux virions et la dissémination du VIH-1 dans l'organisme (Feldmann and Schwartz, 2010; Sourisseau et al., 2007). De plus, les récentes études ont montré que cette transmission de virus entraînait la déplétion des LT CD4 dans les organes lymphoïdes secondaires via un mécanisme de mort cellulaire dépendant de la caspase-1 : la pyroptose ou *pyroptosis* (Doitsh et al., 2014; Galloway et al., 2015).

6.2. Transmission du virus de macrophages aux lymphocytes T

La transmission du VIH-1 des macrophages aux LT peut également s'effectuer via les synapses virologiques (Groot, Welsch, and Sattentau, 2008). Les macrophages peuvent également phagocyter les LT CD4, provoquant, de ce fait, leurs déplétions (Crowe et al., 1990). Les macrophages sont capables de transmettre le virus en *trans* et en *cis* (Peressin et al., 2014). De récentes études ont mis en évidence l'accumulation de particules virales au sein de compartiments intracellulaires particuliers : les VCC. Ces compartiments particuliers présents dans les macrophages serviraient de niche pour l'assemblage des particules virales et de réservoir dans l'attente d'un contact avec les LT. Certaines études suggèrent une migration de ces VCC vers le point de contact entre les cellules, permettant ensuite la transmission du virus en *trans* via les synapses virologiques aux cellules avoisinantes (Gousset et al., 2008; Koppensteiner et al., 2012; Carr et al., 1999; Sharova et al., 2005). Une étude a montré que l'expression du CD36 dans les VCC

est nécessaire dans la libération des nouveaux virions lors de la transmission du virus des macrophages aux LT (Berre et al., 2013). Ces études laissent suggérer que ces VCC faciliteraient l'infection des cellules avoisinantes et la dissémination du VIH-1 dans les tissus (Tan and Sattentau, 2013).

Des études plus approfondies sur le rôle et la formation de ces VCC *in vitro* et *in vivo* sont donc nécessaires afin de déterminer différentes nouvelles cibles et prévenir la transmission du virus des macrophages aux LT.

6.3. Transmission du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T

Dans le cas d'une infection par le VIH-1 *in vitro*, les DC infectées ont été proposées comme impliquées dans la transmission de virions en *trans* et en *cis* aux LT CD4 participant, de ce fait, à la dissémination du VIH-1 dans l'organisme (Figure 11).

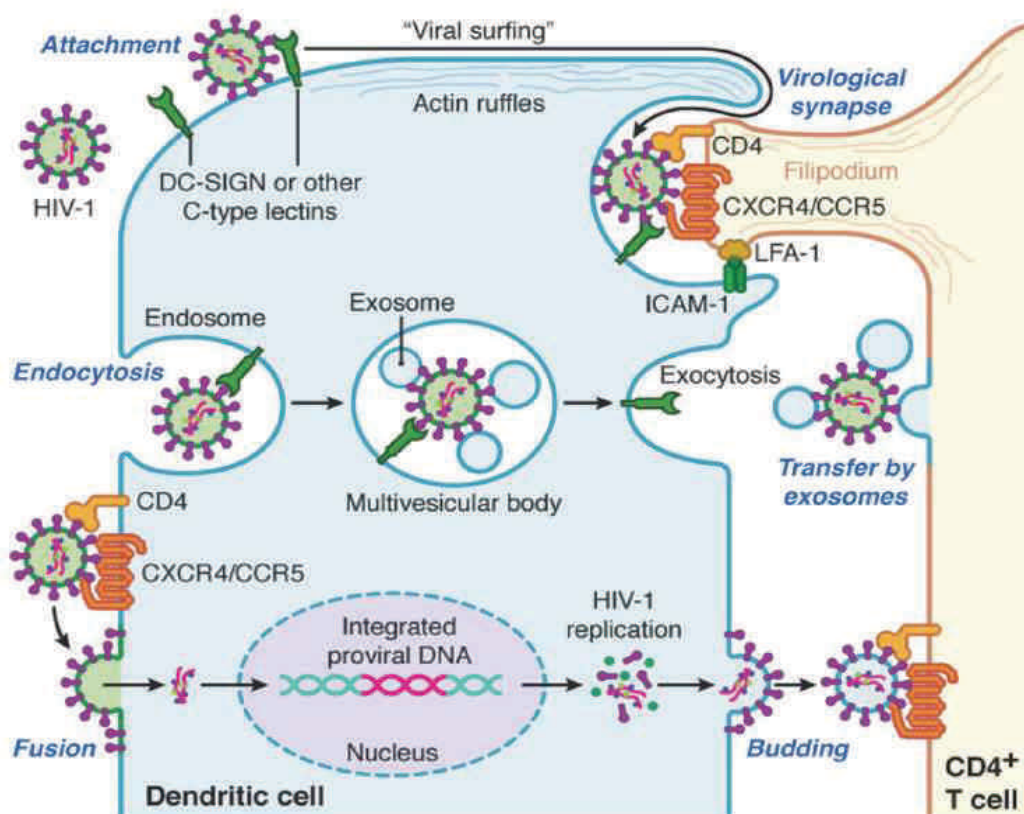


Figure 11 : Mécanismes de transmission du VIH-1 des DC aux LT.

Le VIH-1 est transmis en transfert en *trans* via les exosomes ou la formation de synapse virologique. Le transfert en *cis* s'effectue par une répllication dans les DC et la transmission des nouveaux virions produits aux LT (Coleman, Gelais, and Wu, 2013).

La capture du VIH-1 peut s'effectuer via l'interaction de la protéine virale gp120 aux lectines de type C présentes sur les différentes DC (DC-SIGN, MR ou langerine) suivie de l'internalisation du virus. Différents mécanismes de transfert en *trans* ont été proposés. Les particules virales infectieuses seraient retenues dans un compartiment endosomal puis redirigées vers la membrane plasmique lors du contact avec les LT (Kwon et al., 2002). Cependant, ce modèle fut contesté, démontrant que la plupart des virus internalisés étaient dégradés dans les endosomes (Cavrois et al., 2007). Les particules virales pourraient également être localisées dans des replis vésiculaires suite à l'invagination de la membrane plasmique, échappant à la vigilance immunologique (Yu, Reuter, and McDonald, 2008). Un autre mécanisme impliquant des exosomes a également été proposé. Une rapide internalisation du VIH-1 dans des corps multi-vésiculaires endosomaux (MCV) permettrait une accumulation, puis une libération, dans le milieu extracellulaire, de ces particules virales associées à des vésicules d'endocytose dénommées exosomes (Thery, Zitvogel, and Amigorena, 2002; Wiley and Gummuluru, 2006). Enfin, la transmission du VIH-1 s'effectue essentiellement via la formation de synapse virologique induite par l'interaction étroite entre le TCR et les récepteurs LFA-1 des LT et ICAM-1 des DC et le recrutement des virus au niveau de la jonction cellule-cellule (Larsson, 2005; Wu and KewalRamani, 2006).

L'ensemble des mécanismes proposés font appel à la réorganisation du cytosquelette des DC. En effet, de récentes études ont montré l'intervention de plusieurs facteurs responsables de ce réarrangement tels que les tétraspanines, actomyosine et la dynamine 2 (DNM2). Les tétraspanines (TSPAN7) sont des protéines nécessaires à la formation de dendrites (prolongements cytoplasmiques) entourant les MCV. En absence de ces protéines, les particules virales s'accumulent dans ces vésicules. L'actomyosine génère une force contractile à la membrane plasmique. L'inhibition de cette protéine est impliquée dans la relocalisation des particules virales à la surface membranaire. Ces deux protéines facilitent le transfert du virus des DC aux LT. Tandis que DNM2 limite l'entrée du VIH-1 au sein des DC. Cette protéine est impliquée dans la voie d'endocytose classique associée aux molécules de clathrines. Cette protéine induit une stabilisation de l'actine au sein de la membrane plasmique, bloquant de ce fait, l'internalisation du VIH-1 (Menager and Littman, 2016).

Le transfert en *cis* représente la deuxième phase (24 à 72h) et repose sur la production de nouveaux virions par les DC. La production virale par les DC est considérée comme étant moins efficace comparée à celle détectée dans les LT (Wu and KewalRamani, 2006). Cependant, dans un contexte de co-culture se rapprochant du modèle *in vivo*, de récentes études effectuées dans notre laboratoire ont montré une augmentation de la réplication virale au sein des différents sous-types de DC lorsque celles-ci étaient cultivés en présence de LT CD4 autologues (Holl et al., 2010; Peressin et al., 2014; Su et al., 2014a). De plus *ex vivo*, une autre étude observe cette production virale importante dans les LC vaginales (Ballweber et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les DC seraient des cibles privilégiées du VIH-1 lorsque celles-ci sont avoisinantes des LT CD4.

L'ensemble de ces études démontre le rôle central des DC permettant d'une part l'activation de la réponse immune par la présentation du VIH-1 aux LT CD4 et d'autre part représentant une cellule clé, responsable de la réplication et de la transmission du VIH-1 aux LT CD4 avoisinants. Le mécanisme de transmission du VIH-1 dans un contexte tissulaire lorsque les cellules immunes interagissent entre elles devra être analysé.

6.4. Transmission allogénique : des cellules séminales infectées aux cellules des muqueuses.

Le fluide séminal déversé dans le FGT contient des particules virales libres et associées à des cellules (Macrophages et LT CD4) (Dulioust et al., 1998; Houzet, Matusali, and Dejuq-Rainsford, 2014; Politch, Marathe, and Anderson, 2014). La plupart des études effectuées sur la transmission du VIH-1 dans les muqueuses ont été réalisées en utilisant des particules virales libres. De récentes études commencent à analyser la transmission via du virus associé aux cellules ou des cellules infectées *in vivo* (Barreto-de-Souza et al., 2014). *Ex vivo*, une étude réalisée sur des côlons de singe a également montré l'efficacité de transmission du virus des cellules infectées par rapport à celle via du virus libre (Kolodkin-Gal et al., 2013). Les LT CD4 infectés sont capables de migrer rapidement à travers la barrière épithéliale et de transmettre le virus aux cellules résidentes des muqueuses (Kolodkin-Gal et al., 2013). Des études ont montré que les cellules infectées du fluide séminal sont capables de transmigrer à travers la barrière épithéliale (Lawrence et al., 2012; Anderson et al., 2010). En effet, l'expression de protéines d'adhésion comme LFA-1

(*Lymphocyte function-associated antigen-1*) par les macrophages et les LT séminales peuvent interagir avec les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) de l'épithélium muqueux, déclenchant ainsi la pénétration des cellules infectées à travers la barrière épithéliale (Bernard-Stoecklin et al., 2013; Peled et al., 2000).

L'ensemble de ces études démontre l'importance de la transmission du VIH-1 par les cellules infectées ou associées à du virus, présentes dans le fluide sérial. De nombreuses questions restent en suspens concernant l'infection des premières cellules cibles dans les muqueuses du FGT. La transmission aux cellules résidentes des muqueuses du FGT n'a pas été étudiée.

L'ensemble de ces mécanismes de transmission est potentiellement impliqué dans le contexte tissulaire. Leur relevance physiologique reste à démontrer *in vivo* par l'analyse de la transmission du VIH-1 dans des explants de tissus *ex vivo*.

La compréhension de la multitude des mécanismes et facteurs endogènes et exogènes mise en jeu lors de la transmission du VIH-1 dans les muqueuses du FGT représentent un défi majeur. Un approfondissement des connaissances immunologiques et virologiques sur les premiers événements de l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses sera nécessaire afin de définir de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques ciblant ces premiers événements de l'infection. Les anticorps anti-VIH pourraient jouer un rôle décisif.

Chapitre 3 : Les anticorps anti-VIH et la vaccination

A ce jour, différentes molécules thérapeutiques (antirétroviraux) ont été développées afin de réduire la charge virale et prolonger l'espérance de vie des patients, mais aucun traitement ne permet d'éliminer totalement le VIH chez les personnes séropositives. De plus, l'accès inégal aux traitements et l'émergence de résistances aux antirétroviraux ne permettent pas de maîtriser la propagation de l'épidémie du VIH-1. La nécessité de développement d'un vaccin capable d'induire une réponse immunitaire innée et adaptative forte afin de prévenir les premiers événements de l'infection par le VIH-1 est désormais clairement établie. Les anticorps pourraient jouer un rôle clé dans le développement d'un tel vaccin.

1. Réponse humorale contre le VIH-1

La réponse humorale initiale, dirigée contre le VIH-1, peut être détectée environ une semaine après l'infection. Les anticorps produits sont en premier lieu, dirigés contre la glycoprotéine de fusion gp41, puis contre la glycoprotéine d'enveloppe gp120. Ces anticorps sont incapables de neutraliser les particules virales (Tomaras et al., 2008). La première activité neutralisante autologue apparaît plus tardivement, plusieurs mois post-infection. Ces anticorps « autologues » reconnaissent uniquement les souches transmises lors des premiers événements de l'infection, c'est-à-dire les virus fondateurs (T/F) (Moog et al., 1997a). Par la pression de sélection liée à cette réponse, de nombreux changements mutationnels sur ces glycoprotéines s'opèrent, induisant un échappement viral (Wei et al., 2003). De ce fait, les nouveaux virions produits échappent aux anticorps autologues (Moog et al., 1997a). Quelques années après (2 à 4 ans), des anticorps neutralisants dirigés contre les nouveaux variants se développent. Ces anticorps neutralisent de manière croisée différentes souches virales : neutralisation hétérologue. Cependant, uniquement 10 à 20% des patients séropositifs développent ce type d'anticorps (Gray et al., 2007; Li et al., 2009). De plus, seul environ 1% d'entre eux montrent une activité neutralisante large et efficace contre la majorité des isolats primaires circulants. Ces anticorps sont dénommés anticorps neutralisant à large spectre (bNAbs pour *broadly neutralizing antibodies*) (Simek et al., 2009). Ils sont le résultat d'une longue maturation de la réponse immune (contacts répétés avec l'antigène)

nécessitant de nombreuses mutations somatiques et une longue chaîne lourde HDR3 (Walker et al., 2011) (Figure 12).

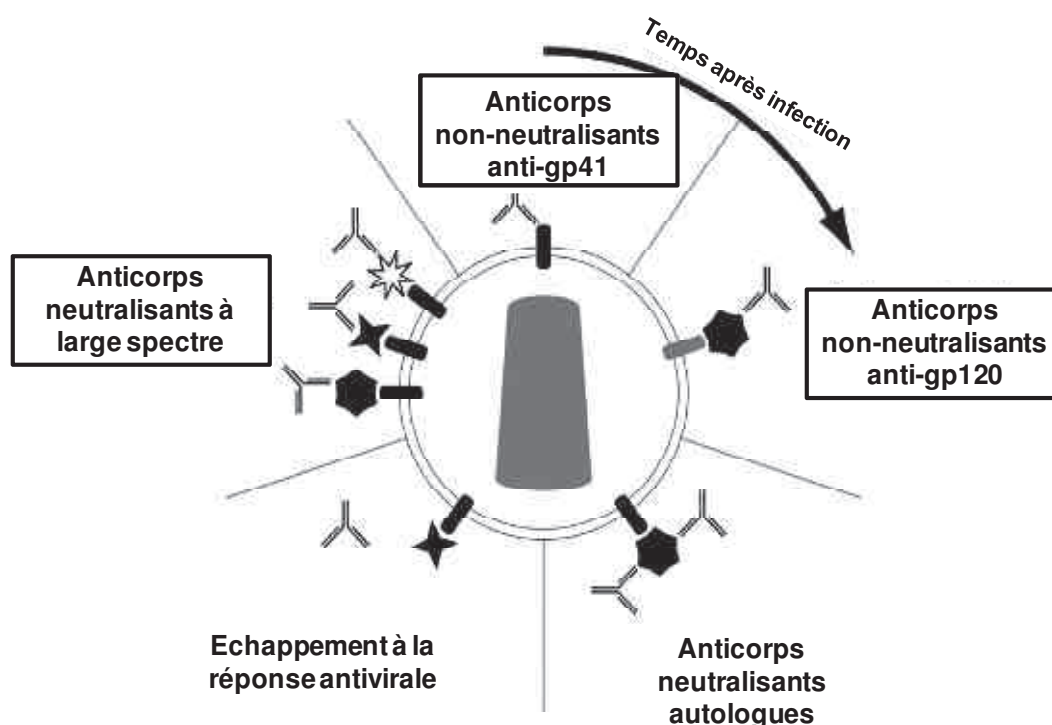


Figure 12 : La réponse humorale contre l'infection au VIH-1 au cours du temps.

La réponse est initiée par des anticorps non neutralisants dirigés contre la gp41 et la gp120, suivie des anticorps neutralisants autologues. Cette réponse induit un échappement viral. Certains patients sont capables de développer des anticorps neutralisants à large spectre plusieurs années après la séroconversion (modifié à partir (Alter and Moody, 2010)).

2. Les anticorps anti-VIH-1 : les épitopes viraux

Les anticorps sont capables de reconnaître différents épitopes ou déterminants antigéniques présents à la surface des agents infectieux. Les épitopes du VIH-1 reconnus par les anticorps sont situés sur les protéines d'enveloppe (Figure 13).

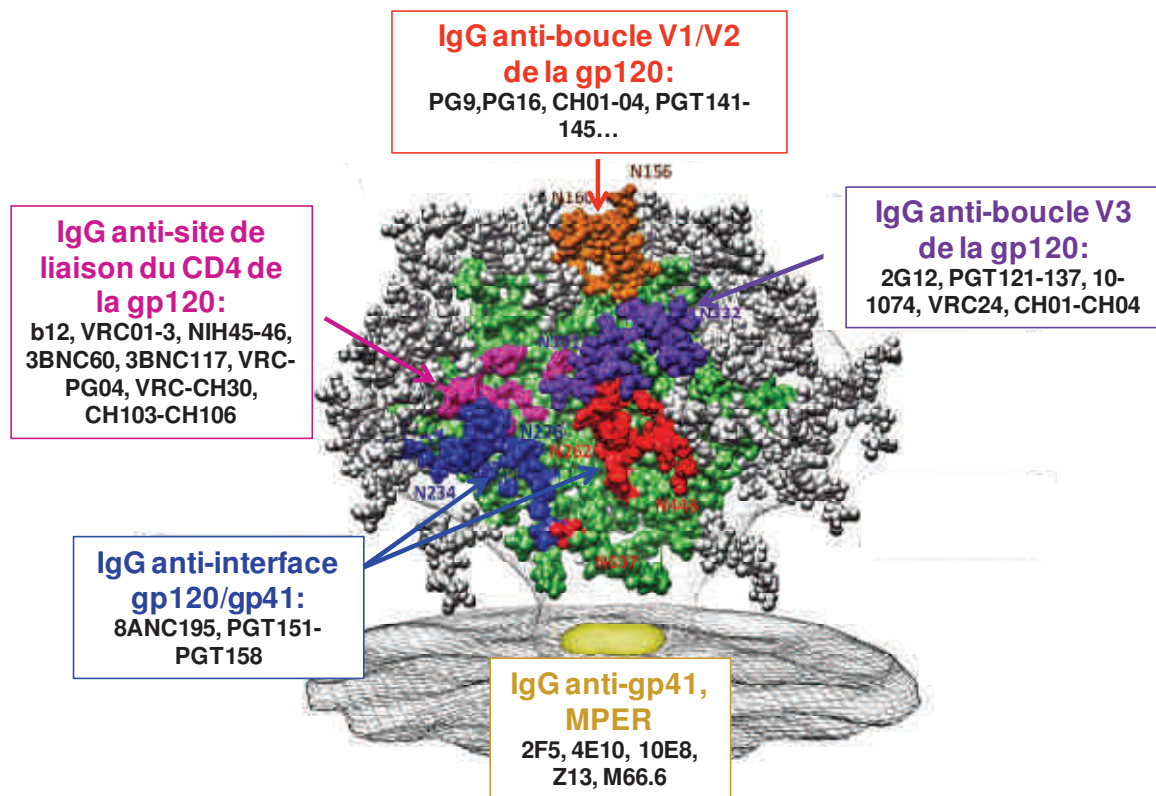


Figure 13 : Les différents épitopes reconnus par les anticorps neutralisants à large spectre.

(modifié à partir de (Mouquet, 2014)).

2.1. La glycoprotéine d'enveloppe : gp120

La glycoprotéine gp120 est un hétérotrimère, fortement glycosylée, organisée en trois sous-unités de gp120. L'analyse séquentielle de différents isolats primaires a permis de caractériser différentes séquences, contenues dans la sous-unité gp120 et pouvant être ciblées par les anticorps : cinq régions conservées (C1 à C5) et cinq régions hautement variables (V1 à V5) (Starcich et al., 1986). Les séquences variables possèdent une structure organisée en boucles exposées et reliées entre elles par des ponts disulfures. Les régions conservées forment des structures discontinues interagissant avec l'ectodomaine de la gp41 et les récepteurs situés sur la cellule hôte (Checkley et al., 2011).

L'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4 de la cellule hôte s'effectue via les séquences conservées C2, C3 et C4 (site d'attachement au CD4). Cette association est structurée en deux domaines : un domaine interne et un domaine externe reliés par un feuillet intermédiaire (4 feuillets antiparallèles). L'ensemble de ces domaines interagissent avec le CD4. La liaison entre les régions conservées et le CD4, induit un changement conformationnel de la gp120, provoquant le

déplacement des boucles V1/V2 et l'exposition de la boucle V3 (glycane) (Kwong et al., 1998). Ce glycane est le principal déterminant impliqué dans la spécificité du corécepteur CCR5 ou CXCR4 (Speck et al., 1997). En effet, la glycosylation d'un site particulier situé sur la boucle V3 définit le tropisme du virus (100% pour R5 et 36% pour X4) (Zhang et al., 2004). Le site d'attachement du CD4, les boucles V1/V2 et la boucle V3 contiennent des séquences conservées reconnues par les anticorps neutralisants. Cependant, certains de ces épitopes (ou déterminants antigéniques) sont peu accessibles. Les anticorps ont donc développé de nombreuses stratégies afin de les cibler.

Pour le site d'attachement du CD4, la reconnaissance des épitopes peut s'effectuer par le biais de la chaîne lourde (CDR H) présente sur l'anticorps, c'est le cas du premier anticorps identifié b12 (Barbas et al., 1992 ; Burton et al., 1994). D'autres anticorps sont capables de mimer le CD4 par l'intermédiaire de leurs chaînes lourdes (VRC01-03, 3BNC117, NIH45-46, 8ANC131...). Cette particularité provient d'importantes mutations somatiques effectuées sur deux gènes codant pour la chaîne lourde (V_H1-2 et V_H1-46).

Les anticorps anti-boucle V1/V2 possèdent une longue chaîne lourde (CDR H3) leur permettant d'atteindre des épitopes à travers le bouclier glycanique (PG9/PG16, CH01-CH04...).

Les anticorps anti-V3 requièrent une hypermutation somatique plus poussée leur conférant de forte affinité de liaison (10-1074, PGT121, PGT123...) (Kwong, Mascola, and Nabel, 2013).

2.2. La glycoprotéine de fusion : gp41

Le réarrangement de la gp120 permet le maintien de l'enveloppe proche de la membrane et facilite la fusion médiée par la gp41.

La gp41 est une glycoprotéine, tout comme la gp120, fortement glycosylée constituée d'un domaine cytoplasmique, d'une partie transmembranaire et d'un ectodomaine (ou domaine extracellulaire). L'ectodomaine contient plusieurs domaines impliqués dans le rôle de fusion dont une région N-terminale hydrophobe également appelée peptide de fusion et un domaine riche en tryptophane dénommé MPER (*Membrane external proximal region*) (Montero et al., 2008). Les différents domaines de la gp41 s'organisent en un complexe de 6 hélices- α stabilisées par des

ponts disulfures intramoléculaires. Cette conformation en super hélice, représente la conformation active de la gp41 et permet la fusion à la membrane plasmique de la cellule hôte (Montero et al., 2008).

Les anticorps anti-MPER reconnaissent des résidus hydrophobes, certains peptides et des séquences situées avant le domaine transmembranaire (4E10, 2F5, 10E8...) (Kwong, Mascola, and Nabel, 2013). La région MPER représente donc un site intéressant à cibler afin d'inhiber cette étape de fusion.

Enfin, certains anticorps de la seconde génération reconnaissent des nouveaux épitopes viraux tels que l'interface entre la gp120 et la gp41 (8ANC195, PGT 151-158). Cette nouvelle génération d'anticorps est deux à trois fois plus efficace que la précédente (Burton and Hangartner, 2016; Kong et al., 2016).

3. Les anticorps anti-VIH-1 : de multiples activités antivirales

La neutralisation est l'activité inhibitrice la plus étudiée. Cependant, différents modes d'action complémentaire des anticorps ont été observés. Ainsi, les anticorps possèdent de multiples fonctions participant à la protection des muqueuses contre les infections (Figure 14).

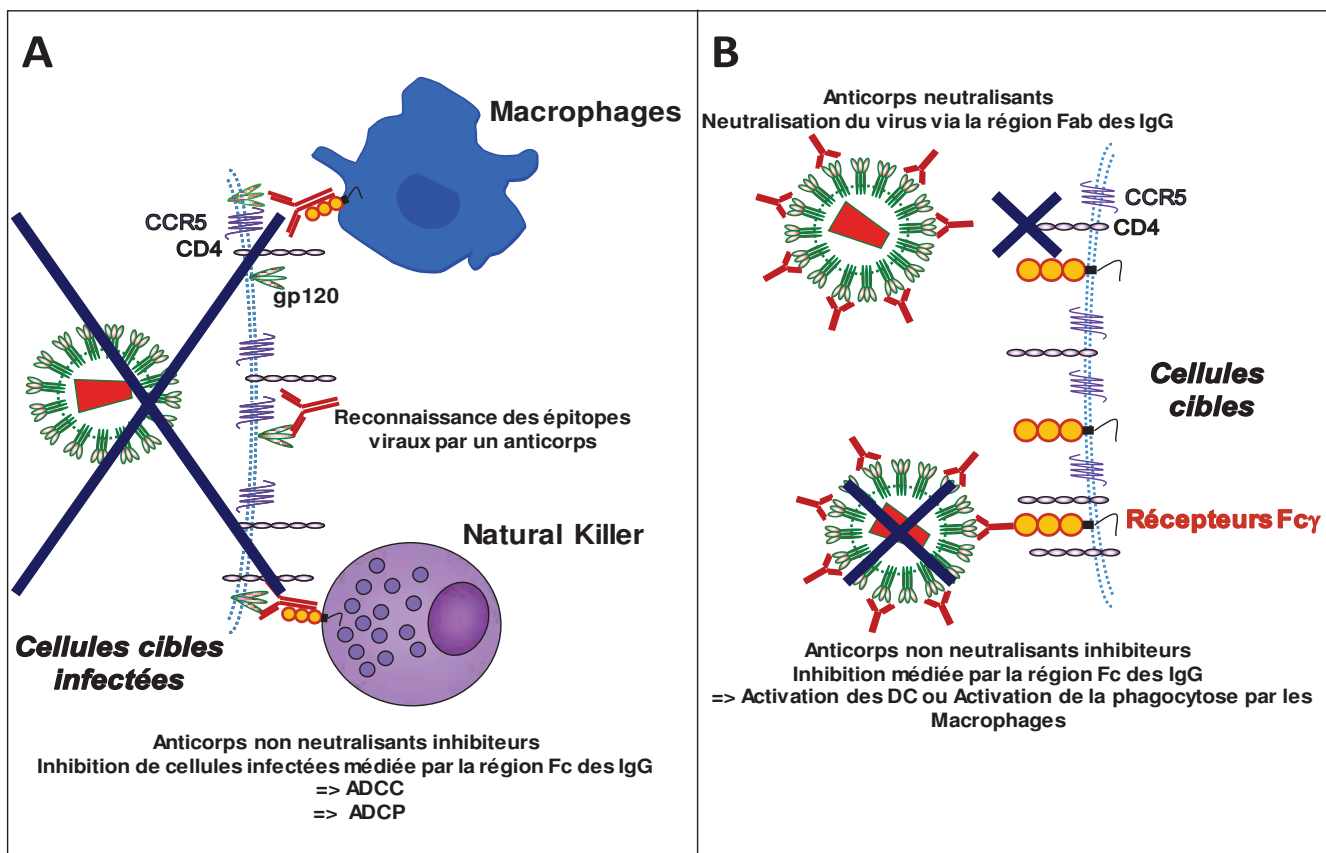


Figure 14 : Les différentes activités inhibitrices des anticorps neutralisants et non-neutralisants inhibiteurs.

- A) Cellule infectée : la reconnaissance des épitopes viraux situés à la surface de la cellule (gp120) par la partie Fab des anticorps induit le recrutement de cellules effectrices comme les cellules NK (Natural Killer) et les macrophages. L'interaction de la partie Fc des anticorps sur les récepteurs RFc situés à la surface des cellules effectrices induit la lyse de la cellule infectée (représentée par une croix bleue) via un mécanisme ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) pour les cellules NK ou ADCP (*Ab-dependent cellular phagocytosis*) pour les macrophages.
- B) Virus libre : inhibition du virus libre par neutralisation bloquant l'entrée du virus dans la cellule cible (représentée par une croix bleue). Après opsonisation de la particule virale, l'interaction de la partie Fc des anticorps sur le récepteur RFc située à la surface des DC et des macrophages entraîne l'activation des DC ou la phagocytose RFc dépendante médiée par les macrophages. Ce mécanisme permet l'élimination du VIH-1 et empêche l'infection des cellules cibles (représentée par une croix bleue).

3.1. La neutralisation du virus libre

La neutralisation entraîne la « perte » du pouvoir infectieux du virus. Cette inhibition s'effectue par la liaison de l'anticorps via son paratope (domaine Fab) à son épitope viral (domaine de la gp120 ou de la gp41) (Burton, 2002). L'interaction de la partie Fab de l'anticorps avec l'antigène de la particule virale forme un complexe immun, bloquant ainsi un épitope viral impliqué dans les premiers événements d'entrée et de fusion du virus avec la cellule cible. Ces anticorps neutralisants à large spectre ont été principalement caractérisés *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'infection, par du virus libre, des LT CD4 ou des lignées cellulaires permissives au VIH-1 telles que les TZM-bl (Heyndrickx et al., 2012). Récemment, la capacité inhibitrice, de différents anticorps neutralisants, a été évaluée sur des explants de tissus vaginaux-utérins. L'équipe de Dezzutti a montré une diminution de la réplication virale en présence d'anticorps sur un système polarisé de tissu préalablement stimulé (Scott, Park, and Dezzutti, 2016). L'équipe de Shattock a mis en place un test d'inhibition par immersion du tissu dans une solution contenant du virus et des anticorps préalablement incubés ensemble. Ils ont également observé une inhibition de l'activité réplicative du virus (Cheeseman et al., 2017). Ces deux équipes proposent ainsi deux modèles distincts de neutralisation sur explants de tissus afin d'évaluer la capacité inhibitrice des anticorps dans un contexte tissulaire. Le premier modèle est plus proche du modèle *in vivo*, car il respecte l'infection par le VIH-1 d'un tissu « polarisé » c'est-à-dire l'infection via la surface du tissu. Il est à noter que, dans ces deux modèles, l'analyse de l'activité inhibitrice a été investiguée dans le surnageant après plusieurs jours de culture, ce qui ne permet pas d'identifier les premières cellules infectées. L'évaluation de l'inhibition de l'infection des cellules résidentes des tissus restent encore à définir dans un modèle se rapprochant du modèle *in vivo*.

3.2. Les mécanismes médiés par la partie Fc des Immunoglobulines

La région Fc des anticorps est capable d'interagir avec des récepteurs Fc gamma (RFc γ) situés à la surface de certaines cellules (cellules présentatrices d'antigènes ou NK) (Forthal and Moog, 2009; Holl et al., 2006b). Chez l'homme, cinq récepteurs RFc γ ont été identifiés : RFc γ I (CD64), RFc γ II a et b (CD32), RFc γ III a et b (CD16). Ces différents récepteurs sont caractérisés en fonction de leur affinité pour les IgG (1-4). Dans les tissus, les DC expriment à leur surface des RFc γ II (CD32) et les

macrophages possèdent des RFcyl (CD64) mais également des RFcylII (CD32) (Cheeseman et al., 2016; Sips et al., 2016). Certaines cellules NK expriment, quant à elles, les RFcylIII (CD16).

En complément de l'activité neutralisante, certains anticorps neutralisants peuvent inhiber l'infection par le VIH-1 par l'intermédiaire de mécanismes additionnels. Des fonctions dépendantes de la liaison Fc des anticorps aux RFcy ont été observées (phagocytose, inhibition et maturation des DCs, antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)...). De plus, cette activité dépendante des RFcy est également détectée avec certains anticorps non-neutralisants appelés anticorps non-neutralisants inhibiteurs (Ac NoNI). Les études des anticorps induits par le RV144 ont permis d'associer l'activité non neutralisante des anticorps anti-V1/V2 avec la diminution du risque d'infection.

3.2.1. ADCP

La liaison de la région Fab à son épitope peut être concomitante à son interaction, par le biais de sa partie Fc, aux RFc situés à la surface de certaines cellules immunes. L'interaction de la partie Fc de l'anticorps à son récepteur entraîne la phagocytose de la particule virale opsonisée. Les cellules responsables de ce mécanisme dénommé ADCP (*Ab-dependent cellular phagocytosis*) sont les monocytes, les macrophages et les neutrophiles. L'internalisation du pathogène opsonisé induit son élimination. Des études ont montré que l'activité ADCP était associée à une activité protectrice dans le modèle macaque après une infection par voie intra-rectale (Barouch et al., 2015; Barouch et al., 2013; Tuero et al., 2015). Récemment, la phagocytose médiée par les macrophages ou par les neutrophiles a été proposée comme possédant un rôle important dans les tissus humains. Cependant l'apparition de cette activité durant l'infection reste à déterminer (Sips et al., 2016). L'ADCP peut être détectée en présence d'anticorps non-neutralisants. *In vitro*, pour certains anticorps anti-VIH-1, la fixation des complexes immuns aux récepteurs Fc situés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) est capable d'induire une diminution de la réplication virale (Holl et al., 2006a). Dans un modèle de lignée cellulaire exprimant les RFc et incubé avec des billes associées à la gp120, une activité phagocytose médiée par la partie Fc des anticorps a été détectée (Ackerman et al., 2013). L'activité ADCP est observée avec de multiples

anticorps, en particulier les anticorps dirigés contre la gp41 (Perez et al., 2009). Même si l'inhibition par phagocytose n'a pas été démontrée sur les lignées cellulaires TZM-bL, il a été proposé que la liaison des complexes immuns aux récepteurs RFcyl donne un avantage cinétique aux Ac anti-gp41 dirigés contre les épitopes cryptiques (Perez et al., 2009). Basé sur cette observation, un mécanisme alternatif pourrait être proposé lorsque les virus sont co-localisés avec les anticorps et les RFc à la surface des CPA. Dans ce cas, le VIH-1 capturé à la surface des cellules via les RFc serait dévié du processus d'infection, lequel requiert la liaison du virus à son récepteur/corécepteur pour la fusion avec la membrane cellulaire, pour être dégradé.

3.2.2. ADCC

L'activité ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps représente un mécanisme par lequel des cellules effectrices comme les cellules NK (ou *Natural killer*), les monocytes ou les neutrophiles sont capables de lyser les cellules infectées. Ainsi, cette activité requiert une interaction entre la cellule infectée et la cellule effectrice via des anticorps anti-VIH-1 spécifiques. Les anticorps doivent donc se lier aux épitopes exprimés à la surface d'une cellule infectée via sa partie Fab et utiliser son domaine Fc pour interagir avec les récepteurs RFc exprimés par les cellules effectrices telles que les cellules NK (interaction Fc/RFcylIII (CD16)). Cette double interaction entraîne la libération de granules cytotoxiques (granzymes et perforines) responsables de la lyse et de la destruction des cellules infectées.

Les cellules NK sont présentes dans les couches sous-muqueuses vaginales et exocervicales. Durant le premier trimestre de grossesse, une concentration élevée de cellules immunitaires sont recrutées dans la décidua, lieu de contact entre la mère et l'unité foeto-placentaire. Les cellules NK déciduales (dNK) représentent 70% de la population leucocytaire. Une récente étude a démontré que les dNK participeraient au contrôle de l'infection par le VIH-1 dans ces tissus (Quillay et al., 2016).

L'essai RV144 et plusieurs études dans le modèle NHP ont montré qu'une activité ADCC ainsi que l'induction d'Ac NoNI dirigé contre la boucle V1/V2 était corrélée à une diminution du risque d'infection (Haynes et al., 2012; Wren et al., 2013; Zolla-Pazner et al., 2014). Ces résultats suggèrent l'importance de l'activité ADCC dans la protection contre le VIH-1 *in vivo* (Chung et al., 2014; Lewis et al.,

2015; Lewis et al., 2017). De plus, récemment, les anticorps non-neutralisants dirigés contre la boucle V2 sélectionnés chez des patients infectés ont montré une forte activité ADCC croisée en utilisant des isolats primaires de sous-type C *in vitro* (Veillette et al., 2016). Cette étude renforce le rôle potentiel des anticorps spécifiques contre la boucle V2. Cependant, l'ADCC est une activité complexe à plusieurs niveaux, des questions restent en suspens sur la mise en place du test ADCC adaequat, reflétant au mieux la protection biologique. Ainsi, plusieurs essais *in vitro* ont été développés utilisant différentes cellules cibles, cellules effectrices NK, différents anticorps et différents temps. Il est à noter que les protéines d'enveloppe virales possèdent une dynamique conformationnelle forte. Pendant les différentes phases de l'infection, différents épitopes viraux sont exposés de manière séquentielle suite aux réarrangements structuraux. Ceci implique que la fenêtre de vulnérabilité des antigènes à la fixation des anticorps pourrait varier entre quelques heures, les phases d'entrée ou de bourgeonnement du virus en fonction de l'épitope ciblé (Lewis, 2016; Lewis, Pazgier, and DeVico, 2017). L'ensemble de ces résultats démontre la complexité des études de l'activité ADCC *in vitro*.

L'analyse des activités ADCC dans le modèle des tissus du FGT serait également particulièrement intéressante.

3.2.3. ADCVI

L'ADCVI (*Antibody-dependent cell-mediated virus inhibition*) englobe *in vitro* l'ensemble des fonctions cytolytiques (ADCC) et non-cytolytiques telles que la production de nombreuses chimiokines- β pouvant jouer un rôle dans l'inhibition de la réplication du VIH-1 (Su and Moog, 2014).

3.3. Inhibition de la transmission cellule à cellule

Les CPA ont été décrites comme étant « des chevaux de Troie » facilitant la transmission et la dissémination du VIH-1 aux LT CD4 avoisinants. L'efficacité d'infection du VIH-1 lors d'une transmission de cellule à cellule a été montrée comme étant 100-1000 fois plus élevée comparée à l'infection par du virus libre, rendant ce mode de transmission déterminant pour la propagation et la dissémination du VIH-1 dans l'ensemble de l'organisme (Agosto, Uchil, and Mothes, 2015; Casartelli, 2016;

Su and Moog, 2014). De ce fait, la prévention de la transmission du VIH-1 de cellule à cellule par les anticorps est indispensable afin d'inhiber la propagation du VIH-1. L'ensemble des études effectuées dans les modèles de transmission cellule-cellule montrent des résultats très controversés sur la capacité inhibitrice des anticorps lors d'une transmission de cellule à cellule. Cette controverse peut s'expliquer par le choix des cellules utilisées, des anticorps, des temps d'incubations anticorps-cellules, ainsi que des virus utilisés (Anderson, 2014). Certaines études montrent une diminution de la capacité inhibitrice des anticorps lors d'une transmission de cellule à cellule comparée à l'inhibition de l'infection par du virus libre (Li et al., 2017 ; Gombos et al., 2015 ; Malbec et al., 2013). D'autres études démontrent une activité inhibitrice des anticorps similaire dans un modèle de co-culture de cellules primaires comparée à l'infection de ces cellules par du virus libre (Duncan et al., 2014; Su et al., 2012). Ainsi, dans ces conditions, l'inhibition de la transmission du VIH-1 de DC/Macrophages aux LT CD4 est aussi efficace que l'inhibition de l'infection par du virus libre. Cette efficacité d'inhibition a également été décrite pour les molécules antivirales, après normalisation de la réplication virale et des cellules cibles (Duncan et al., 2014; Martin et al., 2010). Ces résultats soulignent le rôle important des anticorps neutralisants dans la protection de la transmission et de la dissémination du VIH-1 dans l'organisme.

Puisque les anticorps sont également capables de se lier aux récepteurs Fc, une activité inhibitrice médiée par la partie Fc pourrait également être observée lors d'une transmission de cellule à cellule. En effet, nous avons montré au laboratoire que l'anticorps non-neutralisant inhibiteur 246-D diminuait l'infection des DC préalablement infectées en co-culture avec des LT CD4 de manière significative (Su et al., 2012). Pour ce type d'anticorps, une forte association a été démontrée entre la capacité de liaison aux récepteurs Fc, l'inhibition de la réplication et la maturation des DC. Ces résultats suggèrent que la liaison des anticorps aux DC (interaction Fc/RFc) entraîne la maturation de ces cellules, induisant une faible réplication (Su and Moog, 2014; Su et al., 2012). Cette activité non conventionnelle d'inhibition détectée dans les DC et non sur les LT CD4 pourrait expliquer le faible taux d'infection dans la co-culture en présence d'anticorps. Ainsi, l'activité inhibitrice médiée par la partie Fc dans les DC pourrait participer à la diminution globale de la réplication lors d'une transmission de DC à LT. L'ensemble des études entreprises sur l'analyse de la

capacité inhibitrice des anticorps lors d'une transmission de cellule à cellule ont été réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires provenant d'un même donneur. Une récente étude réalisée sur des explants de tissus a montré une inhibition de l'infection en présence d'anticorps neutralisants. Cependant cette inhibition n'est pas observée en présence d'anticorps non-neutralisants. L'analyse de la capacité inhibitrice de ces anticorps a été effectuée sur la production virale et non sur les cellules infectées présentes dans ces tissus (Cheeseman et al., 2017). De ce fait, l'ensemble des multiples activités des anticorps sur les cellules présentes dans ces tissus n'a pas encore été investiguée. De plus, l'activité inhibitrice de ces anticorps lors d'une transmission de cellules infectées contenues dans le sperme aux cellules résidentes des muqueuses reste à évaluer.

3.4. Le système du complément

Le système du complément représente un ensemble de protéines impliqué dans l'élimination d'agents infectieux, de complexes immuns, mais également dans le contrôle de la réponse inflammatoire et la modulation des réponses immunes spécifiques. Ce système fait ainsi le lien entre la réponse innée et la réponse adaptative. L'activation du complément se déroule autour de trois voies bien distinctes : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. L'activation de ces trois voies s'effectue par la reconnaissance de pathogènes (voie alterne et voie des lectines) ou par le biais des complexes immuns anticorps-pathogène ou anticorps-cellule infectée (voie classique). L'activation de ces voies entraîne une cascade de protéolyses successives de différentes protéines conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire. Ce complexe élimine les pathogènes par lyse osmotique. Les protéines du complément peuvent également opsoniser la particule virale (accumulation de C3b à la surface), déclenchant sa phagocytose (Blue, Spiller, and Blackbourn, 2004). Cependant, l'infection par le VIH-1 induit une faible activation du système du complément. De plus, celui-ci favoriserait également l'infection de cellules nouvellement recrutées par chimiotactisme (Huber and Trkola, 2007).

Les activités des anticorps ont été analysées *in vitro* dans différents modèles de culture de cellules. La capacité inhibitrice de ces anticorps n'a pas encore été définie dans des modèles de tissus proches du contexte *in vivo*. Ces anticorps seront donc à

évaluer afin de caractériser leurs capacités inhibitrices dans ce contexte physiologiquement plus pertinent.

4. Immunité humorale dans les muqueuses

La réponse humorale est médiée, à la suite d'une activation des lymphocytes B en plasmocytes, par la production d'anticorps (immunoglobulines, (Ig)) dirigés spécifiquement contre les protéines virales. Les anticorps peuvent être subdivisés en 4 classes ou isotypes selon la structure des chaînes lourdes : IgG, IgA, IgM et IgE. La population de LB, dans l'ensemble des tissus du FGT, représente une population minoritaire. L'origine des anticorps dans les tissus provient à la fois d'une production locale mais également d'une production dérivant de la circulation sanguine. Parmi les différents d'anticorps sécrétés, les IgG et les IgA sont principalement retrouvés dans les muqueuses du tractus avec une prédominance d'IgA dans les sécrétions vaginales (Mestecky, 2007).

Les IgG sont des monomères, majoritairement retrouvés dans le sérum. Ces anticorps peuvent être subdivisés en 4 sous-classes : les IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

Les IgA de type sécrétoire (SIgA) sont des isotypes sous forme monomérique excepté dans les muqueuses où ces anticorps sont dimériques. Différents types d'IgA sont présents, les IgA1 retrouvées principalement dans le sang et les IgA2 présentes dans les muqueuses.

Le transport des anticorps s'effectue par le biais de récepteurs Fc néonataux (FcRn) et de récepteurs Ig polymérique (pIgR) situés à la surface des cellules épithéliales. Les FcRn sont capables de transporter les anticorps de type IgG à travers la couche épithéliale (Li et al., 2011), tandis que les pIgR permettent le transport de ceux de type IgA.

De plus, les anticorps sont régulés par l'influx hormonal. Par exemple, ceux-ci sont retrouvés en abondance, dans l'endomètre, au cours de l'ovulation (Wira, Rodriguez-Garcia, and Patel, 2015). La régulation de la concentration des anticorps, présents dans les tissus, pourrait s'effectuer au niveau de l'expression ou de la présence des récepteurs à la surface des cellules. Des études complémentaires sur la régulation, l'expression et le transport des anticorps en fonction des différentes phases du cycle seraient d'un grand d'intérêt, afin de mieux comprendre les

différences locales de concentrations en anticorps au cours du temps dans ces organes.

Le rôle des récepteurs FcRn dans l'infection par le VIH-1 reste encore très mal compris. Cependant, il a été proposé que ces récepteurs joueraient un rôle soit inhibiteur, soit facilitateur au cours d'une infection par le VIH-1. La formation du complexe immun entre l'IgG et le pathogène a été proposée comme servant de véhicule pour le passage à travers la barrière épithéliale vers la couche sous-muqueuse. Ce complexe est ensuite capable d'interagir avec les DC présents dans ces muqueuses (Yoshida et al., 2004). Dans le cas du VIH-1, une étude a montré le rôle protecteur des IgG, via un transport bidirectionnel dans les tissus, contre l'infection et la transmission du VIH-1 dans le modèle de souris (Li et al., 2011). Ces résultats soulignent l'importance des études réalisées sur les DC et sur l'inhibition médiée par la partie Fc des anticorps dans l'infection par le VIH-1. Par ailleurs, une autre étude a proposé que l'acidité présente dans l'environnement des muqueuses et les IgG dirigés contre les protéines d'enveloppe augmentent la transcytose du VIH-1 à travers les cellules épithéliales via les FcRn (Gupta et al., 2013). Ces résultats suggèrent que dans certaines conditions, les FcRn faciliteraient l'entrée du virus dans les muqueuses. La majorité des infections bactériennes et virales induisent une réponse IgA spécifique. Le rôle des IgA dans l'infection par le VIH-1 reste mal compris. Ces anticorps ont été proposés comme ayant un rôle à la fois facilitant permettant la transmission et l'infection par le VIH-1, mais également inhibiteur de l'infection (Zhou and Ruprecht, 2014). Une étude a détecté une activité neutralisante après immunisation passive d'IgA par voie intra-rectale dans le modèle de macaque (Watkins et al., 2013). Le passage des IgA sécrétées, de la couche sous-muqueuse vers le milieu extérieur, par transcytose suggèrent un mécanisme où les IgA pourraient inhiber l'infection des particules virales ou des cellules infectées déversées par le sperme dans le tractus génital féminin. La formation des complexes immuns IgA-VIH-1 pourraient également permettre le transport du virus par transcytose inverse de la surface apicale vers les couches sous-muqueuses (Rochereau et al., 2013).

Des études examinant les sécrétions cervico-vaginales des femmes hautement exposées au VIH-1 séronégatives (HESN) ou des travailleuses du sexe résistantes à l'infection par le VIH-1 ont détecté des IgA neutralisants dirigés contre

le domaine MPER de la gp41 (Devito et al., 2000; Kaul et al., 1999; Pastori et al., 2000). L'inhibition de la réplication virale a également été observée en présence de sérum de patients HESN (Janoff et al., 1995).

Néanmoins, deux études suggèrent un rôle facilitant des IgA dans l'infection par le VIH-1. Dans la première étude, les IgA, provenant de patients séropositifs, augmentent la réplication du VIH-1 sur des lignées cellulaires. Cette réplication peut être bloquée par des anticorps anti-RFc (Kozlowski et al., 1995). La deuxième étude met en évidence une augmentation de la réplication virale sur des cellules primaires. Ces résultats suggèrent l'implication de mécanismes médiés par la partie Fc, induisant d'autres activités inhibitrices des IgA.

L'ensemble de ces études montrent l'importance des IgA dans les tissus du FGT. Ces IgA pourraient avoir un double rôle : à la fois protecteur, contribuant à une immunité protectrice mais également délétère, en facilitant l'entrée du virus. L'analyse des différentes activités de tels anticorps présents dans les tissus du FGT permettrait de préciser leur rôle lors des premiers événements d'entrée du VIH-1 au cours d'une transmission par voie hétérosexuelle.

5. Etude du rôle des anticorps *in vivo*

Diverses études *in vivo* menées dans le modèle NHP (*Non Human Primate*) de singe rhésus macaque ont permis d'appréhender le rôle de la réponse humorale associée dans la protection contre le VIH-1. En effet, le transfert passif d'anticorps neutralisants dans le modèle NHP a permis de démontrer le rôle protecteur des anticorps neutralisants dans l'infection par le virus chimérique SHIV par voie intraveineuse, intra-rectale et vaginale (protection stérilisante) (Hessell et al., 2010; Hessell et al., 2007; Moldt et al., 2012; Mascola et al., 2000). D'autres études ont également démontré l'efficacité des anticorps neutralisants chez des macaques nouveau-nés après infection par voie orale (Baba et al., 2000; Ferrantelli et al., 2004). Ces résultats suggèrent l'importance des anticorps neutralisants dans la prévention de la transmission du VIH-1 dans les muqueuses. D'autre part, une concentration importante d'anticorps d'isotype IgG1 et d'IgG3 a été détectée dans les sécrétions vaginales de patientes infectées (Raux et al., 2000), suggérant le rôle important des différents isotypes d'anticorps dans l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses.

De manière intéressante, des études ont montré que l'inoculation d'une combinaison de plusieurs anticorps neutralisants permet d'induire une efficacité protectrice plus efficace et beaucoup plus prolongée dans le temps (Horwitz et al., 2013; Klein et al., 2012; Moldt et al., 2012; Nishimura et al., 2017). Par ailleurs, deux récentes études ont observé que des anticorps inoculés à des temps très précoces de l'infection permet d'induire une élimination complète du virus dans les modèles de macaques (Hessell et al., 2016; Liu et al., 2016). L'équipe de Liu a montré dans des macaques traités avec un bNAb, un jour après une infection de forte dose de virus, l'élimination des premiers foyers d'infection (Liu et al., 2016). L'équipe de Hessell observe que le traitement des macaques nouveaux nés avec plusieurs anticorps, un jour après une infection orale, est capable d'éliminer les premiers foyers d'infection (Hessell et al., 2016). Ainsi, les bNAb seraient également capables d'éliminer les premières cellules infectées. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'élimination de ces foyers d'infection restent à déterminer. Ces résultats très encourageants démontrent l'importance des études sur le rôle des anticorps anti-VIH-1 dans les muqueuses. Les stratégies vaccinales devront prendre en compte ces différentes activités inhibitrices des anticorps afin d'induire ceux, capables de protéger l'infection des cellules cibles et prévenir la formation des premiers foyers d'infection.

6. Les essais vaccinaux

Le développement d'un vaccin anti-VIH représente un des axes majeurs dans la lutte contre le VIH-1. De nombreux essais vaccinaux ont été développés.

Les premiers essais vaccinaux se sont tournés vers le développement d'immunogènes des glycoprotéines d'enveloppe (protéines recombinantes de la gp120 et gp160) capables d'induire des anticorps neutralisants à large spectre (bNAb). Cependant, jusqu'à présent, aucun essai vaccinal ne s'est révélé efficace dans l'induction des bNAb (Flynn et al., 2005; Pitisuttithum et al., 2006; Hammer et al., 2013; Mascola and Montefiori, 2010). La recherche vaccinale a également développée des immunogènes dans le but d'induire une réponse cellulaire cytotoxique efficace, notamment les LT CD8 cytotoxiques. L'activation des LT CD8 est corrélée à la diminution de la charge virale au cours de la primo-infection. Les essais réalisés sur le modèle NHP ont montré que la réponse cytotoxique permet le contrôle de la virémie (Hirsch et al., 1994; Shiver et al., 2002). Parmi les personnes

séropositives, un petit nombre de patients sont capables de contrôler l'infection par le VIH-1 en absence de traitement. C'est le cas des patients dénommés « *Long term non-progressor* » (LTNP). Les études sur ces patients ont démontré que le contrôle de la virémie est corrélé à une forte réponse cellulaire cytotoxique (Pereyra et al., 2010). Ces études soulignent donc l'importance de la réponse cellulaire cytotoxique dans la protection contre le VIH-1. L'essai STEP (ou HIV Vaccine Trials Network (HVTN) 502), a été initié, utilisant un vecteur adénovirus non répliquatif recombinant (Ad5) exprimant les gènes *gag*, *pol* et *nef* du VIH-1 dans le but d'induire une réponse LT CD8 efficace. Cependant cet essai a été rapidement interrompu en phase I. La réponse LT CD8 induite n'a pas montré de protection, un nombre élevé d'infection a été observée suite à cette vaccination.

Les recherches vaccinales se sont alors orientées vers l'utilisation de stratégies vaccinales combinées dénommées « prime-boost » associant différents candidats vaccinaux. L'essai Thaïlandais RV144 effectué sur des volontaires sains est le premier montrant une efficacité protectrice modeste (31%). Cet essai « prime boost » correspondait à plusieurs injections d'un vecteur canarypox contenant les protéines virales du VIH-1 (*gag env protease*) (ALVAC-HIV) suivi de deux boosts contenant deux protéines gp120 recombinantes (AIDSVAX B/E). Il a permis de mettre en évidence de multiples activités antivirales des anticorps impliquées dans la protection contre le VIH-1 (Rerks-Ngarm et al., 2009). L'essai RV144 représente donc une avancée majeure dans la recherche vaccinale.

Malgré les difficultés rencontrées lors du développement des essais vaccinaux, des recherches de nouveaux immunogènes capables d'induire une réponse humorale et cellulaire efficace continuent de se poursuivre. Notamment, l'avancée des nouvelles technologies telles que le séquençage à haut débit (NGS), et le « *single B cells cloning* » permettant d'isoler spécifiquement les cellules B capables d'induire des anticorps neutralisants est très prometteuse. Ces méthodes vont permettre la caractérisation d'anticorps neutralisants *in vitro* et *ex vivo*. Elles vont permettre de déterminer de nouveaux épitopes reconnus par des anticorps neutralisants et produire des immunogènes afin d'induire ces anticorps par vaccination (Burton and Hangartner, 2016; McCoy and Burton, 2017).

Dans l'attente de développement d'un vaccin efficace, des outils de prévention ont été développés.

7. Les microbicides

Les microbicides ont été proposés comme des agents de prévention lors de la transmission par voie sexuelle de divers pathogènes. Ces microbicides agissent directement au niveau de la voie d'entrée du VIH-1 dans les muqueuses. Ils se présentent sous forme de gel, de crème, de suppositoires ou d'anneaux vaginaux.

Dans le cas du VIH-1, le premier essai des microbicides contenant le surfactant : le nonoxynol-9 (N9) s'est révélé être un échec total augmentant par trois le risque d'infection au VIH-1. Des applications répétées de N9 induisaient une inflammation locale, un changement de la microflore bactérienne et des irritations favorisant l'infection par le VIH-1 (Beer et al., 2006; Van Damme et al., 2002). Les microbicides contenant des polyanions représentent une nouvelle classe de microbicides. Les polyanions se lient aux protéines virales cationiques comme la gp120 et empêchent ainsi l'entrée du virus dans sa cellule cible. Parmi ces microbicides testés le PRO2000 a montré une efficacité protectrice chez le modèle animal. Cependant cette protection n'a pas été retrouvée chez les femmes (McCormack et al., 2010).

Des microbicides contenant des antiviraux ont également été développés. L'utilisation d'un gel vaginal contenant 1% de Ténofovir dans l'essai clinique CAPRISA 004 de phase II a permis une protection de 39%. Cet essai démontre que les antirétroviraux ont des propriétés microbicides efficaces dans la protection contre le VIH-1. Cependant l'application de ce gel dans l'essai VOICE, sur des femmes africaines, s'est révélé inefficace (Klatt et al., 2017). Cette divergence de résultats peut s'expliquer par la diversité des flores microbiennes entre les différentes ethnies. Pour permettre une efficacité protectrice des microbicides au niveau des muqueuses, la prise en compte des différents facteurs endogènes contenus dans le FGT devra être prise en compte.

Dans l'attente de nouveaux essais vaccinaux, un approfondissement des connaissances immunologiques et virologiques concernant le VIH-1 dans les tissus est nécessaire afin de mieux comprendre et de mieux appréhender la réponse immunitaire contre le VIH-1 dans les tissus. Cette connaissance devrait permettre de développer de nouveaux concepts vaccinaux.

Objectifs du travail de thèse

Dans l'objectif de développer un vaccin efficace contre le VIH-1, une connaissance approfondie des mécanismes : 1) d'entrée du VIH-1 dans les muqueuses, 2) d'infection des cellules cibles présentes dans les muqueuses via du virus libre ou des cellules infectées, 3) et d'inhibition, par les anticorps, de l'infection de ces cellules dans un contexte tissulaire est grandement souhaité.

Le laboratoire étudie les mécanismes d'infection des cellules cibles du VIH-1 lors d'une contamination par voie hétérosexuelle et les différentes activités d'inhibitrices des anticorps mis en jeu afin d'empêcher l'infection et la transmission du VIH-1.

Comme décrit dans la partie introduction, il a clairement été établi que le virus contenu dans le fluide séminal se trouve sous deux formes : libre ou associé à des cellules. Lors de la transmission sexuelle, ces deux formes sont capables de pénétrer à travers la barrière épithéliale et infecter les cellules présentes dans les couches sous-muqueuses. Cependant, les premiers événements d'infection par le VIH-1 sont très controversés dans les muqueuses du FGT. Des études récentes ont montré que les DC sont capables de capturer rapidement le virus et de le transmettre aux LT CD4 avoisinants, suggérant un rôle important de ces cellules au cours de la transmission du VIH-1.

Le laboratoire a mis en place différents modèles *in vitro* et *ex vivo*, afin d'étudier l'infection des cellules cibles du VIH-1, notamment les DC, via du virus libre ou des cellules infectées et l'inhibition de l'infection par les anticorps.

Les objectifs de ma thèse sont de déterminer les premières cellules cibles du VIH-1 dans les tissus du FGT lors d'une transmission sexuelle et les mécanismes d'inhibition de l'infection par les anticorps dans ces tissus. Trois stratégies expérimentales ont été mis en place : 1) Infection des DC par du virus libre et inhibition de la transmission aux LT CD4 (co-culture autologue), 2) Infection des DC et des LT CD4 par des cellules infectées d'un autre donneur (co-culture allogénique) et 3) Infection et inhibition du VIH-1 dans des cellules issues des muqueuses du FGT par du virus libre et/ou des cellules infectées.

Les deux premières stratégies ont été réalisées en utilisant des cellules isolées du sang périphérique, activées et différenciées pour les LT CD4 et les DC respectivement. Pour la troisième stratégie, je me suis rapprochée des conditions physiologiques de transmission par voie sexuelle en utilisant des cellules isolées de

tissus du FGT. Enfin, j'ai mis en place un modèle d'infection sur des explants de tissus polarisés qui permettra une analyse de l'infection par le VIH-1 dans les tissus intacts.

Matériels et Méthodes

Matériel et Méthodes :

Le matériel et méthodes décrit les deux modèles expérimentaux que j'ai mis place au cours de ma thèse.

1. Le modèle de co-culture allogénique

Dans ce modèle, les cellules sont isolées et générées à partir de poche de sang.

1.1. Préparation des cellules

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) sont isolées à partir de concentrés leucocytaires de donneurs anonymes séronégatifs pour le VIH-1 et le virus de l'Hépatite C (VHC) provenant de l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Les monocytes sont isolés par le biais d'une sélection positive en utilisant des billes magnétiques CD14⁺ (autoMacs Pro Separator, Miltenyi), puis différenciés en monocytes dérivés en cellules dendritiques (MoDC) dans une solution contenant du milieu RPMI 1640 plus GlutaMAX (GIBCO) supplémenté avec 5% sérum de veau foetal (SVF), de 10ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et 20ng/ml d'IL-4 (R&D Systems) pendant 6 jours. Les LT CD4 autologues sont purifiés par sélection positive en utilisant des billes magnétiques CD4⁺ après la purification des cellules CD14⁺. Les LT CD4 primaires sont activés dans une solution contenant du RPMI 1640 plus GlutaMAX supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et de la phytohémagglutinine-A (PHA) (2µg/ml) (Sigma-Aldrich) pendant 3 jours. Les cellules sont congelées, puis décongelées 1 jour avant leur utilisation dans du milieu RPMI supplémenté avec de l'IL-2.

1.2. Préparation de stock de virus

Le VIH-1 étant un virus hautement pathogène, la manipulation de ce virus nécessite des conditions de sécurité particulière. La production de virus, la concentration de virus, l'infection des cellules primaires par le virus et l'inhibition du virus par des anticorps s'effectuent dans les conditions de confinement d'un laboratoire de type L3.

Amplification du virus : Les isolats primaires VIH-1_{Bal}, VIH-1_{Bx08} ont été fournis par le « *National Institute of Health* » (NIH; Bethesda, MD). Ces virus de tropisme R5 (sous-type B) utilisent le corécepteur CCR5 pour entrer dans les cellules cibles.

Les isolats primaires sont amplifiés *in vitro* sur un pool de PBMC provenant de trois donneurs séronégatifs différents, préalablement stimulés avec de la PHA et cultivés dans du RPMI supplémenté avec 10% de SVF et de l'IL-2 (Holl et al., 2006b; Moog et al., 1997b). La production de virus est suivie par mesure de l'activité de la transcriptase inverse (RT) dans le surnageant de culture. Celui-ci est prélevé quotidiennement pendant la période de multiplication du virus. Les surnageants contenant le virus sont concentrés à un facteur multiplié par 80 (Centricon 80 Plus Biomax filter, Millipore) avant d'être aliquotés et conservés à -80 °C.

1.3. Modèle de transmission allogénique

Ce test permet d'analyser les premiers événements de transmission des LT CD4 du donneur A (LT CD4-A) aux DC et LT CD4 provenant du donneur B (DC-B et LT CD4-B). Ce modèle est développé dans le but de mimer *in vitro* la transmission du virus des cellules infectées (comme par exemple celles présentes dans le sperme) à des LT CD4 ou des DC (cellules proposées comme étant de possibles cellules cibles du VIH-1 dans les muqueuses) (Figure 15).

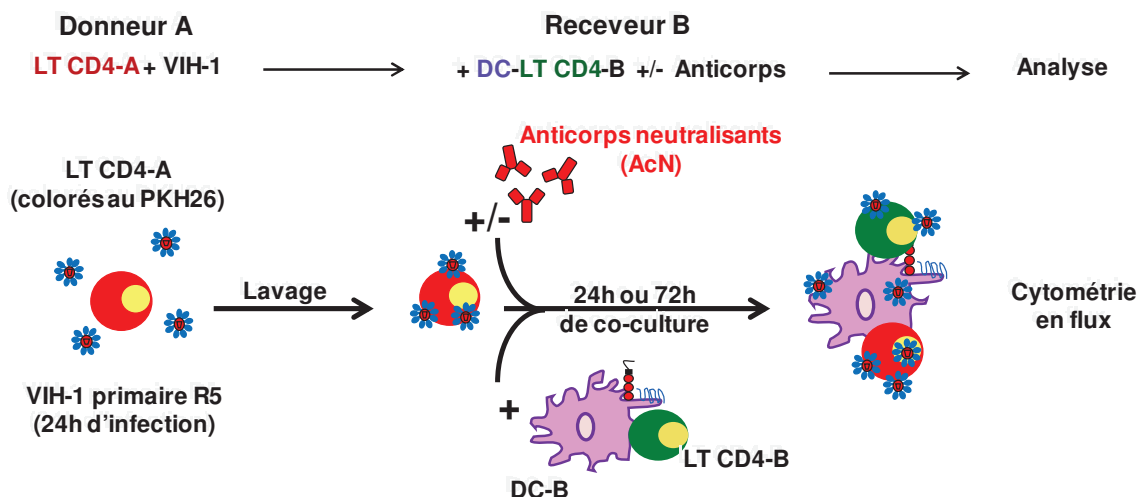


Figure 15 : Représentation schématique du modèle de transmission allogénique.

Les LT CD4 du donneur A (LT CD4-A) sont infectés pendant 24h, puis colorés au PKH26 et lavés. Les LT CD4-A sont co-cultivés avec des DC et des LT CD4 d'un donneur B en présence ou en absence d'anticorps. Après 24 et 72h de co-culture, les différentes populations cellulaires sont caractérisées par cytométrie en flux (phénotypage et détection de la protéine virale p24).

Infection et coloration des cellules du donneur A

Les PBMC du donneur A sont déplétées en cellules NK et LT CD8, par sélection positive en utilisant des billes magnétiques CD56+ et CD8+ respectivement, afin d'enrichir la suspension en LT CD4 primaires (autoMacs Pro Separator, Miltenyi). Ces cellules sont ensuite activées pendant 3 jours avec de la PHA. Les LT CD4 activés sont infectés pendant 24h avec les différents isolats primaires à une concentration de 100 à 500ng/ml d'antigène VIH-1 p24, de sorte que le pourcentage de cellules infectées soit supérieur à 2%. Les cellules sont ensuite lavées afin d'éliminer les particules virales non fixées et colorées à l'aide d'un colorant membranaire : le PKH26 (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma). La coloration des LT CD4 par le PKH26 (fluorescence dans le PE) permet de discriminer les LT CD4 infectés provenant du donneur A des LT CD4 du receveur B (donneur différent). Les LT CD4-A sont resuspendus à une concentration de 12.10^6 cellules/mL dans du milieu RPMI

Co-culture avec les cellules du receveur B

Les LT CD4 du donneur A sont co-cultivés avec des DC et des LT CD4 du receveur B concentrés à 6.10^6 cellules/mL et 12.10^6 cellules/mL respectivement (ratio DC/LT-CDA A/LT-CD4 B = 1/2/2) dans une plaque 96 puits.

Afin d'analyser un cycle unique de réplication, l'inhibiteur de protéase Indinavir (IDV) (AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH) est ajouté à une concentration $1\mu\text{M}$ dans certaines conditions. L'IDV permet d'inhiber la production de nouveaux virions infectieux. Un inhibiteur de la transcriptase inverse, l'azidothymidine (AZT), est également ajouté dans certaines conditions à une concentration de $5\mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich) pour prévenir toutes nouvelles réplifications virales. Afin d'analyser le rôle des anticorps, $25\mu\text{l}$ d'AcN (10-1074, 3BNC117, PGT121 et 4E10) sont ajoutés à différentes concentrations dans la co-culture en même temps que les cellules infectées. Les anticorps 3BNC117, dirigé contre le site d'attachement au CD4, 10-1074 et PGT121, dirigés contre la boucle variable V3 proviennent du NIH. L'anticorps 4E10, dirigé contre la région MPER de la gp41, provient de *Polynum Scientific*. L'infection productive est quantifiée après détection intracellulaire de la protéine virale p24 par la technique de cytométrie en flux. Les différentes populations cellulaires sont identifiées par phénotypage après 24 et 72h de culture.

2. Modèle de culture de cellules isolées de tissus

Les tissus des trompes de Fallope (T), de l'endomètre (M), de l'endocol (N) et de l'exocol (X) proviennent d'une collaboration avec le centre médico-chirurgical obstétrique (Strasbourg, France). Ces tissus sont obtenus à la suite d'une hystérectomie pratiquée sur des femmes séronégatives pour le VIH-1. L'hystérectomie est pratiquée après diagnostic de prolapsus, fibromes, ménorragies et d'endométriose. Les études ont été approuvées par le comité d'éthique (Autorisation N°RNI2014 - Réf. n°006-15). Le consentement écrit des patientes a été obtenu.

Les tissus sont transportés et stockés à 4°C dans une solution de saline (PBS) contenant des antibiotiques (100 U pénicilline/ml and 100 µg streptomycine/ml, 50 mg/ml gentamicine) avant leurs utilisations.

2.1. Isolement des cellules immunitaires des muqueuses

Après lavage des tissus, une partie de la couche musculaire des tissus est éliminée (hauteur du tissu d'environ 5mm en dessous de la barrière épithéliale). Les tissus sont digérés dans une solution contenant du milieu RPMI 1640 plus GlutaMAX (Gibco) supplémenté avec 2,5 % de collagénase IV (1mg/ml) et de la DNASE-1 (1mg/ml) pendant 30 min at 37°C (Sigma Aldrich). La suspension obtenue est filtrée à 70µM (Cell strainer, Miltenyi). Les cellules isolées sont collectées après centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min. L'étape de digestion des tissus est renouvelée plusieurs fois afin de récupérer une concentration cellulaire importante. Les cellules isolées sont ensuite incubées dans une solution de lyse de globules rouge (1X) (Red blood cells, Miltenyi). Cette solution permet d'éliminer les globules rouges présents dans les tissus et de conserver les autres cellules. Les cellules sont lavées puis resuspendues à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans un milieu DMEM HamF12 (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF et des antibiotiques (100 U pénicilline/ml and 100 µg streptomycine/ml, 50 mg/ml gentamicine).

2.2. Infection des cellules

Les cellules immunitaires des différents tissus sont infectées avec un « transmitted founder » VIH-1_{PREJO} à une concentration de 70ng/ml d'antigène VIH-1 p24 (virus fourni par NIH, ND). L'isolat primaire a été préparé comme précédemment

(partie 1.2). Après 48h d'incubation, les cellules sont phénotypées et analysées par cytométrie en flux.

3. Immunophénotypage et analyse

Le marquage des protéines extracellulaires appelé phénotypage permet de caractériser les différentes populations cellulaires en fonction de l'expression des protéines exprimées à leur surface.

Anticorps utilisés pour la co-culture allogénique : Différents anticorps ont été utilisés pour caractériser les cellules : anti-CD3 conjugué à l'APC-Vio770 pour les LT du donneur B (Miltenyi), anti-CD209 conjugué au PerCPC5,5 pour les DC (BD Biosciences), et anti-p24 de VIH-1 conjugué au FITC pour la détection du virus.

La viabilité des cellules a été caractérisée par le kit de marquage fluorescent des cellules mortes, le Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain (Life Science). Ce marquage permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes dans l'analyse par cytométrie en flux.

Anticorps utilisés pour les cellules isolées des tissus : Différents anticorps ont été utilisés pour caractériser les cellules : anti-CD45 conjugué à l'APC-Vio770, anti-CD3 conjugué au Vioblue, anti-CD64 conjugué au PE-Vio770 (Miltenyi), anti-CD11c conjugué à l'APC (BD Biosciences), anti-CX3CR1 conjugué au PE (Miltenyi) et anti-CD103 conjugué au FITC (Immunotech). L'anticorps anti-p24 du VIH-1 conjugué à l'Alexa-700 est utilisé pour la détection du virus (Tableau 2).

Modèle co-culture hétérologue				
Cellules	Marqueurs	Fluorochrome	Clone-fournisseur	Rôle
LT CD4-B	CD3	APC-Vio770	Clone BW264/56. Miltenyi Biotec	CD3 est associé au récepteur des cellules T (TCR). CD3 est présent à la surface des LT
DC	CD209 ou DC-SIGN	PerCPC5,5	Clone DN46 (RUO) BD Biosciences	CLR capable de fixer le VIH-1
LT CD4-A	Coloration au PKH26	PE	PKH26 Red Fluorescent Cell linker. Sigma Aldrich	PKH26 est un colorant fortement lipophile. PKH26 s'insère dans les membranes plasmiques des cellules

Modèle infection des cellules des muqueuses				
Cellules	Marqueurs	Fluorochrome	Clone-fournisseur	Rôle
LT CD4	CD3	APC-Vio770	Clone BW264/56. Miltenyi Biotec	CD3 est associé au récepteur des cellules T (TCR). CD3 est présent à la surface des LT
DC	CD11c	APC	Clone B-ly6 (RUO). BD Biosciences	Intégrine alphaX
	CX3CR1	PE	clone: 2A9-1. Miltenyi Biotec	Récepteur à la fractalkine (CX3CL1) migration des DC
	CD103	FITC	clone: HML-1. Beckman Coulter	Intégrine $\alpha E\beta 7$. Différenciation des LT en LT régulateurs et LT Th17
Macrophages	CD64	PE-Vio770	clone: 10.1.1. Miltenyi Biotec	Récepteur aux immunoglobulines (RFcyl)
	CD11c	APC	Clone B-ly6 (RUO). BD Biosciences	Intégrine alphaX

Tableau 2 : Marqueurs cellulaire étudiés par cytométrie en flux.

L'acquisition des échantillons est réalisée avec un cytomètre LSRII SORP, BD Bioscience) calibré par billes CST (Cytometer Setup&Tracking, BD Biosciences) pour assurer la qualité et la cohérence des mesures entre les différentes expériences. La compensation entre les différents fluorochromes choisis est réalisée en utilisant le kit CompBeads (BD Biosciences). L'analyse des résultats est effectuée en utilisant la même procédure précédemment décrite à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Immunophénotypage : Les cellules sont incubées avec le kit « Live/Dead » pendant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons sont lavés et les anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines de surface sont ajoutés pendant 10min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées, fixées et perméabilisées avec un kit de solution Cytotfix/PermWash (P/W) (BD Biosciences) puis les anticorps spécifiques de l'antigène p24 intracellulaire sont ajoutés pendant 10 minutes à 4°C.

Analyse par cytométrie en flux : L'acquisition des échantillons est réalisée sur un cytomètre AutoMacs (Miltenyi) calibré par billes CST (Cytometer Setup&Tracking, Miltenyi) pour assurer la qualité et la cohérence des mesures entre les différentes expériences. La compensation entre les différents fluorochromes choisis est réalisée en utilisant le kit CompBeads (BD Biosciences).

Le marquage membranaire et intracellulaire permet de déterminer l'intensité et le pourcentage de cellules positives pour des marqueurs donnés par rapport aux contrôles. Les débris cellulaires sont exclus via les paramètres « Forward angle » et « Side Scatter light gating ». Les doublets cellulaires sont exclus via les paramètres

de « Forward Scatter Width » et « Forward Scatter Area ». Les cellules mortes sont exclues par le marquage « Live/Dead ». L'analyse des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter).

Analyse par microscopie à épifluorescence : Les cellules isolées provenant des tissus du FGT sont infectées pendant 24h avec un pseudovirus VIH-1_{PREJO} couplé au GFP/mCherry. Les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde puis marquées au DAPI, avec un anti-CX3CR1-PE et un anti-CD103 APC (Miltenyi Biotech).

4. Analyses statistiques

L'ensemble des données avec les barres d'erreurs sont exprimées sous forme « Mean \pm SD ». Les comparaisons entre groupes sont analysées par le test « *Student unpaired t-test* » générant des valeurs *P*. Les valeurs inférieures à 0.05 ($p < 0.05$) sont considérées comme statistiquement significatives. Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5.04 (GraphPad, San Diego, CA).

5. Modèle de culture de tissus

Dans ce modèle, les tissus sont conservés intacts. Ce modèle est encore en cours de développement.

5.1. Préparation des tissus et infection

La couche musculaire des tissus est éliminée de la même manière que précédemment. Les tissus sont coupés à l'aide de « biopsy punch » de 8mm de diamètre (Acuderm) puis placés avec l'épithélium dirigé vers le haut dans une plaque de 48 puits. Un cylindre en polystyrène (ID x 6.4 mm x 8 mm, Sigma) est placé au-dessus du tissu. L'ensemble de la structure est scellé à l'aide de Matrigel afin de consolider la structure (Matrigel Matrix, Corning). Le virus concentré est déposé dans le cylindre et le tissu est maintenu en culture pendant 24h. Les tissus sont ensuite lavés, puis fixés pendant une nuit dans une solution de Cytofix contenant 4% de paraformaldéhyde (BD, Bioscience) (Figure 16).

5.2. Congélation des tissus

Les tissus sont placés dans un liquide de montage (CryoMatrix, ThermoScientific) permettant de conserver la viabilité tissulaire, puis cryogénisés.

L'analyse des tissus est réalisée en collaboration avec le Dr Mariangela Cavarelli (CEA, Fontenay aux Roses, France). Les tissus sont découpés, et après immunomarquage, la co-localisation des cellules dans ces tissus est observée par microscopie confocale.

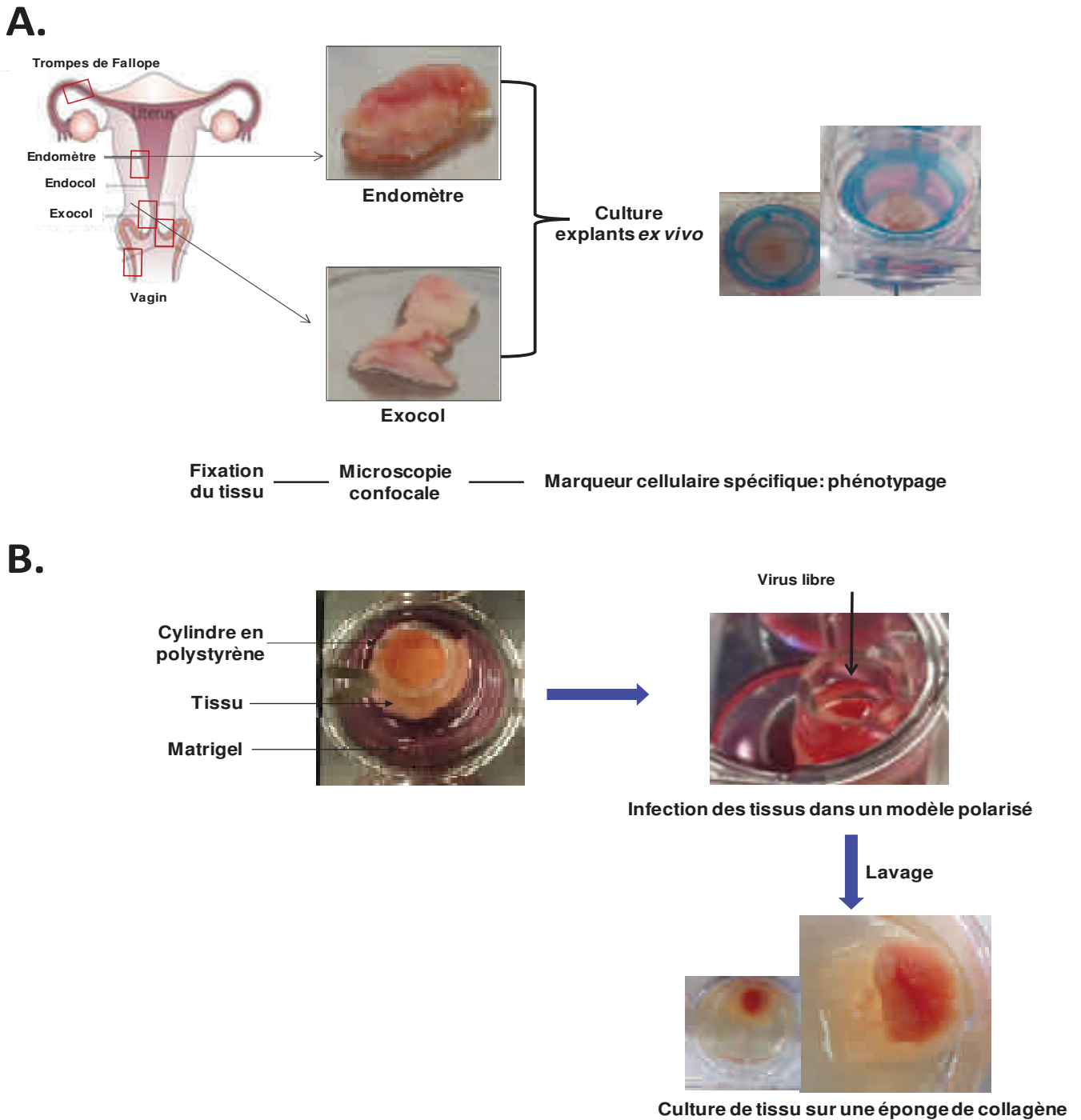


Figure 16 : Représentation schématique du modèle d'infection sur des explants de tissus intacts.

A. Les tissus du FGT, conservés intacts, sont scellés à l'aide de Matrigel. L'infection des tissus se fait par dépôt de virus libre concentré à l'intérieur d'un cylindre polystyrène, situé sur la surface apicale du tissu. Après 24h de culture, les tissus sont lavés, puis fixés et cryogénisés. L'analyse est réalisée sur des coupes de tissus par microscopie confocale. B. Images illustrant les différentes étapes expérimentales d'infection des tissus du FGT par du virus libre.

Résultats

La première partie de la thèse s'intéresse à l'infection des DC et des LT CD4 par du virus libre et des cellules infectées et à l'inhibition de l'infection de ces cellules dans un modèle de co-culture (Résultats sous forme de publications). La deuxième partie de la thèse s'intéresse à l'infection et à l'inhibition des anticorps dans un modèle de co-culture contenant des cellules isolées provenant de tissus du FGT et dans un modèle d'explant de tissus du FGT (Résultats sous forme de résultats préliminaires).

1. Infection et inhibition des DC et des LT CD4 dans un modèle de co-culture

1.1. Infection des DC par du virus libre et inhibition de la transmission aux LT CD4 (co-culture autologue) (Publication 1 et 2)

Résultat 1 : Infection des DC par du virus libre et transmission aux LT CD4

Au laboratoire, nous avons étudié l'infection de différents sous-types de DC présent dans les muqueuses (monocytes dérivés en DC (MoDC), DC de type Langerhans (LC), DC de type interstitiel (iDC) et DC de type plasmacytoïdes (pDC)) et la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4 autologues en présence et en absence d'anticorps neutralisants. Ces études ont été réalisées à partir de cellules isolées et/ou générées provenant du sang périphérique et du sang de cordon ombilical. Dans un premier temps, nous avons observé une réplication virale augmentée dans tous ces types de DC lorsqu'ils sont co-cultivés avec les LT CD4 autologues (provenant du même donneur) (Publication 1 et 2). Cette augmentation est corrélée à la diminution de l'expression du facteur de restriction SAMHD1, présent dans les DC (Publication 1). Les différents sous-types de DC transmettent efficacement le VIH-1 aux LT CD4 autologues (Publication 1 et 2).

Résultat 2 : Inhibition de la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4

Nous avons ensuite analysé la capacité inhibitrice des anticorps neutralisants sur la transmission du virus des DC aux LT CD4 dans les différents modèles de co-culture. Les anticorps neutralisants VRC01 dirigé contre le site d'attachement du CD4 (Publication 1 et 2) et 4E10 dirigé contre la région MPER de la gp41 (Publication 2) inhibent efficacement la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4. Cette inhibition

est similaire à l'inhibition de l'infection des LT CD4 par du virus libre (Publication 1 et 2). De plus, les anticorps diminuent la réplication virale dans les différents sous-types de DC. Cette inhibition de la réplication virale varie en fonction des sous-types de DC utilisées (Publication 1 et 2). Cette diminution est corrélée à l'augmentation de la maturation des DC (exprimé par l'expression du marqueur CD83 et/ou CD86) et la production d'IFN- α en présence d'anticorps (Publication 1 et 2). Ces résultats démontrent une activité inhibitrice additionnelle impliquant la partie Fc des anticorps aux récepteurs Fc (RFc) présent à la surface des DC. Dans la co-culture MoDC/LT, la présence des inhibiteurs des RFc induit une inhibition partielle de la réplication virale dans les MoDC. Les inhibiteurs des RFc dans la co-culture n'influencent pas sur l'inhibition de la transmission des DC aux LT CD4, qui reste similaire en présence et absence de ces inhibiteurs (Publication 2). Ces résultats démontrent donc l'importance des activités inhibitrices des anticorps médiées par la partie Fc dans l'inhibition de l'infection par le VIH-1.

Dans ces études, nous avons analysé l'infection des DC par du virus libre et l'inhibition de la transmission des DC aux LT CD4 par les anticorps dans un modèle co-culture autologue. Lors d'une transmission par voie hétérosexuelle, le fluide séminal contient du virus libre et des cellules infectées. Des études réalisées *in vivo* et *ex vivo* ont montré que la transmission des cellules infectées est beaucoup plus efficace comparé à celle par du virus libre (Bernard-Stoecklin et al., 2013 ; Kolodkin-Gal et al., 2013 ; Lawrence et al., 2012 ; Sallé et al., 2010). Ainsi, l'étude de l'infection des DC et des LT CD4 par des cellules infectées dans ce contexte de co-culture serait particulièrement intéressante.

Publication 1

L'anticorps neutralisant à large spectre VRC01 empêche la transmission du VIH-1 des cellules dendritiques plasmacytoïdes aux lymphocytes T CD4

Broadly Neutralizing Antibody VRC01 prevents HIV-1 Transmission from Plasmacytoid Dendritic Cells to CD4 T Lymphocytes

Bin Su, Alexandre Lederle, Géraldine Laumond, Camille Ducloy, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville and Christiane Moog

Journal of Virology, 2014.

Broadly Neutralizing Antibody VRC01 Prevents HIV-1 Transmission from Plasmacytoid Dendritic Cells to CD4 T Lymphocytes

Bin Su,^a Alexandre Lederle,^{b*} Géraldine Laumond,^a Camille Ducloy,^a Sylvie Schmidt,^a Thomas Decoville,^a Christiane Moog^a

INSERM U1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France^a; INSERM U1110, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France^b

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) poorly replicate human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) but efficiently transfer HIV-1 to adjacent CD4 T lymphocytes. We found that coculture with T lymphocytes downregulates SAMHD1 expression, enhances HIV-1 replication, and increases pDC maturation and alpha interferon (IFN- α) secretion. HIV-1 transfer to T lymphocytes is inhibited by broadly neutralizing antibody VRC01 with efficiency similar to that of cell-free infection of T lymphocytes. Interestingly, prevention of HIV-1 transmission by VRC01 retains IFN- α secretion. These results emphasize the multiple functions of VRC01 in protection against HIV-1 acquisition.

Novel broadly neutralizing antibodies (bNAb), such as VRC01, are able to inhibit a broad spectrum of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains with a neutralization breadth of >90% (1–7). Their protective role has been extensively studied in various experimental infection models, including non-human primates (NHP) and humanized mice (8–13). Plasmacytoid dendritic cells (pDC) link innate and adaptive immunity and produce various cytokines and chemokines, especially type I interferons (IFN) (14–16). In addition, pDC present antigens and stimulate adaptive immune response as antigen-presenting cells, although with less efficiency than myeloid dendritic cells (mDC) (17–19). pDC were susceptible to HIV-1 infection (20, 21) with low levels of viral replication due to expression of various host restriction factors, such as SAMHD1 (22, 23). SAMHD1 restriction can be counteracted by the presence of Vpx, a viral protein found in HIV-2 or in simian immunodeficiency virus (SIV) from macaques (SIV_{mac}) (23, 24) but absent in HIV-1 (25, 26). Despite low HIV-1 replication in pDC, these cells efficiently transfer HIV-1 to adjacent CD4 T lymphocytes (27–29). HIV-1 transfer has been well described in immature monocyte-derived dendritic cells (MoDC) as a two-phase transfer with first a direct cell-to-cell passage of virus in *trans* followed by *cis*-infection with newly produced viruses (30, 31; reviewed in references 32–34). Here, we aim to analyze early phases of HIV-1 transfer from primary pDC to CD4 T lymphocytes and the effect of bNAb VRC01 on this transfer.

We used an HIV-1 transfer assay previously reported (31, 35) to mimic early mucosal HIV-1 infection and dissemination in which pDC bind and take up HIV-1 and transfer the virus in *trans* to CD4 T cells. Primary pDC isolated by BDCA-4 MicroBead kits (Miltenyi) from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated for 2 h with 500 ng/ml of primary HIV-1_{BaL} isolate (NIH, MD) or transmitted/founder (T/F) primary isolate HIV-1_{Bx11} (obtained before seroconversion from a French HIV-infected individual [36]). After extensive washing, autologous phytohemagglutinin (PHA; 2 μ g/ml)-interleukin 2 (IL-2; 0.1 μ g/ml)-activated CD4 T cells, purified by positive selection after pDC purification, and anti-HIV-1 bNAb VRC01 (kindly provided by J. R. Mascola, NIH) were added to HIV-1-loaded pDC. After 72 h, we determined HIV-1 replication in the different cell types by flow cytometry (Fig. 1A). We found HIV-1_{BaL} replication occurred in CD4 T cells (3.6% of CD3⁺ T cells were p24⁺), demon-

strating HIV-1 transfer from pDC to CD4 T cells (Fig. 1A). These percentages of p24⁺ cells correspond to newly synthesized virions, as addition of the reverse transcriptase inhibitor zidovudine (AZT) (5 μ M; Sigma-Aldrich) completely abrogated the detection of p24⁺ cells (Fig. 1A). Interestingly, the percentage of infected pDC was significantly higher in the presence of CD4 T cells (8% of CD123⁺ pDC were p24⁺) than that in the absence of CD4 T cells (3% of CD123⁺ pDC were p24⁺) (Fig. 1A). An association between the percentage of HIV-1 replication in CD4 T cells and in pDC (Fig. 1B) was observed, suggesting a high degree of cooperation between CD4 T cells and pDC to promote HIV-1 replication.

The increased HIV-1 replication in pDC following cocultivation with activated CD4 T cells was confirmed with $n = 9$ donors ($P < 0.0001$) (Fig. 1C). This increase was similar to that observed in the presence of virus-like particles containing Vpx (VLP-Vpx) (Fig. 1C). In parallel, we found a downregulated SAMHD1 expression in pDC ($P = 0.0463$) cocultivated with CD4 T cells (Fig. 1D). A decreased SAMHD1 expression was also observed in the presence of VLP-Vpx, although this difference was not statistically significant ($P = 0.0899$). Interestingly, SAMHD1 levels were also decreased in pDC cocultivated with autologous CD4 T cells in the absence of HIV-1 infection. These results suggest that SAMHD1 not only plays a critical role in HIV-1 restriction but may also modulate biological functions occurring during pDC-lymphocyte cross talk, as shown for MoDC (35).

As the selection of T/F virus occurs at the mucosal portal of HIV entry and disseminates through the body (37–41), the eval-

Received 17 June 2014 Accepted 19 June 2014

Published ahead of print 25 June 2014

Editor: B. H. Hahn

Address correspondence to Bin Su, binsu.paris7@gmail.com, or Christiane Moog, c.moog@unistra.fr.

* Present address: Alexandre Lederle, INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, Créteil, France.

B.S. and A.L. contributed equally.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JVI.01748-14

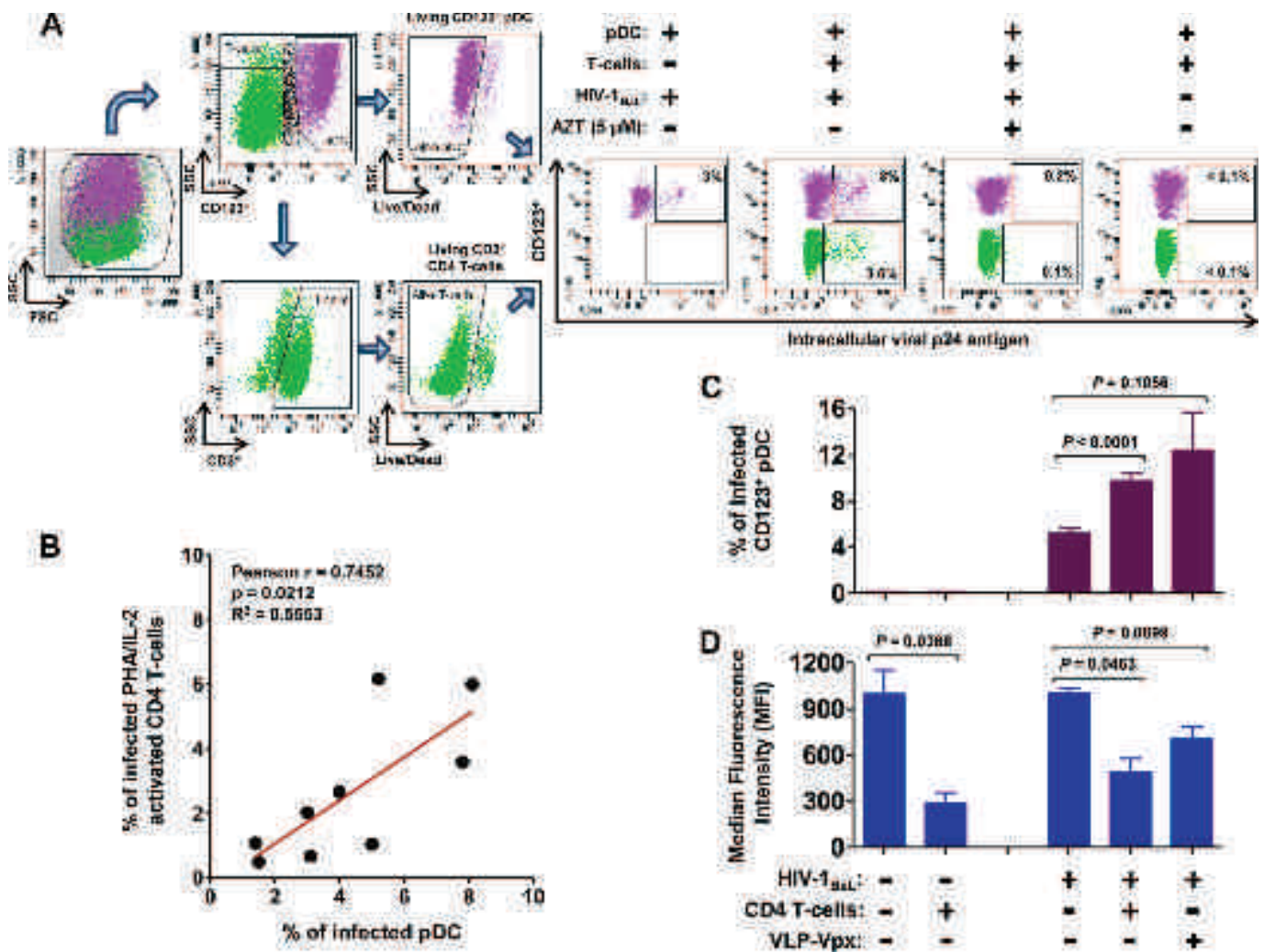


FIG 1 Measurement of HIV-1 infection and SAMHD1 expression in pDC cocultured with autologous activated CD4 T lymphocytes. (A) The gating strategy for detection of HIV-1 replication in pDC. Among all events, forward width and forward area were used to exclude doublet cells; forward angle and side scatter light gating were used to exclude cell debris. Ab directed against human CD123 (pDC-specific surface marker) was used to select CD123⁺ pDC; Ab directed against human CD3 was used to select CD3⁺ CD4 T cells. Dead cells were then excluded with the Live/Dead fixable dead cell stain fluorescence kits (Invitrogen, CA). Percentages of living CD123⁺ pDC and CD3⁺ CD4 T cells that are infected by primary clinical HIV-1_{BAL} can be determined (31). Dot plots represent CD123⁺ pDC (in pink), infected with a primary HIV-1_{BAL} isolate or uninfected, and CD3⁺ CD4 T cells (in green) in the coculture. The HIV-1 reverse transcriptase inhibitor AZT (5 μ M) was added to the coculture at the same time as CD4 T cells, as a control for HIV-1 replication. Experiments were performed in duplicate, and the mean percentages of intracellular p24⁺ pDC or CD4 T cells are shown. Productive infection was quantified by flow cytometry, based on the detection of intracellular viral p24 antigen in both cell populations after 72 h of culture. Multicolor samples were acquired on an LSRII SORP cytometer (BD Biosciences). The final analysis was performed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) Diva software, which generated a graphical output. (B) Curve for the correlation between the mean values of percentages of infected pDC and infected CD4 T cells in coculture conditions. Pearson's correlation coefficient and its significance are shown. $n = 9$ experiments performed with cells from 9 healthy blood donors for panels A and B. Percentage of HIV-1-infected CD123⁺ pDC (C) and median fluorescence intensity (MFI) for SAMHD1 expression (D) in CD123⁺ pDC cocultured with PHA-IL-2-activated CD4 T cells were measured at 72 h postinfection in the absence or presence of virus, autologous CD4 T cells, or VLP-Vpx (kindly provided by O. Schwartz, Institut Pasteur). For staining of SAMHD1 expression, anti-SAMHD1 Ab (clone I19-18) (kindly provided by O. Schwartz [35, 63]) was used following incubation with goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG1-phycoerythrin (PE) (Beckman-Coulter). The data are the means \pm standard errors of the means (SEM) of pDC from 9 healthy blood donors (C) and 3 donors (D). Statistical analysis was performed using the two-tailed paired t test, and P values of <0.05 are considered significant (GraphPad Prism 5.04 software, GraphPad, California).

uation of inhibitory activity of anti-HIV-1 bNAb capable of preventing mucosal T/F HIV transmission is critical for the development of effective prophylactic and therapeutic vaccines. We thus investigated the inhibitory activity of bNAb VRC01 on the transfer of HIV-1_{BAL} and T/F HIV-1_{Bx11} primary isolates (Fig. 2A to C and D to F, respectively). First, the relative contribution of HIV-1 transfer *in trans* was investigated by the addition of the protease inhibitor, indinavir (IDV; 1 μ M; NIAID, NIH) (42). IDV blocks

final assembly and maturation of newly synthesized virions and is therefore restricting to HIV-1 transfer *in trans*. In the presence of IDV, we observed a decrease of 76% and 49% of the percentages of HIV-1_{BAL}- and T/F HIV-1_{Bx11}-infected CD4 T cells, respectively, compared with control cells in the absence of IDV, indicating that 24% and 51% of infected CD4 T cells correspond to *trans*-infection at 72 h postinfection (Fig. 2A and D); the additional infected CD4 T cells were the results from *de novo* infection *in cis*. More-

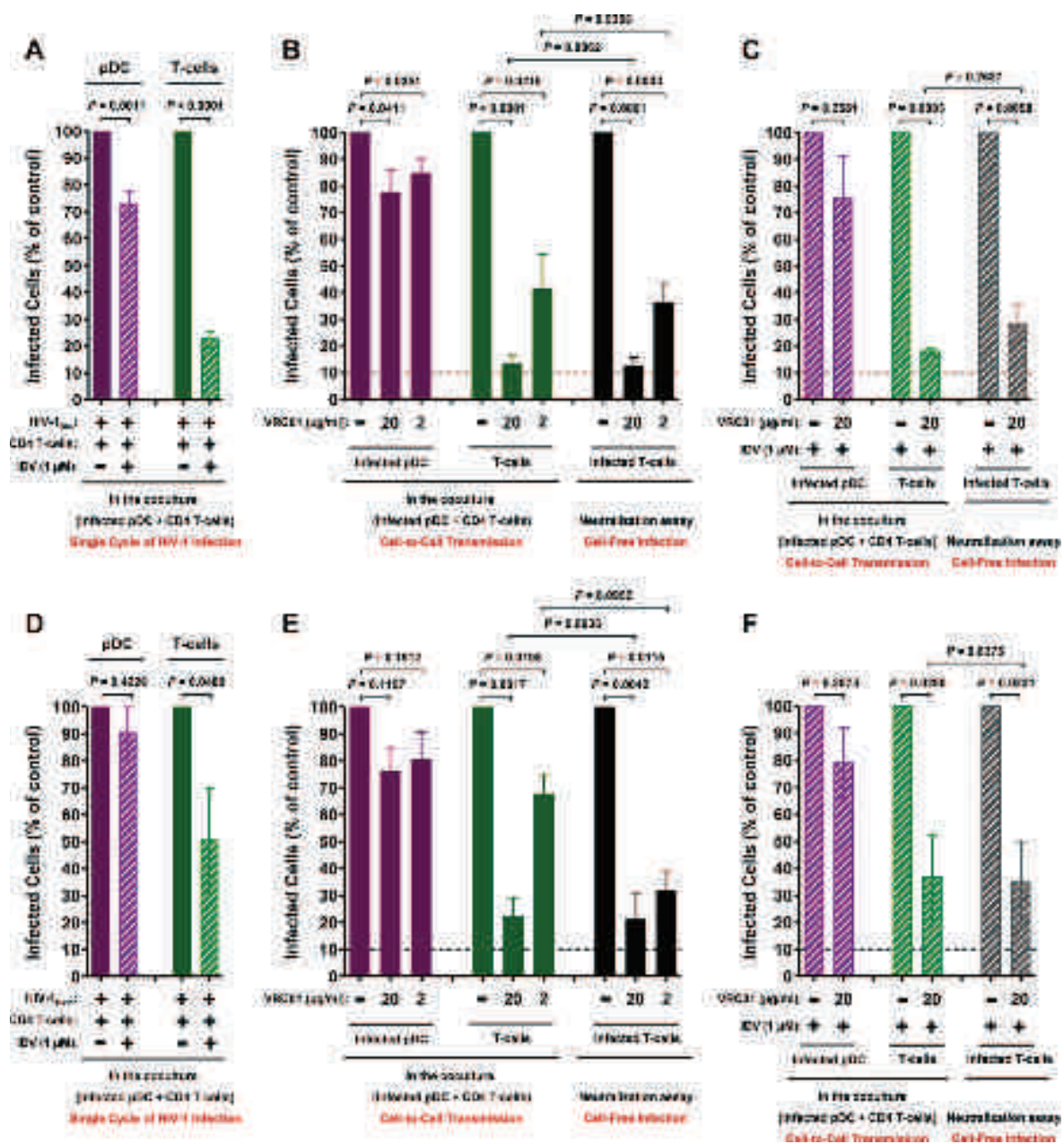


FIG 2 Inhibition of HIV-1 transfer by bNAb VRC01. (A) Single cycle of HIV-1_{BaL} infection. Percentages of infection in each cocultured cell population in the presence of the HIV-1 protease inhibitor indinavir (IDV; 1 μM; NIAID, NIH) compared to control cells (in the absence of IDV). Data are expressed as the means ± SEM from $n = 7$ healthy blood donors. (B) The percentage of infection of pDC by HIV-1_{BaL} in the presence of various concentrations of VRC01 (kindly provided by J. R. Mascola, NIH) compared to control cells without VRC01 is represented. (C) IDV (1 μM) was added at the same time as VRC01 and CD4 T cells to limit HIV-1_{BaL} transfer *trans*. After 72 h, the percentages of infected CD4 T cells (in green) and infected pDC (in pink) were determined by flow cytometry. Data are means ± SEM from at least 6 independent experiments with cells from 6 healthy blood donors. The capacity of VRC01 to inhibit HIV-1_{BaL} cell-free infection of CD4 T cells (with a conventional neutralization assay using autologous activated CD4 T cells, $n > 4$ healthy blood donors) was analyzed (in black). HIV-1 infection in primary pDC and CD4 T cells (D) and inhibitory activity of bNAb VRC01 (E and F) were assessed under the same conditions as described for panels A, B, and C in the presence of transmitted/founder HIV-1_{Bx11} virus. Means ± SEM from at least 3 independent experiments performed with pDC from 3 healthy blood donors are shown. Statistical analysis was performed using the two-tailed paired *t* test, and *P* values of < 0.05 are considered significant.

over, 73% and 90% of pDC were infected with HIV-1_{BaL} and T/F HIV-1_{Bx11}, respectively, in the presence of IDV, compared to control-infected pDC (in the absence of IDV). Therefore, although primary pDC are less susceptible to HIV-1_{Bx11} infection (about 3% of CD123⁺ pDC were p24⁺) than to HIV-1_{BaL} (about 8% of CD123⁺ pDC were p24⁺), a single cycle of infection was detected for both viruses at 72 h (Fig. 2A and D), allowing the investigation

of the inhibition of HIV-1 transfer *in trans* from pDC to CD4 T cells by bNAb.

When the bNAb VRC01 was added at the concentration of 20 μg/ml to HIV-1-loaded pDC at the same time as activated CD4 T cells, transfer of HIV-1_{BaL} and T/F HIV-1_{Bx11} to CD4 T cells was prevented by 87% and 78%, respectively (Fig. 2B and E). In contrast, HIV-1 replication in pDC only slightly decreased (about

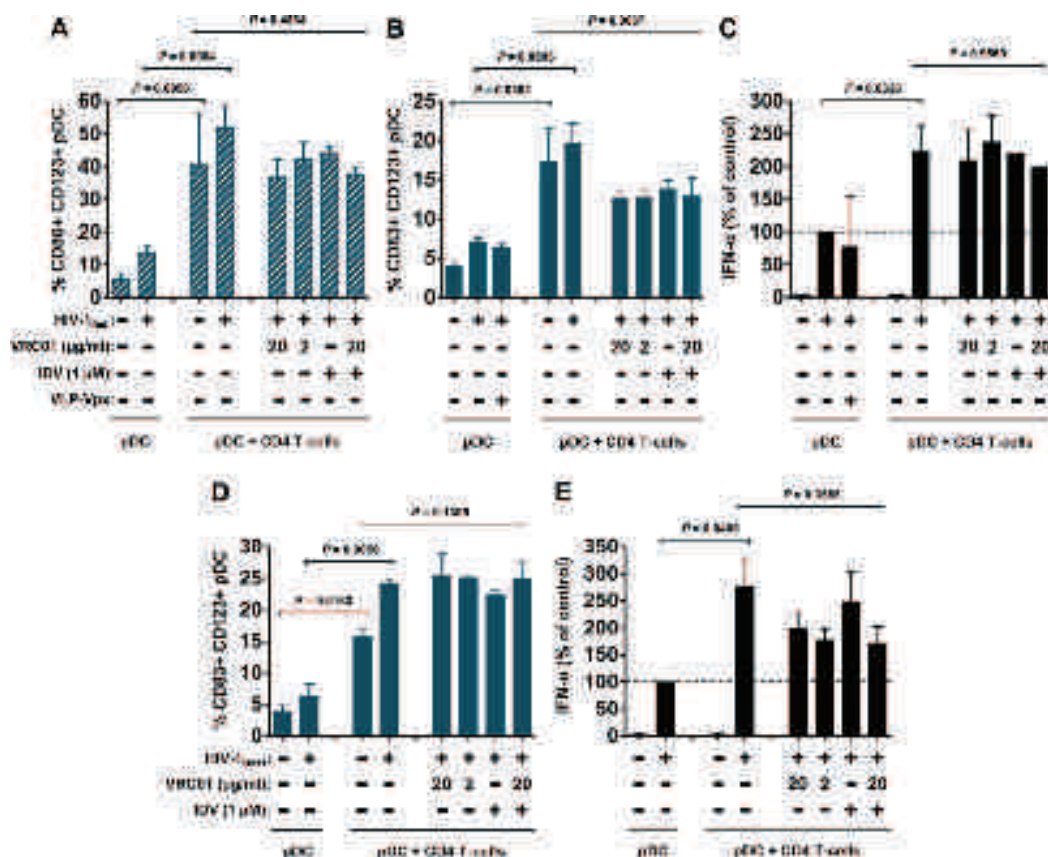


FIG 3 Coculture with CD4 T lymphocytes enhances maturation and innate sensing of HIV-1-infected pDC. The percentages of CD123⁺ pDC expressing CD86⁺ (A) and CD83⁺ (B and D) were determined by flow cytometry following infection of HIV-1_{BaL} (A and B) or T/F HIV-1_{Bx11} (D) in the presence of activated CD4 T cells and various concentrations of VRC01, IDV (1 μ M), or VLP-Vpx at 72 h postinfection. (C, E) IFN- α secretion in the supernatants of pDC infected with HIV-1_{BaL} (C) or T/F HIV-1_{Bx11} (E) was detected using the Verikine human IFN- α MultiSubtype enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (PBL Interferon Source, New Jersey) under the same conditions as described for panel B compared to the control (HIV-1-infected pDC alone) at 72 h postinfection. At least 6 independent experiments performed with pDC from 6 healthy blood donors are shown for HIV-1_{BaL}, and 3 independent experiments with cells from 3 healthy blood donors are shown for T/F HIV-1_{Bx11}. Statistical analysis was performed using the two-tailed paired *t* test, and groups were compared by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) with *P* values of <0.05 considered significant.

20%) when VRC01 was added 2 h after incubation of pDC with HIV-1_{BaL} or T/F HIV-1_{Bx11} (Fig. 2B and E). We further analyzed the effect of VRC01 on HIV-1 transfer *in trans* by adding IDV to the cocultures (Fig. 2C and F). We observed a similar inhibition of CD4 T cell infection in the presence of 20 μ g/ml of VRC01, demonstrating its capacity to inhibit HIV-1 transfer *in trans* from pDC to CD4 T cells as well as further transfer *in cis* to CD4 T cells. Besides, we compared VRC01-mediated inhibition of transfer with inhibition of cell-free viral particles infecting CD4 T cells in a conventional neutralization assay. Equivalent percentages of infected T cells and similar NAb inhibitory concentrations were recorded for both assays (Fig. 2B and C or E and F). These results indicate that HIV-1 transfer from pDC to CD4 T cells is inhibited to a similar extent as cell-free virus particles in these culture conditions. A similar inhibition was previously observed between cell-free and HIV-1 transfer from MoDC to CD4 T cells (31) and confirmed in this study. Interestingly, a similar inhibitory activity of VRC01 was recently reported for the HIV-1 transmission from macrophages to T cells (43). In contrast, Abela et al. and Sagar et al. found that VRC01 did not block cell-mediated HIV-1 transmission from HIV-1-infected PBMC or mature MoDC to TZM-bl target cells and proposed that cell-to-cell transmission enabled

HIV-1 to evade inhibition by anti-gp120 Ab (44, 45). Several mechanisms might be explained by the different findings observed. First, the difference of inhibitory activity may be attributed to the HIV-1 target cells used in the transfer assay. As TZM-bl overexpress CD4/CCR5 HIV-1 receptor/coreceptor entry molecules, we may hypothesize that higher concentrations of VRC01 are necessary to prevent binding to receptor/coreceptor on these cells. Second, immunological synapse formation may differ according to the type of cell used. DC-lymphocyte cross talk involves ICAM-1 and LFA-1 adhesion molecules and stabilizes interactions (33, 35, 43, 46, 47) that are absent on TZM-bl cell lines (48, 49). The strength of the synapse established and the efficiency of HIV-1 transfer may influence the inhibitory activity of HIV-1-specific NAb, making the comparison with different donor/target cell pairs difficult (50). In this regard, the close interaction between DC and autologous lymphocytes may modulate the immune response (32, 35, 51–54). Finally, the density of Env expressed on infected cells may influence the potential of NAb inhibition. In this regard, the amount of Env expressed on infected pDC may be lower than that expressed on other infected cells. Therefore, although more energy may be required to block fusion between infected pDC and uninfected T cells compared to the

energy required to block fusion between free virus particles and T cells, this type of event may be limited by the amount of Env expressed on pDC, limiting the concentration of NAb required. In conclusion, the NAb activity in cell-to-cell transmission versus cell-free infection will be difficult to normalize, as it relies on the capacity to enter and infect the different cell types (reviewed in reference 55–57).

Cross talk between pDC and lymphocytes induces immune activation; the expression of the costimulation marker CD86 and DC maturation marker CD83 was therefore determined on the surface of HIV-1-infected pDC in the presence or absence of VRC01. Infection with HIV-1_{BaL} or HIV-1_{BX11} did not induce pDC maturation, but the maturation markers were increased in the context of coculture with CD4 T cells in the presence or absence of HIV-1 and independently of VRC01 or IDV treatment (Fig. 3A, B, and D). Similar triggering of DC maturation by DC-lymphocyte cross talk was also described for MoDC (31). As pDC are the major producers of type I IFN in response to viral infection (15), IFN- α production was measured in the supernatants (Fig. 3C and E). We found that IFN- α secretion was induced following HIV-1_{BaL} or HIV-1_{BX11} infection, and this production varied between 10 and 200 ng/ml, depending on the donors. Moreover, IFN- α production was significantly increased in the presence of CD4 T cells (Fig. 3C and E). Noteworthy, IFN- α production was not decreased following VRC01 inhibition of HIV-1 transfer or IDV treatment (Fig. 3C and E). These results contrast with the recent reports showing a decreased IFN- α production in the presence of viral inhibitory concentrations of VRC01 using other experimental conditions, i.e., PBMC as a source of pDC cocultured with HIV-1-infected MT4C5 lymphoblastoid T cells and detection of type I IFN with reporter cell line HL116 (58). Different experimental protocols, as well as different detection methods, may explain our discrepant findings. Of note, the transduction of VLP-Vpx to infected pDC failed to induce pDC maturation and IFN- α production (Fig. 3B and C), consistent with previous reports (22). Our findings indicate that pDC-lymphocyte cross talk contributes to pDC activation and innate immune sensing of HIV-1.

Recent studies showed that pDC sense hepatitis C virus (HCV)- or lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-infected cells (59, 60), and viral transmission by cell-to-cell contacts are more potent inducers of IFN than infection by cell-free viral particles (61, 62). We confirmed and extended these data to HIV-1 transfer from primary pDC to CD4 T lymphocytes. Interestingly, IFN- α induced in cocultured pDC by HIV-1 and the pDC maturation was not modified following the inhibition of HIV-1 transfer by VRC01. These results suggest that increased immune sensing and DC maturation during pDC-lymphocyte cross talk could promote efficient innate immune responses and the ability to control viral infection. Moreover, we observed a significant downregulation of host restriction factor SAMHD1 in pDC following coculture with autologous CD4 T cells, which might be responsible for the increase of IFN- α production by cocultured infected pDC. Therefore, we propose that the involvement of SAMHD1 in the restriction of HIV-1 replication and in the triggering of immune responses described for MoDC (35, 63) also accounts for primary pDC.

In summary, we demonstrate that the potent and bNAb VRC01 inhibits transfer of a T/F primary isolate from primary pDC to CD4 T lymphocytes with an efficiency similar to that of

cell-free infection of CD4 T lymphocytes. These findings are very encouraging observations for the *in vivo* role of bNAb in protection from early HIV-1 transmission and rapid dissemination in the body. Together with previous studies (31, 64, 65; reviewed in reference 55), these results suggest that at the mucosal portal of HIV-1 entry, the enhanced virus replication in pDC promotes HIV-1 transfer to neighboring CD4 T lymphocytes. HIV-1-specific NAb may prevent this early virus dissemination if locally present early after sexual transmission.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank O. Schwartz (Institut Pasteur, Unité Virus et Immunité, Paris, France) for the generous gift of antibody against human SAMHD1 and VLP-Vpx. We thank J. R. Mascola (NIH, Bethesda, MD), who kindly provided bNAb VRC01.

We thank our financial support from the EuroNeut41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), Sidaction, Dormeur Investment Service Ltd., Fonds de Dotation Pierre Berge, Vaccine Research Institute, and French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). B.S. and A.L. were supported by French fellowship from ANRS.

B.S. and A.L. performed the experiments; B.S., A.L., and C.M. analyzed the data; B.S., A.L., G.L., C.D., S.S., T.D., and C.M. contributed to reagents, materials, and analysis tools; B.S., A.L., and C.M. conceived the study, designed the experiments, and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

We declare that we have no conflicting financial interests.

REFERENCES

- Mascola JR, Haynes BF. 2013. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunol. Rev.* 254:225–244. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12075>.
- Klein F, Mouquet H, Dosenovic P, Scheid JF, Scharf L, Nussenzweig MC. 2013. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science* 341:1199–1204. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1241144>.
- Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. 2013. Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat. Rev. Immunol.* 13:693–701. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3516>.
- Kwong PD, Mascola JR. 2012. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. *Immunity* 37:412–425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.012>.
- Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Pognard P, Protocol G Principal Investigators. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477:466–470. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10373>.
- Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD. 2010. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329:811–817. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1192819>.
- Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD, Wu L, Xu L, Longo NS, McKee K, O'Dell S, Louder MK, Wycuff DL, Feng Y, Nason M, Doria-Rose N, Connors M, Kwong PD, Roederer M, Wyatt RT, Nabel GJ, Mascola JR. 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* 329:856–861. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1187659>.
- Shingai M, Nishimura Y, Klein F, Mouquet H, Donau OK, Plishka R, Buckler-White A, Seaman M, Piatak M, Jr., Lifson JD, Dimitrov DS, Nussenzweig MC, Martin MA. 2013. Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* 503:277–280. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12746>.
- McCoy LE, Weiss RA. 2013. Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *J. Exp. Med.* 210:209–223. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20121827>.
- Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, Stephenson KE, Chang HW, Shekhar K, Gupta S, Nkolola JP, Seaman

- MS, Smith KM, Borducchi EN, Cabral C, Smith JY, Blackmore S, Sanisetty S, Perry JR, Beck M, Lewis MG, Rinaldi W, Chakraborty AK, Poignard P, Nussenzweig MC, Burton DR. 2013. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature* 503:224–228.
11. Veselinovic M, Neff CP, Mulder LR, Akkina R. 2012. Topical gel formulation of broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody VRC01 confers protection against HIV-1 vaginal challenge in a humanized mouse model. *Virology* 432:505–510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.06.025>.
 12. Klein F, Halper-Stromberg A, Horwitz JA, Gruell H, Scheid JF, Bournazos S, Mouquet H, Spatz LA, Diskin R, Abadir A, Zang T, Dorner M, Billerbeck E, Labitt RN, Gaebler C, Marcovecchio PM, Incesu RB, Eisenreich TR, Bieniasz PD, Seaman MS, Bjorkman PJ, Ravetch JV, Ploss A, Nussenzweig MC. 2012. HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* 492:118–122. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11604>.
 13. Klein F, Gaebler C, Mouquet H, Sather DN, Lehmann C, Scheid JF, Kraft Z, Liu Y, Pietzsch J, Hurley A, Poignard P, Feizi T, Morris L, Walker BD, Fatkenheuer G, Seaman MS, Stamatatos L, Nussenzweig MC. 2012. Broad neutralization by a combination of antibodies recognizing the CD4 binding site and a new conformational epitope on the HIV-1 envelope protein. *J. Exp. Med.* 209:1469–1479. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20120423>.
 14. Fitzgerald-Bocarsly P, Jacobs ES. 2010. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J. Leukoc. Biol.* 87:609–620. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0909635>.
 15. Liu YJ. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23:275–306. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633>.
 16. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835–1837. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>.
 17. Sandgren KJ, Smed-Sorensen A, Forsell MN, Soldemo M, Adams WC, Liang F, Perbeck L, Koup RA, Wyatt RT, Karlsson Hedestam GB, Lore K. 2013. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently capture HIV-1 envelope glycoproteins via CD4 for antigen presentation. *J. Immunol.* 191:60–69. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202489>.
 18. O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. 2013. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 762:71–107. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0909635>.
 19. Miller E, Bhardwaj N. 2013. Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 254:170–189. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12082>.
 20. Smed-Sorensen A, Lore K, Vasudevan J, Louder MK, Andersson J, Mascola JR, Spetz AL, Koup RA. 2005. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 79:8861–8869. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.14.8861-8869.2005>.
 21. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.14.6710-6713.2001>.
 22. Bloch N, O'Brien M, Norton TD, Polsky SB, Bhardwaj N, Landau NR. 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. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2013.0119>.
 23. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segal E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474:654–657. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10117>.
 24. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson SK, Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn MP, Skowronski J. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474:658–661. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10195>.
 25. Tristem M, Marshall C, Karpas A, Hill F. 1992. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from Vpx and Vpr. *EMBO J.* 11:3405–3412.
 26. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326:662–669. <http://dx.doi.org/10.1038/326662a0>.
 27. Evans VA, Lal L, Akkina R, Solomon A, Wright E, Lewin SR, Cameron PU. 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. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-8-43>.
 28. Lore K, Smed-Sorensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA. 2005. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 201:2023–2033. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20042413>.
 29. Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG. 2002. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J. Virol.* 76:11033–11041. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.21.11033-11041.2002>.
 30. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stosel H, Romani N, Piatak M, Jr., Lifson JD, Pope M, Cunningham AL. 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103:2170–2179. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-09-3129>.
 31. Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma ME, Laumond G, Schmidt S, Decoville T, Proust A, Lambotin M, Holl V, Moog C. 2012. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* 120:3708–3717. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-03-418913>.
 32. Coleman CM, Gelas CS, Wu L. 2013. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 762:109–130. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4433-6_4.
 33. McDonald D. 2010. Dendritic cells and HIV-1 trans-infection. *Viruses* 2:1704–1717. <http://dx.doi.org/10.3390/v2081704>.
 34. Wu L, KewalRamani VN. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6:859–868. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1960>.
 35. Su B, Biedma ME, Lederle A, Peressin M, Lambotin M, Proust A, Decoville T, Schmidt S, Laumond G, Moog C. 2014. Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells. *J. Virol.* 88:5109–5121. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03057-13>.
 36. Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. 1997. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 71:3734–3741.
 37. Parrish NF, Gao F, Li H, Giorgi EE, Barbian HJ, Parrish EH, Zajic L, Iyer SS, Decker JM, Kumar A, Hora B, Berg A, Cai F, Hopper J, Denny TN, Ding H, Ochsenbauer C, Kappes JC, Galimidi RP, West AP, Jr., Bjorkman PJ, Wilen CB, Doms RW, O'Brien M, Bhardwaj N, Borrow P, Haynes BF, Muldoon M, Theiler JP, Korber B, Shaw GM, Hahn BH. 2013. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:6626–6633. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1304288110>.
 38. Parker ZF, Iyer SS, Wilen CB, Parrish NF, Chikere KC, Lee FH, Didugu CA, Berro R, Klasse PJ, Lee B, Moore JP, Shaw GM, Hahn BH, Doms RW. 2013. Transmitted/founder and chronic HIV-1 envelope proteins are distinguished by differential utilization of CCR5. *J. Virol.* 87:2401–2411. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02964-12>.
 39. Ochsenbauer C, Edmonds TG, Ding H, Keele BF, Decker J, Salazar MG, Salazar-Gonzalez JF, Shattock R, Haynes BF, Shaw GM, Hahn BH, Kappes JC. 2012. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 86:2715–2728. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06157-11>.
 40. Wilen CB, Parrish NF, Pfaff JM, Decker JM, Henning EA, Haim H, Petersen JE, Wojcechowskyj JA, Sodroski J, Haynes BF, Montefiori DC, Tilton JC, Shaw GM, Hahn BH, Doms RW. 2011. Phenotypic and immunologic comparison of clade B transmitted/founder and chronic HIV-1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 85:8514–8527. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00736-11>.
 41. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, Sun C, Grayson T, Wang S, Li H, Wei X, Jiang C, Kirchherr JL, Gao F, Anderson JA, Ping LH, Swanstrom R, Tomaras GD, Blattner WA, Goepfert PA, Kilby JM, Saag MS, Delwart EL, Busch MP, Cohen MS, Montefiori DC, Haynes BF, Gaschen B, Athreya GS, Lee HY, Wood N, Seighe C, Perelson AS, Bhattacharya T, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM. 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. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802203105>.
42. Mascola JR, Louder MK, Winter C, Prabhakara R, De Rosa SC, Douek DC, Hill BJ, Gabuzda D, Roederer M. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J. Virol.* 76:4810–4821. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.10.4810-4821.2002>.
 43. Duncan CJ, Williams JP, Schiffner T, Gartner K, Ochsenbauer C, Kappes J, Russell RA, Frater J, Sattentau QJ. 2014. High-multiplicity HIV-1 infection and neutralizing antibody evasion mediated by the macrophage-T cell virological synapse. *J. Virol.* 88:2025–2034. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03245-13>.
 44. Sagar M, Akiyama H, Etemad B, Ramirez N, Freitas I, Gummuluru S. 2012. Transmembrane domain membrane proximal external region but not surface unit-directed broadly neutralizing HIV-1 antibodies can restrict dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. *J. Infect. Dis.* 205:1248–1257. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis183>.
 45. Abela IA, Berlinger L, Schanz M, Reynell L, Gunthard HF, Rusert P, Trkola A. 2012. Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. *PLoS Pathog.* 8:e1002634. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002634>.
 46. Rodriguez-Plata MT, Puigdomenech I, Izquierdo-Useros N, Puertas MC, Carrillo J, Erkizia I, Clotet B, Blanco J, Martinez-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. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-10-42>.
 47. Sanders RW, de Jong EC, Baldwin CE, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, Berkhout B. 2002. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J. Virol.* 76:7812–7821. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.15.7812-7821.2002>.
 48. Kondo N, Melikyan GB. 2012. Intercellular adhesion molecule 1 promotes HIV-1 attachment but not fusion to target cells. *PLoS One* 7:e44827. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044827>.
 49. Tardif MR, Gilbert C, Thibault S, Fortin JF, Tremblay MJ. 2009. LFA-1 antagonists as agents limiting human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission and potentiating the effect of the fusion inhibitor T-20. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4656–4666. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00117-09>.
 50. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, Dorjbal B, Truong R, Derse D, Uchil PD, Heidecker G, Mothes W. 2013. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One* 8:e53138. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053138>.
 51. Kulpa DA, Brehm JH, Fromentin R, Cooper A, Cooper C, Ahlers J, Chomont N, Sekaly RP. 2013. The immunological synapse: the gateway to the HIV reservoir. *Immunol. Rev.* 254:305–325. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12080>.
 52. Hivroz C, Chemin K, Tourret M, Bohineust A. 2012. Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol.* 32:139–155. <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i2.30>.
 53. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, Sacristan C, Victoria GD, Zanin-Zhorov A, Dustin ML. 2010. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu. Rev. Immunol.* 28:79–105. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101308>.
 54. Dustin ML, Tseng SY, Varma R, Campi G. 2006. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* 18:512–516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2006.05.017>.
 55. Su B, Moog C. 2014. Which antibody functions are important for an HIV vaccine? *Front. Immunol.* 5:289. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00289>.
 56. Schiffner T, Sattentau QJ, Duncan CJ. 2013. Cell-to-cell spread of HIV-1 and evasion of neutralizing antibodies. *Vaccine* 31:5789–5797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.020>.
 57. Moris A. 2013. Antiviral treatments over cell-to-cell infection: is it just a matter of dose? *AIDS* 27:2481–2483. <http://dx.doi.org/10.1097/01.aids.0000432447.45486.03>.
 58. Malbec M, Porrot F, Rua R, Horwitz J, Klein F, Halper-Stromberg A, Scheid JF, Eden C, Mouquet H, Nussenzweig MC, Schwartz O. 2013. Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J. Exp. Med.* 210:2813–2821. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20131244>.
 59. Wieland SF, Takahashi K, Boyd B, Whitten-Bauer C, Ngo N, de la Torre JC, Chisari FV. 2014. Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells *in vitro*. *J. Virol.* 88:752–757. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01714-13>.
 60. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, Chisari FV. 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:7431–7436. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1002301107>.
 61. Lepelley A, Louis S, Sourisseau M, Law HK, Pothlichet J, Schilte C, Chaperot L, Plumas J, Randall RE, Si-Tahar M, Mammano F, Albert ML, Schwartz O. 2011. Innate sensing of HIV-infected cells. *PLoS Pathog.* 7:e1001284. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001284>.
 62. Schmidt B, Ashlock BM, Foster H, Fujimura SH, Levy JA. 2005. HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* 343:256–266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.059>.
 63. Puigdomenech I, Casartelli N, Porrot F, Schwartz O. 2013. SAMHD1 restricts HIV-1 cell-to-cell transmission and limits immune detection in monocyte-derived dendritic cells. *J. Virol.* 87:2846–2856. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02514-12>.
 64. Peressin M, Proust A, Schmidt S, Su B, Lambotin M, Biedma ME, Laumond G, Decoville T, Holl V, 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. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0000000000000193>.
 65. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud JL, Biedma ME, Holl V, Van Ham G, Heyndrickx L, Van Dorsselaer A, Katinger D, Vcelar B, Zolla-Pazner S, Mangeot I, Kelly C, Shattock RJ, Le Grand R. 2014. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol.* 7:46–56. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2013.23>.

Publication 2

**Détermination des anticorps potentiels en tant que stratégie
prohylactique/thérapeutique lors de l'infection précoce au VIH dans les
muqueuses**

Short communication:

*Exploring Antibody Potential as Prophylactic/Therapeutic Strategies for Prevention of Early
Mucosal HIV-1 Infection*

Bin Su, Maryse Peressin, Camille Ducloy, Julien Penichon, Luzia M.Mayr, Géraldine
Laumond, Sylvie Schmidt, Thomas Decoville and Christiane Moog.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, 2015.

Short Communication: Exploring Antibody Potential as Prophylactic/Therapeutic Strategies for Prevention of Early Mucosal HIV-1 Infection

Bin Su,¹ Maryse Peressin,² Camille Ducloy,¹ Julien Penichon,¹ Luzia M. Mayr,¹
Géraldine Laumond,¹ Sylvie Schmidt,¹ Thomas Decoville,^{1,3} and Christiane Moog^{1,3}

Abstract

Mucosal tissues are the predominant sites for genital HIV-1 transmission. We investigated the mechanisms by which broadly neutralizing antibodies (bNAbs) inhibit HIV-1 replication in a coculture model including primary mucosal dendritic cells (DCs), such as Langerhans cells, interstitial dendritic cells, and CD4⁺ T lymphocytes. We show that bNAbs efficiently prevent HIV-1 infection by inhibiting HIV-1 transmission to CD4⁺ T lymphocytes. This inhibition of cell-to-cell transmission was observed with equal potency as the inhibition of cell-free infection of primary CD4⁺ T lymphocytes. In addition, a decrease in HIV-1 replication in DCs and the induction of DC maturation were detected. This additional inhibition was Fc mediated as it was blocked by the use of specific anti-Fc γ R monoclonal Abs. The DC maturation by bNAbs during HIV transmission may contribute to mucosal protection. Therefore, multiple antibody-mediated inhibitory functions should be combined for the improvement of future preventive/therapeutic strategies to cure HIV.

GENITAL TRANSMISSION OF HIV in the mucosal tissues involves both cell-free and cell-associated virions to establish an infection.^{1–3} Various mucosal target cells including antigen-presenting cells (APCs) such as Langerhans cells (LCs), interstitial dendritic cells (iDCs), or plasmacytoid dendritic cells have the capacity to capture antigen, to migrate to draining lymph nodes, and to transfer HIV to surrounding memory CD4⁺ T cells.^{4–7} Dendritic cells (DCs) play a critical role in HIV transmission by transporting infectious HIV virions without being infected themselves (transfer in *trans*) or by transferring newly synthesized virus (transfer in *cis*).^{6,8,9} DCs provide short-term reservoirs before spreading HIV infection and establishing the long-lasting reservoir in central memory CD4⁺ T cells (T_{CM}).¹⁰ Moreover, DCs are involved in immune defense against HIV infection by generating and regulating innate and adaptive immune responses.^{11,12} Although the protective role of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) against cell-free HIV infection and cell-to-cell transmission *in vitro* has been largely described,^{13,14} their effect on cell-associated HIV-1 transmission following mucosal challenge has been poorly evaluated. The aim of this study was to decipher the mechanisms by which HIV-specific bNAbs inhibit HIV-1 replication and transmission to mucosal target cells.

We used a physiologically relevant model of HIV-1 transmission including various primary DCs to mimic early mucosal HIV-1 infection, as previously reported.^{15,16} Primary LCs and iDCs were generated from CD34⁺ stem cells as previously described¹⁵; monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) were isolated and differentiated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy blood donors by positive selection using CD14 MicroBeads selection kits and autoMACS (Miltenyi Biotec), respectively.¹⁶ The primary DCs were incubated for 2 h with 50–200 ng/ml of primary HIV-1_{BaL} isolate (NIH, Bethesda, MD). After extensive washing to remove unbound free viral particles, autologous, PHA (2 μ g/ml)/IL-2 (0.1 μ g/ml)-activated CD4⁺ T cells, purified by positive selection using CD4 MicroBeads after CD14⁺ purification, and anti-HIV-1 bNAbs VRC01 (directed against HIV Env gp120, kindly provided by Dr. John R. Mascola, NIH, Bethesda, MD) or 4E10 (against Env gp41, obtained from Polymun Scientific, Austria) were added to the HIV-1-loaded DCs. The percentages of infected cells and CD83⁺/CD86⁺ maturation markers were determined by flow cytometry after 72 h, and IFN- α multisubtype secretion (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ) was quantified by ELISA (Fig. 1A).

We assessed the inhibitory activity of bNAbs VRC01 and 4E10 using various inhibitory assays. VRC01 at a

¹INSERM UMR S_1109, Centre de Recherche en Immunologie et Hématologie, Faculté de Médecine, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

²Centre d'investigation clinique/Service de neurologie, INSERM CIC-P1434, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France.

³Vaccine Research Institute, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France.

concentration of 20 and 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 4E10 at a concentration of 100 and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ efficiently inhibited the transfer of PBMC-derived HIV-1_{BaL} primary isolate from DCs to autologous activated CD4⁺ T cells (Fig. 1B and C, green columns). Interestingly, VRC01 and 4E10 inhibited with a similar efficiency the infection of CD4⁺ T cells from the same donor by cell-free HIV-1_{BaL} in a conventional neutralization assay when normalized to display equivalent percentages of infected T cells (Fig. 1B and C, hatched green column). A similar bNAb-mediated inhibition was also observed with HIV-1_{BaL} or a transmitted/founder (T/F) primary isolate HIV-1_{Bx11} either transferred from pDCs or directly infecting CD4⁺ T cells.¹⁷

Noteworthy, using the TZM-bl assay (NIH, Bethesda, MD),¹⁸ a 10-fold more efficient inhibition of the cell-free HIV-1_{BaL} infection was measured for bNAb VRC01 whereas 4E10 performed poorly against this primary isolate on TZM-bl cells (Fig. 1B and C, black column). The surprisingly poor inhibition of bNAb 4E10 on the infection of TZM-bl cells by primary isolates was previously documented.¹⁹ These results emphasize the complexity of bNAb inhibition, which depends on the target cells, the virus, and the host cells used to propagate it. This makes a direct comparison between inhibitions of cell-free versus cell-to-cell HIV-1 transmission difficult.^{20,21} Further clarification of the role of bNAbs in the physiologically relevant mucosal tissues will be crucial for future vaccine and intervention strategies to prevent transmission.

DCs have been described as partially restricting HIV-1 replication and DC maturation further decreases their infection rate.¹⁶ Early after cross-talk with autologous lymphocytes, the susceptibility of HIV-1 replication in immature DCs increases.^{15,22} Surprisingly, we observed that VRC01 and 4E10 decreased DC infection, although they were added 2 h after HIV-1_{BaL} (Fig. 1B and C). LCs, iDCs, or MoDCs express various Fc γ receptors (Fc γ Rs) on their surfaces,^{15,16} while CD4⁺ T cells or the TZM-bl cells lack these receptors.²³

To investigate the involvement of Fc γ Rs on the mechanism of inhibition of DC infection by bNAbs, we blocked

these Fc γ Rs by addition of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of monoclonal Abs directed against human Fc γ RI, Fc γ RII, and Fc γ RIII (BD Pharmingen)¹⁶ to HIV-1_{BaL}-loaded MoDCs concomitantly with bNAbs (Fig. 1B and C). We found that the blockade of Fc γ Rs completely abrogated the anti-HIV-1 activity of VRC01 on MoDCs (Fig. 1B), indicating that the inhibition of DC infection by VRC01 involves Fc γ Rs present on the surface of these cells. Moreover, the blocking Fc γ Rs significantly impaired HIV-1 inhibitory activity of 4E10 on MoDCs ($p=0.0057$ at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and $p=0.0218$ at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of 4E10) (Fig. 1C). This impairment of 4E10 inhibitory activity is only partial, most likely because of the postfusion inhibitory potential of 4E10.^{24,25} Indeed, we previously showed that about 80% of HIV-1 particles had not yet fused 2 h after addition of virus to immature MoDCs,¹⁶ suggesting that the virus is still accessible to the postfusion inhibitory activity of 4E10. Of note, no changes in the inhibition of HIV-1 transfer to autologous activated CD4⁺ T cells that lack Fc γ Rs were observed in the presence of antihuman Fc γ Rs blocking Abs (Fig. 1B and C).

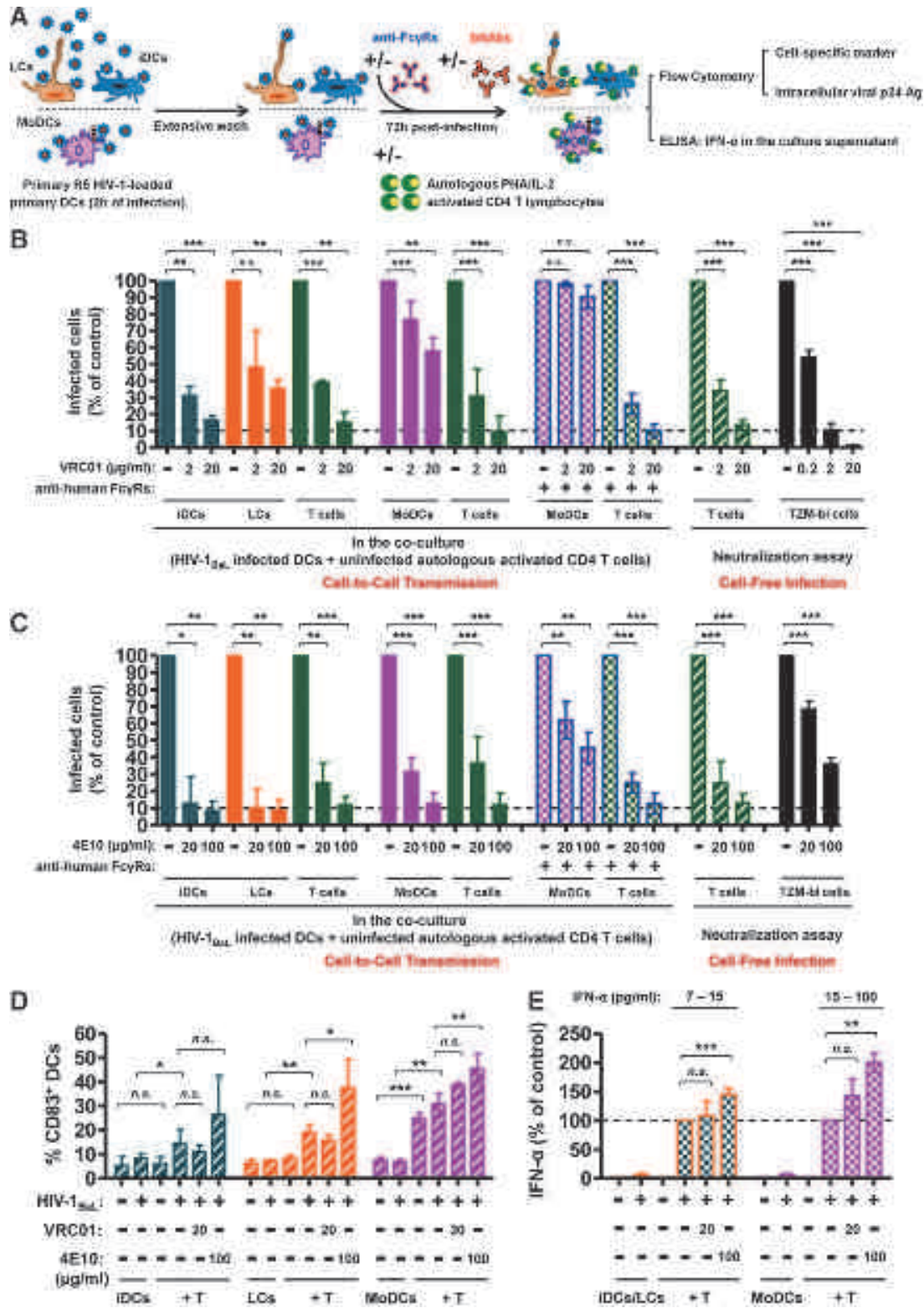
DC-T cell coculture stimulates HIV-1 replication in DCs and this stimulation was previously attributed to DC-T cell cross-talk.^{22,26} Interestingly, the addition of antihuman Fc γ Rs blocking Abs themselves reduced by 50% the stimulation of HIV-1 replication observed in cocultured MoDCs (data not shown). This reduction of HIV-1 replication in DCs may be due to the hindrance of DC-T cell cross-talk by Fc γ Rs blocking Abs. Additional investigations will be necessary to define the role of Fc receptor-mediated adhesion, signal transduction pathways and its effect on immunological synapse formation between DCs and T cells. Taken together, these results fully corroborate the key role of Fc γ Rs in bNAb-mediated antiviral inhibition of DC infection and of DC-to-T cell HIV-1 transmission *in vitro*^{15,16} and possibly *in vivo*.^{27,28}

As triggering of Fc γ Rs induces DC activation, we further assessed whether HIV-1-specific bNAbs activate DCs in our cell-to-cell HIV transmission assay. The expression of the DC maturation marker CD83 and costimulation marker CD86 was measured on the surface of HIV-1-infected DCs. We

FIG. 1. Inhibition of HIV-1 cell-free and cell-to-cell transmission by HIV-1-specific broadly neutralizing antibodies. (A) Experimental design: various primary dendritic cells (DCs) [interstitial dendritic cells (iDCs)+Langerhans cells (LCs), monocyte-derived dendritic cells (MoDCs)] were pulsed with a primary R5 HIV-1_{BaL} isolate for 2 h. They were then thoroughly washed and added to uninfected primary autologous PHA/IL-2-activated CD4 T lymphocytes treated/untreated with HIV-1-specific broadly neutralizing antibodies (bNAbs) VRC01 or 4E10. After 72 h, the percentage of HIV-1-infected cells in each cell population was determined on the basis of intracellular viral p24 antigen detection; CD83⁺ maturation markers were determined by flow cytometry and IFN- α production was quantified in the supernatants by ELISA. Ab directed against human CD11b was used to select CD11b⁺ iDCs, CD207 to select CD207⁺ LCs, and CD209 to select DC-SIGN⁺ MoDCs and Ab directed against human CD3 for CD3⁺ CD4 T lymphocytes. Dead cells were excluded with the Live/Dead fixable dead cell stain fluorescence kits (Invitrogen, Carlsbad, CA). Multicolor samples were acquired on an LSRII SORP cytometer (BD Biosciences). The percentage of cells infected with HIV-1_{BaL} is shown in each cell population in the presence of various concentrations of VRC01 (B) or 4E10 (C). In some experiments, a mixture of purified anti-Fc γ RI (CD64, clone 10.1), anti-Fc γ RII (CD32, clone 3D3), and anti-Fc γ RIII (CD16, clone 3G8) monoclonal Abs (BD Pharmingen) was added at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B, C) simultaneously with HIV-1-specific bNAbs. The capacity of VRC01 or 4E10 to inhibit HIV-1_{BaL} cell-free infection of CD4 T cells (in hatched green) or TZM-bl cells (in black) using a conventional neutralization assay was analyzed. (D) The percentage of DC expressing the DC maturation marker CD83⁺ on their surface was determined by flow cytometry following infection of HIV-1_{BaL} in the presence or absence of activated CD4 T cells, VRC01, or 4E10 72 h postinfection. (E) IFN- α secretion in the supernatants of DCs infected with HIV-1_{BaL} was detected using the Verikine Human IFN- α Multi-Subtype ELISA kit (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ)²² under the same conditions as in (D). Data are means \pm standard deviations (SD) from three to eight independent experiments with cells from different healthy blood donors. Statistical analysis was performed using the two-tailed paired *t* test or Wilcoxon matched-pairs signed rank test, and $p < 0.05$ was considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and n.s. = not significant). GraphPad Prism 5.04 software (GraphPad, San Diego, CA) was used for all statistical analyses.

found that the expression of CD83 and CD86¹⁷ was increased in the presence of HIV-1_{BaL} and HIV-1_{BX11}¹⁷ when DCs were cocultured with CD4⁺ T lymphocytes, and that these maturation markers were further increased by the addition of bNAb 4E10 (Fig. 1D). This maturation process could contribute to

the impairment of HIV-1 replication in DCs as mature DCs are less susceptible to R5 virus replication.^{16,29} DC maturation was enhanced for 4E10 at 100 μg/ml (*p* < 0.05) (Fig. 1D). This increased maturation is partially reverted after FcγRs blockade (data not shown) demonstrating that the binding of



4E10 to Fc γ Rs on DCs was partially responsible for their maturation. Noteworthy, bNAb 4E10 was particularly efficacious and displayed high inhibitory activity on DC infection in our coculture model (Fig. 1C). Additional studies will be necessary to determine if this high inhibitory activity of 4E10 on DCs is due to other functions such as its polyspecific properties or its capacity to bind to phospholipids.^{30,31} In contrast, bNAb VRC01 at 20 μ g/ml did not induce significant DC maturation, suggesting the involvement of additional mechanisms of Fc-mediated inhibition.

In addition to DC activation markers, we measured interferon (IFN)- α secretion in the supernatants by ELISA (Fig. 1E). We found that IFN- α secretion by infected DCs was significantly increased in the presence of autologous CD4⁺ T cells and this effect was maintained or even enhanced in the presence of bNAbs VRC01 or 4E10, respectively (Fig. 1E); this production was donor dependent. IFN- α is known to inhibit early stages of the HIV-1 replication cycle.^{12,32,33} A synergistic effect between IFN and antibodies was described for enterovirus 70 and adenovirus.³⁴ Whether such synergistic activity occurs in HIV has to be further analyzed. Altogether, the findings indicate that the increased DC maturation and persistence of IFN- α production in the presence of bNAbs may participate in the overall protection of cell-to-cell HIV-1 transmission.

In conclusion, we demonstrate for the first time that bNAbs not only inhibit cell-to-cell HIV-1 transmission, but also participate in the overall inhibition by decreasing HIV-1 replication in mucosal DCs and enhancing DC maturation and IFN- α production. These additional inhibitory functions involving the Fc domain of the antibody open a new area of research on Fc domain engineering (including an increase in serum half-life or modification of the affinity of the Fc region for various Fc receptors). Therefore, at the mucosal portal of HIV-1 entry, a complex network of virus–cell and cell–cell interactions induces multifunctional antibody inhibitory activities. These multiple antibody activities should be taken into consideration for the design of vaccine strategies to prevent early virus dissemination at mucosal frontlines, to contribute to protection against sexual transmission of HIV-1, and to create the next generation of antibody-based therapeutic agents.^{35–37}

Acknowledgments

We thank Dr. John R. Mascola (NIH, Bethesda) and Polymun who kindly provided bNAb VRC01 and 4E10, respectively. We thank our financial support from the ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral hepatitis), VRI (Vaccine Research Institute), EuroNeut41 (FP7-HEALTH-2007-A-201038), Sidaction, Dormeur Investment Service Ltd., and Fonds de Dotation Pierre Berge. B.S. was supported by a French fellowship from ANRS.

B.S. and C.M. conceived the study, designed the experiments, and analyzed the data. B.S., M.P., C.D., and J.P. performed the experiments; L.M.M., G.L., S.S., and T.D. contributed to reagents and materials; and B.S. and C.M. wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Xu H, Wang X, and Veazey RS: Mucosal immunology of HIV infection. *Immunol Rev* 2013;254(1):10–33.
- Carias AM, McCoombe S, McRaven M, *et al.*: Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol* 2013;87(21):11388–11400.
- Hladik F and McElrath MJ: Setting the stage: Host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 2008;8(6):447–457.
- Preza GC, Tanner K, Elliott J, *et al.*: Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014;30(3):241–249.
- Haase AT: Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 2010;464(7286):217–223.
- Piguet V and Steinman RM: The interaction of HIV with dendritic cells: Outcomes and pathways. *Trends Immunol* 2007;28(11):503–510.
- Shattock RJ and Moore JP: Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2003;1(1):25–34.
- Cunningham AL, Harman A, and Nasr N: Initial HIV mucosal infection and dendritic cells. *EMBO Mol Med* 2013;5(5):658–660.
- McDonald D, Wu L, Bohks SM, *et al.*: Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell–T cell junctions. *Science* 2003;300(5623):1295–1297.
- Chomont N, El-Far M, Ancuta P, *et al.*: HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009;15(8):893–900.
- Smed-Sorensen A and Lore K: Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS* 2011;6(5):405–410.
- Zhang Z and Wang FS: Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Immunol* 2005;2(6):411–417.
- Klasse PJ, Sanders RW, Cerutti A, and Moore JP: How can HIV-type-1-Env immunogenicity be improved to facilitate antibody-based vaccine development? *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012;28(1):1–15.
- Mascola JR and Montefiori DC: The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* 2010;28:413–444.
- Peressin M, Proust A, Schmidt S, *et al.*: Efficient transfer of HIV-1 in trans and in cis from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes. *AIDS* 2014;28(5):667–677.
- Su B, Xu K, Lederle A, *et al.*: Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* 2012;120(18):3708–3717.
- Su B, Lederle A, Laumond G, *et al.*: Broadly neutralizing antibody VRC01 prevents HIV-1 transmission from plasmacytoid dendritic cells to CD4 T lymphocytes. *J Virol* 2014;88(18):10975–10981.
- Sarzotti-Kelsoe M, Bailer RT, Turk E, *et al.*: Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J Immunol Methods* 2014;409:131–146.
- Polonis VR, Schuitemaker H, Bunnik EM, *et al.*: Impact of host cell variation on the neutralization of HIV-1 in vitro. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4(5):400–407.
- Su B and Moog C: Which antibody functions are important for an HIV vaccine? *Front Immunol* 2014;5:289.
- Schiffner T, Sattentau QJ, and Duncan CJ: Cell-to-cell spread of HIV-1 and evasion of neutralizing antibodies. *Vaccine* 2013;31(49):5789–5797.

22. Su B, Biedma ME, Lederle A, *et al.*: Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells. *J Virol* 2014;88(9):5109–5121.
23. Nimmerjahn F and Ravetch JV: Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008;8(1):34–47.
24. Alam SM, Morelli M, Dennison SM, *et al.*: Role of HIV membrane in neutralization by two broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(48):20234–20239.
25. Frey G, Peng H, Rits-Volloch S, *et al.*: A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(10):3739–3744.
26. Holl V, Xu K, Peressin M, *et al.*: Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *J Virol* 2010;84(9):4172–4182.
27. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud JL, *et al.*: Protective effect of vaginal application of neutralizing and non-neutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol* 2014;7(1):46–56.
28. Bournazos S, Klein F, Pietzsch J, *et al.*: Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity. *Cell* 2014;158(6):1243–1253.
29. Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, *et al.*: APO-BEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med* 2006;203(13):2887–2893.
30. Moody MA, Liao HX, Alam SM, *et al.*: Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce beta-chemokines. *J Exp Med* 2010;207(4):763–776.
31. Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, *et al.*: Cardiophilic polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 2005;308(5730):1906–1908.
32. Kaushik S, Teque F, Patel M, *et al.*: Plasmacytoid dendritic cell number and responses to Toll-like receptor 7 and 9 agonists vary in HIV Type 1-infected individuals in relation to clinical state. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013;29(3):501–510.
33. Reuter MA, Pombo C, and Betts MR: Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: Lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012;23(4–5):181–191.
34. Langford MP, Villarreal AL, and Stanton GJ: Antibody and interferon act synergistically to inhibit enterovirus, adenovirus, and herpes simplex virus infection. *Infect Immun* 1983;41(1):214–218.
35. Euler Z and Alter G: Exploring the potential of monoclonal antibody therapeutics for HIV-1 eradication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015;31(1):13–24.
36. Deeks SG, Aufran B, Berkhout B, *et al.*: Towards an HIV cure: A global scientific strategy. *Nat Rev Immunol* 2012;12(8):607–614.
37. Hope TJ: Moving ahead an HIV vaccine: To neutralize or not, a key HIV vaccine question. *Nat Med* 2011;17(10):1195–1197.

Address correspondence to:
Christiane Moog
INSERM U1109
Faculté de Médecine
Université de Strasbourg,
3 rue Koeberlé
67000 Strasbourg
France

E-mail: c.moog@unistra.fr

1.2. Infection des DC et des LT CD4 par des cellules infectées et inhibition de la transmission (co-culture allogénique) (Publication 3)

Dans cette étude, nous avons mis en place et développé, un modèle où des cellules infectées d'un donneur A sont co-cultivées avec des DC et les LT CD4 d'un receveur B. Les différentes cellules ont été isolées et générées à partir du sang périphérique. Cette étude a pour but de mimer une transmission des cellules contenues dans le sperme aux cellules résident dans les muqueuses. Ce modèle est le premier à décrire ce type de co-culture.

Résultat 1 : Transmission du virus de cellules infectées du donneur A aux cellules allogéniques (receveur B)

Nous observons que les cellules infectées du donneur A transmettent rapidement le virus aux DC et LT CD4 du receveur B après 24h de co-culture. De manière intéressante, nous observons que, dans ce modèle, les DC sont préférentiellement infectées à 24 et 72h post-infection. Après un traitement des cellules avec de l'AZT (inhibiteur de la transcriptase inverse), nous observons que l'infection des DC est productive. En présence d'IDV (inhibiteur de la protéase), la transmission du virus du donneur A aux cellules du receveur B est principalement en *cis* après 72h de co-culture. Nos résultats contredisent les résultats précédemment publiés décrivant la restriction du VIH-1 dans les DC.

Résultat 2 : Inhibition de la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4

Nous avons ensuite analysé la capacité inhibitrice de différents anticorps neutralisants dans cette co-culture : 3BNC117, dirigé contre le site d'attachement au CD4, 10-1074 et PGT121, dirigés contre la boucle variable V3 et 4E10, dirigé contre la région MPER de la gp41.

Les anticorps neutralisants inhibent la transmission du virus des cellules infectées du donneur A aux cellules du receveur B. De manière intéressante, nous observons également une diminution de la réplication virale dans les cellules du donneur A. Ces résultats nous montrent que, dans notre modèle de co-culture, les anticorps sont capables d'inhiber la transmission du virus des LT CD4 du donneur A aux cellules du receveur B mais également d'inhiber l'infection des LT CD4 du donneur A.

Publication 3

La transmission du VIH-1 des cellules T CD4 infectés aux cellules T CD4 et aux cellules dendritiques allogéniques est inhibée par les anticorps neutralisants à large spectre

Concise Communication

HIV transmission from infected CD4 T cells to allogenic T and dendritic cells is inhibited by broadly neutralizing antibodies

Camille Ducloy, Bin Su, Luzia Mayr, Jérôme Klingler, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Géraldine Laumond, Nathalie Salomé, Seiamak Bahram and Christiane Moog.

Soumis et accepté dans AIDS, le 7 mars 2018.

CONCISE COMMUNICATION

HIV transmission from infected CD4⁺ T cells to allogenic T and dendritic cells is inhibited by broadly neutralizing antibodies

AQ2

Camille **Ducloy**^a, Bin **Su**^b, Luzia **Mayr**^a, Jérôme **Klingler**^a,
Thomas **Decoville**^a, Sylvie **Schmidt**^a, Géraldine **Laumond**^a,
Nathalie **Salomé**^a, Seiamak **Bahram**^a and Christiane **Moog**^{a,c}

Objective: In the semen, both free virus and infected cells are able to establish HIV infection during sexual intercourse. An efficient vaccine should, therefore, inhibit both infectious states. The aim of this study was to analyze the capacity of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) to inhibit HIV transmission by the infected cells.

Design/methods: We developed an in-vitro model aiming to mimic mucosal HIV transmission via infected cells. PHA-activated CD4⁺ T cells stained with PKH26 from donor A were infected and co-cultured with CD4⁺ T cells and dendritic cells from donor B in the presence of bNAbs.

Results: We showed that dendritic cells were the preferential HIV target cells at early time points in this co-culture model. In the context of this co-culture model where infection and transmission occurred simultaneously, bNAbs efficiently inhibited HIV replication as well as HIV transmission from infected cells to allogenic dendritic cells and CD4⁺ T cells.

AQ5

Conclusion: Overall, our results indicate that dendritic cells, in addition to CD4⁺ T cells, are key cells that are efficiently infected by HIV and bNAbs are potent inhibitors of infection of both target cells. Future HIV prophylactic vaccine design should develop immune strategies able to prevent the infection of dendritic cells, in addition to the inhibition of CD4⁺ T-cell infection.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2018, **32**:000–000

Keywords: allogenic T cells, broadly neutralizing antibodies, dendritic cells, HIV cell-to-cell transmission

AQ3 ^aINSERM U1109, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ^bBeijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research, Center for Infectious Diseases, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing, China, and ^cVaccine Research Institute (VRI), Créteil, France.

AQ4 Correspondence to Christiane Moog, PhD, INSERM U1109, Université de Strasbourg, 3 rue Koeberlé, Strasbourg 67000, France. Tel: +33 368 853 742; fax: +33 368 854 016; e-mail: c.moog@unistra.fr
Received: 22 December 2017; revised: 27 February 2018; accepted: 17 March 2018.

DOI:10.1097/QAD.0000000000001834

Introduction

AQ6 During sexual intercourse, free viruses and infected cells, both contained in the semen, disseminate into the female genital tract (reviewed in [1–7]). Recently, simian immunodeficiency virus/ simian human immunodeficiency virus (SIV/SHIV) infection was established following an intravaginal challenge of infected cell in the female macaque genital track [8] firmly demonstrating that HIV sexual transmission can occur directly with infected cells [1,8–11]. In the mucosa, the identity of the first HIV cellular target is still a matter of debate. On one hand, dendritic cells have been proposed to be the first target cells capturing the antigen and transferring HIV to neighboring CD4⁺ T cells [12–14]. Moreover, recent studies reported an enhancement of HIV replication in immature dendritic cells when these cells were co-cultured with CD4⁺ T cells [15–18], indicating that dendritic cells are HIV replication-competent when they are in contact with CD4⁺ T cells. On the other hand, infection of whole tissue explants showed that mostly CD4⁺ T cells were infected [19–21]. These results indicate that either dendritic cells and/or CD4⁺ T cells may represent the first HIV target following sexual intercourse.

Strategic preventive approaches to inhibit HIV in the macaque model of in-vivo mucosal challenge have mainly focused on the inhibition of free viral particles and in-vivo models of inhibition of transmission by infected cells were not well elucidated. *In vitro*, however, the inhibitory potential of bNAbs on the cell-to-cell HIV-1 transmission has been largely examined ([17,22–32] reviewed in [33–36]). These studies analyzed the HIV transfer from infected cell lines to target cell lines [22,24,26–29,31] or target primary CD4⁺ T cells [27–29,31], or the transmission from primary dendritic cells to CD4⁺ T cells [15,17,23,25,30,32]. It is noteworthy that the inhibitory potential of bNAbs on HIV transmission varied according to the type of cell and of virus used in the assay. Moreover, none of these assays analyzed the inhibitory potential of bNAbs when HIV was transmitted from cells by another donor in allogenic conditions, the real-life situation, which occurs following HIV mucosal transmission by infected cells present in semen or cervicovaginal secretions. Indeed, dendritic cells are professional antigen-presenting cells that will be activated by allogenic cells from nonself origin. dendritic cells may, therefore, be favorably triggered in the presence of infected cells from an allogenic donor [13,37–39].

The aim of this study was to decipher the inhibitory potential of bNAbs on mucosal transmission by allogenic HIV-infected cells. Therefore, we developed an in-vitro model where T cells from donor A transmit HIV to dendritic cells and T cells of donor B and we analyzed the inhibitory potential of bNAbs under these conditions.

Results

Dendritic cells are the first HIV target cells in the allogenic dendritic cell/T-cell transmission model

In this allogenic model, T cells from donor A were infected for 24 h. At that time point, the percentage of infected cells is very low (around 1%) and almost no free virus particles are detected in the supernatant [17]. Infected cells were further labeled with PKH26, extensively washed and co-cultivated with T cells and dendritic cells from donor B for 24 and 72 h (Fig. 1a). Under these conditions, HIV transmission in the absence of free virus particles can be measured [17]. We observed the infection of CD4⁺ T cells from donor A and a rapid transmission to donor B cells with HIV-1_{Bal} or a transmitted/founder (T/F) primary isolate HIV-1_{Bx08} as early as 24 h (Fig. 1b). At that time, the detection of HIV replication in the different cell types correspond to a single round of HIV replication, that is, HIV transmission from cells of donor A to cells of donor B [17]. In order to allow normalization of the cell infection rate of donor B according to the infection rate of CD4⁺ T cells from donor A, the ratio of the percentage of infected cells from donor B to the percentage of infected CD4⁺ T cells from donor A was calculated (Fig. 1c). Remarkably, after 24 h, the ratio of HIV-1_{Bal} and HIV-1_{Bx08}-infected dendritic cell from donor B was significantly higher ($P < 0.05$) than that of infected CD4⁺ T cells from donor B, demonstrating that HIV transmission by infected CD4⁺ T cells from donor A preferentially occurs in dendritic cells. After 72 h, the infection rate for dendritic cells was still higher compared to CD4⁺ T cells, although the difference was no more statistically significant for HIV-1_{Bx08} (Fig. 1c). These results indicate that dendritic cells are highly susceptible HIV-1 target cells under these co-culture transfer conditions.

Detection of multiple cycles of HIV replication in cells from donor B after 3 days

In order to measure HIV replication, the reverse transcriptase inhibitor AZT was added to the co-culture at the same time as the infected T cells. After 72 h, HIV replication in T cells from donor A treated with AZT decreased by about 90% (Fig. 1d), demonstrating that HIV continues to spread in these cells under these co-culture conditions. Moreover, the percentage of p24 positive cells decreased by 86% (dendritic cells) and 82% (T cells) from donor B for HIV-1_{Bal}, or 78% (dendritic cells) and 89% (T cells) for HIV-1_{Bx08}. This indicates that the p24 detected after 72 h in these cells represents new viral production. These results show that all three cell populations are productively infected after 72 h.

In order to discriminate HIV transmission from cells of donor A to donor B from subsequent virus replication, the protease inhibitor indinavir (IDV) was added at the same time as the infected cells from donor A (Fig. 1e).

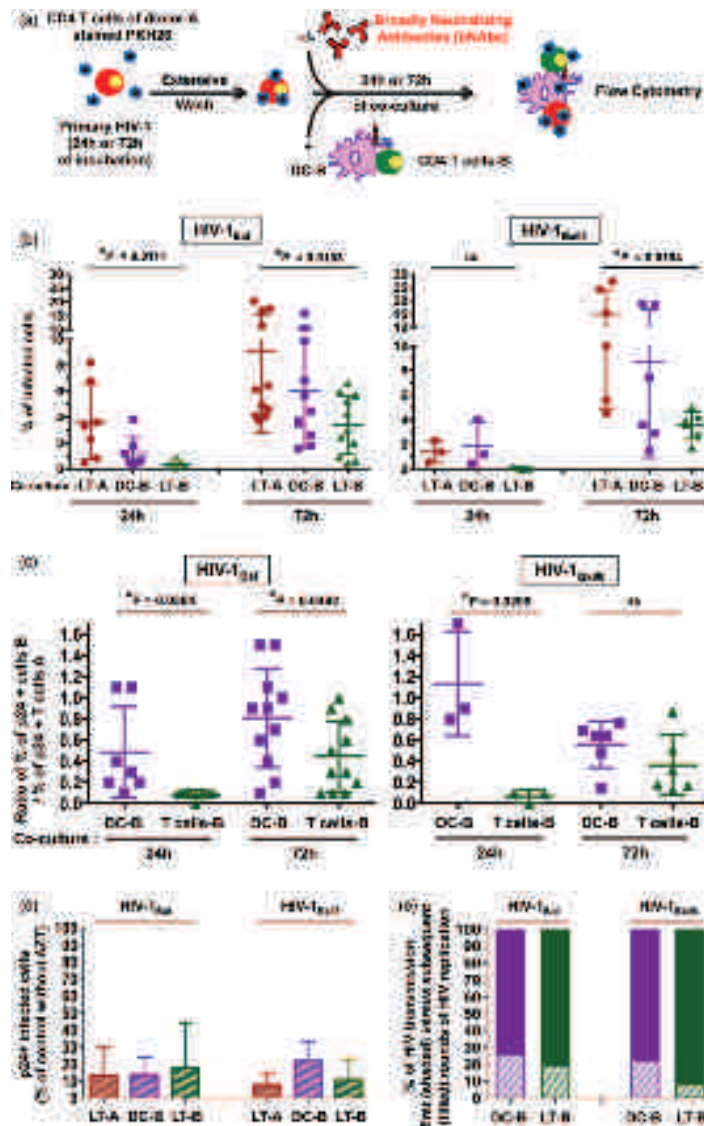


Fig. 1. HIV transmission from infected CD4⁺ T cells of donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells of donor B (an allogenic model). (a) Experimental design: T cells of donor A (LT-A) infected with primary HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} for 24 h and labeled with PKH26 membrane dye were co-cultured for 24 or 72 h with CD4⁺ T cells and dendritic cells from donor B. The percentage of cells infected in each cell population was determined by intracellular viral p24 antigen staining. (b) Percentage of cells infected with HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} in each cell population: PKH26 positive T cells of donor A (LT-A, red), CD209-positive dendritic cells from donor (DC-B, purple) and CD3-positive PKH26 negative CD4⁺ T cells from donor B (LT-B, green) after 24 and 72 h of co-culture. Mean ± SD of seven independent experiments performed with different donor cells are shown. (c) Ratio of the percentage of HIV-1-infected dendritic cells (purple) or T cells of donor B (green) compared with the percentage of infected PKH26-labeled T cells of donor A was calculated. Mean ± SD of seven independent experiments performed with different donor cells are shown. (d) The HIV-1 reverse transcriptase inhibitor AZT (5 μM) or (e) the HIV-1 protease inhibitor IDV (1 μM) were added to the co-culture. Infection was assessed after 72 h of co-culture and the percentage of HIV-1-infected cells in each population, PKH26-stained T cells of donor A (LT-A red), CD209⁺ dendritic cells (DC-B, purple) and CD3⁺ T cells of donor B (LT-B, green) was compared with the control-infected cells without AZT (d) or IDV (e). (e) Percentage of HIV transmission (transfer of HIV from CD4⁺ T cells from donor A, shaded histogram, % p24⁺ cells detected in the presence of IDV) and subsequent round of HIV transfer from the three infected cell types (filled histogram, 100 – percentage of p24⁺ cells detected in the presence of IDV). Mean ± SD of four and five independent experiments performed with different donor cells for AZT and IDV, respectively. Statistic analysis was performed using Student unpaired-test and *P* < 0.05 was considered significant.

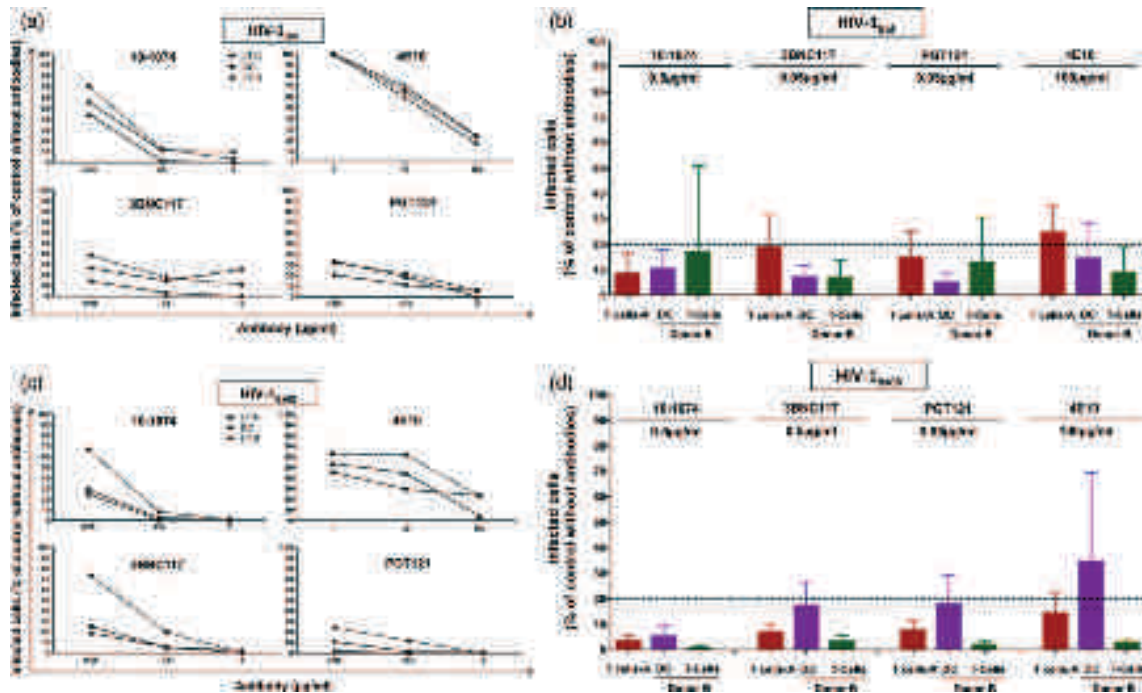


Fig. 2. Inhibition by broadly neutralizing antibodies of HIV transmission of HIV-1_{Bal}-infected T cells from donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells from donor B. bNAb against HIV CD4bs (3BNC117) or V3-glycan (10–1074, PGT121) or gp41 protein (4E10) were co-cultured with T cells of donor A infected with HIV-1_{Bal} or HIV-1_{Bx08} and dendritic cells and T cells of donor B for 72 h. The percentage of infected cells in the presence of bNAb compared with the percentage of infected cells in the absence of bNAb was calculated. (a and c) Dose–response curve of mAbs added at different concentrations 0.05, 0.5, and 5 μg/ml for bNAb 10-1074, 3BNC117, and PGT121, and at 1, 10, and 100 μg/ml for bNAb 4E10. One representative experiment out of three is shown. (b and d) Percentage of infected cells for each population in the presence of bNAb at the concentration indicated mean ± SD of five independent experiments performed with different donors is shown. Statistic analysis was performed using Student unpaired-test (*P* > 0.05).

IDV blocks the final assembly and maturation of newly synthesized virions, therefore, restricting to a single round of HIV transmission from donor A CD4⁺ T cells to cells from donor B. In the presence of IDV, we observed a significant decrease of infected cells from donor B at 72 h. Twenty-five and 21% of dendritic cells and 20 and 7% of T cells from donor B for HIV-1_{Bal} and HIV-1_{Bx08}, respectively, were infected in the presence of IDV (shaded histogram). These percentages correspond to virus transmitted from HIV-infected CD4⁺ T cells from donor A. The remaining infection, 75 and 79% infected dendritic cells and 80 and 93% infected CD4⁺ T cells for HIV-1_{Bal} and HIV-1_{Bx08}, respectively, corresponds to the replication of newly produced virus from the three cell types (filled histogram). This result indicates that after 72 h, a large percentage of cells from donor B were infected by newly synthesized virions. This new virus production is because of subsequent cell-to-cell transmission from either donor A or donor B infected cells. However, we cannot exclude that few infections already occurs with the free virus particles released in the supernatant, even though the proportion of free virus

particles released at these early time points is of very limited amount [17,18].

Broadly neutralizing antibodies efficiently inhibit HIV transmission in the co-culture model

To analyze the inhibition of HIV transmission to donor B, bNAb against the HIV gp120 protein (10–1074, 3BNC117, PGT121) and against gp41 (4E10) were added at the same time as infected cells from donor A. We initially measured a dose–response inhibitory activity at 0.05, 0.5 and 5 μg/ml for 10–1074, 3BNC117, PGT121 and at 1, 10 and 100 μg/ml for 4E10 (Fig. 2a and c). We observed an inhibition of HIV replication in the three HIV target cells, with slight variation of Ab inhibitory profile according to the target cell analyzed. The IC80 (inhibition of HIV replication by 80%) on CD4⁺ T-target cells from donor A cells referred to as neutralization) was 0.5, 0.05, 0.05 and 100 μg/ml for Abs 10–1074, 3BNC117, PGT121 and 4E10, respectively. These concentrations correspond to the IC80 neutralizing activity classically observed with these Abs on primary PBMCs [40]. In order to define if the IC80 on dendritic cell and CD4⁺ T cells from donor B varied

significantly from that of donor A, the mean Ab inhibitory activity for the three HIV target cells was determined on five independent experiments performed with five different donor cells (Fig. 2b and d). For HIV-1_{BaL}, the inhibitory activity of these Abs was similar for the three cell types studied. For HIV-1_{Bx08}, the inhibition by these bNAbS is more efficient in CD4⁺ T cells from donor B than in dendritic cells, however, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$). These results show that the inhibitory activity is cell-type and virus-type specific as previously emphasized [35,36,41]. Overall, bNAbS show potent inhibitory activity in the three cellular populations. Therefore, under co-culture conditions, bNAbS not only inhibit new virus replication in CD4⁺ T cells from donor A but also the transfer from infected cells of donor A to dendritic cells and CD4⁺ T cells from donor B.

Discussion

Although the mechanisms of HIV transmission have been extensively analyzed (reviewed in [35,36,42–45]), the present study documents for the first time that HIV transmission can occur in an allogenic context using infected T cells from donor A in co-culture with uninfected dendritic cells and T cells from donor B. With this allogenic model, we found that infected T cells were able to rapidly, within 24 h, transmit HIV to allogenic dendritic cells and T cells. Importantly, under these conditions, dendritic cells were preferentially infected at an early time point. This efficient replication in dendritic cells may be explained by the antigen presenting functions of these cells. In fact, dendritic cells are programmed to recognize nonself-antigens on allogenic cells. Therefore, dendritic cells can rapidly interact with CD4⁺ T cells from donor A recognized as nonself. This close dendritic cell/T-cell contact may favor HIV transmission to dendritic cells. Previously, we found that the presence of autologous T cells enhances HIV replication in the dendritic cells [15–18]. We also showed that this increase of HIV replication in the dendritic cells was because of close dendritic cell/T-cell contact [16,18] and was associated with a down regulation of a restriction factor SAMHD1 in these cells [15,16]. Our current findings confirm the high infection rate of dendritic cells and further demonstrate that dendritic cells are the preferential target in an allogenic model, where infected CD4⁺ T cells have the choice to either transmit HIV to dendritic cells or to CD4⁺ T cells. Moreover, treatment with AZT proved that this infection corresponds to newly synthesized virus and treatment with IDV showed that although new replication occurs after 72 h, about 20% of infected dendritic cells was because of early HIV transmission from donor A CD4⁺ T cells.

The present results contradict previous observations of HIV restriction in dendritic cells [46,47]. However, the main methodological difference between these studies

and our current results is the dendritic cell/T-co-culture model. Moreover, the studies showing HIV restriction in dendritic cells all analyze the infection of these cells as purified dendritic cell population whereas the high infection rate of dendritic cells observed here is in the presence of CD4⁺ T cells at a one dendritic cells to four CD4⁺ T-cell ratio. Our study firmly demonstrates that dendritic cells are efficient HIV targets in co-culture conditions. Whether such dendritic cell/T cell cross-talk is relevant in infected tissues and whether infected CD4⁺ T cells in the semen can disseminate in cervicovaginal tissues following infection of tissue resident dendritic cells needs to be further analyzed.

The inhibitory potential of bNAbS on HIV transmission is controversial, some publication suggesting a decreased inhibitory activity on HIV cell-to-cell transmission compared with free viruses [22,24,27] whilst others proposing a similar inhibitory activity between HIV transmission and infection [15,17,23,48]. Noteworthy, such a comparison is hampered by the necessity to use similar HIV target cells and normalize cell-free versus cell-associated HIV infection in two distinct assays [36]. In the context of our co-culture model, we simultaneously analyzed the antibody inhibitory activity on the transmission to dendritic cells and CD4⁺ T cells of donor B (i.e. inhibition of HIV transmission) and on subsequent infection of CD4⁺ T cells of donor A (i.e. neutralization). Although some slight variation in inhibitory potential were observed depending on virus and on the donor/target cells used, infection was decreased to a similar extent in the three populations studied indicating that neutralization and inhibition of HIV cell-to-cell transmission is comparable between T-to-T or dendritic cells-to-T cells. These results observed with IgG antibody isotype need now to be performed with secretory IgA antibodies as they are largely present at the mucosa site. Overall, our findings indicate that efficient Ab response induced at the mucosal site could prevent HIV transmission to dendritic cells as well as the infection of surrounding CD4⁺ T cells.

In summary, our data suggest that dendritic cells play a central role in early HIV transmission in the mucosa and that bNAbS efficiently prevent this transmission. These results on inhibitory potential of Abs on cell-free versus cell-to-cell transmission of HIV are of direct relevance for the design and development of prophylactic HIV-1 vaccine, passive immunotherapy, and antiviral therapy.

Materials and methods

Cell preparations

The primary immature monocyte were isolated using CD14⁺ Microbeads selection kit (Miltenyi) and differentiated into dendritic cells as previously described [16–18,49].

Autologous CD4⁺ T lymphocytes were purified by positive selection after CD14⁺ purification and activated by incubation with phytohemagglutinin A (PHA) (2 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemie S.a.r.l, France) for 3 days. Cells were stored frozen and thawed 1 day before use.

All human blood samples were collected from healthy anonymized donors seronegative for HIV-1 and hepatitis C virus (EFS, Strasbourg, France).

Cell infection

The 30 × 10⁶ PHA activated CD4⁺ T cells were infected with 1 µg of concentrated HIV-1 stocks (Bal, Bx08). After 24 h, cells were stained with PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane (Sigma) and extensively washed to remove all free virus particles. This dye allows to discriminate these infected T cells from allogenic donor/target cells.

Heterologous transfer model

Monocyte-derived dendritic cells and their corresponding PHA-activated autologous CD4⁺ T cells were co-cultured with the PKH26-stained infected CD4⁺ T cells from another donor with a final ratio of one dendritic cell for two autologous CD4⁺ T cells and two allogenic infected CD4⁺ T cells. Whenever indicated, 5 µM AZT (Sigma-Aldrich), a reverse transcriptase inhibitor or 1 µM IDV, a protease inhibitor were added in the co-culture. To analyze the inhibitory capacity of bNAbs, 10-1074, 3BNC117, PGT121 obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH and 4E10 obtained from Polynum Scientific were added at different concentrations in the co-culture. Infected cells were detected by intracellular p24 staining in the different cellular populations after 24 and 72 h of co-culture. Briefly, cells were stained using Live/Dead Fixable Violet Dead Cells Stain Kit (Life Technologies) and labeled with CD3 APC-Vio770 (MiltenyiBiotec), CD209 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen). Cells were then fixed and permeabilized with the Cytotfix/Cytoperm wash kit solution (BD Biosciences) before being labeled with HIV core p24 antibody (Beckman Coulter). The percentage of each infected cell population positive for p24 was defined by flow cytometry (MacQuant, Miltenyi) and analyzed using the Kaluza software.

Statistics

Statistic analysis was performed using the Student unpaired *t*-test and *P* < 0.05 was considered significant. GraphPad Prism 5.04 software was used for all statistical analyses.

Acknowledgements

We thank the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), the Vaccine Research institute,

Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77, INSERM UMR_S 1109, Fonds de Dotation Pierre Berge, the National Natural Science Foundation of China (81772165), the Funding for Chinese overseas talents returning to China in 2016 (B.S.), and the Beijing Key Laboratory for HIV/AIDS Research (BZ0089) for financial support. C.D. was supported by a doctoral fellowship from SIDACTION. L.M. was supported by a postdoctoral fellowship from ANRS. J.K. was supported by a doctoral fellowship from University of Strasbourg. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

B.S. and C.M. conceived the study. C.D., B.S., and C.M. designed the experiments, and analyzed the data. C.D., B.S., J.K., and L.M. performed the experiments; T.D., S.S., G.L., and N.S. contributed to reagents and materials; and C.D., B.S., L.M., S.B. and C.M. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Kariuki SM, Selhorst P, Arien KK, Dorfman JR. **The HIV-1 transmission bottleneck.** *Retrovirology* 2017; **14**:22.
2. Heron SE, Elahi S. **HIV infection and compromised mucosal immunity: oral manifestations and systemic inflammation.** *Front Immunol* 2017; **8**:241.
3. Gagneux-Brunon A, Rochereau N, Botelho-Nevers E, Lucht F, Pozzetto B, Paul S, et al. **Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies.** *AIDS* 2017; **31**:1055-1064.
4. Iwasaki A. **Exploiting Mucosal Immunity for Antiviral Vaccines.** *Annu Rev Immunol* 2016; **34**:575-608.
5. Dutarte H, Claviere M, Journo C, Mahieux R. **Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication.** *J Virol* 2016; **90**:7607-7617.
6. Anderson DJ, Le Grand R. **Cell-associated HIV mucosal transmission: the neglected pathway.** *J Infect Dis* 2014; **210** (Suppl 3):S606-S608.
7. Hladik F, McElrath MJ. **Setting the stage: host invasion by HIV.** *Nat Rev Immunol* 2008; **8**:447-457.
8. Bernard-Stoecklin S, Gomet C, Cavarelli M, Le Grand R. **Nonhuman primate models for cell-associated simian immunodeficiency virus transmission: the need to better understand the complexity of HIV mucosal transmission.** *J Infect Dis* 2014; **210** (Suppl 3):S660-S666.
9. Kolodkin-Gal D, Hulot SL, Koriath-Schmitz B, Gombos RB, Zheng Y, Owuor J, et al. **Efficiency of cell-free and cell-associated virus in mucosal transmission of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus.** *J Virol* 2013; **87**:13589-13597.
10. Bernard-Stoecklin S, Gomet C, Corneau AB, Guenounou S, Torres C, Dejucq-Rainsford N, et al. **Semen CD4⁺ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques.** *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003810.
11. Sallé B, Brochard P, Bourry O, Mannioui A, Andrieu T, Prevot S, et al. **Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus.** *J Infect Dis* 2010; **202**:337-344.

NAbS inhibit HIV transmission to allogenic immune cells Ducloy *et al.*

7

AQ1

12. Cavarelli M, Foglieni C, Rescigno M, Scarlatti G. **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* 2013; **5**:776–794.
13. Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, Lentz G, Fialkow M, Eschenbach D, *et al.* **Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1.** *Immunity* 2007; **26**:257–270.
14. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, de Gruijl T, *et al.* **Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.** *Nat Med* 2007; **13**:367–371.
15. Su B, Lederle A, Laumond G, Ducloy C, Schmidt S, Decoville T, *et al.* **Broadly neutralizing antibody VRC01 prevents HIV-1 transmission from plasmacytoid dendritic cells to CD4 T lymphocytes.** *J Virol* 2014; **88**:10975–10981.
16. Su B, Biedma ME, Lederle A, Peressin M, Lambotin M, Proust A, *et al.* **Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells.** *J Virol* 2014; **88**:5109–5121.
17. Su B, Xu K, Lederle A, Peressin M, Biedma ME, Laumond G, *et al.* **Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes.** *Blood* 2012; **120**:3708–3717.
18. Holl V, Xu K, Peressin M, Lederle A, Biedma ME, Delaporte M, *et al.* **Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes.** *J Virol* 2010; **84**:4172–4182.
19. Shang L, Duan L, Perkey KE, Wietgreffe S, Zupancic M, Smith AJ, *et al.* **Epithelium-innate immune cell axis in mucosal responses to SIV.** *Mucosal Immunol* 2017; **10**:508–519.
20. Merbah M, Arakelyan A, Edmonds T, Ochsenbauer C, Kappes JC, Shattock RJ, *et al.* **HIV-1 expressing the envelopes of transmitted/founder or control/reference viruses have similar infection patterns of CD4 T-cells in human cervical tissue *ex vivo*.** *PLoS One* 2012; **7**:e50839.
21. Gupta P, Collins KB, Ratner D, Watkins S, Naus GJ, Landers DV, *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**:9868–9876.
22. Li H, Zony C, Chen P, Chen BK. **Reduced potency and incomplete neutralization of broadly neutralizing antibodies against cell-to-cell transmission of HIV-1 with transmitted founder Envs.** *J Virol* 2017; **91**:pii e02425–16.
23. Su B, Peressin M, Ducloy C, Penichon J, Mayr LM, Laumond G, *et al.* **Short communication: exploring antibody potential as prophylactic/therapeutic strategies for prevention of early mucosal HIV-1 infection.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; **31**:1187–1191.
24. Gombos RB, Kolodkin-Gal D, Eslamizar L, Owuor JO, Mazzola E, Gonzalez AM, *et al.* **Inhibitory effect of individual or combinations of broadly neutralizing antibodies and antiviral reagents against cell-free and cell-to-cell HIV-1 transmission.** *J Virol* 2015; **89**:7813–7828.
25. Peressin M, Proust A, Schmidt S, Su B, Lambotin M, Biedma ME, *et al.* **Efficient transfer of HIV-1 in trans and in cis from Langerhans dendritic cells and macrophages to autologous T lymphocytes.** *AIDS* 2014; **28**:667–677.
26. Zhong P, Agosto LM, Ilinskaya A, Dorjbal B, Truong R, Derse D, *et al.* **Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV.** *PLoS One* 2013; **8**:e53138.
27. Malbec M, Porrot F, Rua R, Horwitz J, Klein F, Halper-Stromberg A, *et al.* **Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission.** *J Exp Med* 2013; **210**:2813–2821.
28. Abela IA, Berlinger L, Schanz M, Reynell L, Gunthard HF, Rusert P, *et al.* **Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies.** *PLoS Pathog* 2012; **8**:e1002634.
29. Dale BM, McNERNEY GP, Thompson DL, Hubner W, de Los Reyes K, Chuang FY, *et al.* **Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion.** *Cell Host Microbe* 2011; **10**:551–562.
30. van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, Pollakis G, Paxton WA. **Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes.** *J Immunol* 2007; **178**:3177–3185.
31. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK. **Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses.** *J Virol* 2007; **81**:12582–12595.
32. Cavois M, Neidleman J, Kreisberg JF, Greene WC. **In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions.** *PLoS Pathog* 2007; **3**:e4.
33. Smith SA, Derdeyn CA. **New connections: cell-to-cell HIV-1 transmission, resistance to broadly neutralizing antibodies, and an envelope sorting motif.** *J Virol* 2017; **91**:pii: e00149-17.
34. Pegu A, Hessel AJ, Mascola JR, Haigwood NL. **Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention.** *Immunol Rev* 2017; **275**:296–312.
35. Su B, Moog C. **Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine?** *Front Immunol* 2014; **5**:289.
36. Schiffrer T, Sattentau QJ, Duncan CJ. **Cell-to-cell spread of HIV-1 and evasion of neutralizing antibodies.** *Vaccine* 2013; **31**:5789–5797.
37. Botting RA, Rana H, Bertram KM, Rhodes JW, Baharlou H, Nasr N, *et al.* **Langerhans cells and sexual transmission of HIV and HSV.** *Rev Med Virol* 2017; **27**:.
38. Cunningham AL, Harman AN, Nasr N. **Initial HIV mucosal infection and dendritic cells.** *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 658–660.
39. Wu L, KewalRamani VN. **Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination.** *Nat Rev Immunol* 2006; **6**:859–868.
40. Cohen YZ, Lorenzi JCC, Seaman MS, Nogueira L, Schoofs T, Krassnig L, *et al.* **Neutralizing activity of broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies against clade B clinical isolates produced in peripheral blood mononuclear cells.** *J Virol* 2018 pii: e01883–17.
41. Fenyo EM, Heath A, Dispinseri S, Holmes H, Lusso P, Zolla-Pazner S, *et al.* **International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report.** *PLoS One* 2009; **4**:e4505.
42. Law KM, Satija N, Esposito AM, Chen BK. **Cell-to-cell spread of HIV and viral pathogenesis.** *Adv Virus Res* 2016; **95**:43–85.
43. Graw F, Perelson AS. **Modeling Viral Spread.** *Annu Rev Virol* 2016; **3**:555–572.
44. Casartelli N. **HIV-1 cell-to-cell transmission and antiviral strategies: an overview.** *Curr Drug Targets* 2016; **17**:65–75.
45. Agosto LM, Uchil PD, Mothes W. **HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy.** *Trends Microbiol* 2015; **23**:289–295.
46. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringeard M, Chable-Bessia C, Segeral E, *et al.* **SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx.** *Nature* 2011; **474**:654–657.
47. Manel N, Hogstad B, Wang Y, Levy DE, Unutmaz D, Littman DR. **A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells.** *Nature* 2010; **467**:214–217.
48. Duncan CJ, Russell RA, Sattentau QJ. **High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy.** *AIDS* 2013; **27**:2201–2206.
49. Holl V, Peressin M, Decoville T, Schmidt S, Zolla-Pazner S, Aubertin AM, *et al.* **Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells.** *J Virol* 2006; **80**:6177–6181.

AQ11

AQ10

QAD

Manuscript No. AIDS-D-18-00013

AIDS**Typeset by Thomson Digital
for Wolters Kluwer**

Dear Author,

During the preparation of your manuscript for typesetting, some queries have arisen. These are listed below. Please check your typeset proof carefully and mark any corrections in the margin as neatly as possible or compile them as a separate list. This form should then be returned with your marked proof/ list of corrections to the Production Editor.

QUERIES: to be answered by AUTHOR/EDITOR?

QUERY NO.	QUERY DETAILS	RESPONSE
<AQ1>	As per style, the short title/running head can have a maximum of 65 characters including spaces and author names, and abbreviations/acronyms only as exceptions. Please check the suggested short title for appropriateness.	
<AQ2>	Please confirm whether surnames/family names (red) have been identified correctly in the author byline.	
<AQ3>	Affiliations have been set as per style. Please check for accuracy of information.	
<AQ4>	Please check and confirm the corresponding author's name and relevant details for correctness.	
<AQ5>	Please check the superscript '+' symbols provided with 'CD4.'	
<AQ6>	As per the journal style, the Section Headings should be of the order: Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. Please reset the Section Headings accordingly, as per style.	
<AQ7>	Please check the definitions for the abbreviations 'SIV' and 'SHIV' for correctness.	
<AQ8>	Please provide the full manufacturer's details such as city, state, country, etc. for Sigma, Polynum Scientific, Life Technologies, MiltenyiBiotec, BD Pharmingen, BD Biosciences, Beckman Coulter, MacsQuant, Miltenyi.	
<AQ9>	References have been updated using PubMed. Please check.	

- | | |
|--------|--|
| <AQ10> | Please check the page range for correctness. |
| <AQ11> | Please provide the page range for Ref. [37]. |
| <AQ12> | Please expand the abbreviation 'AZT.' |

L'ensemble des résultats sur les différents modèles de co-culture autologue (partie 1.1) et allogénique (partie 1.2) nous démontrent que les DC ont un rôle clé lors des premiers événements de l'infection par le VIH-1 et que les anticorps sont capables d'inhiber efficacement l'infection des DC et des LT CD4 et la transmission du virus de cellule à cellule (Figure 17). L'analyse des différentes activités inhibitrices des anticorps, notamment les activités inhibitrices des anticorps médiées par la partie Fc, dans la co-culture allogénique n'ont pas encore été investiguées. Des études complémentaires dans ce modèle permettront de déterminer si la partie Fc des anticorps jouent un rôle dans l'inhibition de la transmission du VIH-1 des cellules infectées du donneur A aux DC et LT CD4 du receveur B.

L'étude des mécanismes additionnels des anticorps dans l'inhibition de l'infection des cellules cibles est particulièrement pertinente notamment dans le cadre de la vaccination

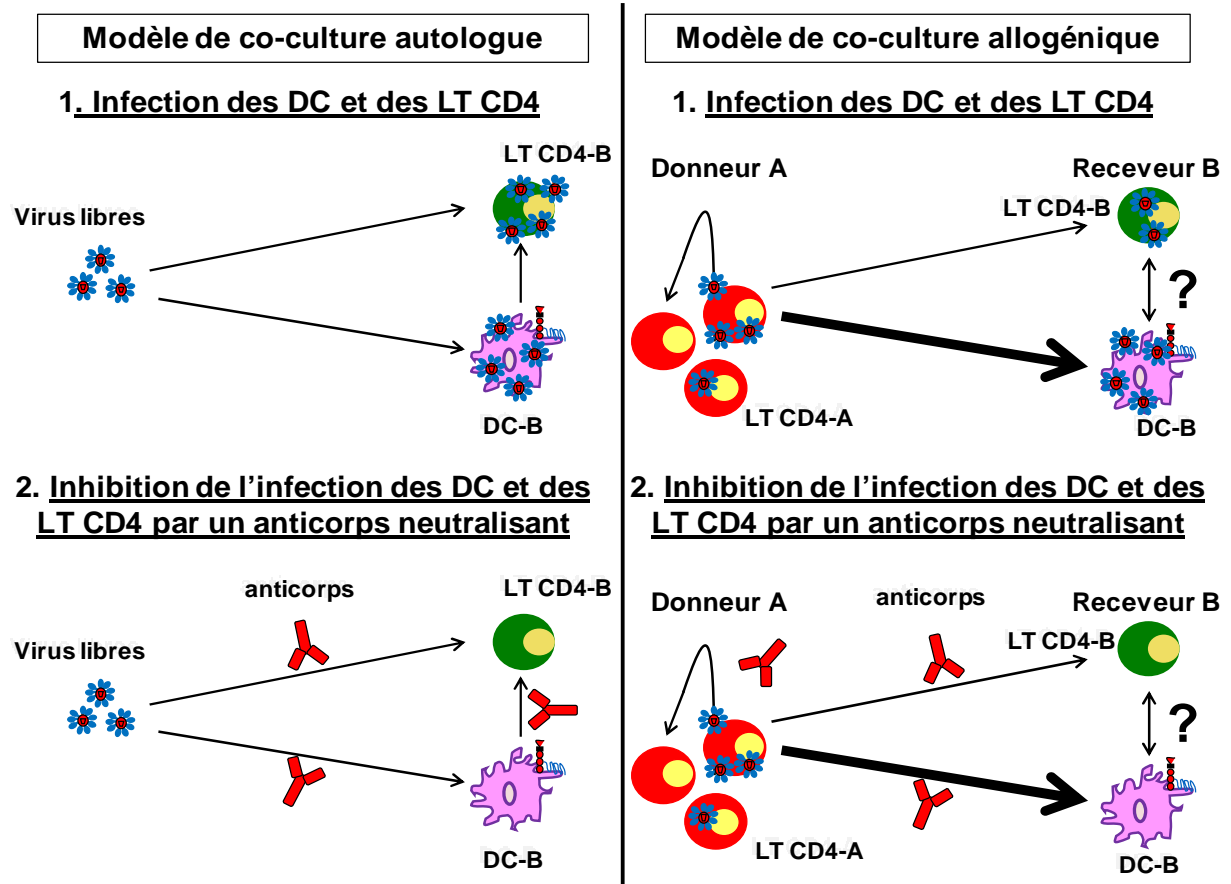


Figure 17 : Schéma récapitulatif de l'infection et l'inhibition des DC et des LT CD4 dans un modèle de co-culture par : Virus libre / Cellules infectées.

Dans le modèle de co-culture autologue, 1. Le virus libre est capable d'infecter les LT CD4 et les DC (infection représentée par les flèches). La présence des LT CD4 induit une augmentation de la réplication virale dans les DC (représentée par la présence de virus dans la cellule). 2. Les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4 et l'infection des DC et des LT CD4 (représentée par l'absence de virus dans les cellules).

Dans le modèle de co-culture allogénique, 1. Les cellules infectées du donneur A transmettent le VIH-1 aux cellules du receveur B, et préférentiellement au DC (représenté par une flèche plus épaisse). 2. Les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber la transmission du VIH-1 des cellules infectées aux DC et LT CD4 du receveur B et l'infection des LT CD4 du donneur A.

2. Inhibition de l'infection par le biais d'une activité ADCC (Publication 4).

Contexte de l'étude

L'essai RV144 et plusieurs modèles NHP ont montré que l'induction d'anticorps non-neutralisants dirigés contre la boucle V1/V2 de la gp120 était corrélée avec une diminution du risque d'infection (Haynes et al., 2012 ; Wren et al., 2013 ; Zolla Pazner et al., 2014). Cette diminution du risque d'infection pourrait être due à l'activité ADCC de ces anticorps non-neutralisants. Cependant, la complexité de cette activité suggère une difficulté dans la mise en place de modèle *in vitro* reflétant la meilleure corrélation avec les études *in vivo*.

Résultats

Dans cette étude, nous avons analysé l'activité ADCC de différents anticorps neutralisants et d'anticorps non-neutralisants dirigés contre la boucle V1/V2 isolés de patients infectés. Le test ADCC utilise des cellules NK et cellules cibles LT CD4 primaires infectées avec des isolats primaires ou des virus fondateurs « *transmitted founder* ». Ce test nous permet donc de nous rapprocher des conditions physiologiques de lyse de cellules *in vivo*. L'activité ADCC induite par les anticorps dirigés contre V1/V2 est comparée à l'activité ADCC induite par d'autres anticorps neutralisants ciblant différents épitopes viraux.

Dans ces conditions de culture, nous détectons une activité ADCC élevée en présence d'anticorps non-neutralisants dirigés contre V2. Cette étude est la première à mettre en évidence une activité ADCC en présence d'anticorps non-neutralisant dirigé contre la boucle V2.

Ces résultats démontrent le rôle potentiel des anticorps dirigés contre la boucle V1/V2 dans l'activité ADCC.

L'induction de ces anticorps, par vaccination, serait particulièrement pertinente dans l'élimination des cellules infectées dans les muqueuses où les cellules NK sont recrutées lors de l'infection par le VIH-1 dès les premiers événements de l'infection.

Publication 4

Les anticorps non-neutralisants ciblant la région V1/V2 du VIH-1 présente une importante activité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

Non-neutralizing Antibodies Targeting the V1V2 Domain of HIV Exhibit Strong Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxic Activity.

Luzia M.Mayr, Thomas Decoville, Sylvie Schmidt, Géraldine Laumond, Jérphine Klingler, Camille Ducloy, Siamak Bahram, Susan Zolla-Pazner and Christiane Moog.

SCIENTIFIC REPORTS, 2017.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Non-neutralizing Antibodies Targeting the V1V2 Domain of HIV Exhibit Strong Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxic Activity

Luzia M. Mayr¹, Thomas Decoville^{1,3}, Sylvie Schmidt¹, Géraldine Laumond¹, Jérôme Klingler¹, Camille Ducloy^{1,3}, Seiamak Bahram¹, Susan Zolla-Pazner² & Christiane Moog^{1,3}

The development of an effective vaccine against HIV-1 has proven to be challenging. Broadly neutralizing antibodies (bNAbs), whilst exhibiting neutralization breadth and potency, are elicited only in a small subset of infected individuals and have yet to be induced by vaccination. Case-control studies of RV144 identified an inverse correlation of HIV-1 infection risk with antibodies (Abs) to the V1V2 region of gp120 with high antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity. The neutralizing activity of Abs was not found to contribute to this protective outcome. Using primary effector and target cells and primary virus isolates, we studied the ADCC profile of different monoclonal Abs targeting the V1V2 loop of gp120 that had low or no neutralizing activity. We compared their ADCC activity to some bNAbs targeting different regions of gp120. We found that mAbs targeting the V1V2 domain induce up to 60% NK cell mediated lysis of HIV-1 infected PBMCs in a physiologically relevant ADCC model, highlighting the interest in inducing such Abs in future HIV vaccine trials. Our data also suggest that in addition to neutralization, lysis of infected cells by Abs can effectively participate in HIV protection, as suggested by the RV144 immune correlate analysis.

A strong antibody (Ab) response directed against gp120 and gp41 envelope proteins is mounted in essentially all HIV-1 infected individuals. However, these Abs have limited neutralization capacity against the constantly mutating virus. Indeed, only a small subset of infected subjects produce broadly neutralizing antibodies (bNAbs) that possess neutralization breadth and potency against different HIV-1 subtypes^{1,2}. The monoclonal bNAbs generated from these patients however display special features such as high rates of somatic mutation and long complementary-determining region 3 (CDR3) sequences, making them difficult to be induced by vaccination.

Follow-up analysis of the immune correlates of RV144, the Thai HIV-1 vaccine trial - which reported modest protection (estimated 31.2% vaccine efficacy) - showed a correlation in vaccinees between reduced infection rates and high levels of Abs targeting the V1/V2 region of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Further analyses indicated that, in the presence of low IgA Env Abs, Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) inversely correlated with a reduced rate of infection^{3,4}. Neutralizing activity did not contribute to the protective effect of RV144⁵.

The V1V2 domain is immunogenic and Abs targeting this region are induced in most HIV-1 infected patients⁶. It is located at the distal apex of the trimeric HIV-1 Env spike, where it is accessible to Abs^{7,8}. The region assumes a five-stranded beta barrel structure and contains the LDV/I motif that has been shown to bind to the $\alpha 4\beta 7$ integrin, important for T cell homing^{9,10}. Interestingly, $\alpha 4\beta 7$ mAb treatment of macaques that lead to sustained SIV virological control also promoted V2 antibody responses, recognizing the same region identified in a sieve analysis for immune correlates of reduced risk in the RV144 vaccine trial¹¹.

¹INSERM U1109, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ²Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA. ³Vaccine Research Institute (VRI), Créteil, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M. (email: c.moog@unistra.fr)

Received: 9 June 2017

Accepted: 15 September 2017

Published online: 04 October 2017

A set of mAbs, termed V2i mAbs, was isolated from HIV-1 clade B-infected patients and recognize a conformation-dependent epitope surrounding the $\alpha 4\beta 7$ integrin binding site of the V1V2 domain^{12–15}. These V2i mAbs display numerous physiochemical similarities to the Abs elicited in RV144 such as weak neutralizing activity and overlapping epitope regions. However, their ADCC activity was not yet assessed. Abs targeting this region are commonly induced by HIV-1 infection and are also elicited by vaccination^{3,6,16,17}. This makes them a promising tool for HIV-1 vaccine research.

ADCC activity is characterized by the interaction of the Fc region of an immunoglobulin, bound via its Fab part to Env on infected cells, and to Fc receptors expressed on the surface of effector cells, such as NK cells. This triggers the release of cytotoxic granules containing perforin and granzymes, leading to the death of the antibody-bound infected target cell. In this regard, ADCC is a complex multistep process. Several user-optimized assays have been developed with different target cells, effector cells and end-point read-outs to detect ADCC *in vitro*, but it is not known which assay shows the best correlation with *in vivo* protection.

Noteworthy, assays using HIV-1 infected cells showed that CD4 binding modifies the expression of ADCC epitopes¹⁸ and lysis of primary HIV-infected T cells was shown to be enhanced by the addition of CD4 mimetics¹⁹. These results imply that some HIV epitopes may be masked on infected cells, therefore allowing the virus to escape from ADCC in physiologically relevant *in vivo* situations.

Although difficult to compare to each other, these assays have shown that ADCC may effectively participate in protection against HIV. In addition to the RV144 immune correlate analysis, high levels of ADCC Abs have been associated with slow disease progression in both HIV and simian immunodeficiency virus (SIV) models^{20–22}. Local application of Abs directed against the principal immunodominant domain (PID) of gp41 and exhibiting ADCC and Fc-mediated inhibitory activities *in vitro* were shown to decrease the viral load set point and the number of transmitted/founder viruses in macaques challenged experimentally^{23,24}. ADCC activity was also significantly higher in HIV elite controllers, a group of rare HIV-1 infected patients who were able to maintain viremia below detectable limits²⁵. In the context of mother-infant transmission, high ADCC activity in maternal breast milk reduced HIV infection of the infant via breastfeeding and decreased the mortality risk of the infected infants^{26,27}. These and additional studies have pointed towards ADCC as an important mechanism to target HIV-1 *in vivo*^{28–30}.

Recently, Bruel *et al.* reported a lack of ADCC activity in non-neutralizing anti-HIV-1 Abs, using re-activated T cells from HIV-1 infected patients. The study included non-neutralizing Abs targeting the V3 crown, CD4 binding site, and the PID site of gp41. Non-neutralizing Abs targeting V2 epitopes were not tested³¹.

The present study was performed to assess and compare the ADCC capacity of mAbs using an assay that directly measures the lysis of infected primary CD4 T cells and is therefore physiologically more relevant than assays using cell lines. Abs to different regions of gp120 were included, but the focus was on anti-V1V2 mAbs, isolated from HIV-1 infected patients and similar to Abs induced by RV144, with no or low neutralizing activity. In addition, other anti-V1/V2 Abs and well-characterized bNAbs were used. Our data suggest that mAbs targeting the V1V2 domain of gp120 show exceptional ADCC activity using this assay and are highly relevant Abs for inducing ADCC activity.

Results

Non-neutralizing V2i mAbs induce stronger NK cell-mediated lysis of HIV-1_{SF162} infected CD4 T cells than a panel of three broadly neutralizing mAbs.

The ADCC assay that we perform uses primary CD4 T cells infected with HIV-1 isolates produced by primary PBMCs (target cells) and autologous purified NK cells (effector cells). We require a minimum infection rate of 15% for the target cells and record the decrease of infected cells over 4 hrs, hence measuring the direct lysis of infected cells in the presence of Abs (Fig. 1A). All measurements were performed with at least 2 different donor cells to ensure reproducibility. This assay gives a highly physiologically relevant reading of the decrease of infected primary cells by Abs.

An initial titration of the Abs was carried out. We measured a dose response for all mAbs and selected the concentration that induced the highest NK cell mediated killing of HIV-1_{SF162}-infected cells (Fig. 1B). Using this concentration (5 μ g/ml) we then compared the ADCC activity of several bNAbs with mAbs with no or low neutralizing activity (here referred to as non-neutralizers). The mAbs used target several gp120 epitopes as indicated in Table 1.

We found that the non-neutralizing mAbs directed against the V2i epitope and the gp41 principal immunodominant domain (PID) were more potent in inducing NK cell mediated killing of HIV-1_{SF162}-infected cells compared to the broadly neutralizing mAbs tested (Fig. 2A). Notably, the V2i mAbs reached high levels of ADCC, achieving levels of p24+ cell decrease of up to 55–65% for non-neutralizing mAbs 697D and 830A. As level of ADCC activity varied according to the primary donor cell used, we repeated the ADCC experiment 6 times with different PBMC donors. The mean of decrease of p24+ cells was 45% for mAb 697D and 33% for mAb 830A. The gp41 PID mAb 7B2, which is also non-neutralizing, achieved a maximum ADCC level of 38% and a mean of 29% when tested in 5 independent experiments with different PBMC donors. There was no statistically significant difference in the ADCC levels of these 3 non-neutralizers (Fig. 2A).

In contrast, the ADCC activity of the bNAbs reached maximum levels of 34%, 23%, and 16% for 3BNC117, 10-1074, and 10E8, respectively (Fig. 2A). They were each tested in 5–6 different ADCC experiments and the mean reduction in p24+ cells was 23%, 14%, and 10% for 3BNC117, 10-1074, and 10E8, respectively. This was significantly lower than the ADCC activity displayed by 697D. Finally, mAb 3BC176, targeting an interprotomer epitope of gp41, displayed no ADCC.

When comparing the reduction in p24+ cells induced by the 2 mAbs targeting the V2i epitope to the reduction achieved by the 3 bNAbs we found that the V2i mAbs were significantly better at inducing ADCC ($p < 0.0001$) on SF162-infected cells. The mean p24+ cell decrease was more than 2-fold higher with the V2i mAbs (39% for V2i mAbs vs, 16% for bNAbs) (Fig. 2B).

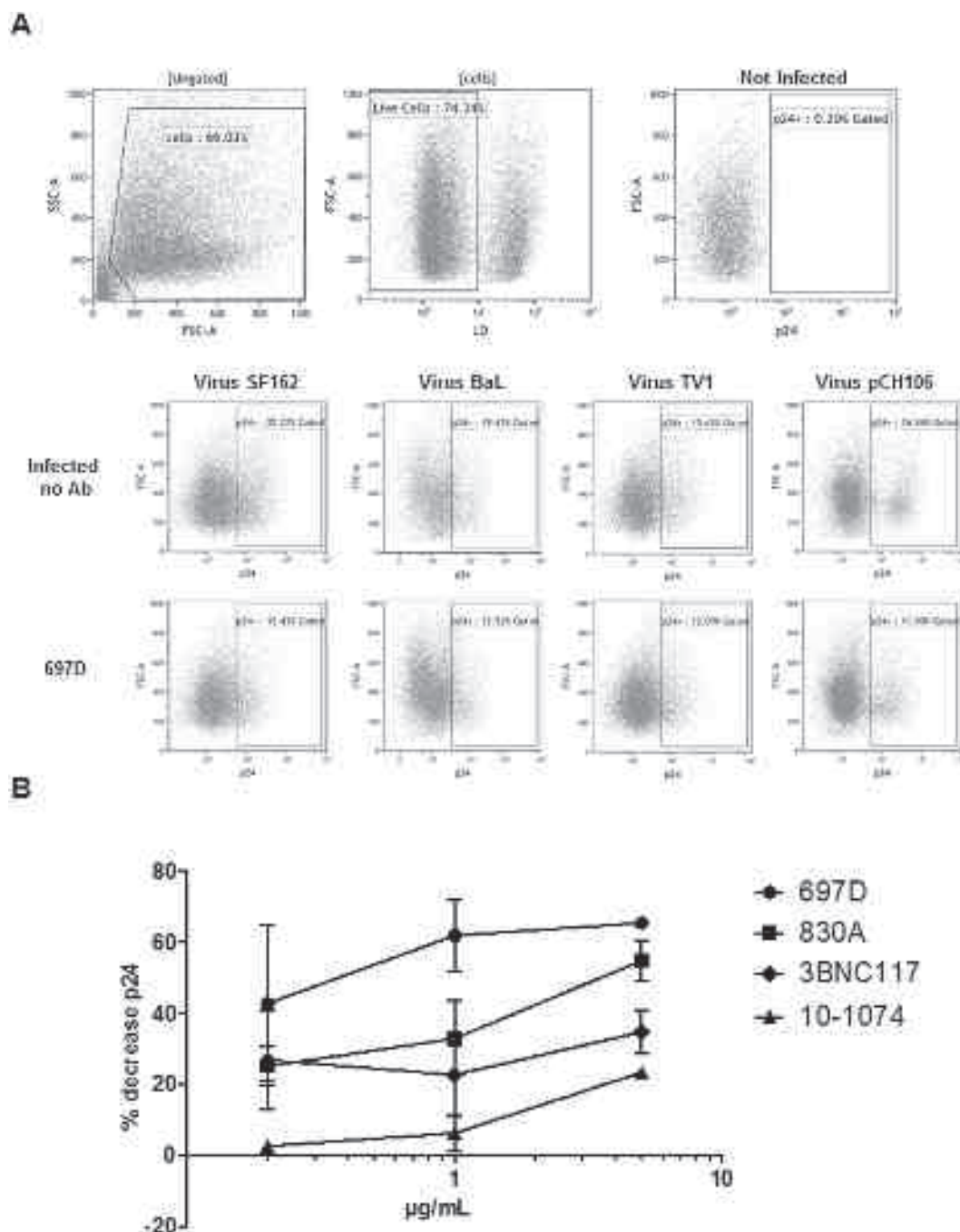


Figure 1. Flow cytometry data of three ADCC experiments. The infected cells were stained with a Live/Dead marker to exclude the dead cells from the analysis. After permeabilization, cells were stained for intracellular p24. The addition of 5 µg/ml of each mAb induced the lysis of infected cells, visible in the decrease in p24 positive cells. Data for 3 independent experiments with 3 different donor cells infected with different HIV subtypes are shown. (A) A dose-response curve is shown for mAbs to determine the best concentration for inducing NK cell mediated killing of HIV-1_{SF162}-infected cells. MAbs were used at 5 -1- and 0.2 µg/ml and were specific for V2i (697D and 830A), CD4bs (3BNC117) and the V3-glycan (10-1074). The mean with SEM of one experiment in duplicates is shown (B).

V2i mAbs induce cross-clade NK cell mediated lysis. The high ADCC activity of the V2i mAbs demonstrated in our experimental conditions encouraged us to take a closer look at a panel of V2i mAbs (Table 1). We have previously shown that these V2i mAbs have little neutralizing capacity¹². To further assess mAbs that target other epitopes in V2, we included in the study the V2p mAbs CH58 and CH59, isolated from RV144 vaccinees receiving subtype A/E and B gp120s, which had been shown to have weak and narrow neutralizing activity³² and therefore are categorized here as non-neutralizers (Table 1). Monoclonal Ab PG9, a V2q mAb that was isolated

mAb	Specificity	Source	Neutralizing Activity	Reference	Derivation
697-D	V2i	SZP	–	15	hybridoma
830A	V2i	SZP	–	50	hybridoma
1361	V2i	SZP	–	51	hybridoma
1393A	V2i	SZP	–	50	hybridoma
2158	V2i	SZP	–	49	hybridoma
2297	V2i	SZP	–	14	hybridoma
CH58	V2p	XPK	–	38	recombinant
CH59	V2p	XPK	–	38	recombinant
PG9	V2q	HIV Rep	++	33	recombinant
7B2	gp41 (cluster I PID)	HIV Rep	–	52	hybridoma
3BNC117	CD4bs	HIV Rep	+++	53	recombinant
10–1074	V3-glycan	HM	+++	54	recombinant
10E8	gp41 (MPER)	HIV Rep	++	48	recombinant
3BC176	gp41 (interprotomer)	HM	+/-	55	recombinant

Table 1. Human mAbs used. SZP: Susan Zola-Pazner, XPK: Xiangpeng Kong, HIV Rep: NI H HIV Repository, HM: Hugo Mouquet.

from a clade A donor, recognizes a quaternary epitope that requires the presence of the N160 glycan on gp120 and is a potent and broad neutralizer³³ (Table 1).

All six tested V2i mAbs showed strong ADCC activity against SF162, as did the two V2p mAbs CH58 and CH59. Monoclonal Ab 697D induced the strongest decrease in intracellular p24+ cells (45%), followed by 830A (33%) and 1391 A (28%). CH58 and CH59 induced a 30% and 28% decrease in p24+ cells, respectively. PG9 did not induce ADCC against SF162 infected cells since the SF162 Env lacks the required N160 glycan^{34,35} (Fig. 3A). Furthermore, V2i mAbs were able to lyse CD4 T target cells infected with the clade B BaL virus, although with slightly lower ADCC activity (range of 4% to 33% of intracellular p24+ cell decrease). Both V2p mAbs CH58 and CH59 also strongly induced NK cell mediated killing of BaL infected cells with a mean 25% and 44% reduction in p24+ cells, respectively. PG9 displayed the strongest ADCC capacity against BaL with more than 50% of p24+ cell reduction (Fig. 3B). Low levels of ADCC were recorded when the cells were infected with TV1, a clade C virus and Bx08, a clade B virus, both classified as Tier 2 for neutralization. Against TV1, the maximum ADCC activity by V2i mAbs was detected with mAbs 830A and 697D, achieving a decrease in p24+ cell of 18% and 17%, respectively. V2p mAb CH58 induced ADCC levels of 8% whilst CH59 did not display ADCC activity against TV1 infected target cells. The V2q mAb PG9 performed very well in inducing ADCC against this subtype C, Tier 2 primary isolate with a mean of 30% reduction of p24+ cells (Fig. 3C). Similar levels of ADCC were achieved against Bx08, with maximum ADCC levels reaching and 19% (PG9 and 697D) (Fig. 3D). In addition, we also tested two Transmitted/Founder (T/F) viruses: all of the V2i mAbs exhibited ADCC activity against pREJO, with means ranging from 23% (697D) to 13% (1393 A and 2158). Similar ADCC levels were reached by the neutralizing Ab PG9 that induced a mean 17% decrease in p24+ cells (Fig. 3E). 697D showed an ADCC activity of 29% using T/F virus pCH106, compared to 21% for PG9 (Fig. 3F).

Overall, the V2 mAbs consistently induced NK cell mediated killing of primary cells infected with a variety of different viruses.

Binding to infected cells is necessary but not sufficient for ADCC activity. Abs need to bind to infected cells in order to carry out ADCC. We therefore measured the capacity of Abs to bind p24+ infected cells. V2i mAbs were able to bind p24+ pREJO-infected cells at levels ranging between 12% and 18%. This suggests that V2 epitopes are expressed on primary infected cells. However, this binding was less efficient than that observed with some bNABs, which reached levels of up to 66% (Fig. 4A). Moreover, the binding capacity of mAbs to infected cells did not strongly correlate with their ADCC activity ($p = 0.0171$) (Fig. 4B). Indeed, binding is required but not sufficient to carry out the killing of infected cells and the triggering of additional steps via the Fc domain is necessary to induce ADCC.

Discussion

This is the first report showing that non-neutralizing anti-V2 mAbs elicited in HIV-1 infected patients have strong ADCC activity. Cross-reactive ADCC capacity was observed for four subtype B and C primary isolates (SF162, BaL, Bx08, and TV1) and two subtype B Transmitted Founder infectious molecular clones (pREJO, pCH106).

Abs displaying ADCC activity have to recognize and bind infected cells via their Fab fragments. Indeed, we found that anti-V2 mAbs bind to the V2 epitopes displayed on the surface of infected cells. However, the precise accessibility of V2 epitopes required for binding to infected cells was not determined. It has been suggested that “transitional epitopes” emerge on the surface of infected cells during conformational rearrangement^{12,36}. Moreover, epitopes may vary according to their stage of infection (early infection versus latently infected cells, cells covered with virus particles versus cells in the course of virus budding). Binding of CD4 was also shown to downregulate the expression of certain epitopes. Thus, the nature of the epitopes of the viral envelope glycoproteins exposed on the surface of these infected cells requires further investigation. We suggest that the V2 loop

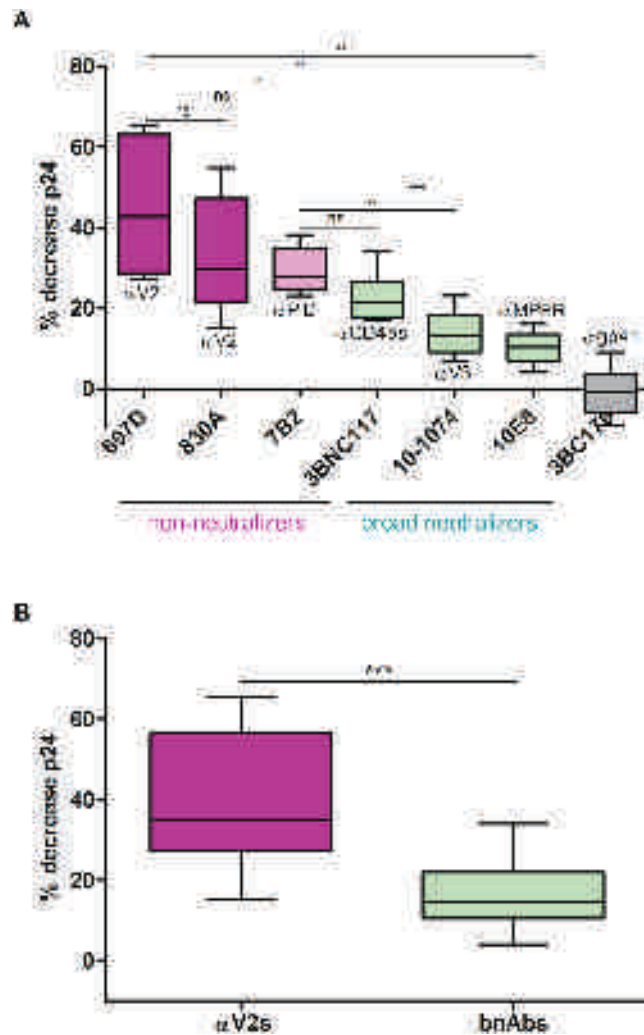


Figure 2. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) with enriched primary CD4 T cells infected with HIV-1_{SF162}. (A) ADCC activity of a set of mAbs was analyzed using 5 μ g/ml of each mAb, using autologous NK cells as effector cells (E/T ratio = 1:1). A minimum of 5 different donor cells was tested per mAb. The percentage of target cell lysis (% decrease p24) was normalized to control wells without mAbs using the following formula: ((%p24 infected target cells with effectors – %p24 infected target cells with effectors and mAb) / %p24 infected targets with effector cells) \times 100. (B) Pooled ADCC results of mAbs 697D and 830A (V2s) and 3BNC117, 10-1074, and 10E8 (bnAbs). A two-tailed unpaired ttest was used for statistical analyses.

epitopes remain accessible on infected primary cells and that Abs targeting these epitopes are therefore highly relevant for ADCC activity under physiological conditions.

Previously, mAbs CH58 and CH59 were shown to induce ADCC using an NK cell line as effectors and a T cell line (CEM) infected with the IMC AE.CM235, the same subtype as the immunogen used for immunization^{32,37,38}. Here we show that CH58 and CH59 mAbs also display ADCC activity against SF162 and BaL infected primary cells.

The reported ADCC activity of mAb PG9 is contradictory depending on the assay used. With primary cells and primary BaL and TV1 virus, we detected high ADCC activity of PG9. Previously, no ADCC was observed using this mAb with the HIV-1_{JRCSF}-infected CEM.NKR.CCR5 cell line and primary NK effector cells whilst others reported ADCC when CEM.NKR.CCR5 cells infected with HIV-1_{NL4-3} and HIV-1_{JR-FL} and an NK cell line expressing human Fc γ R1IIIA was used as effector cells. The binding of the Fc domain of PG9 and other Abs to the FcR on the surface of different effector cells may explain the distinct results^{39,40}.

Abs have to capture effector cells via their Fc domain to trigger the ADCC process. Huang *et al.* recently showed that the mAb b12, mutated in the Fc domain to modify its Fc binding capacity, displayed distinct ADCC, or phagocytic functions⁴¹. These results firmly demonstrate that binding to the Fc domain is decisive for Fc-mediated functions. In this regard, binding to the tip of the envelope trimeric spike, where V1/V2 epitopes are located, may facilitate binding of the effector cell via the Fc domain of the Ab.

Noteworthy, in our study, the binding of the V1/V2 Abs did not strongly correlate with cell lysis implying that the Fc domain participates in induction of lysis. All V2i mAbs used here are IgG1, except for 830A, which

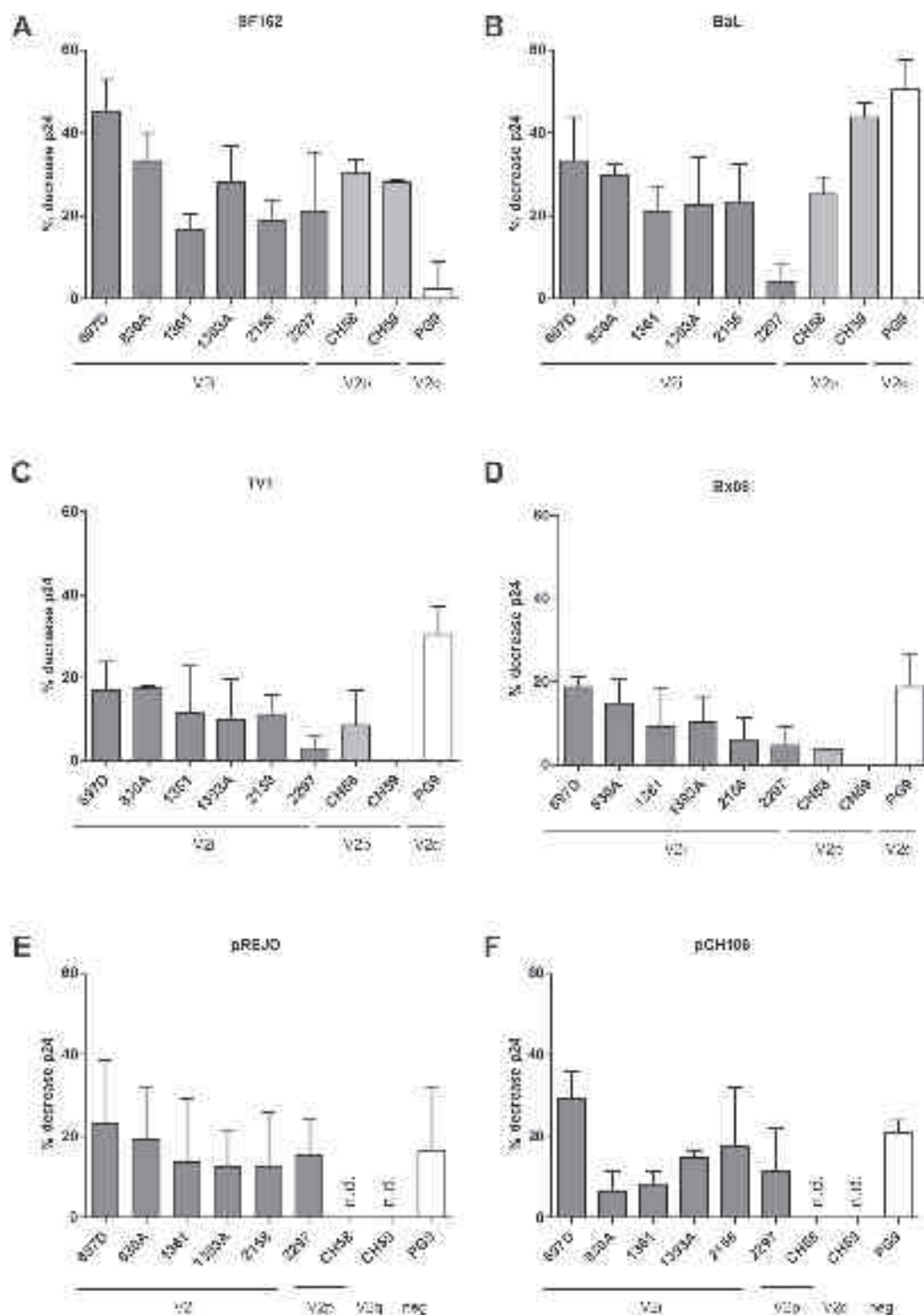


Figure 3. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) on enriched primary CD4 T cells infected with SF162 (A), BaL (B), TV1 (C), Bx08 (D), pREJO (E), or pCH106 (F). ADCC activity of mAbs targeting the V2 region of gp120 was analyzed using 5 μg/ml of each mAb, using autologous NK cells as effector cells (E/T ratio = 1:1). The mean of 2–3 independent experiments is shown with SEM. The percentage of target cell lysis was normalized to control wells without mAbs using the following formula: ((%p24 infected target cells with effectors – %p24 infected target cells with effectors and mAb)/ %p24 infected targets with effectors) × 100.

is IgG3. The mAbs tested herein were both recombinant and hybridoma-derived; the Fc domain is that of the Ab from the infected patients for the V2i mAbs but recombinantly engineered to be IgG1 for the bNAbs^{14,42}. Therefore, the specificity and derivation of the Abs studied here differed from those examined by Bruel *et al.*³¹,

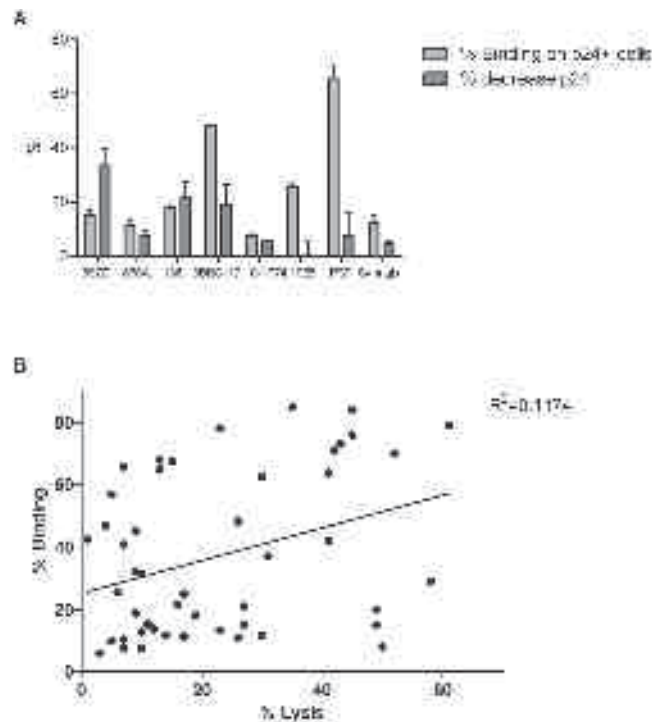


Figure 4. Binding of mAbs to enriched primary CD4 T cells infected with pREJO. Binding of mAbs targeting different regions of gp120 was analyzed by incubating 5 μ g/ml of each mAb for 4 hrs with infected primary cells. At the same time, ADCC was measured in parallel. Mean of one representative experiment in duplicates with SEM is shown (A). The correlation of binding versus ADCC activity for the same set of mAbs (697D, 830A, 1361, 3BNC117, 10-1074, 10E8, PG9) was calculated by combining the results of 3 independent experiments, using the Pearson two-tailed correlation test. $p = 0.0171$ (B).

who used different mAbs constructed with identical heavy chains. With their panel of mAbs, they found that non-neutralizing Abs targeting V3 and the CD4 binding site of gp120 and the PID of gp41 displayed little to no detectable ADCC activity on reactivated cells isolated from HAART-treated HIV-infected patients³¹. Of note, ADCC activity with mAbs of these specificities but with distinct Fc domains has previously been described^{43,44}. Whether this discrepancy is due to the Fc domain of the Abs needs to be further assessed.

Since the Fc domains of the patient-recovered V2i mAbs were able to induce NK cell-mediated killing, they are able to efficiently trigger the Fc γ RIIIA (CD16), which is expressed on primary NK cells. We therefore propose that the combination of the heavy and light chains that constitute these V2i mAbs are particularly favorable for inducing ADCC, and that increased attention be given to the characterization of the Fc domains of Abs, since they are essential for the induction of ADCC⁴⁵.

Overall, our results revealed ADCC activity of non-neutralizing anti-V2 Abs isolated from HIV-1 infected patients. Notably, these V2i mAbs show specificities that are similar to the Abs that correlated with reduced infection rates in the RV144 vaccine trial, and the V2i mAbs displaying ADCC activity are further similar to the Abs induced in RV144, where reduced infection was correlated with ADCC rather than neutralizing activity. Further significance to the studies described above comes from the physiologically relevant ADCC assay, which employed autologous primary effector cells and primary target cells infected with primary isolates and transmitter/founder viruses. These results emphasize the potential role of anti-V1/V2 Abs for ADCC activity and further suggest that lysis of infected cells may be an additional relevant antibody inhibitory effect that we should continue to unravel to define the components required for a protective vaccine.

Materials and Methods

Cells and viruses. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood via Ficoll-Hypaque sedimentation. The blood was received from healthy volunteers at the Blood Transfusion Center (EFS) in Strasbourg. Using an AutoMACS (Miltenyi Biotec) for immunomagnetic bead isolation, NK cells were separated from the PBMCs via anti-CD56 beads and then frozen in liquid nitrogen. The rest of the cells were depleted of CD8⁺ cells (anti-CD8 magnetic beads) to obtain enriched primary CD4⁺ T cells, which were then activated for 3 days using phytohemagglutinin (PHA). The activated cells were infected with purified and concentrated primary HIV-1 isolates (SF162, BaL, or TV1) for 72–96 hrs. Infection efficiency was analyzed after 2 days via flow cytometry and the cells were used if the levels of intracellular p24 were above 15%.

ADCC. The ADCC assay was performed using primary cells and primary HIV-1 isolates, as previously described²⁴. Briefly, NK cell-depleted PBMCs were infected for 4 days with primary isolates. Our ADCC assay

is highly challenging as experiments were carried out only if at least 15% of primary CD4 T cells were infected (p24+) after 4 days. 2×10^5 HIV-1 infected enriched primary CD4+ T cells were plated in 50 μ l of RPMI-1640, 10% FCS, and 50IU interleukin-2 (R&D Systems) in a U-bottom 96-well-plate and mixed with 2×10^5 autologous NK cells in 50 μ l of the same medium (1:1 effector: target ratio). 5 μ l CD107a-PE (Miltenyi Biotec) was added per 1×10^6 autologous NK cells. 25 μ l of mAbs at the indicated concentrations were added. After 4 hrs of incubation, cells were stained using Live/Dead Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Life Technologies), CD3-APC Vio770 (Miltenyi Biotec), CD16-PercP Vio700 (Miltenyi Biotec), and CD56-APC (Miltenyi Biotec). Cells were then fixed and permeabilized (Cytotfix/Cytoperm; BD Biosciences) and stained for intracellular p24 (KC57-RD1-FITC; Beckman Coulter) to measure infection rate. The percentage of target cell lysis was normalized to control wells without mAbs using the following formula:

$$\left(\frac{\%p24 \text{ infected target cells with effectors} - \%p24 \text{ infected target cells with effectors and mAb}}{\%p24 \text{ infected targets with effector cells}} \right) \times 100.$$

This takes into account the decreased infection rate due to direct lysis in the absence of Abs.

Less than 1% of variation within the 4 control wells was observed, demonstrating that the infection rate is highly homogeneous. Due to the complexity of this assay, a variability of the lysis capacity was observed depending on the different donor cells used. We repeated each experiment with 2 to 6 different donor cells according to the assay performed. Although the lysis intensity varied, the general pattern of ADCC activity for the different Abs was constant, demonstrating reproducibility.

mAbs. The mAbs used are listed in Table 1.

Statistics. For all experiments, the mean of at least one experiment in duplicates with SEM is shown (Figs 1 and 4: one experiment in duplicates, Fig. 2: 5–6 experiments in duplicates, Fig. 3: 2–3 experiments in duplicates). For statistical analyses in Fig. 2, a two-tailed unpaired ttest was carried out. The correlation of Fig. 3 was calculated by combining the results of 3 independent experiments and using the Pearson two-tailed correlation test.

Ethics Statement. Human peripheral blood mononuclear cells were purified from blood packs purchased from the blood bank (Établissement Français du Sang, Strasbourg), with written informed consent from the donors.

References

- Mascola, J. R. & Montefiori, D. C. HIV-1: nature's master of disguise. *Nat Med* **9**, 393–394, <https://doi.org/10.1038/nm0403-393> (2003).
- Simek, M. D. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol* **83**, 7337–7348, <https://doi.org/10.1128/JVI.00110-09> (2009).
- Haynes, B. F. *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* **366**, 1275–1286, <https://doi.org/10.1056/NEJMoal113425> (2012).
- Zolla-Pazner, S. *et al.* Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. *PLoS One* **9**, e87572, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087572> (2014).
- Montefiori, D. C. *et al.* Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis* **206**, 431–441, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis367> (2012).
- Israel, Z. R., Gorny, M. K., Palmer, C., McKeating, J. A. & Zolla-Pazner, S. Prevalence of a V2 epitope in clade B primary isolates and its recognition by sera from HIV-1-infected individuals. *AIDS* **11**, 128–130 (1997).
- Lyumkis, D. *et al.* Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1484–1490, <https://doi.org/10.1126/science.1245627> (2013).
- Julien, J. P. *et al.* Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1477–1483, <https://doi.org/10.1126/science.1245625> (2013).
- Pan, R., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S. & Kong, X. P. The V1V2 Region of HIV-1 gp120 Forms a Five-Stranded Beta Barrel. *J Virol* **89**, 8003–8010, <https://doi.org/10.1128/JVI.00754-15> (2015).
- Arthos, J. *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* **9**, 301–309, <https://doi.org/10.1038/ni1566> (2008).
- Byrareddy, S. N. *et al.* Sustained virologic control in SIV+macaques after antiretroviral and alpha4beta7 antibody therapy. *Science* **354**, 197–202, [354/6309/197](https://doi.org/10.1126/science.1245627) (2016).
- Upadhyay, C. *et al.* Distinct mechanisms regulate exposure of neutralizing epitopes in the V2 and V3 loops of HIV-1 envelope. *J Virol* **88**, 12853–12865, <https://doi.org/10.1128/JVI.02125-14> (2014).
- Mayr, L. M., Cohen, S., Spurrier, B., Kong, X. P. & Zolla-Pazner, S. Epitope mapping of conformational V2-specific anti-HIV human monoclonal antibodies reveals an immunodominant site in V2. *PLoS One* **8**, e70859, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070859> (2013).
- Gorny, M. K. *et al.* Functional and immunochemical cross-reactivity of V2-specific monoclonal antibodies from HIV-1-infected individuals. *Virology* **427**, 198–207, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.003> (2012).
- Gorny, M. K. *et al.* Human anti-V2 monoclonal antibody that neutralizes primary but not laboratory isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 8312–8320 (1994).
- Zolla-Pazner, S. *et al.* Analysis of V2 antibody responses induced in vaccinees in the ALVAC/AIDSAX HIV-1 vaccine efficacy trial. *PLoS One* **8**, e53629, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053629> (2013).
- Bar, K. J. *et al.* Early low-titer neutralizing antibodies impede HIV-1 replication and select for virus escape. *PLoS Pathog* **8**, e1002721, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002721> (2012).
- Veillette, M. *et al.* Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* **88**, 2633–2644, <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-13> (2014).
- Lee, W. S. *et al.* Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Reactivated HIV-1-Infected Cells. *J Virol* **90**, 2021–2030, <https://doi.org/10.1128/JVI.02717-15> (2015).
- Wren, L. H. *et al.* Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* **138**, 116–123, <https://doi.org/10.1111/imm.12016> (2013).
- Baum, L. L. *et al.* HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* **157**, 2168–2173 (1996).

22. Chung, A. W. *et al.* Activation of NK cells by ADCC antibodies and HIV disease progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* **58**, 127–131, <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31822c62b9> (2011).
23. Santra, S. *et al.* Human Non-neutralizing HIV-1 Envelope Monoclonal Antibodies Limit the Number of Founder Viruses during SHIV Mucosal Infection in Rhesus Macaques. *PLoS Pathog* **11**, e1005042, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005042> (2015).
24. Moog, C. *et al.* Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol* **7**, 46–56, <https://doi.org/10.1038/mi.2013.23> (2014).
25. Lambotte, O. *et al.* Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* **23**, 897–906, <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328329f97d> (2009).
26. Milligan, C., Richardson, B. A., John-Stewart, G., Nduati, R. & Overbaugh, J. Passively acquired antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-infected infants is associated with reduced mortality. *Cell Host Microbe* **17**, 500–506, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.002> (2015).
27. Mabuka, J., Nduati, R., Odem-Davis, K., Peterson, D. & Overbaugh, J. HIV-specific antibodies capable of ADCC are common in breastmilk and are associated with reduced risk of transmission in women with high viral loads. *PLoS Pathog* **8**, e1002739, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002739> (2012).
28. Chung, A. W. *et al.* Polyfunctional Fc-effector profiles mediated by IgG subclass selection distinguish RV144 and VAX003 vaccines. *Sci Transl Med* **6**, 228ra238, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007736> (2014).
29. Su, B. & Moog, C. Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front Immunol* **5**, 289, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00289> (2014).
30. Lewis, G. K., Finzi, A., DeVico, A. L. & Pazgier, M. Conformational Masking and Receptor-Dependent Unmasking of Highly Conserved Env Epitopes Recognized by Non-Neutralizing Antibodies That Mediate Potent ADCC against HIV-1. *Viruses* **7**, 5115–5132, <https://doi.org/10.3390/v7092856> (2015).
31. Bruel, T. *et al.* Lack of ADCC Breadth of Human Nonneutralizing Anti-HIV-1 Antibodies. *J Virol* **91**, doi:e02440-16 (2017).
32. Liao, H. X. *et al.* Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity* **38**, 176–186, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.011> (2013).
33. Walker, L. M. *et al.* Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**, 285–289, <https://doi.org/10.1126/science.1178746> (2009).
34. Gorny, M. K. *et al.* Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J Virol* **79**, 5232–5237, doi:79/8/5232 (2005).
35. Ackerman, M. E. *et al.* Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog* **12**, e1005315, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005315> (2016).
36. Lewis, G. K. *et al.* Epitope target structures of Fc-mediated effector function during HIV-1 acquisition. *Curr Opin HIV AIDS* **9**, 263–270, <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000055> (2014).
37. Pollara, J. *et al.* HIV-1 vaccine-induced C1 and V2 Env-specific antibodies synergize for increased antiviral activities. *J Virol* **88**, 7715–7726, <https://doi.org/10.1128/JVI.00156-14> (2014).
38. Bonsignori, M. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J Virol* **86**, 11521–11532, <https://doi.org/10.1128/JVI.01023-12> (2012).
39. Loos, A. *et al.* Glycan modulation and sulfoengineering of anti-HIV-1 monoclonal antibody PG9 in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 12675–12680, <https://doi.org/10.1073/pnas.1509090112> (2015).
40. von Bredow, B. *et al.* Comparison of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Virus Neutralization by HIV-1 Env-Specific Monoclonal Antibodies. *J Virol* **90**, 6127–6139, <https://doi.org/10.1128/JVI.00347-16> (2016).
41. Huang, Y. *et al.* Diversity of Antiviral IgG Effector Activities Observed in HIV-Infected and Vaccinated Subjects. *J Immunol* **197**, 4603–4612, doi:jimmunol.1601197 (2016).
42. Tiller, T. *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* **329**, 112–124, doi:S0022-1759(07)00312-2 (2008).
43. Chung, A. W. *et al.* Identification of antibody glycosylation structures that predict monoclonal antibody Fc-effector function. *AIDS* **28**, 2523–2530, <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000444> (2014).
44. Pollara, J. *et al.* Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses. *Curr HIV Res* **11**, 378–387, doi:CHIVR-EPUB-57200 (2013).
45. Gunn, B. M. & Alter, G. Modulating Antibody Functionality in Infectious Disease and Vaccination. *Trends Mol Med* **22**, 969–982, doi:S1471-4914(16)30117-4 (2016).
46. Zhang, W., Godillot, A. P., Wyatt, R., Sodroski, J. & Chaiken, I. Antibody 17b binding at the coreceptor site weakens the kinetics of the interaction of envelope glycoprotein gp120 with CD4. *Biochemistry* **40**, 1662–1670, doi:bi001397m (2001).
47. Shingai, M. *et al.* Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature* **503**, 277–280, <https://doi.org/10.1038/nature12746> (2013).
48. Huang, J. *et al.* Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* **491**, 406–412, <https://doi.org/10.1038/nature11544> (2012).
49. Pinter, A. *et al.* The V1/V2 domain of gp120 is a global regulator of the sensitivity of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to neutralization by antibodies commonly induced upon infection. *J Virol* **78**, 5205–5215 (2004).
50. Nyambi, P. N. *et al.* Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. *J Virol* **74**, 7096–7107 (2000).
51. Gorny, M. K., VanCott, T. C., Williams, C., Revesz, K. & Zolla-Pazner, S. Effects of oligomerization on the epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Virology* **267**, 220–228, <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0095> (2000).
52. Pincus, S. H. *et al.* *In vivo* efficacy of anti-glycoprotein 41, but not anti-glycoprotein 120, immunotoxins in a mouse model of HIV infection. *J Immunol* **170**, 2236–2241 (2003).
53. Scheid, J. F. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* **333**, 1633–1637, <https://doi.org/10.1126/science.1207227> (2011).
54. Mouquet, H. *et al.* Complex-type N-glycan recognition by potent broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, E3268–E3277, <https://doi.org/10.1073/pnas.1217207109> (2012).
55. Lee, J. H. *et al.* Antibodies to a conformational epitope on gp41 neutralize HIV-1 by destabilizing the Env spike. *Nat Commun* **6**, 8167, <https://doi.org/10.1038/ncomms9167> (2015).

Acknowledgements

CH58 and CH59 were kindly provided by X. Kong, and mAbs 3BC176 and 10–1074 by H. Mouquet. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: mAbs PG9, 7B2, 10E8, and 3BNC117^{14,15,33,38,46–50}. This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the ANR under reference ANR-10-LABX-77, Sidaction Pierre Bergé under grand number AP-FPB-2013-2/06 and in part by NIH grant number P01 AI100151 (SZP). Dr. Zolla-Pazner was also supported in part by funds from the Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai. L. Mayr was supported by an ANRS fellowship.

Author Contributions

L.M., S.B., S.Z.P. and C.M. wrote the manuscript. L.M., S.Z.P. and C.M. designed the experiments. L.M. and T.D. performed the experiments. L.M., T.D., S.Z.P. and C.M. analyzed the data. S.S., G.L., J.K. and C.D. provided cells and virus stocks. L.M. and C.M. directed the project.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

L'ensemble des cellules utilisées dans les différents modèles (partie 1 et 2) sont également présentes dans les muqueuses du FGT. Cependant, dans ces modèles, les cellules utilisées ont été isolées et/ou générées à partir du sang périphérique et du sang de cordon ombilical. Les cellules provenant des tissus du FGT possèdent des caractéristiques phénotypiques bien distinctes par rapport aux cellules retrouvées dans le sang. L'étude de l'infection des cellules cibles du VIH-1 et des mécanismes d'inhibition des anticorps dans un modèle de tissus du FGT serait donc physiologiquement plus pertinente.

1. Infection et inhibition du VIH-1 dans des cellules issues des muqueuses du tractus génital féminin par du virus libre

Résultats préliminaires présentés en français

Afin de nous rapprocher des conditions physiologiques d'infections des muqueuses, nous avons mis en place deux modèles d'infection : un modèle d'infection sur des cellules en co-culture issues des muqueuses du FGT et un modèle d'infection sur des explants de tissus du FGT. Dans le premier modèle, nous avons isolé les cellules immunitaires provenant des différents tissus du FGT : trompe de Fallope (T), endomètre (M), endocol (N) et exocol (X). Pour le second modèle, nous avons conservé l'intégrité des tissus du FGT.

Ces études sont particulièrement difficiles à réaliser car la disponibilité des tissus humains est limitée et la concentration de cellules immunitaires collectées après digestion est faible. Les cellules immunitaires représentent en moyenne entre 20 et 30% de la totalité des cellules digérées dans l'ensemble des tissus du FGT.

Distribution des cellules cibles du VIH-1 dans les tissus du FGT :

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les cellules immunitaires isolées dans les différents tissus. Pour ce faire, nous avons d'abord identifié les cellules exprimant le marqueur des cellules leucocytaires : le CD45. Ce marqueur est fréquemment utilisé pour discriminer les cellules immunitaires des fibroblastes et des cellules épithéliales présentes dans la suspension cellulaire après digestion des tissus. Ces cellules sont ensuite marquées avec des Ac anti-CD3, anti-CD64 et anti-CD11c (voir matériel et méthodes) afin de caractériser les lymphocytes T (CD3+), les macrophages (CD64+) et les DC (CD11c+) (Annexe 1). Sur la base des résultats obtenus par le Dr Mariangela Cavarelli (communication personnelle), nous avons caractérisé deux populations de macrophages exprimant les phénotypes CD64+**CD11c+** et CD64+**CD11c-** ainsi que les DC **CD64-CD11c+** et les lymphocytes **CD3+** (Figure 1). Ces résultats nous indiquent que les phénotypes des macrophages et des DC sont très proches, particulièrement les macrophages CD64+**CD11c+**. Les macrophages CD11c- et CD11c+ représentent en moyenne 5% des cellules CD45+ totales dans les différents tissus (4% dans les trompes de Fallope (T), 5% dans l'endomètre (M), 4% dans l'endocol et 5% dans l'exocol pour les macrophages

CD11c- et 8% dans les trompes de Fallope (T), 5% dans l'endomètre (M), 2% dans l'endocol et 5% dans l'exocol pour les macrophages CD11c-). Les DC représentent en moyenne 2% de la population CD45+ (1% dans les trompes de Fallope (T), 1% dans l'endomètre (M), 1% dans l'endocol et 4% dans l'exocol) et les lymphocytes 60% de la population CD45+ (66% dans les trompes de Fallope (T), 52% dans l'endomètre (M), 58% dans l'endocol et 64% dans l'exocol). Nous n'observons pas de différence significative dans la répartition cellulaire entre les différents tissus. Nos résultats indiquent que les cellules T CD3+ représentent la population majoritaire des cellules immunitaires dans ces différents tissus.

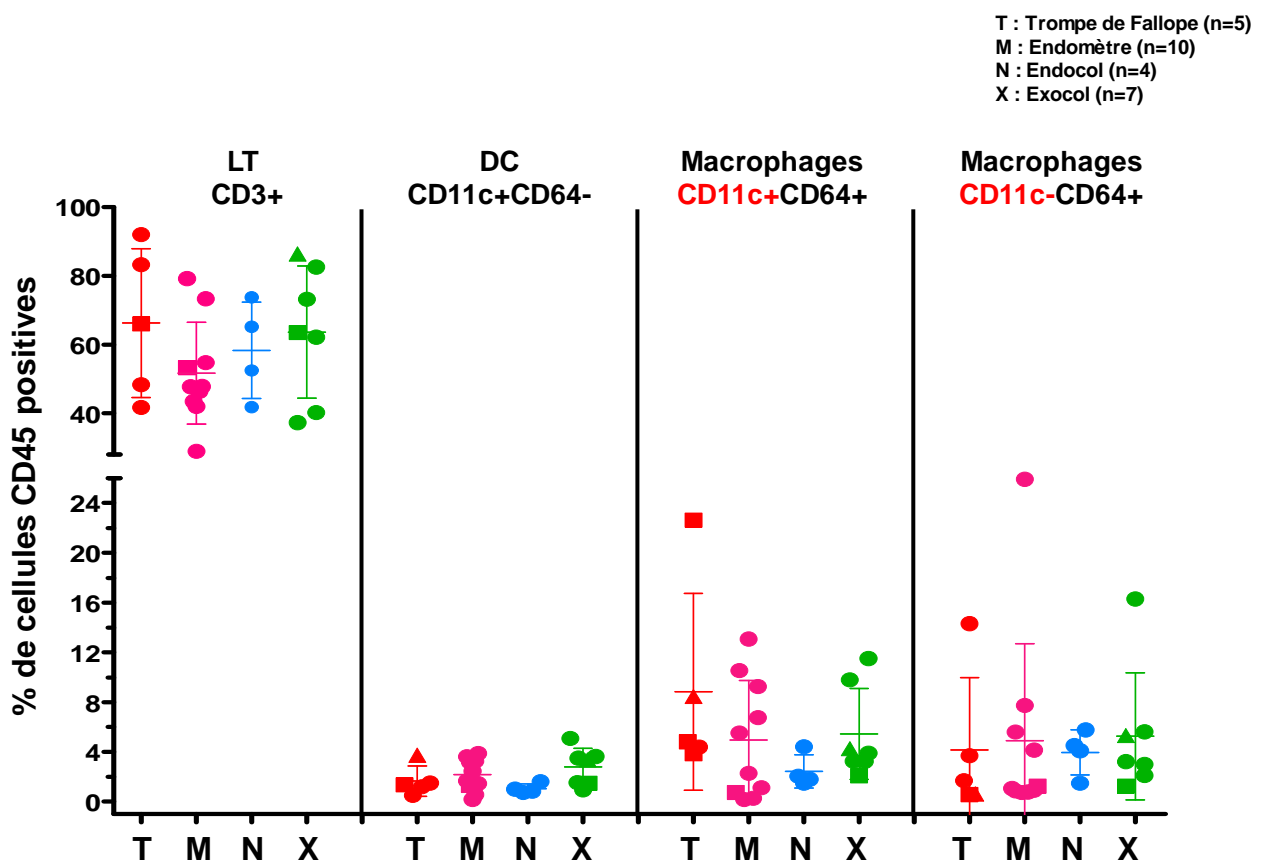


Figure 1 : Caractérisation phénotypique des cellules immunitaires dans les différents tissus.

Les lymphocytes TCD3, DC (CD64-CD11c+) et les deux populations de macrophages (CD64+CD11c+ et CD64+CD11c-) sont identifiées par le marqueur CD45 dans les trompes de Fallope en rouge (T) (n=5), l'endomètre en rose (M) (n=10), l'endocol en bleu (N) (n=4) et l'exocol en vert (X) (n=7). Le pourcentage des différentes populations cellulaires est calculé par rapport aux cellules immunitaires totales CD45+ présentes dans les différents tissus. Chaque point correspond à un donneur. Les différentes populations cellulaires sont caractérisées par la technique de cytométrie en flux.

Infection des cellules isolées des muqueuses du FGT :

Les cellules isolées sont infectées avec du virus libre (VIH-1_{pREJO}) pendant 2 jours. Nous observons que l'ensemble des cellules cibles du VIH-1 (LT CD4, DC et macrophages) caractérisées sont infectées dans les différents tissus (Figure 2). Le pourcentage de cellules infectées varie entre les différents tissus. Par exemple, 7% de lymphocytes T CD3+CD4+ infectés sont détectés dans l'endomètre et 12% de lymphocytes T CD3+CD4+ infectés sont détectés dans l'exocol. De manière intéressante, nous observons également une infection des DC dans les différents tissus (9,5% de DC infectées dans l'endomètre et 7% de DC infectées dans l'exocol). Le pourcentage de macrophages infectés exprimant le marqueur CD11c détecté est plus élevé comparé aux macrophages n'exprimant pas ce marqueur (14% de macrophages infectés CD11c+ et 5% de macrophages infectés CD11c- dans l'exocol). De manière intéressante, dans l'endomètre et l'endocol, nous observons que les pourcentages de DC (CD64-CD11c+) et de macrophages (CD64+CD11c+) infectés sont légèrement plus élevés que le pourcentage de LT CD3 infectés bien que les cellules T CD3 représentent environ 60% de la population des CD45 totales. Ces résultats nous suggèrent que les macrophages et les DC présents en minorité dans ces tissus sont préférentiellement infectés si l'on compare le pourcentage de cellules infectées parmi les cellules CD45 totales dans les différentes sous-populations. Il est à noter que, dans ce modèle d'infection, nous avons utilisé un virus fondateur ou « *transmitted founder* » T/F. Ces virus représentant les premiers virus transmis lors de la transmission et sont responsable de l'établissement des premiers foyers d'infection. L'utilisation de ce type de virus démontre la pertinence de nos résultats dans l'étude des premiers événements de l'infection par le VIH-1. Ainsi, dans notre modèle de co-culture, les DC et les macrophages exprimant le marqueur CD11c+ isolés de tissus représentent des cellules cibles du VIH-1 infectées précocement (dans les 2 jours) par des virus T/F. Ces résultats suggèrent que ces cellules pourraient avoir un rôle clé lors de la transmission de VIH-1 par voie sexuelle.

Au cours de cette étude, nous avons également analysé l'infection des cellules cibles du VIH-1 dans les trompes de Fallope. Au cours de la transmission par le VIH-1, les muqueuses des trompes de Fallope pourrait permettre l'établissement des premiers réservoirs viraux, puis favoriserait la dissémination et la persistance du virus dans

l'organisme. Dans ces tissus, nous observons que le pourcentage de DC et les macrophages CD11c+ infectés est 4 fois plus élevé (8% pour les DC et les macrophages) comparé au pourcentage des LT CD3 infectés (2%). Ces résultats nous laissent suggérer que les DC et les macrophages, une fois infectés, transmettent le virus aux LT CD3 avoisinants.

Dans les tissus du FGT, nos résultats indiquent que les DC et les macrophages ont un rôle clé au cours des premiers événements de l'infection par le VIH-1.

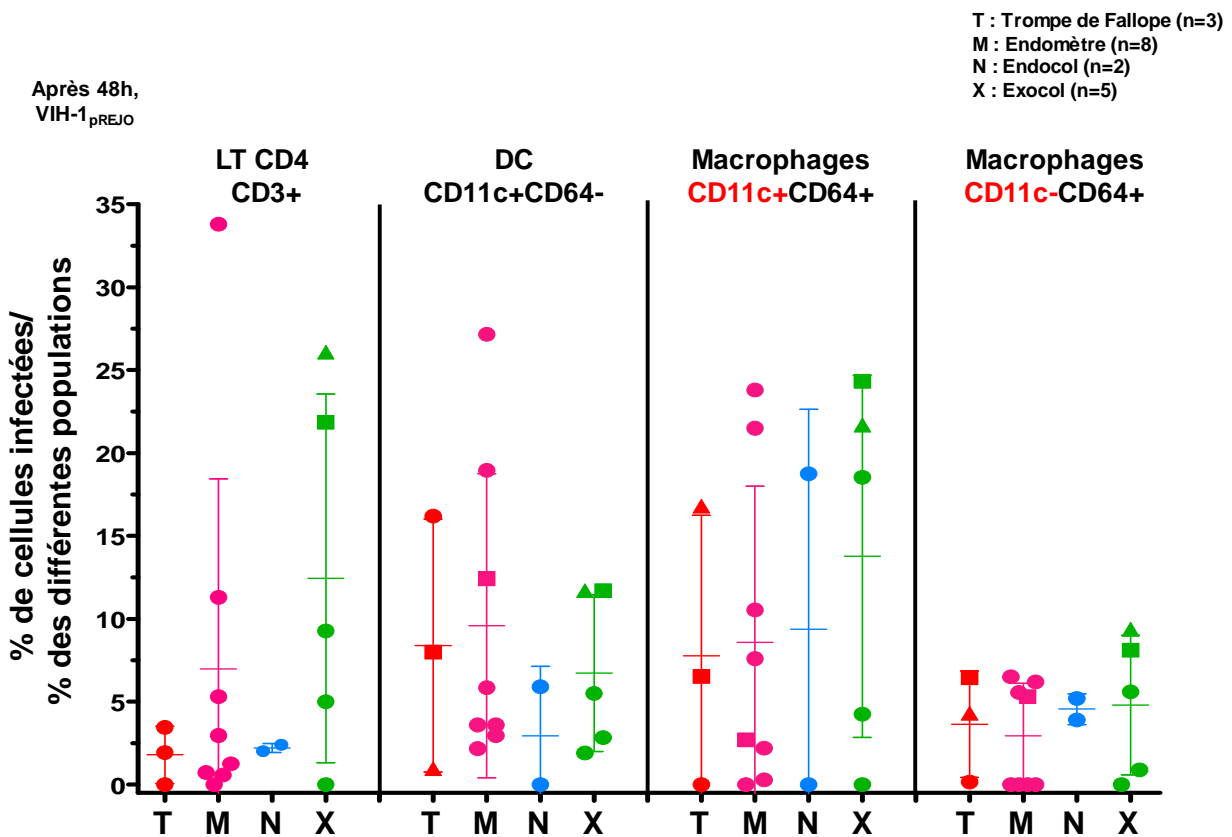


Figure 2 : Infection des cellules isolées de tissus. Les cellules isolées provenant des trompes de Fallope en rouge (T) (n=3), de l'endomètre en rose (M) (n=8), l'endocol en bleu (N) (n=2) et l'exocol en vert (X) (n=5) sont infectées avec un virus *transmitted founder* VIH-1-1_{pREJO} pendant 48h. Le pourcentage des cellules infectées dans les différentes populations cellulaires a été calculé par rapport au pourcentage de cellules totales présentes dans chaque population cellulaire. Le pourcentage de cellules positives à l'antigène viral intracellulaire p24 dans les différentes populations a été détecté par cytométrie en flux. Chaque point correspond à un donneur.

Les cellules dendritiques dans les muqueuses

Les DC des muqueuses possèdent des phénotypes particuliers avec l'expression du CD103 représentant les DC tolérogéniques et du CX3CR1 impliqué dans la formation des dendrites. Nous nous sommes intéressés à ces deux marqueurs présents à la surface des DC (Figure 3). Nous observons une majorité de DC CX3CR1- CD103- dans l'endomètre et dans l'exocol (72% et 84% respectivement) (Figure 3, A et B). Les DC CD103+ sont présentes en majorité dans l'endomètre (24%) comparé à l'exocol (11%) (Figure 3, A et B). Nous n'observons pas de différences significatives pour le marqueur CX3CR1 dans ces différents tissus (4% dans l'endomètre et 5% dans l'exocol). De plus, nous détectons des DC CX3CR1+ dans l'endomètre (4%) et les trompes de Fallope (1%) (Figure 3, A, B et C). Les marqueurs CD103 et CX3CR1 n'avaient pas encore été décrits dans ces tissus (9% de DC CD103+ et 1% de DC CX3CR1+). La caractérisation des DC CX3CR1+ et CD103+ dans l'endocol est en cours.

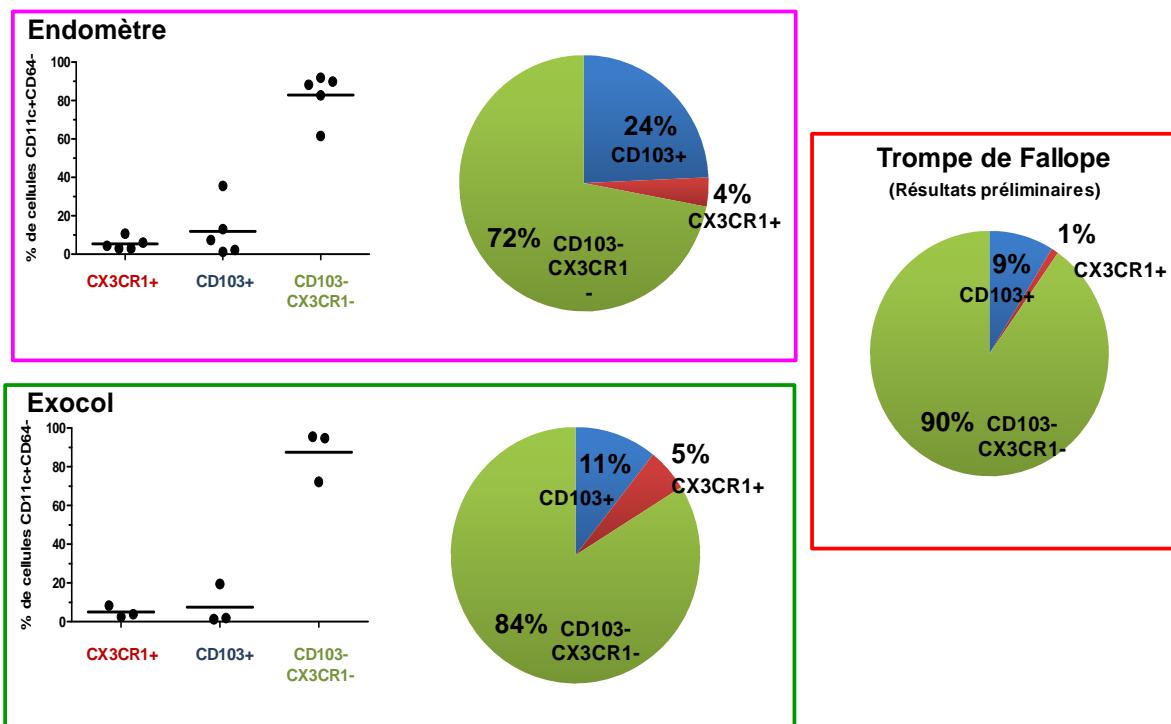


Figure 3 : Caractérisation des DC CD11c+ dans les tissus. Les différentes populations de DC sont identifiées par les marqueurs CD103 (en bleu) et CX3CR1 (en rouge) et double négative pour ces deux marqueurs (en vert) dans A) l'endomètre (n=5), B) l'exocol (n=3) et C) les trompes de Fallope (n=1). Le pourcentage des différentes populations des DC est calculé par rapport au pourcentage de DC totales présentes dans les différents tissus. Chaque point correspond à un donneur. La caractérisation des DC a été analysée par cytométrie en flux.

Après infection par le VIH-1, nos résultats très préliminaires détectent l'infection des DC CD103- et CX3CR1- dans l'endomètre et l'exocol (Figure 4). Cependant, nous observons également la présence de DC CX3CR1+ infectées dans l'endomètre. Ces résultats suggèrent, que ces DC capable d'émettre des prolongements cytoplasmiques vers la surface apicale pourraient capturer le virus présent à sa surface et devenir des cibles privilégiées du VIH-1.

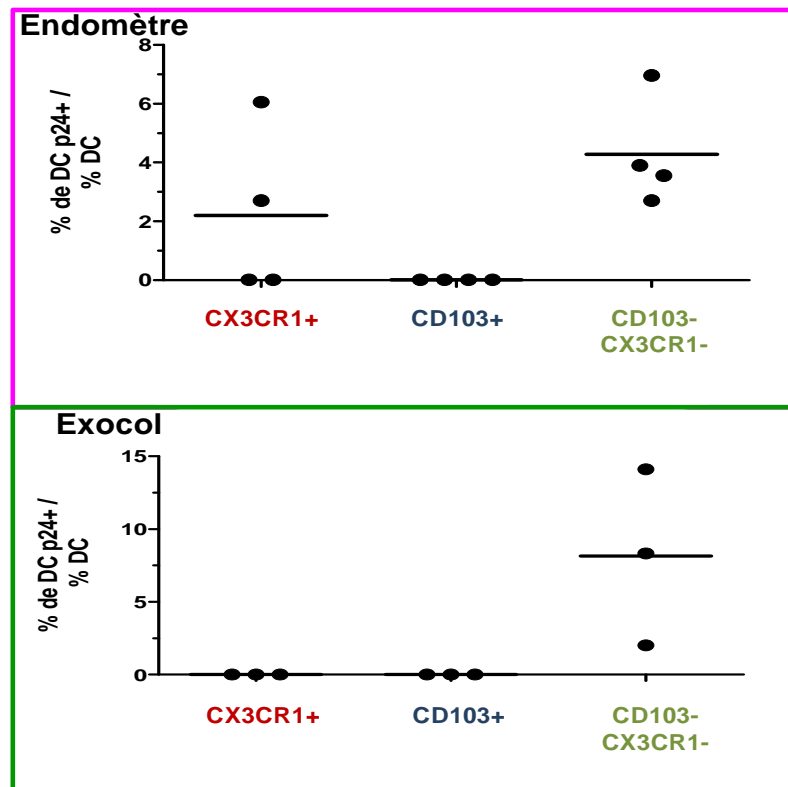


Figure 4 : Phénotype des DC infectées dans les tissus. Les cellules isolées provenant des différents tissus sont infectées avec un virus *transmitted founder* VIH-1_{pREJO} pendant 48h. Les DC p24 positives sont caractérisées en fonction de l'expression des marqueurs CD103 et CX3CR1 dans A) l'endomètre (n=4) et B) l'exocol (n=3). Le pourcentage de cellules infectées dans les différentes populations de DC a été calculé par rapport au pourcentage total de cellules présentes dans chaque population. Chaque point correspond à un donneur. Le pourcentage de cellules positives à l'antigène viral intracellulaire p24 dans les différentes populations a été détecté par cytométrie en flux

En parallèle, nous avons caractérisé les cellules immunitaires isolées des tissus par microscopie à épi-fluorescence (Figure 5). Nous avons détecté l'infection des cellules en utilisant un pseudovirus VIH-1_{pREJO} couplé au GFP/mCherry et l'expression des marqueurs CD103 et CX3CR1 dans cette culture. Nos résultats très préliminaires

montrent des cellules positives à la GFP (Figure 5A) mais également exprimant le CX3CR1 (Figure 5B) et CD103 (Figure 5C). Une co-localisation du virus et des cellules immunitaires au microscope confocal nous permettrait de déterminer les cellules infectées et confirmer nos résultats de cytométrie de flux.

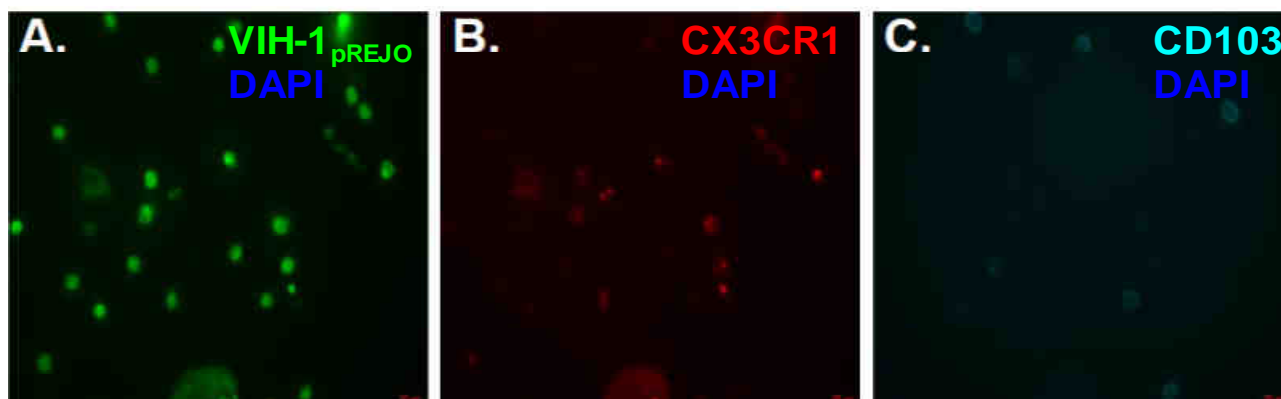


Figure 5. Caractérisation des cellules isolées provenant de l'endomètre. Les cellules isolées provenant de l'endomètre sont infectées pendant 24h avec un pseudovirus VIH-1_{pREJO} couplé au GFP/mCherry (A). Les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde puis marquées au DAPI (noyau en bleu), un anti-CX3CR1 PE (B) et anti-CD103 APC (C). Les images sont obtenues par microscopie à épifluorescence.

Localisation des cellules immunes dans les muqueuses.

En parallèle, nous avons mis au point et finalisé le modèle de culture de tissus. Les résultats préliminaires d'analyse de coupes de tissu non infecté par microscopie confocale nous ont permis d'observer la localisation des cellules immunitaires dans les trompes de Fallope et l'exocol. Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Dr M. Cavarelli au CEA (Paris). Nous pouvons observer les différentes structures de la barrière épithéliale : une monocouche retrouvée dans les trompes de Fallope et une couche pluristratifiée retrouvée dans l'exocol (Figure 6, A et D). Une abondance de lymphocytes T CD3 est retrouvée dans l'exocol et les trompes de Fallope (Figure 6, B et E). Ces cellules sont localisées dans la couche sous-muqueuse des trompes de Fallope et proche de la lame basale dans l'exocol. Les macrophages CD64+ sont localisés proche de la lame basale dans les tissus des trompes de Fallope (Figure 6F). Nous détectons des cellules CD64+ dans l'épithélium pluristratifié de l'exocol (Figure 6C). L'ensemble des résultats suggèrent que les macrophages pourraient avoir un rôle clé dans les premiers événements de l'infection par le VIH-1. La localisation des DC serait également particulièrement souhaitée dans ce contexte.

Ces tissus ont été infectés par inoculation d'un pseudovirus VIH-1pREJO couplé au GFP/mCherry à l'intérieur d'un cylindre dans un tissu polarisé pendant 24h. La recherche des cellules infectées sur des coupes de tissus est en cours d'analyse.

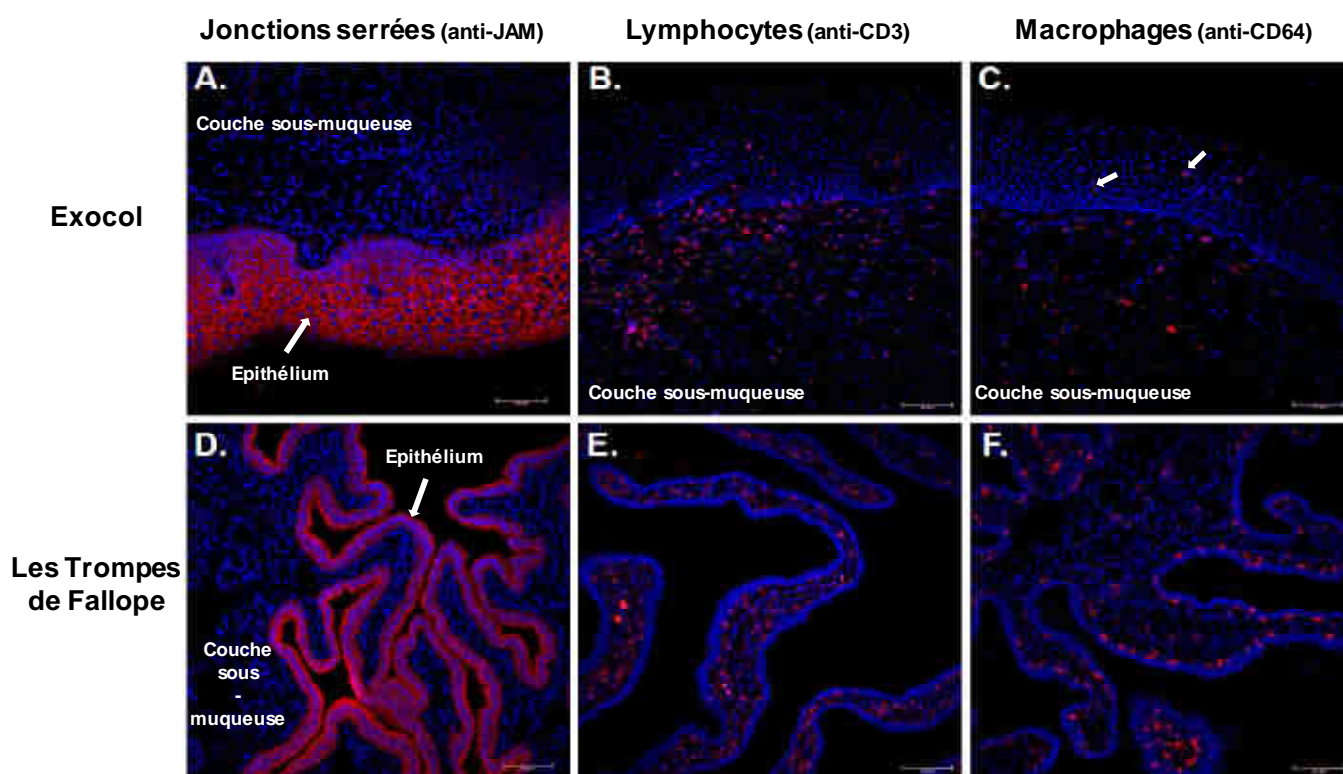


Figure 6. Localisation des cellules immunitaires dans l'exocol (A, B et C) et les trompes de Fallope (D, E et F). Les tissus sont cryogénisés le jour même après réception des tissus. Les cryosections sont fixées à l'acétone puis marquées au DAPI (noyau en bleu), anti- JAM Alexa fluor 594 (A et D), anti-CD3 Alexa fluor 594 (B et E) et anti-CD64 Alexa fluor 594 (C et F) dans l'exocol (A, B, et C) et les trompes de Fallope (D, E et F). C. Les flèches correspondent à la détection de macrophages dans l'épithélium de l'exocol. Les images sont obtenues par microscopie confocale. L'échelle est de 100 μ m pour l'ensemble des photos représentées.

Par ailleurs, nous avons également analysé l'expression des marqueurs CX3CR1 et CD103 dans ces tissus. Nous détectons des cellules CD103+ proche de la lame basale dans les trompes de Fallope cryogénisées (Figure 7). La localisation des cellules CX3CR1+ est en cours d'analyse. D'autres expériences sur coupes de tissus sont en cours afin de déterminer l'expression du CX3CR1 et du CD103 dans les différents tissus du FGT en présence de VIH-1.

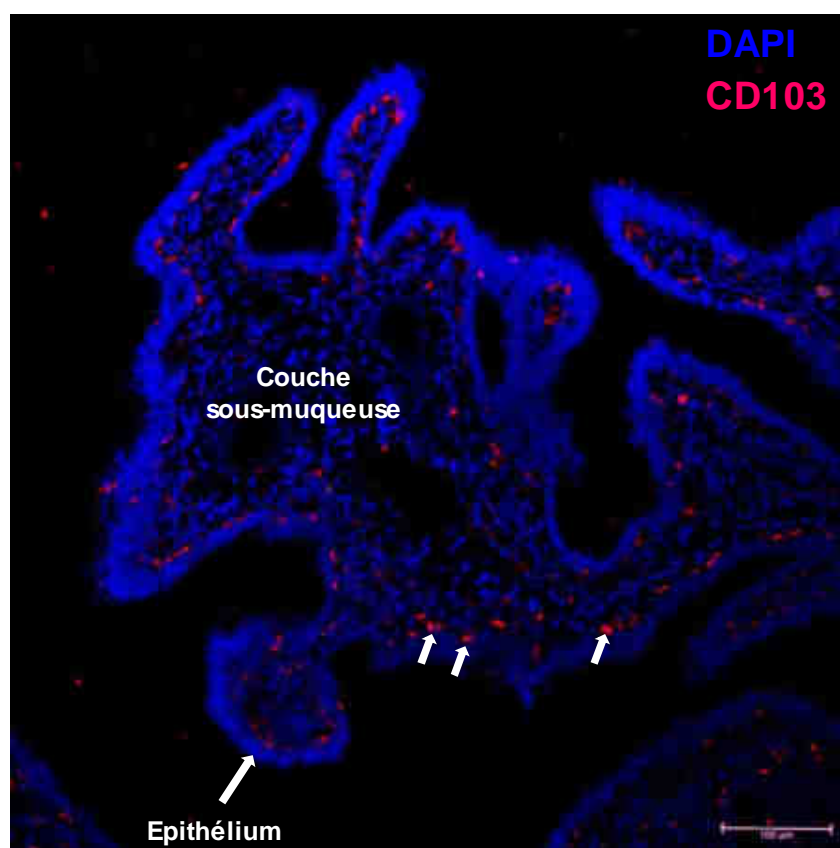


Figure 7 : Localisation des cellules immunitaires CD103 positives dans les trompes de Fallope. Les tissus des trompes de Fallope cryogénisés et fixés à l'acétone sont marqués au DAPI (noyau en bleu) et anti-CD103 Alexa fluor 594 (D). Les flèches indiquent la détection de cellules CD103+ situées proches de la lame basale. Les images sont obtenues par microscopie confocale. L'échelle est de 100µm.

Discussion :

Dans cette étude, nous avons montré que les cellules T CD3 représentent la population la plus abondante dans les différents tissus du FGT. Ces résultats sont en accord avec les observations publiées précédemment (Rodriguez-Garcia et al., 2014 ; 2013 ; Ardighieri et al., 2014 ; Givan et al., 1997). L'ensemble de nos résultats montrent que les DC et les macrophages exprimant le marqueur CD11c sont infectés alors que ces cellules sont peu représentées comparées aux lymphocytes TCD3 (60% de la population totale). Dans cette étude, nous avons analysé l'infection des cellules des muqueuses par détection de la protéine de capsid p24 virale. Ces résultats nous indiquent que l'infection des DC et des macrophages CD11c+ est productive, ce qui contredit les publications proposant les DC comme étant peu

permissives à l'infection par le VIH-1 (Laguet et al., 2011 ; Pion et al., 2006 ; Mcllroy et al., 1995 ; Pope et al., 1995 ; Cameron et al., 1992). Nous détectons des cellules DC CD103+ et DC CX3CR1+ dans les trompes de Fallope, l'endomètre et l'exocol. Nos résultats très préliminaires nous indiquent que les DC CX3CR1+ sont infectées dans l'endomètre et non dans l'exocol. Les DC CX3CR1+ sont capables de migrer vers la lame basale et de capturer les pathogènes présents à la surface épithéliale via des prolongements cytoplasmiques (dendrites) (Niess et al., 2005). Ces résultats nous indiquent que les DC de l'endomètre peuvent migrer vers la lame basale et capturer le VIH-1 à la surface épithéliale. La capture du VIH-1 par ces DC CX3CR1+ entraîne l'infection de ces cellules. De ce fait, ces cellules représenteraient des cibles privilégiées du VIH-1 dans l'endomètre. Des études complémentaires d'analyse des DC CX3CR1+ infectées par cytométrie dans les autres tissus du FGT, nous permettront de confirmer cette hypothèse. La détection de DC CX3CR1+ par microscopie confocal nous permettra également de confirmer cette hypothèse et les résultats obtenus par cytométrie. Les macrophages CD64 sont localisés proche de la lame basale dans les trompes de Fallope et dans l'épithélium de l'exocol. Ces résultats suggèrent que les macrophages présents dans ces tissus pourraient jouer un rôle clé lors des premiers événements de l'infection. L'analyse de la co-localisation des marqueurs CD64 et CD11c dans ces tissus nous permettront de déterminer si ces macrophages sont CD64+CD11c+ et s'ils sont infectés en présence de virus, afin de confirmer les résultats obtenus par cytométrie en flux. Les DC et les macrophages infectés pourraient ensuite transmettre le virus aux lymphocytes T situés dans les couches sous-muqueuses et favoriser la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme.

Discussion et Perspectives

Discussion générale et Perspectives

La transmission hétérosexuelle est la voie de contamination majoritaire dans le monde et les femmes sont les plus touchées. Lors d'un rapport sexuel, le fluide séminal, contenant virus libre infectieux et cellules infectées, interagissent avec la barrière épithéliale et pénètrent dans les muqueuses. Les cibles du VIH-1 sont les lymphocytes LT CD4, les DC et les macrophages. Les LT CD4 retrouvés en abondance dans ces différents tissus, ont été décrits comme étant les premières cibles du VIH-1 (Zhang et al., 1999; Gupta et al., 2002; Joag et al., 2016). Cependant, des études ont montré que le fluide séminal peut induire une augmentation du CCL20 par les cellules épithéliales vaginales, entraînant le recrutement des DC (Lourenço et al., 2014; Berlier et al., 2006). D'autres études ont également montré que les DC sont capables d'être infectées (Su et al., 2012) et de migrer vers la barrière épithéliale en présence de VIH-1 (Cavarelli et al., 2013). La migration des DC favoriserait donc la transmission du virus au LT CD4 avoisinants et permettre sa dissémination dans l'organisme (Larsson, 2005; Wu and KewalRamani, 2006). Les LT CD4 et les DC participeraient donc aux premiers événements de l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses.

Cette thèse a pour but de déterminer les premières cellules cibles du VIH-1 et les mécanismes d'inhibition des anticorps dans les tissus du tractus génital féminin afin d'empêcher leurs infections.

Au laboratoire, nous avons étudié l'infection de différents sous-types de DC (monocytes dérivés en DC (MoDC), DC de type Langerhans (LC), DC de type interstitiel (iDC) et DC de type plasmacytoïdes (pDC)) et la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4 autologues en présence et en absence d'anticorps neutralisants. Nous avons démontré l'infection de différentes DC par du virus libre et une augmentation de la réplication virale dans tous ces types de DC en présence de LT CD4 autologues dans la co-culture (Publication 1 et 2; Su et al., 2014a). Ces résultats sont en contradiction avec les observations publiées précédemment. En effet, les DC sont décrites comme étant peu permissives à l'infection par le VIH-1 (Cameron et al., 1992; Pope et al., 1995; McIlroy et al., 1995; Smed-Sørensen et

al., 2005). La restriction des DC peut s'expliquer par la présence d'un facteur de restriction SAMHD1. Ce facteur est majoritairement exprimé dans les DC et est impliqué dans la diminution du pool de désoxyribonucléotides (Bloch et al., 2014; Choi et al., 2015; Laguette et al., 2011). Dans notre étude, nous avons démontré que l'interaction entre les DC et les LT CD4 induit une diminution de l'expression du facteur de restriction SAMHD1 et la levée de la restriction de l'infection des DC (Publication 1 ; Su et al., 2014a). Ces résultats indiquent que la présence de LT CD4 dans notre co-culture modifie l'infectiosité des DC. Les différents sous-types de DC transmettent efficacement le VIH-1 aux LT CD4 autologues (Publication 1 et 2). Ces résultats sont accord avec les observations publiées précédemment (Holl et al., 2010; Peressin et al., 2014; Su et al., 2014a; Su et al., 2014b; Turville et al., 2004). Nous avons ensuite analysé la capacité inhibitrice des anticorps neutralisants sur la transmission du virus des DC aux LT CD4 dans les différents modèles de co-culture. *In vitro*, l'inhibition de l'infection des cellules par du virus libre et l'inhibition de la transmission du VIH-1 de cellule à cellule a largement été décrit. Cependant, les résultats obtenus dans les différentes études sont très controversés. Des études ont montré une diminution de l'activité inhibitrice des anticorps lors d'une transmission du VIH-1 de cellule à cellule comparé l'inhibition de l'infection par du virus libre (Li et al., 2017 ; Gombos et al., 2015 ; Malbec et al., 2013). D'autres études, en revanche, suggèrent une activité inhibitrice similaire entre l'inhibition de la transmission du virus de cellule à cellule et l'infection par du virus libre (Su et al., 2012 ; Duncan et al., 2014). Dans notre étude, nous démontrons que les anticorps neutralisants inhibent efficacement la transmission du VIH-1 des DC aux LT CD4. L'activité inhibitrice des anticorps dans la transmission de cellule à cellule est similaire à l'activité inhibitrice de l'infection par du virus libre (Publication 1 et 2). La controverse peut s'expliquer par le choix des modèles de transmission de cellule à cellule utilisés : transmission de cellule-cellule utilisant des cellules issues de lignée cellulaire (Li et al., 2017 ; Gombos et al., 2015 ; Zhong et al., 2013 ; Malbec et al., 2013 ; Abela et al., 2012 ; Dale et al., 2011 ; Chen et al., 2007), transmission de cellules de lignée cellulaire infectées à des cellules cibles primaires (Malbec et al., 2013 ; Abela et al., 2012 ; Dale et al., 2011 ; Chen et al., 2007) ou transmission du virus dans un modèle utilisant des cellules primaires comme dans notre modèle (Publication 1 et 2 ; Peressin e al., 2014 ; Su et al., 2012 ; van Montfort et al., 2007 ; Cavrois et al.,

2007). Il est à noter que l'activité inhibitrice des anticorps varie en fonction des cellules utilisées dans les différents modèles, suggérant la limite de certains modèles. Par ailleurs, dans notre modèle de co-culture, les anticorps diminuent la réplication virale dans les différents sous-types de DC. Cette diminution est corrélée à l'augmentation de la maturation des DC et la production d'IFN- α en présence d'anticorps (Publication 1 et 2 ; Su and Moog, 2014; Su et al., 2012). De plus, l'addition d'anticorps anti-RFc permet de restaurer la réplication virale dans ces MoDC démontrant que l'inhibition de l'infection des DC fait intervenir les récepteurs Fc à leurs surfaces. Ces résultats démontrent une activité inhibitrice additionnelle impliquant la partie Fc des anticorps aux récepteurs Fc (RFc) présent à la surface des DC et l'importance de cette activité dans l'inhibition de l'infection.

Dans ces études, l'analyse de l'infection des DC a été réalisé par du virus libre. Or le fluide séminal contient du virus libre et des cellules infectées. Des études réalisées *in vivo* et *ex vivo* ont montré que la transmission des cellules infectées est beaucoup plus efficace comparé à celle par du virus libre (Bernard-Stoecklin et al., 2013 ; Kolodkin-Gal et al., 2013 ; Lawrence et al., 2012 ; Sallé et al., 2010). D'autre part, les cellules associées à du virus et/ou infectées contenues dans le sperme sont capables de transmigrer à travers la barrière épithéliale et de se disséminer rapidement dans les muqueuses (Lawrence et al., 2012; Anderson et al., 2010). Dans le modèle de singe, les cellules infectées sont détectées dans les tissus lymphoïdes à 1 et 2 jours post-infection. De ce fait, les cellules infectées contenues dans le sperme seraient donc impliquées dans l'établissement de l'infection par le VIH-1 au niveau des muqueuses. Cependant, la transmission du virus aux cellules des muqueuses dans ce contexte n'a pas encore été démontrée.

Pour étudier cette transmission, nous avons mis au point un modèle où des LT CD4 d'un donneur A sont infectés et mis en co-culture avec des DC et des LT CD4 d'un receveur. Cette étude est la première à décrire ce type de co-culture (Publication 3). Nous montrons que les LT CD4 infectées du donneur transmettent le virus aux cellules du receveur. De manière intéressante, nous avons observé que les DC sont préférentiellement infectées au temps précoce de l'infection et que ces cellules sont infectées de façon productive. Ces résultats nous indiquent que la présence de LT CD4 dans cette co-culture, favorise l'infection et la réplication des DC. Les DC sont ensuite capables de migrer vers les organes lymphoïdes secondaire et de

transmettre le virus aux LT CD4. Ces observations sont en accord avec nos études publiées précédemment (Publication 1 et 2 ; Su et al., 2014a). L'analyse de l'expression du facteur SAMHD1 nous permettrait de déterminer si l'infection précoce des DC est induite par la diminution de l'expression de ce facteur et confirmerait nos résultats précédents dans cette co-culture allogénique.

La capacité inhibitrice de quatre anticorps a été analysée dans ce modèle de co-culture allogénique. Nous avons montré que ces anticorps inhibent efficacement l'infection des cellules du receveur. De manière intéressante, nous observons également une diminution de la réplication virale dans les LT CD4 du donneur A. Ces résultats montrent que les anticorps neutralisants inhibent les virus nouvellement produits dans les LT CD4 du donneur A et la transmission du virus aux DC et LT CD4 du donneur B. L'implication des RFc dans ce contexte de co-culture n'a pas été investigué. Des études complémentaires, nous permettront de déterminer le rôle de ces récepteurs sur l'activation des DC et l'inhibition de l'infection dans cette co-culture allogénique.

L'ensemble de ces résultats soulignent le rôle clé des DC dans des conditions de co-culture avec les LT CD4. Les anticorps neutralisants sont capables d'inhiber efficacement l'infection (neutralisation) et la transmission de cellule à cellule dans ce contexte de co-culture. Les études sur la capacité inhibitrice des anticorps non-neutralisants inhibiteur n'a pas été investiguée dans ces 3 études. Une étude précédente avec l'anticorps non-neutralisants inhibiteur 246-D a montré une diminution significative de l'infection des DC préalablement infectées en co-culture avec des LT CD4 (Su et al., 2012). Cette inhibition était corrélée à la maturation des DC et à l'interaction anticorps/cellules via les Fc/RFc. Par ailleurs, les anticorps non-neutralisants dirigés contre la boucle V2 induisent une forte activité ADCC *in vitro* (Publication 4). Ces études démontrent les fonctions inhibitrices additionnelles des anticorps, ce qui suggèrent l'intérêt de ces anticorps dans le développement de nouvelles stratégies préventives. Des études complémentaires impliquant ces anticorps non-neutralisants sont donc à envisager dans le modèle de co-culture allogénique. Cependant, l'ensemble de ces études ont été réalisées à partir de cellules issues du sang périphérique. Les cellules présentes dans les tissus du FGT possèdent des caractéristiques phénotypiques distinctes de celles utilisées jusqu'à présent. Une étude de la transmission du VIH-1 avec des cellules issues des tissus

permettrait de nous rapprocher d'un modèle d'infection et de transmission du VIH-1 dans les muqueuses.

Afin de nous rapprocher de ces conditions physiologiques, nous avons isolé les cellules immunitaires provenant d'explant de tissus du tractus génital féminin (trompe de Fallope, endomètre, endocol et exocol). Les études publiées précédemment ont été réalisées sur l'exocol, l'endocol et l'utérus. Une récente étude avec le modèle de singe a démontré que des cellules infectées par le SIV sont capables de disséminer rapidement dans les tissus du tractus inférieur (vagin, exocol, endocol) et supérieure (endomètre, trompe de Fallope et ovaires) 48h post-infection (Stieh et al., 2014). L'étude de l'infection dans l'ensemble des tissus du FGT sera donc particulièrement intéressante.

Après digestion des tissus et isolement des cellules immunitaires, nous avons observé que les LT représentent les cellules immunitaires les plus abondantes dans l'ensemble des tissus du FGT. Nos résultats sont en accord avec les résultats précédemment publiés dans les trompes de Fallope, l'endomètre, l'endocol et l'exocol (Hladik and McElrath, 2008; Pudney, Quayle, and Anderson, 2005; Trifonova, Lieberman, and van Baarle, 2014 ; Ardighieri et al., 2014). Récemment, l'équipe de Shen, a caractérisé les cellules immunitaires dans les tissus provenant des ovaires (Shen et al., 2017). Dans cette étude, ils ont montré que les LT représentent également la population majoritaire. Par ailleurs, nous avons caractérisé les DC et les macrophages dans les différents tissus du FGT. Nous avons détecté des DC (CD64-CD11c+) et deux populations de macrophages lesquelles sont CD64+CD11c+ et CD64+CD11c-. Ces populations cellulaires sont faiblement représentées. En présence de virus libre, nous observons l'infection des DC et les macrophages exprimant le marqueur CD11c alors que ces cellules sont peu représentées comparées aux LT CD3. Ces résultats nous laissent suggérer que les DC et les macrophages CD11c+ sont des cibles privilégiées du VIH-1 dans les muqueuses. Dans ce contexte de co-culture, l'infection des DC serait favorisée par son environnement cellulaire, notamment les LT. Ces observations sont en accord avec nos résultats précédents utilisant des cellules du sang périphérique. De plus, l'analyse par microscopie montre que les macrophages CD64 sont localisés proche de la lame basale dans les trompes de Fallope et dans l'épithélium de l'exocol. Par ailleurs, les LT CD4 infectés dans les études publiées sont de type

mémoires (CD45RO) (Gupta et al., 2002; Haase, 2010; Hladik et al., 2007; Shen, Richter, and Smith, 2011; Veazey, Marx, and Lackner, 2003). Dans notre modèle, nous n'avons pas caractérisé les lymphocytes via ce marqueur. Des études complémentaires sur la caractérisation des LT CD4 seraient donc à envisager. D'autre part, les DC des muqueuses possèdent des phénotypes particuliers avec l'expression du CD103 représentant une population de DC tolérogéniques et le CX3CR1 impliqué dans la formation des dendrites (voir introduction). Nous avons caractérisé les différentes sous-populations de DC exprimant ces deux marqueurs dans les tissus provenant des trompes de Fallope, de l'endomètre et de l'exocol. Les précédentes études ont montré que les DC CX3CR1+ sont présentes dans l'exocol et les DC CD103+ sont présentes dans l'endomètre et faiblement exprimées dans l'endocol et l'exocol (Rodriguez-Garcia et al., 2017; Trifonova, Lieberman, and van Baarle, 2014). Nos résultats montrent que les DC CX3CR1+ et CD103+ sont détectées dans l'ensemble des tissus. De manière intéressante, nous observons également ces deux sous-types de DC dans les trompes de Fallope. Dans l'endomètre nous détectons des DC CX3CR1+. Ces résultats nous indiquent que les DC de l'endomètre peuvent migrer vers la lame basale et capturer le VIH-1 à la surface épithéliale. La capture du VIH-1 par ces DC CX3CR1+ entraîne l'infection de ces cellules. De ce fait, ces cellules représenteraient donc des cibles privilégiées du VIH-1 dans l'endomètre. Des études complémentaires dans ce tissu et la détection des DC CX3CR1+ infectées par cytométrie dans les autres tissus du FGT, nous permettront de confirmer cette hypothèse.

L'ensemble des tissus du FGT représente donc des sites potentiels à l'infection par le VIH-1. Au cours de l'infection par le VIH-1, ces sites anatomiques pourraient être impliqués dans la persistance du virus par l'établissement des réservoirs viraux. Une étude montre que l'infection productive des LT CD4 est corrélée à une diminution de l'expression d'un facteur de restriction CTIP2 (Annexe 2). La dégradation de CTIP2 par une protéine accessoire du VIH-1 : vpr favoriserait la persistance du virus au sein des sites anatomiques, par l'établissement de la latence. Il s'agira maintenant d'analyser l'inhibition de cette infection par différents anticorps neutralisants et non-neutralisants.

En conclusion, cette étude fournit de nouvelles données concernant l'infection des cellules cibles du VIH-1 dans les muqueuses. Les résultats obtenus montrent que les DC ont un rôle clé lors des premiers événements d'infection par le VIH-1 après une transmission par voie sexuelle chez la femme. Ces cellules représentent donc des cibles privilégiées du VIH-1 dans l'infection précoce et la dissémination du VIH-1 dans l'organisme. Dans le cadre de nouvelles stratégies vaccinales, l'inhibition de ces cellules sera donc à prendre en compte afin de prévenir leurs infections. Les anticorps possédant une activité neutralisante efficace et les anticorps non-neutralisants capables d'induire des activités antivirales dépendantes des récepteurs Fc pourraient permettre d'établir une protection stérilisante de ces cellules lors de la transmission par voie sexuelle du VIH-1

Références bibliographiques

www.aides.org/vih-sida-chiffres-2016, Chiffres de l'épidémie en 2016

UNAIDS 2014. The gap report 2014: Sex workers:

http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/06_Sexworkers.pdf. (2014).

(1981). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**(21), 250-2.

(1982). A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **31**(23), 305-7.

A

Abdool Karim Q., Abdool Karim S. S., Frohlich J. A., Grobler A. C., Baxter C., Mansoor L. E., et al. (2010). Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science*. **329**(5996):1168–74.

Abela IA, Berlinger L, Schanz M, Reynell L, Gunthard HF, Rusert P, et al. Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. (2012). *PLoS Pathog*, **8**:e1002634.

Abrahams, M. R., Anderson, J. A., Giorgi, E. E., Seoighe, C., Mlisana, K., Ping, L. H., Athreya, G. S., Treurnicht, F. K., Keele, B. F., Wood, N., Salazar-Gonzalez, J. F., Bhattacharya, T., Chu, H., Hoffman, I., Galvin, S., Mapanje, C., Kazembe, P., Thebus, R., Fiscus, S., Hide, W., Cohen, M. S., Karim, S. A., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Hahn, B. H., Korber, B. T., Swanstrom, R., and Williamson, C. (2009). Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J Virol* **83**(8), 3556-67.

Ackerman, M. E., Dugast, A. S., McAndrew, E. G., Tsoukas, S., Licht, A. F., Irvine, D. J., and Alter, G. (2013). Enhanced phagocytic activity of HIV-specific antibodies correlates with natural production of immunoglobulins with skewed affinity for Fcγ2a and Fcγ2b. *J Virol* **87**(10), 5468-76.

Adefuye, A. O., Adeola, H. A., Sales, K. J., and Katz, A. A. (2016). Seminal Fluid-Mediated Inflammation in Physiology and Pathology of the Female Reproductive Tract. *J Immunol Res* **2016**, 9707252.

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., Ebert E. C., Moser B., Parker C. M. (2000). Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol*. Mar 23; **10**(6):325-8.

Agosto, L. M., Uchil, P. D., and Mothes, W. (2015). HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. *Trends Microbiol* **23**(5), 289-95.

Alfsen, A., Yu, H., Magerus-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**(9), 4267-79.

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**(10), 5569-80.

Alter, G., and Moody, M. A. (2010). The humoral response to HIV-1: new insights, renewed focus. *J Infect Dis* **202 Suppl 2**, S315-22.

Ananworanich J, Chomont N, Fletcher JL, Pinyakorn S, Schuetz A, Sereti I, Rerknimitr R, Dewar R, Kroon E, Vandergeeten C, Trichavaroj R, Chomchey N, Chalermchai T, Michael NL, Kim JH, Phanuphak P, Phanuphak N. (2015). Markers of HIV reservoir size and immune activation after treatment in acute HIV infection with and without raltegravir and maraviroc intensification. *J Virus Erad*. 2015;1(2):116-122. Epub 2015 Apr.

Anahtar M. N., Bowman B. A., Kwon D. S. (2016). Efficient Nucleic Acid Extraction and 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Community Characterization. *J Vis Exp*. Apr **14**(110). doi: 10.3791/53939

Anahtar M. N., Byrne E. H., Doherty K. E., Bowman B. A., Yamamoto H. S., Soumillon M., Padavattan N., Ismail N., Moodley A., Sabatini M. E., Ghebremichael M. S., Nusbaum C., Huttenhower C., Virgin H. W., Ndung'u T., Dong K. L., Walker B. D., Fichorova R. N., Kwon D. S. (2015). Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*. **42**:965–976

- Anderson, D. J. (2014). Modeling mucosal cell-associated HIV type 1 transmission in vitro. *J Infect Dis* **210 Suppl 3**, S648-53.
- Anderson, D. J., Politch, J. A., Nadolski, A. M., Blaskewicz, C. D., Pudney, J., and Mayer, K. H. (2010). Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. *Aids* **24**(2), 163-87.
- D'Arc M., Ayouba A., Esteban A., Learn G. H., Boué V., Liegeois F., Etienne L., Tagg N., Leendertz F. H., Boesch C., Madinda N. F., Robbins M. M., Gray M., Cournil A., Ooms M., Letko M., Simon V. A., Sharp P. M., Hahn B. H., Delaporte E., Mpoudi Ngole E., Peeters M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *PNAS*. Mar 17; **112** (11):E1343-52.
- Ardighieri L., Lonardi S., Moratto D., Facchetti F., Shih leM., Vermi W., Kurman R. J. (2014). Characterization of the immune cell repertoire in the normal fallopian tube. *Int J Gynecol Pathol*. Nov;**33**(6):581-91.
- Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* **7**, 96.
- Arthos, J., Cicala, C., Martinelli, E., Macleod, K., Van Ryk, D., Wei, D., Xiao, Z., Veenstra, T. D., Conrad, T. P., Lempicki, R. A., McLaughlin, S., Pascuccio, M., Gopaul, R., McNally, J., Cruz, C. C., Censoplano, N., Chung, E., Reitano, K. N., Kottlil, S., Goode, D. J., and Fauci, A. S. (2008). HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* **9**(3), 301-9.
- Asin, S. N., Heimberg, A. M., Eszterhas, S. K., Rollenhagen, C., and Howell, A. L. (2008). Estradiol and progesterone regulate HIV type 1 replication in peripheral blood cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**(5), 701-16.
- Auvert B., Taljaard D., Lagarde E., Sobngwi-Tambekou J., Sitta R, Puren A.(2005). Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk : the ANRS 1265 Trial. *PLoS Med*. Nov;**2**(11):e298. Epub 2005 Oct 25.
- Azevedo-Pereira, J. M., and Santos-Costa, Q. (2016). HIV Interaction With Human Host: HIV-2 As a Model of a Less Virulent Infection. *AIDS Rev* **18**(1), 44-53.

B

- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Lu, Y., Wright, J. E., Chou, T. C., and Ruprecht, R. M. (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**(2), 200-6.
- 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**(12), 7596-604.
- Baldauf, H. M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., Panitz, S., Flory, E., Landau, N. R., Sertel, S., Rutsch, F., Lasitschka, F., Kim, B., Konig, R., Fackler, O. T., and Keppler, O. T. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med* **18**(11), 1682-7.
- Ballweber, L., Robinson, B., Kreger, A., Fialkow, M., Lentz, G., McElrath, M. J., and Hladik, F. (2011). Vaginal langerhans cells nonproductively transporting HIV-1 mediate infection of T cells. *J Virol* **85**(24), 13443-7.
- Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**(6673), 245-52.
- Barbas C. F. 3rd., Crowe J. E. Jr., Cababa D., Jones T. M., Zebedee S. L., Murphy B. R., Chanock R. M., Burton D. R. (1992). Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 1;**89**(21):10164-8.
- Barouch, D. H., Alter, G., Broge, T., Linde, C., Ackerman, M. E., Brown, E. P., Borducchi, E. N., Smith, K. M., Nkolola, J. P., Liu, J., Shields, J., Parenteau, L., Whitney, J. B., Abbink, P., Ng'ang'a, D. M., Seaman, M. S., Lavine, C. L., Perry, J. R., Li, W., Colantonio, A. D., Lewis, M. G., Chen, B., Wenschuh, H., Reimer, U., Piatak, M., Lifson, J. D., Handley, S. A., Virgin, H. W., Koutsoukos, M., Lorin, C., Voss, G., Weijtens, M., Pau, M. G., and Schuitemaker, H. (2015). Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys. *Science* **349**(6245), 320-4.

- Barouch, D. H., Stephenson, K. E., Borducchi, E. N., Smith, K., Stanley, K., McNally, A. G., Liu, J., Abbink, P., Maxfield, L. F., Seaman, M. S., Dugast, A. S., Alter, G., Ferguson, M., Li, W., Earl, P. L., Moss, B., Giorgi, E. E., Szinger, J. J., Eller, L. A., Billings, E. A., Rao, M., Tovanabuttra, S., Sanders-Buell, E., Weijtens, M., Pau, M. G., Schuitemaker, H., Robb, M. L., Kim, J. H., Korber, B. T., and Michael, N. L. (2013). Protective efficacy of a global HIV-1 mosaic vaccine against heterologous SHIV challenges in rhesus monkeys. *Cell* **155**(3), 531-9.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.
- Barreto-de-Souza, V., Arakelyan, A., Margolis, L., and Vanpouille, C. (2014). HIV-1 vaginal transmission: cell-free or cell-associated virus? *Am J Reprod Immunol* **71**(6), 589-99.
- Benning L., Golub E. T., Anastos K., French A. L., Cohen M., Gilbert D., Gillevet P., Munyazesa E., Landay A. L., Sikaroodi M., Spear G. T. (2014). Comparison of lower genital tract microbiota in HIV-infected and uninfected women from Rwanda and the US. *PLoS One*. May 9;**9**(5):e96844. doi: 10.1371/journal.pone.0096844.
- Berlier W., Cremel M., Hamzeh H., Lévy R., Lucht F., Bourlet T., Pozzetto B., Delézay O. (2006). 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*. May;**21**(5):1135-42. Epub 2006 Mar 10.
- Berlier W., Bourlet T., Lawrence P., Hamzeh H., Lambert C., Genin C., Verrier B., Dieu-Nosjean M.C., Pozzetto B., 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*. Dec;**77**(4):465-74.
- Bernard-Stoecklin, S., Gomet, C., Corneau, A. B., Guenounou, S., Torres, C., Dejucq-Rainsford, N., Cosma, A., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2013). Semen CD4+ T cells and macrophages are productively infected at all stages of SIV infection in macaques. *PLoS Pathog* **9**(12), e1003810.
- Berre S., Gaudin R., Cunha de Alencar B., Desdouits M., Chabaud M., Naffakh N., Rabaza-Gairi M., Gobert F. X., Jouve M., Benaroch P. (2013). CD36-specific antibodies block release of HIV-1 from infected primary macrophages and its transmission to T cells. *J Exp Med*. Nov 18;**210**(12):2523-38.
- Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**(10), 889-96.
- Blue, C. E., Spiller, O. B., and Blackbourn, D. J. (2004). The relevance of complement to virus biology. *Virology* **319**(2), 176-84.
- Blumenthal, R., Durell, S., and Viard, M. (2012). HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion. *J Biol Chem* **287**(49), 40841-9.
- 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., Gallay P. A. (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol*. Jan;**81**(1):395-405. Epub 2006 Oct 18.
- Boily, M. C., Baggaley, R. F., Wang, L., Masse, B., White, R. G., Hayes, R. J., and Alary, M. (2009). Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Lancet Infect Dis* **9**(2), 118-29.
- Bomsel, M. (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* **3**(1), 42-7.
- Bomsel M, Tudor D, Drillet AS et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity* 2011;**34**(2):269-80.
- Boukari, F., Makrogiannis, S., Nossal, R., and Boukari, H. (2016). Imaging and tracking HIV viruses in human cervical mucus. *J Biomed Opt* **21**(9), 96001.
- Boukari, H., Brichacek, B., Stratton, P., Mahoney, S. F., Lifson, J. D., Margolis, L., and Nossal, R. (2009). Movements of HIV-virions in human cervical mucus. *Biomacromolecules* **10**(9), 2482-8.
- Brandt, L., Benfield, T., Mens, H., Clausen, L. N., Katzenstein, T. L., Fomsgaard, A., and Karlsson, I. (2011). Low level of regulatory T cells and maintenance of balance between regulatory T cells and TH17 cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* **57**(2), 101-8.

- Briggs, J. A., and Krausslich, H. G. (2011). The molecular architecture of HIV. *Journal of Molecular Biology* **410**(4), 491-500.
- Bui JK, Halvas EK, Fyne E, Sobolewski MD, Koontz D, Shao W, Luke B, Hong FF, Kearney MF, Mellors JW. (2017). Ex vivo activation of CD4+ T-cells from donors on suppressive ART can lead to sustained production of infectious HIV-1 from a subset of infected cells. *PLoS Pathog*.**13**:e1006230.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G., and Stevenson, M. (1993). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 6125-9.
- Burgener, A., McGowan, I., and Klatt, N. R. (2015). HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. *Curr Opin Immunol* **36**, 22-30.
- Burton D. R., Pyati J., Koduri R., Sharp S. J., Thornton G. B., Parren P. W., Sawyer L. S., Hendry R. M., Dunlop N., Nara P. L., et al. (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. Nov 11;**266**(5187):1024-7.
- Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**(9), 706-13.
- Burton, D. R., and Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu Rev Immunol* **34**, 635-59.

C

- Cameron, P. U., Freudenthal, P. S., Barker, J. M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R. M. (1992). Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* **257**(5068), 383-7.
- Carias, A. M., McCoombe, S., McRaven, M., Anderson, M., Galloway, N., Vandergrift, N., Fought, A. J., Lurain, J., Duplantis, M., Veazey, R. S., and Hope, T. J. (2013). Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract. *J Virol* **87**(21), 11388-400.
- Carr J. M., Hocking H., Li P., Burrell C. J. (1999). Rapid and efficient cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus infection from monocyte-derived macrophages to peripheral blood lymphocytes. *Virology*. Dec 20; **265**(2):319-29.
- Carreno M. P., Chomont N., Kazatchkine M. D., Irinopoulou T., Krief C., Mohamed A. S., Andreoletti L., Matta M., Belec L. (2002). 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*. Jan;**76**(1):32-40.
- Casartelli, N. (2016). HIV-1 Cell-to-Cell Transmission and Antiviral Strategies: An Overview. *Curr Drug Targets* **17**(1), 65-75.
- Cassetta, L., Cassol, E., and Poli, G. (2011). Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal* **11**, 2391-402.
- 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**(5), 776-94.
- Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F., and Greene, W. C. (2007). In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS Pathog* **3**(1), e4.
- Cecchinato, V., and Franchini, G. (2010). Th17 cells in pathogenic simian immunodeficiency virus infection of macaques. *Curr Opin HIV AIDS* **5**(2), 141-5.
- Celum, C. L. (2004). The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. *Herpes* **11 Suppl 1**, 36A-45A.
- Chaban, B., Links, M.G., Jayaprakash, T.P., Wagner, E.C., Bourque, D.K., Lohn, Z., Albert, A.Y., van Schalkwyk, J., Reid, G., Hemmingsen, S.M., et al. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome* **2**, 23.
- Checkley M. A., Luttge B. G., Freed E. O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol*. Jul 22;**410**(4):582-608. Review.
- Cheeseman, H. M., Carias, A. M., Evans, A. B., Olejniczak, N. J., Ziprin, P., King, D. F., Hope, T. J., and Shattock, R. J. (2016). Expression Profile of Human Fc Receptors in Mucosal Tissue: Implications for Antibody-Dependent Cellular Effector Functions Targeting HIV-1 Transmission. *PLoS One* **11**(5), e0154656.
- Cheeseman, H. M., Olejniczak, N. J., Rogers, P. M., Evans, A. B., King, D. F., Ziprin, P., Liao, H. X., Haynes, B. F., and Shattock, R. J. (2017). Broadly Neutralizing Antibodies Display Potential

- for Prevention of HIV-1 Infection of Mucosal Tissue Superior to That of Nonneutralizing Antibodies. *J Virol* **91**(1).
- Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M. A., and Chen, B. K. (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol* **81**(22), 12582-95.
- Choi, J., Ryoo, J., Oh, C., Hwang, S., and Ahn, K. (2015). SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity. *Retrovirology* **12**.
- Chun, T. W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J. A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T. C., Kuo, Y. H., Brookmeyer, R., Zeiger, M. A., Barditch-Crovo, P., and Siliciano, R. F. (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**(6629), 183-8.
- Chung, A. W., Ghebremichael, M., Robinson, H., Brown, E., Choi, I., Lane, S., Dugast, A. S., Schoen, M. K., Rolland, M., Suscovich, T. J., Mahan, A. E., Liao, L., Streeck, H., Andrews, C., Rerks-Ngarm, S., Nitayaphan, S., de Souza, M. S., Kaewkungwal, J., Pitisuttithum, P., Francis, D., Michael, N. L., Kim, J. H., Bailey-Kellogg, C., Ackerman, M. E., and Alter, G. (2014). Polyfunctional Fc-effector profiles mediated by IgG subclass selection distinguish RV144 and VAX003 vaccines. *Sci Transl Med* **6**(228), 228ra38.
- Cicala, C., Martinelli, E., McNally, J. P., Goode, D. J., Gopaul, R., Hiatt, J., Jelacic, K., Kottlil, S., Macleod, K., O'Shea, A., Patel, N., Van Ryk, D., Wei, D., Pascuccio, M., Yi, L., McKinnon, L., Izulla, P., Kimani, J., Kaul, R., Fauci, A. S., and Arthos, J. (2009). The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(49), 20877-82.
- Cicone, E. J., Greenwald, J. H., Lee, P. I., Biancotto, A., Read, S. W., Yao, M. A., Hodge, J. N., Thompson, W. L., Kovacs, S. B., Chairez, C. L., Migueles, S. A., Kovacs, J. A., Margolis, L. B., and Sereti, I. (2011). CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* **85**(12), 5880-8.
- Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Guetard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rouzioux, C., Rey, M., Katlama, C., Rey, F., Champelinaud, J. L., and et al. (1986). [LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *C R Acad Sci III* **302**(13), 485-8.
- 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**, 109-30.
- 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**(4), 475-9.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**(12), 1219-26.
- Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**(8), 1757-64.
- 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**(4), 455-80.
- Cremel, M., Berlier, W., Hamzeh, H., Cognasse, F., Lawrence, P., Genin, C., Bernengo, J. C., Lambert, C., Dieu-Nosjean, M. C., and Delezay, O. (2005). Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. *J Leukoc Biol* **78**(1), 158-66.
- Crowell TA, Phanuphak N, Pinyakorn S, Kroon E, Fletcher JL, Colby D, Tipsuk S, Karnsomlap P, Laopraynak N, O'Connell RJ, Robb ML, Ananworanich J; RV254SEARCH010 Study Group. (2016). Virologic failure is uncommon after treatment initiation during acute HIV infection. *AIDS*. Jul 31;30(12):1943-50. doi: 10.1097/QAD.0000000000001148.
- Crowe, S. M., Mills, J., Kirihara, J., Boothman, J., Marshall, J. A., and McGrath, M. S. (1990). Full-length recombinant CD4 and recombinant gp120 inhibit fusion between HIV infected macrophages and uninfected CD4-expressing T-lymphoblastoid cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**(8), 1031-7.
- Cunningham A. L., Harman A., Kim M., Nasr N., Lai J.(2013). Immunobiology of dendritic cells and the influence of HIV infection. *Adv Exp Med Biol*. 762:1-44. doi: 10.1007/978-1-4614-4433-6_1.
- Cu-Uvin S., DeLong A. K., Venkatesh K. K., Hogan J. W., Ingersoll J., Kurpewski J., De Pasquale M. P., D'Aquila R., Caliendo A. M. (2010). Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. *AIDS*. Oct 23;24(16):2489-97.

D

- Dale, B. M., Alvarez, R. A., and Chen, B. K. (2013). Mechanisms of enhanced HIV spread through T-cell virological synapses. *Immunol Rev* **251**(1), 113-24.
- Dale, B. M., McNerney, G. P., Thompson, D. L., Hubner, W., de Los Reyes, K., Chuang, F. Y., Huser, T., and Chen, B. K. (2011). Cell-to-cell transfer of HIV-1 via virological synapses leads to endosomal virion maturation that activates viral membrane fusion. *Cell Host Microbe* **10**(6), 551-62.
- Dalgleish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**(5996), 763-7.
- Danielsson, D., Teigen, P. K., and Moi, H. (2011). The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci* **1230**, 48-58.
- Deleage C, Schuetz A, Alvord WG, Johnston L, Hao XP, Morcock DR, Rerknimitr R, Fletcher JL, Puttamaswin S, Phanuphak N, Dewar R, McCune JM, Sereti I, Robb M, Kim JH, Schacker TW, Hunt P, Lifson JD, Ananworanich J, Estes JD. (2016). Impact of early cART in the gut during acute HIV infection. *JCI Insight*. 2016 Jul 7;**1**(10). pii: e87065.
- Delwart E. L., Mullins J. I., Gupta P, Learn G. H Jr., Holodniy M., Katzenstein D., Walker B. D., Singh M. K. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol*. Jan;**72**(1):617-23.
- 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., Shaw, G. M., Korber, B. T., Allen, S., and Hunter, E. (2004). Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science* **303**(5666), 2019-22.
- Devito, C., Hinkula, J., Kaul, R., Lopalco, L., Bwayo, J. J., Plummer, F., Clerici, M., and Broliden, K. (2000). Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *Aids* **14**(13), 1917-20.
- Dezzutti C. S., Guenther P. C., Cummins J.E. Jr., Cabrera T., Marshall J. H, Dillberger A., Lal R. B. (2001). Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. Apr 15;**183**(8):1204-13. Epub 2001 Mar 13.
- Dichmann, S., Herouy, Y., Purlis, D., Rheinen, H., Gebicke-Harter, P., and Norgauer, J. (2001). Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. *Inflamm Res* **50**(11), 529-33.
- Di Fabio S., Giannini G., Lapenta C., Spada M., Binelli A., Germinario E., Sestili P., Belardelli F., Proietti E., Vella S. (2001). Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: a new model for the evaluation of vaginal microbicides. *AIDS*. Nov 23;**15**(17):2231-8.
- Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., Hunt, P. W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I., and Greene, W. C. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* **505**(7484), 509-14.
- Doncel, G. F., Joseph, T., and Thurman, A. R. (2011). Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? *Am J Reprod Immunol* **65**(3), 292-301.
- Dulioust, E., Tachet, A., De Almeida, M., Finkielsztejn, L., Rivalland, S., Salmon, D., Sicard, D., Rouzioux, C., and Jouannet, P. (1998). Detection of HIV-1 in seminal plasma and seminal cells of HIV-1 seropositive men. *J Reprod Immunol* **41**(1-2), 27-40.
- Duncan, C. J., Williams, J. P., Schiffner, T., Gartner, K., Ochsenbauer, C., Kappes, J., Russell, R. A., Frater, J., and Sattentau, Q. J. (2014). High-multiplicity HIV-1 infection and neutralizing antibody evasion mediated by the macrophage-T cell virological synapse. *J Virol* **88**(4), 2025-34.

E

- El Costa, H., Quillay, H., Marlin, R., Cannou, C., Duriez, M., Benjelloun, F., de Truchis, C., Rahmati, M., Ighil, J., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., and Menu, E. (2016). The local environment orchestrates mucosal decidual macrophage differentiation and substantially inhibits HIV-1 replication. *Mucosal Immunol* **9**(3), 634-46.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**(6418), 359-62.

- Escolano, A., Dosenovic, P., and Nussenzweig, M. C. (2017). Progress toward active or passive HIV-1 vaccination. *J Exp Med* **214**(1), 3-16.
- Evan M., Risher K., Zungu N., Shisana O., Moyo S., Celentano DD., Maughan-Brown B., Rehle TM.. (2016). Age-disparate sex and HIV risk for young women from 2002 to 2012 in SouthAfrica. *J Int AIDS Soc.* Dec 26;**19**(1):21310. doi: 10.7448/IAS.19.1.21310.

F

- Fahey, J. V., Bodwell, J. E., Hickey, D. K., Ghosh, M., Muia, M. N., and Wira, C. R. (2011). New approaches to making the microenvironment of the female reproductive tract hostile to HIV. *Am J Reprod Immunol* **65**(3), 334-43.
- Farnet, C. M., and Haseltine, W. A. (1991). Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* **65**(4), 1910-5.
- Feldmann, J., and Schwartz, O. (2010). HIV-1 Virological Synapse: Live Imaging of Transmission. *Viruses* **2**(8), 1666-80.
- Ferrantelli, F., Rasmussen, R. A., Buckley, K. A., Li, P. L., Wang, T., Montefiori, D. C., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D. C., McClure, H. M., and Ruprecht, R. M. (2004). Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **189**(12), 2167-73.
- Ferreira, V. H., Kafka, J. K., and Kaushic, C. (2014). Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **71**(6), 543-54.
- Flynn, N. M., Forthal, D. N., Harro, C. D., Judson, F. N., Mayer, K. H., and Para, M. F. (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* **191**(5), 654-65.
- Fontaine, E. A., and Taylor-Robinson, D. (1990). Comparison of quantitative and qualitative methods of detecting hydrogen peroxide produced by human vaginal strains of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* **69**(3), 326-31.
- Forthal, D. N., and Moog, C. (2009). Fc receptor-mediated antiviral antibodies. *Curr Opin HIV AIDS* **4**(5), 388-93.
- Foussat, A., Bouchet-Delbos, L., Berrebi, D., Durand-Gasselien, I., Coulomb-L'Hermine, A., Krzysiek, R., Galanaud, P., Levy, Y., and Emilie, D. (2001). Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients. *Blood* **98**(6), 1678-86.
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* **13**(8), 484-96.
- Freeman, E. E., Weiss, H. A., Glynn, J. R., Cross, P. L., Whitworth, J. A., and Hayes, R. J. (2006). Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Aids* **20**(1), 73-83.

G

- Galloway, N. L., Doitsh, G., Monroe, K. M., Yang, Z., Munoz-Arias, I., Levy, D. N., and Greene, W. C. (2015). Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 Is Required to Trigger Pyroptotic Death of Lymphoid-Tissue-Derived CD4 T Cells. *Cell Rep* **12**(10), 1555-1563.
- Galvin, S. R., and Cohen, M. S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol* **2**(1), 33-42.
- Gaudin R, Berre S, Cunha de Alencar B, Decalf J, Schindler M, Gobert FX, Jouve M, Benaroch P. (2013). Dynamics of HIV-containing compartments in macrophages reveal sequestration of virions and transient surface connections. *PLoS One.* Jul 29;**8**(7):e69450.
- Ghosh M., Shen Z., Schaefer T. M., Fahey J. V., Gupta P., Wira C. R. (2009). CCL20/MIP3alpha is a novel anti-HIV-1 molecule of the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* Jul;**62**(1):60-71. doi: 10.1111/j.1600-0897.2009.00713.x.
- Givan, A. L., White, H. D., Stern, J. E., Colby, E., Gosselin, E. J., Guyre, P. M., and Wira, C. R. (1997). Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* **38**(5), 350-9.
- Gombos RB, Kolodkin-Gal D, Eslamizar L, Owuor JO, Mazzola E, Gonzalez AM, et al. Inhibitory Effect of Individual or Combinations of Broadly Neutralizing Antibodies and Antiviral Reagents against Cell-Free and Cell-to-Cell HIV-1 Transmission. *J Virol* 2015;**89**:7813-7828.

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**(24), 1425-31.
- Gousset, K., Ablan, S. D., Coren, L. V., Ono, A., Soheilian, F., Nagashima, K., Ott, D. E., and Freed, E. O. (2008). Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages. *PLoS Pathog* **4**(3), e1000015.
- Gray, E. S., Moore, P. L., Choge, I. A., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Li, H., Leseka, N., Treurnicht, F., Mlisana, K., Shaw, G. M., Karim, S. S., Williamson, C., and Morris, L. (2007). Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J Virol* **81**(12), 6187-96.
- Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* **37** Suppl 1, S94-102.
- 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**(12), 5577-86.
- Groot, F., Welsch, S., and Sattentau, Q. J. (2008). Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses. *Blood* **111**(9), 4660-3.
- Gunn, B., Schneider, J., Shansab, M., Bastian, A. R., Fahrback, K., Smith, A. t., Mahan, A., Karim, M., Licht, A., Zvonar, I., Tedesco, J., Anderson, M., Chapel, A., Suscovich, T., Malaspina, D., Streeck, H., Walker, B. D., Kim, A., Lauer, G., Altfeld, M., Pillai, S., Szeleifer, I., Kelleher, N. L., Kiser, P. F., Hope, T. J., and Alter, G. (2016). Enhanced binding of antibodies generated during chronic HIV infection to mucus component MUC16. *Mucosal Immunol* **9**(6), 1549-1558.
- Gupta, P., Collins, K. B., Ratner, D., Watkins, S., Naus, G. J., Landers, D. V., and Patterson, B. K. (2002). 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* **76**(19), 9868-76.
- 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., Corti, D., Moldt, B., Hel, Z., Lanzavecchia, A., Ruprecht, R. M., Burton, D. R., Mestecky, J., Anderson, D. J., and Forthal, D. N. (2013). The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog* **9**(11), e1003776.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**(6114), 662-9.

H

- Haase, A. T. (2010). Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* **464**(7286), 217-23.
- Haase A. T. (1999). Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* **17**:625-56.
- Haase, A. T., Henry, K., Zupancic, M., Sedgewick, G., Faust, R. A., Melroe, H., Cavert, W., Gebhard, K., Staskus, K., Zhang, Z. Q., Dailey, P. J., Balfour, H. H., Jr., Erice, A., and Perelson, A. S. (1996). Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* **274**(5289), 985-9.
- Haldar, M., and Murphy, K. M. (2014). Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol Rev* **262**(1), 25-35.
- Hammer, S. M., Sobieszczyk, M. E., Janes, H., Karuna, S. T., Mulligan, M. J., Grove, D., Koblin, B. A., Buchbinder, S. P., Keefer, M. C., Tomaras, G. D., Frahm, N., Hural, J., Anude, C., Graham, B. S., Enama, M. E., Adams, E., DeJesus, E., Novak, R. M., Frank, I., Bentley, C., Ramirez, S., Fu, R., Koup, R. A., Mascola, J. R., Nabel, G. J., Montefiori, D. C., Kublin, J., McElrath, M. J., Corey, L., and Gilbert, P. B. (2013). Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. *N Engl J Med* **369**(22), 2083-92.
- 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., Liao, H. X., DeVico, A. L., Lewis, G. K., Williams, C., Pinter, A., Fong, Y., Janes, H., DeCamp, A., Huang, Y., Rao, M., Billings, E., Karasavvas, N., Robb, M. L., Ngauy, V., de Souza, M. S., Paris, R., Ferrari, G., Bailer, R. T., Soderberg, K. A., Andrews, C., Berman, P. W., Frahm, N., De Rosa, S. C., Alpert, M. D., Yates, N. L., Shen, X., Koup, R. A., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Rerks-

- Ngarm, S., Michael, N. L., and Kim, J. H. (2012). Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* **366**(14), 1275-86.
- Hemelaar, J. (2012). The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* **18**(3), 182-92.
- Herbein, G., and Varin, A. (2010). The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology* **7**, 33.
- Hertoghs, N., Geijtenbeek, T. B., and Ribeiro, C. M. (2017). Interplay between HIV-1 innate sensing and restriction in mucosal dendritic cells: balancing defense and viral transmission. *Curr Opin Virol* **22**, 112-119.
- Hessell, A. J., Hangartner, L., Hunter, M., Havenith, C. E., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Lanigan, C. M., Landucci, G., Forthal, D. N., Parren, P. W., Marx, P. A., and Burton, D. R. (2007). Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**(7158), 101-4.
- Hessell, A. J., Rakasz, E. G., Tehrani, D. M., Huber, M., Weisgrau, K. L., Landucci, G., Forthal, D. N., Kahl, C., Koff, W. C., Poignard, P., Watkins, D. I. and Burton, D. R. (2010). Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies 2F5 and 4E10 directed against the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Membrane-Proximal External Region Protect against Mucosal Challenge by Simian-Human Immunodeficiency Virus SHIV_{Ba-L}. *J Virol.* **84**(3): 1302-1313.
- Hessell, A. J., Jaworski, J. P., Epton, E., Matsuda, K., Pandey, S., Kahl, C., Reed, J., Sutton, W. F., Hammond, K. B., Cheever, T. A., Barnette, P. T., Legasse, A. W., Planer, S., Stanton, J. J., Pegu, A., Chen, X., Wang, K., Siess, D., Burke, D., Park, B. S., Axthelm, M. K., Lewis, A., Hirsch, V. M., Graham, B. S., Mascola, J. R., Sacha, J. B., and Haigwood, N. L. (2016). Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques. *Nat Med* **22**(4), 362-8.
- Heyndrickx, L., Heath, A., Sheik-Khalil, E., Alcamí, J., Bongertz, V., Jansson, M., Malnati, M., Montefiori, D., Moog, C., Morris, L., Osmanov, S., Polonis, V., Ramaswamy, M., Sattentau, Q., Tolazzi, M., Schuitemaker, H., Willems, B., Wrin, T., Fenyo, E. M., and Scarlatti, G. (2012). International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report II. *PLoS One* **7**(5), e36438.
- Hickey, D. K., Patel, M. V., Fahey, J. V., and Wira, C. R. (2011). Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* **88**(2), 185-94.
- Hill, J. A., and Anderson, D. J. (1992). Human vaginal leukocytes and the effects of vaginal fluid on lymphocyte and macrophage defense functions. *Am J Obstet Gynecol* **166**(2), 720-6.
- 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., 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**(2), 257-70.
- Ho, D. D., Sarngadharan, M. G., Resnick, L., Dimarzo-veronese, F., Rota, T. R., and Hirsch, M. S. (1985). Primary human T-lymphotropic virus type III infection. *Ann Intern Med* **103**(6 (Pt 1)), 880-3.
- 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**, S448-53.
- Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A. M., and Moog, C. (2006a). Nonneutralizing antibodies are able to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and immature dendritic cells. *J Virol* **80**(12), 6177-81.
- Holl, V., Peressin, M., Schmidt, S., Decoville, T., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A. M., and Moog, C. (2006b). Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood* **107**(11), 4466-74.
- Holl, V., Xu, K., Peressin, M., Lederle, A., Biedma, M. E., Delaporte, M., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., Aubertin, A. M., and Moog, C. (2010). Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *J Virol* **84**(9), 4172-82.
- Horwitz, J. A., Halper-Stromberg, A., Mouquet, H., Gitlin, A. D., Tretiakova, A., Eisenreich, T. R., Malbec, M., Gravemann, S., Billerbeck, E., Dorner, M., Buning, H., Schwartz, O., Knops, E., Kaiser, R., Seaman, M. S., Wilson, J. M., Rice, C. M., Ploss, A., Bjorkman, P. J., Klein, F., and

- Nussenzweig, M. C. (2013). HIV-1 suppression and durable control by combining single broadly neutralizing antibodies and antiretroviral drugs in humanized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(41), 16538-43.
- Houzet, L., Matusali, G., and Dejudcq-Rainsford, N. (2014). Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. *J Infect Dis* **210** Suppl 3, S622-30.
- Huber, M., and Trkola, A. (2007). Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J Intern Med* **262**(1), 5-25.
- Hughes, J. P., Baeten, J. M., Lingappa, J. R., Magaret, A. S., Wald, A., de Bruyn, G., Kiarie, J., Inambao, M., Kilembe, W., Farquhar, C., and Celum, C. (2012). Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among African HIV-1-serodiscordant couples. *J Infect Dis* **205**(3), 358-65.
- 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**(3), 475-84.

I, J, K

- Igarashi, T., Brown, C. R., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., and Martin, M. A. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(2), 658-63.
- Introuini, A., Bostrom, S., Bradley, F., Gibbs, A., Glaessgen, A., Tjernlund, A., and Broliden, K. (2017). Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants. *PLoS Pathog* **13**(5), e1006402.
- Iwasaki, A. (2007). Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 381-418.
- Iwasaki, A. (2010). Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nat Rev Immunol* **10**(10), 699-711.
- Jameson, B., Baribaud, F., Pohlmann, S., Ghavimi, D., Mortari, F., Doms, R. W., and Iwasaki, A. (2002). Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* **76**(4), 1866-75.
- Janoff, E. N., Wahl, S. M., Thomas, K., and Smith, P. D. (1995). Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infection of human monocytes by IgA. *J Infect Dis* **172**(3), 855-8.
- Jespers, V., Kyongo, J., Joseph, S., Hardy, L., Cools, P., Crucitti, T., Mwaura, M., Ndayisaba, G., Delany-Moretwe, S., Buyze, J., Vanham, G., and van de Wijgert, J. (2017). A longitudinal analysis of the vaginal microbiota and vaginal immune mediators in women from sub-Saharan Africa. *Sci Rep* **7**(1), 11974.
- 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**(2), 283-93.
- Kaul, R., Trabattoni, D., Bwayo, J. J., Arienti, D., Zagliani, A., Mwangi, F. M., Kariuki, C., Ngugi, E. N., MacDonald, K. S., Ball, T. B., Clerici, M., and Plummer, F. A. (1999). HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *Aids* **13**(1), 23-9.
- 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., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J. L., Gao, F., Anderson, J. A., Ping, L. H., Swanstrom, R., Tomaras, G. D., Blattner, W. A., Goepfert, P. A., Kilby, J. M., Saag, M. S., Delwart, E. L., Busch, M. P., Cohen, M. S., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., Gaschen, B., Athreya, G. S., Lee, H. Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A. S., Bhattacharya, T., Korber, B. T., Hahn, B. H., and Shaw, G. M. (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(21), 7552-7.
- Keogan, S., Siegert, K., Wigdahl, B., and Krebs, F. C. (2015). Critical Review: Immunomodulation by Seminal Factors and Implications for Male-to-Female HIV-1 Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* **69**(2), 131-7.
- Kersh, E. N., Henning, T., Vishwanathan, S. A., Morris, M., Butler, K., Adams, D. R., Guenther, P., Srinivasan, P., Smith, J., Radzio, J., Garcia-Lerma, J. G., Dobard, C., Heneine, W., and McNicholl, J. (2014). SHIV susceptibility changes during the menstrual cycle of pigtail macaques. *J Med Primatol* **43**(5), 310-6.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**(3), 223-46.
- Klatt, N. R., and Brenchley, J. M. (2010). Th17 cell dynamics in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* **5**(2), 135-40.

- Klatt, N. R., Cheu, R., Birse, K., Zevin, A. S., Perner, M., Noel-Romas, L., Grobler, A., Westmacott, G., Xie, I. Y., Butler, J., Mansoor, L., McKinnon, L. R., Passmore, J. S., Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S. S., and Burgener, A. D. (2017). Vaginal bacteria modify HIV tenofovir microbicide efficacy in African women. *Science* **356**(6341), 938-945.
- Klatt, N. R., Estes, J. D., Sun, X., Ortiz, A. M., Barber, J. S., Harris, L. D., Cervasi, B., Yokomizo, L. K., Pan, L., Vinton, C. L., Tabb, B., Canary, L. A., Dang, Q., Hirsch, V. M., Alter, G., Belkaid, Y., Lifson, J. D., Silvestri, G., Milner, J. D., Paiardini, M., Haddad, E. K., and Brenchley, J. M. (2012). Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal Immunol* **5**(6), 646-57.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**(5996), 767-8.
- 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**(1), 289-92.
- Klechevsky, E., and Banchereau, J. (2013). Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Ann N Y Acad Sci* **1284**, 24-30.
- Klein, F., Halper-Stromberg, A., Horwitz, J. A., Gruell, H., Scheid, J. F., Bournazos, S., Mouquet, H., Spatz, L. A., Diskin, R., Abadir, A., Zang, T., Dorner, M., Billerbeck, E., Labitt, R. N., Gaebler, C., Marcovecchio, P., Incesu, R. B., Eisenreich, T. R., Bieniasz, P. D., Seaman, M. S., Bjorkman, P. J., Ravetch, J. V., Ploss, A., and Nussenzweig, M. C. (2012). HIV therapy by a combination of broadly neutralizing antibodies in humanized mice. *Nature* **492**(7427), 118-22.
- Kolodkin-Gal, D., Hulot, S. L., Koriath-Schmitz, B., Gombos, R. B., Zheng, Y., Owuor, J., Lifton, M. A., Ayeni, C., Najarian, R. M., Yeh, W. W., Asmal, M., Zamir, G., and Letvin, N. L. (2013). Efficiency of cell-free and cell-associated virus in mucosal transmission of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **87**(24), 13589-97.
- Kong, R., Xu, K., Zhou, T., Acharya, P., Lemmin, T., Liu, K., Ozorowski, G., Soto, C., Taft, J. D., Bailer, R. T., Cale, E. M., Chen, L., Choi, C. W., Chuang, G. Y., Doria-Rose, N. A., Druz, A., Georgiev, I. S., Gorman, J., Huang, J., Joyce, M. G., Louder, M. K., Ma, X., McKee, K., O'Dell, S., Pancera, M., Yang, Y., Blanchard, S. C., Mothes, W., Burton, D. R., Koff, W. C., Connors, M., Ward, A. B., Kwong, P. D., and Mascola, J. R. (2016). Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody. *Science* **352**(6287), 828-33.
- Koppensteiner, H., Banning, C., Schneider, C., Hohenberg, H., and Schindler, M. (2012). Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies. *J Virol* **86**(5), 2826-36.
- Kozlowski, P. A., Black, K. P., Shen, L., and Jackson, S. (1995). High prevalence of serum IgA HIV-1 infection-enhancing antibodies in HIV-infected persons. Masking by IgG. *J Immunol* **154**(11), 6163-73.
- 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**(1), 135-44.
- Kwong, P. D., Mascola, J. R., and Nabel, G. J. (2013). Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol* **13**(9), 693-701.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**(6686), 648-59.

L

- Laanani M., Ghosn J., Essat A., Melard A., Seng R., Gousset M., Panjo H., Mortier E., Girard P. M., Goujard C., Meyer L., Rouzioux C.; Agence Nationale de Recherche sur le Sida PRIMO Cohort Study Group. (2015). Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis*. Jun 1;**60**(11):1715-21. doi: 10.1093/cid/civ171. Epub 2015 Mar 3.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segéral, 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**(7353), 654-7.
- Larsson, M. (2005). HIV-1 and the hijacking of dendritic cells: a tug of war. *Springer Semin Immunopathol* **26**(3), 309-28.

- Lawrence P., Portran D., Terrasse R., Palle S., Olivier T., Fantini J., Bourlet T., Pozzetto B., Delezay O. (2012). Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. *AIDS*. Apr 24; **26**(7):785-96. doi: 10.1097/QAD.0b013e328351426e.
- Lee, S. K., Kim, C. J., Kim, D. J., and Kang, J. H. (2015). Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw* **15**(1), 16-26.
- Leligdowicz, A., Feldmann, J., Jaye, A., Cotten, M., Dong, T., McMichael, A., Whittle, H., and Rowland-Jones, S. (2010). Direct relationship between virus load and systemic immune activation in HIV-2 infection. *J Infect Dis* **201**(1), 114-22.
- Le Tortorec, A., and Dejuq-Rainsford, N. (2010). HIV infection of the male genital tract – consequences for sexual transmission and reproduction. *Int J Androl* **33**, e98–e108.
- Lewis, G. K. (2016). The first 24 h: targeting the window of opportunity for antibody-mediated protection against HIV-1 transmission. *Curr Opin HIV AIDS* **11**(6), 561-568.
- Lewis, G. K., Finzi, A., DeVico, A. L., and Pazgier, M. (2015). Conformational Masking and Receptor-Dependent Unmasking of Highly Conserved Env Epitopes Recognized by Non-Neutralizing Antibodies That Mediate Potent ADCC against HIV-1. *Viruses* **7**(9), 5115-32.
- Lewis, G. K., Pazgier, M., and DeVico, A. L. (2017). Survivors Remorse: antibody-mediated protection against HIV-1. *Immunol Rev* **275**(1), 271-284.
- Lewis, G. K., Pazgier, M., Evans, D. T., Ferrari, G., Bournazos, S., Parsons, M. S., Bernard, N. F., and Finzi, A. (2017). Beyond Viral Neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **33**(8), 760-764.
- Li, H., Zony, C., Chen, P., and Chen, B. K. (2017). Reduced Potency and Incomplete Neutralization of Broadly Neutralizing Antibodies against Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 with Transmitted Founder Envs. *J Virol* **91**(9).
- Li, Y., Svehla, K., Louder, M. K., Wycuff, D., Phogat, S., Tang, M., Migueles, S. A., Wu, X., Phogat, A., Shaw, G. M., Connors, M., Hoxie, J., Mascola, J. R., and Wyatt, R. (2009). Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **83**(2), 1045-59.
- Li, Z., Palaniyandi, S., Zeng, R., Tuo, W., Roopenian, D. C., and Zhu, X. (2011). Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(11), 4388-93.
- Liu, J., Ghneim, K., Sok, D., Bosche, W. J., Li, Y., Chipriano, E., Berkemeier, B., Oswald, K., Borducchi, E., Cabral, C., Peter, L., Brinkman, A., Shetty, M., Jimenez, J., Mondesir, J., Lee, B., Giglio, P., Chandrashekar, A., Abbink, P., Colantonio, A., Gittens, C., Baker, C., Wagner, W., Lewis, M. G., Li, W., Sekaly, R. P., Lifson, J. D., Burton, D. R., and Barouch, D. H. (2016). Antibody-mediated protection against SHIV challenge includes systemic clearance of distal virus. *Science* **353**(6303), 1045-1049.
- 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., Nephew K.R., Pambuccian S., Lifson J.D., Carlis J.V., Haase A.T. (2009). Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature*. Apr 23; **458**(7241):1034-8. doi: 10.1038/nature07831. Epub 2009 Mar 4.
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., and Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**(3), 367-77.
- Lusic, M., and Siliciano, R. F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat Rev Microbiol* **15**(2), 69-82.
- van Loggerenberg F., Mlisana K., Williamson C., Auld S. C., Morris L., Gray C. M., Abdool Karim Q., Grobler A., Barnabas N., Iriogbe I., Abdool Karim S.S. ; CAPRISA 002 Acute Infection Study Team.(2008). Establishing a cohort at high risk of HIV infection in South Africa: challenges and experiences of the CAPRISA 002 acute infection study. *PLoS One*. Apr **16**; **3**(4):e1954. doi: 10.1371/journal.pone.0001954.
- Lourenço A. G., Komesu M. C., Machado A. A., Quintana S. M., Bourlet T., Pozzetto B., Delézay O. (2014). Semen lactoferrin promotes CCL20 production by epithelial cells: Involvement in HIV transmission. *World J Virol*. May 12; **3**(2): 11–17

M

- Makvandi-Nejad, S., and Rowland-Jones, S. (2015). How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? *Immunol Lett* **163**(1), 69-75.
- Malbec, M., Porrot, F., Rua, R., Horwitz, J., Klein, F., Halper-Stromberg, A., Scheid, J. F., Eden, C., Mouquet, H., Nussenzweig, M. C., and Schwartz, O. (2013). Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J Exp Med* **210**(13), 2813-21.
- Mall, A. S., Habte, H., Mthembu, Y., Peacocke, J., and de Beer, C. (2017). Mucus and Mucins: do they have a role in the inhibition of the human immunodeficiency virus? *Virology* **14**(1), 192.
- Margolis, L., and Shattock, R. (2006). Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved? *Nat Rev Microbiol* **4**(4), 312-7.
- van Marle G., Gill M. J., Kolodka D., McManus L., Grant T., Church D. L. (2007). Compartmentalization of the gut viral reservoir in HIV-1 infected patients. *Retrovirology*. Dec **4**:4:87.
- Marlink, R. (1996). Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. *Aids* **10**(7), 689-99.
- Martellini, J. A., Cole, A. L., Venkataraman, N., Quinn, G. A., Svoboda, P., Gangrade, B. K., Pohl, J., Sorensen, O. E., and Cole, A. M. (2009). Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. *FASEB J* **23**(10), 3609-18.
- Martin, N., Welsch, S., Jolly, C., Briggs, J. A., Vaux, D., and Sattentau, Q. J. (2010). Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition. *J Virol* **84**(7), 3516-27.
- Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13.
- Mascola, J. R., and Montefiori, D. C. (2010). The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu Rev Immunol* **28**, 413-44.
- Mascola, J. R., Stiegler, G., VanCott, T. C., Katinger, H., Carpenter, C. B., Hanson, C. E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S. S., Birx, D. L., and Lewis, M. G. (2000). Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* **6**(2), 207-10.
- Masson, L., Passmore, J. A., Liebenberg, L. J., Werner, L., Baxter, C., Arnold, K. B., Williamson, C., Little, F., Mansoor, L. E., Naranbhai, V., Lauffenburger, D. A., Ronacher, K., Walzl, G., Garrett, N. J., Williams, B. L., Couto-Rodriguez, M., Hornig, M., Lipkin, W. I., Grobler, A., Abdool Karim, Q., and Abdool Karim, S. S. (2015). Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women. *Clin Infect Dis* **61**(2), 260-9.
- Mayr, L., Su, B., and Moog, C. (2017). Langerhans Cells: the 'Yin and Yang' of HIV Restriction and Transmission. *Trends Microbiol* **25**(3), 170-172.
- Mayr, L. M., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., Klingler, J., Ducloy, C., Bahram, S., Zolla-Pazner, S., and Moog, C. (2017). Non-neutralizing Antibodies Targeting the V1V2 Domain of HIV Exhibit Strong Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxic Activity. *Sci Rep* **7**(1), 12655.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* **6**(2), e1000788.
- McClelland RS, Ndinya-Achola JO, Baeten JM. (2007). Re: distinguishing the temporal association between women's intravaginal practices and risk of human immunodeficiency virus infection: a prospective study of South African women. *Am J Epidemiol*. Feb 15; **165**(4):474-5; author reply 475-6. Epub 2006 Dec 8.
- McCoy, L. E., and Burton, D. R. (2017). Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev* **275**(1), 11-20.
- McDonald, R. A., Mayers, D. L., Chung, R. C., Wagner, K. F., Ratto-Kim, S., Birx, D. L., and Michael, N. L. (1997). Evolution of human immunodeficiency virus type 1 env sequence variation in patients with diverse rates of disease progression and T-cell function. *J Virol* **71**(3), 1871-9.
- McIlroy, D., Autran, B., Cheynier, 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.
- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., and Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **10**(1), 11-23.
- Melikyan, G. B. (2008). Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111.

- Menager, M. M., and Littman, D. R. (2016). Actin Dynamics Regulates Dendritic Cell-Mediated Transfer of HIV-1 to T Cells. *Cell* **164**(4), 695-709.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**, 563-604.
- Merbah, M., Arakelyan, A., Edmonds, T., Ochsenbauer, C., Kappes, J. C., Shattock, R. J., Grivel, J. C., and Margolis, L. B. (2012). HIV-1 expressing the envelopes of transmitted/founder or control/reference viruses have similar infection patterns of CD4 T-cells in human cervical tissue ex vivo. *PLoS One* **7**(12), e50839.
- Mestecky, J. (2007). Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. *J Reprod Immunol* **73**(1), 86-97.
- Micsenyi A. M., Zony C., Alvarez R. A., Durham N. D., Chen B. K., Klotman M. E. (2013). Postintegration HIV-1 infection of cervical epithelial cells mediates contact-dependent productive infection of T cells. *J Infect Dis.* Dec 1;**208**(11):1756-67. doi: 10.1093/infdis/jit362. Epub 2013 Aug 1.
- Miller, C. J., McChesney, M., and Moore, P. F. (1992). Langerhans cells, macrophages and lymphocyte subsets in the cervix and vagina of rhesus macaques. *Lab Invest* **67**(5), 628-34.
- Miller, C. J., and Shattock, R. J. (2003). Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect* **5**(1), 59-67.
- Miller, M. D., Farnet, C. M., and Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**(7), 5382-90.
- Moldt, B., Rakasz, E. G., Schultz, N., Chan-Hui, P. Y., Swiderek, K., Weisgrau, K. L., Piaskowski, S. M., Bergman, Z., Watkins, D. I., Poignard, P., and Burton, D. R. (2012). Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(46), 18921-5.
- Montero, M., van Houten, N. E., Wang, X., and Scott, J. K. (2008). The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(1), 54-84, table of contents.
- van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, Pollakis G, Paxton WA. Efficient capture of antibody neutralized HIV-1 by cells expressing DC-SIGN and transfer to CD4+ T lymphocytes. (2007). *J Immunol*,**178**:3177-3185.
- Moog, C., Fleury, H. J., Pellegrin, I., Kirn, A., and Aubertin, A. M. (1997a). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**(5), 3734-41.
- Moog, C., Spenlehauer, C., Fleury, H., Heshmati, F., Saragosti, S., Letourneur, F., Kirn, A., and Aubertin, A. M. (1997b). Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates: a study of parameters implicated in neutralization in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(1), 19-27 "[
- Moore, J. P., Kitchen, S. G., Pugach, P., and Zack, J. A. (2004). The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(1), 111-26.
- Mouquet, H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol* **35**(11), 549-61.
- Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., Gimenez-Gallego, G., Sanchez, P. C., Fowler, D. M., Koulov, A., Kelly, J. W., Mothes, W., Grivel, J. C., Margolis, L., Keppler, O. T., Forssmann, W. G., and Kirchhoff, F. (2007). Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* **131**(6), 1059-71.

N, O

- Nahui Palomino, R. A., Zicari, S., Vanpouille, C., Vitali, B., and Margolis, L. (2017). Vaginal Lactobacillus Inhibits HIV-1 Replication in Human Tissues Ex Vivo. *Front Microbiol* **8**, 906.
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., Vyas, J. M., Boes, M., Ploegh, H. L., Fox, J. G., Littman, D. R., and Reinecker, H. C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**(5707), 254-8.
- Nijhuis M., van Maarseveen N. M., Boucher C. A. (2009). Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb Exp Pharmacol.* (189):299-320. doi: 10.1007/978-3-540-79086-0_11.

- Nishimura, Y., Gautam, R., Chun, T. W., Sadjadpour, R., Foulds, K. E., Shingai, M., Klein, F., Gazumyan, A., Golijanin, J., Donaldson, M., Donau, O. K., Plishka, R. J., Buckler-White, A., Seaman, M. S., Lifson, J. D., Koup, R. A., Fauci, A. S., Nussenzweig, M. C., and Martin, M. A. (2017). Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV. *Nature* **543**(7646), 559-563.
- Nisole, S., and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* **1**, 9.
- Nydegger S., Foti M., Derdowski A., Spearman P., Thali M. (2003). HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic*. 4:902–910
- Ochsenbauer, C., Edmonds, T. G., Ding, H., Keele, B. F., Decker, J., Salazar, M. G., Salazar-Gonzalez, J. F., Shattock, R., Haynes, B. F., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Kappes, J. C. (2012). Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages. *J Virol* **86**(5), 2715-28.

P

- Pang S., Yu D., An D. S., Baldwin G. C., Xie Y., Poon B., Chow Y. H., Park N. H., Chen I. S. (2000). Human immunodeficiency virus Env-independent infection of human CD4(-) cells. *J Virol*. Dec;**74**(23):10994-1000.
- Pastori, C., Barassi, C., Piconi, S., Longhi, R., Villa, M. L., Siccardi, A. G., Clerici, M., and Lopalco, L. (2000). HIV neutralizing IgA in exposed seronegative subjects recognise an epitope within the gp41 coiled-coil pocket. *J Biol Regul Homeost Agents* **14**(1), 15-21.
- 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**(2), 481-90.
- Pelchen-Matthews A., Giese S., Mlcochova P., Turner J., Marsh M. (2011). beta2 Integrin Adhesion Complexes Maintain the Integrity of HIV-1 Assembly Compartments in Primary Macrophages. *Traffic*. 13: 273–291.
- Pelchen-Matthews A., Kramer B., Marsh M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol*.162:443–455
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M. M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., Zipori, D., and Lapidot, T. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* **95**(11), 3289-96.
- 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**(5), 667-77.
- Perez, L. G., Costa, M. R., Todd, C. A., Haynes, B. F., and Montefiori, D. C. (2009). Utilization of immunoglobulin G Fc receptors by human immunodeficiency virus type 1: a specific role for antibodies against the membrane-proximal external region of gp41. *J Virol* **83**(15), 7397-410.
- Pereyra F, Jia X et al. International HIV Controllers Study. (2010). The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*. 330(6010):1551-7.
- Persson, E. K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hagerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Hakansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., and Agace, W. W. (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* **38**(5), 958-69.
- Peters, P. J., Gonzalez-Perez, M. P., Musich, T., Moore Simas, T. A., Lin, R., Morse, A. N., Shattock, R. J., Derdeyn, C. A., and Clapham, P. R. (2015). Infection of ectocervical tissue and universal targeting of T-cells mediated by primary non-macrophage-tropic and highly macrophage-tropic HIV-1 R5 envelopes. *Retrovirology* **12**, 48.
- Petrova, M. I., Reid, G., Vaneechoutte, M., and Lebeer, S. (2017). *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends Microbiol* **25**(3), 182-191.
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, J. W., and Choopanya, K. (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**(12), 1661-71.

- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12), 7415-9.
- Politch, J. A., Marathe, J., and Anderson, D. J. (2014). Characteristics and quantities of HIV host cells in human genital tract secretions. *J Infect Dis* **210 Suppl 3**, S609-15.
- Politch J. A., Mayer K. H., Welles S. L., O'Brien W. X., Xu C., Bowman F. P., Anderson D. J. (2012). Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men. *AIDS*. Jul 31;**26**(12):1535-43. doi: 10.1097/QAD.0b013e328353b11b.
- 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.
- Powers, K. A., Poole, C., Pettifor, A. E., and Cohen, M. S. (2008). Rethinking the heterosexual infectivity of HIV-1: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **8**(9), 553-63.
- 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**(6), 1253-63.
- Pudney J., Anderson D. (1991). Orchitis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Pathol*. Jul;**139**(1):149-60.

Q, R

- Quayle, A. J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* **57**(1-2), 61-79.
- Quillay, H., El Costa, H., Duriez, M., Marlin, R., Cannou, C., Madec, Y., de Truchis, C., Rahmati, M., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., and Menu, E. (2016). NK cells control HIV-1 infection of macrophages through soluble factors and cellular contacts in the human decidua. *Retrovirology* **13**(1), 39.
- Quillay, H., El Costa, H., Marlin, R., Duriez, M., Cannou, C., Chretien, F., Fernandez, H., Lebreton, A., Ighil, J., Schwartz, O., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., and Menu, E. (2015). Distinct characteristics of endometrial and decidual macrophages and regulation of their permissivity to HIV-1 infection by SAMHD1. *J Virol* **89**(2), 1329-39.
- Ramjee G., Wand H., Whitaker C., Wand H., Whitaker C., McCormack S., Padian N., Kelly C., Nunn A. (2012). HIV incidence among non-pregnant women living in selected rural, semi-rural and urban areas in Kwazulu-Natal, South Africa. *AIDS Behav*, 16, pp. 2062-2071
- Raposo G., Moore M., Innes D., Leijendekker R., Leigh-Brown A., Benaroch P., Geuze H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*. Oct;**3**(10):718-29.
- Raux, M., Finkielsztejn, L., Salmon-Ceron, D., Bouchez, H., Excler, J. L., Dulioust, E., Grouin, J. M., Sicard, D., and Blondeau, C. (2000). IgG subclass distribution in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(6), 583-94.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., and Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**, 4680-7.
- Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Prensri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., Benenson, M., Gurunathan, S., Tartaglia, J., McNeil, J. G., Francis, D. P., Stablein, D., Birx, D. L., Chunsuttiwat, S., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., Robb, M. L., Michael, N. L., Kunasol, P., and Kim, J. H. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**(23), 2209-20.
- 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.
- Reynoso, R., Wieser, M., Ojeda, D., Bonisch, M., Kuhnel, H., Bolcic, F., Quendler, H., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., and Quarleri, J. (2012). HIV-1 induces telomerase activity in monocyte-derived macrophages, possibly safeguarding one of its reservoirs. *J Virol* **86**(19), 10327-37.

- Ribeiro, C. M., Sarrami-Forooshani, R., Setiawan, L. C., Zijlstra-Willems, E. M., van Hamme, J. L., Tigchelaar, W., van der Wel, N. N., Kootstra, N. A., Gringhuis, S. I., and Geijtenbeek, T. B. (2016). Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5alpha in dendritic cell subsets. *Nature* **540**(7633), 448-452.
- Roan, N. R., Munch, 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**(1), 73-80.
- Robertson, S.A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* **322**, 43-52.
- Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinghuys, P., Brown, G. D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., Corthesy, B., and Paul, S. (2013). Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol* **11**(9), e1001658.
- Rodriguez-Garcia, M., Barr, F. D., Crist, S. G., Fahey, J. V., and Wira, C. R. (2014). Phenotype and susceptibility to HIV infection of CD4+ Th17 cells in the human female reproductive tract. *Mucosal Immunol* **7**(6), 1375-85.
- Rodriguez-Garcia, M., Biswas, N., Patel, M. V., Barr, F. D., Crist, S. G., Ochsenbauer, C., Fahey, J. V., and Wira, C. R. (2013). Estradiol reduces susceptibility of CD4+ T cells and macrophages to HIV-infection. *PLoS One* **8**(4), e62069.
- Rodriguez-Garcia, M., Patel, M. V., and Wira, C. R. (2013). Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* **97**(1), 74-84.
- Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., Barr, F. D., Boesch, A. W., Ackerman, M. E., Kappes, J. C., Ochsenbauer, C., and Wira, C. R. (2017). Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunol* **10**(2), 531-544.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M., and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**(1), 83-93.

S

- Saba, E., Grivel, J. C., Vanpouille, C., Brichacek, B., Fitzgerald, W., Margolis, L., and Lisco, A. (2010). HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol* **3**(3), 280-90.
- 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**(6), 1081-90.
- 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**(24), 13723-34.
- Sagar, M., Laeyendecker, O., Lee, S., Gamiel, J., Wawer, M. J., Gray, R. H., Serwadda, D., Sewankambo, N. K., Shepherd, J. C., Toma, J., Huang, W., and Quinn, T. C. (2009). Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J Infect Dis* **199**(4), 580-9.
- 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., Parrish, N. F., Shaw, K. S., Guffey, M. B., Bar, K. J., Davis, K. L., Ochsenbauer-Jambor, C., Kappes, J. C., Saag, M. S., Cohen, M. S., Mulenga, J., Derdeyn, C. A., Allen, S., Hunter, E., Markowitz, M., Hraber, P., Perelson, A. S., Bhattacharya, T., Haynes, B. F., Korber, B. T., Hahn, B. H., and Shaw, G. M. (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* **206**(6), 1273-89.
- Sallé B., Brochard P., Bourry O., Mannioui A., Andrieu T., Prevot S., Dejuçq-Rainsford N., Dereuddre-Bosquet N., Le Grand R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. Aug 15; **202**(3):337-44. doi: 10.1086/653619.
- 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., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy,

- G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**(6593), 722-5.
- Sattentau, Q. J., and Stevenson, M. (2016). Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host Microbe* **19**(3), 304-10.
- Sharova N., Swingler C., Sharkey M., Stevenson M. (2005). Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *EMBO J.* 2005 Jul 6; **24**(13):2481-9.
- Scheid, J. F., Mouquet, H., Feldhahn, N., Seaman, M. S., Velinzon, K., Pietzsch, J., Ott, R. G., Anthony, R. M., Zebroski, H., Hurley, A., Phogat, A., Chakrabarti, B., Li, Y., Connors, M., Pereyra, F., Walker, B. D., Wardemann, H., Ho, D., Wyatt, R. T., Mascola, J. R., Ravetch, J. V., and Nussenzweig, M. C. (2009). Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* **458**(7238), 636-40.
- Schellenberg, J. J., and Plummer, F. A. (2012). The Microbiological Context of HIV Resistance: Vaginal Microbiota and Mucosal Inflammation at the Viral Point of Entry. *Int J Inflam* **2012**, 131243.
- Schuetz A., Deleage C., Sereti I., Rerknimitr R., Phanuphak N., Phuang-Ngern Y., Estes J. D., Sandler N. G., Sukhumvittaya S., Marovich M., Jongrakthaitae S., Akapirat S., Fletscher JL., Kroon E., Dewar R., Trichavaraj R., Chomchey N., Douek D. C., O Connell RJ., Ngauy V., Robb ML., Phanuphak P., Michael NL., Excler J. L., Kim J. H., de Souza M. S., Ananworanich J.; RV254/SEARCH 010 and RV304/SEARCH 013 StudyGroups.(2014). Initiation of ART during early acute HIV infection preserves mucosal Th17function and reverse s HIV-related immune activation. *PLoS Pathog.* Dec **11**;10(12):e1004543. doi: 10.1371/journal.ppat.1004543.
- Scott, Y. M., Park, S. Y., and Dezzutti, C. S. (2016). Broadly Neutralizing Anti-HIV Antibodies Prevent HIV Infection of Mucosal Tissue Ex Vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **60**(2), 904-12.
- Sewankambo, N., Gray, R. H., Wawer, M. J., Paxton, L., McNaim, D., Wabwire-Mangen, F., Serwadda, D., Li, C., Kiwanuka, N., Hillier, S. L., Rabe, L., Gaydos, C. A., Quinn, T. C., and Konde-Lule, J. (1997). HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* **350**(9077), 546-50.
- Sha, B. E., Zariffard, M. R., Wang, Q. J., Chen, H. Y., Bremer, J., Cohen, M. H., and Spear, G. T. (2005). Female genital-tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and Mycoplasma hominis. *J Infect Dis* **191**(1), 25-32.
- Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Jasper, M. J., Gemzell-Danielsson, K., and Robertson, S. A. (2012). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J Immunol* **188**(5), 2445-54.
- Sharma, H., Tal, R., Clark, N. A., and Segars, J. H. (2014). Microbiota and pelvic inflammatory disease. *Semin Reprod Med* **32**(1), 43-9.
- Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**(1), a006841.
- Shattock, R. J., and Griffin, G. E. (1994). Cellular adherence enhances HIV replication in monocytic cells. *Res Virol* **145**(3-4), 139-45.
- Shen, R., Meng, G., Ochsenaubauer, C., Clapham, P. R., Grams, J., Novak, L., Kappes, J. C., Smythies, L. E., and Smith, P. D. (2011). Stromal down-regulation of macrophage CD4/CCR5 expression and NF-kappaB activation mediates HIV-1 non-permissiveness in intestinal macrophages. *PLoS Pathog* **7**(5), e1002060.
- Shen, R., Richter, H. E., Clements, R. H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P. R., Smythies, L. E., and Smith, P. D. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **83**(7), 3258-67.
- Shen, R., Richter, H. E., and Smith, P. D. (2011). Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. *Am J Reprod Immunol* **65**(3), 261-7.
- Shenoi S. V., Moll A. P., Brooks R. P., Kyriakides T., Andrews L., Kompala T., Upadhy D., Altice FL., Eksteen F. J., Friedland G. (2017). Integrated Tuberculosis/Human Immunodeficiency Virus Community-Based Case Finding in Rural South Africa: Implications for Tuberculosis Control Efforts. *Open Forum Infect Dis.* May 4;4(3):ofx092. doi: 10.1093/ofid/ofx092.
- Sherer N. M., Lehmann M. J., Jimenez-Soto L. F., Ingmundson A., Horner S. M., et al. (2003). Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic.* 4:785–801

- Shiver, J.W., Fu, T.-M., Chen, L., Casimiro, D.R., Davies, M.-E., Evans, R.K., Zhang, Z.-Q., Simon, A.J., Triona, W.L., Dubey, S.A., et al. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**, 331–335.
- Simek, M. D., Rida, W., Priddy, F. H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D. S., Lehrman, J. K., Boaz, M., Tarragona-Fiol, T., Miuro, G., Birungi, J., Pozniak, A., McPhee, D. A., Manigart, O., Karita, E., Inwoley, A., Jaoko, W., Dehovitz, J., Bekker, L. G., Pitisuttithum, P., Paris, R., Walker, L. M., Pognard, P., Wrin, T., Fast, P. E., Burton, D. R., and Koff, W. C. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol* **83**(14), 7337-48.
- Simon, V., Ho, D. D., and Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* **368**(9534), 489-504.
- Sips, M., Krykbaeva, M., Diefenbach, T. J., Ghebremichael, M., Bowman, B. A., Dugast, A. S., Boesch, A. W., Streeck, H., Kwon, D. S., Ackerman, M. E., Suscovich, T. J., Brouckaert, P., Schacker, T. W., and Alter, G. (2016). Fc receptor-mediated phagocytosis in tissues as a potent mechanism for preventive and therapeutic HIV vaccine strategies. *Mucosal Immunol* **9**(6), 1584-1595.
- Smed-Sørensen, 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.
- Sourisseau, M., Sol-Foulon, N., Porrot, F., Blanchet, F., and Schwartz, O. (2007). Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J Virol* **81**(2), 1000-12.
- Speck, R. F., Wehrly, K., Platt, E. J., Atchison, R. E., Charo, I. F., Kabat, D., Chesebro, B., and Goldsmith, M. A. (1997). Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* **71**(9), 7136-9.
- Spira, A. I., Marx, P. A., Patterson, B. K., Mahoney, J., Koup, R. A., Wolinsky, S. M., and Ho, D. D. (1996). Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques. *J Exp Med* **183**(1), 215-25.
- Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., and et al. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**(5), 637-48.
- Stary, G., Olive, A., Radovic-Moreno, A. F., Gondek, D., Alvarez, D., Basto, P. A., Perro, M., Vrbanac, V. D., Tager, A. M., Shi, J., Yethon, J. A., Farokhzad, O. C., Langer, R., Starnbach, M. N., and von Andrian, U. H. (2015). VACCINES. A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells. *Science* **348**(6241), aaa8205.
- 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**(2), 203-11.
- Stieh, D. J., Matias, E., Xu, H., Fought, A. J., Blanchard, J. L., Marx, P. A., Veazey, R. S., and Hope, T. J. (2016). Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques. *Cell Host Microbe* **19**(4), 529-40.
- Stieh D. J., Maric D., Kelley Z. L., Anderson M. R, Hattaway H. Z, Beilfuss B. A, Rothwangl K. B, Veazey R. S., Hope T. J. (2014). 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 Oct 9;10(10):e1004440.
- Stoddard E., Ni H., Cannon G., Zhou C., Kallenbach N., Malamud D., Weissman D.(2009). gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue. *J Virol.* Sep;**83**(17):8596-603. doi: 10.1128/JVI.00744-09. Epub 2009 Jun 24.
- Su, B., Biedma, M. E., Lederle, A., Peressin, M., Lambotin, M., Proust, A., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., and Moog, C. (2014a). Dendritic cell-lymphocyte cross talk downregulates host restriction factor SAMHD1 and stimulates HIV-1 replication in dendritic cells. *J Virol* **88**(9), 5109-21.
- Su, B., Lederle, A., Laumond, G., Ducloy, C., Schmidt, S., Decoville, T., and Moog, C. (2014b). Broadly neutralizing antibody VRC01 prevents HIV-1 transmission from plasmacytoid dendritic cells to CD4 T lymphocytes. *J Virol* **88**(18), 10975-81.

- Su, B., and Moog, C. (2014). Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front Immunol* **5**, 289.
- Su, B., Peressin, M., Ducloy, C., Penichon, J., Mayr, L. M., Laumond, G., Schmidt, S., Decoville, T., and Moog, C. (2015). Short Communication: Exploring Antibody Potential as Prophylactic/Therapeutic Strategies for Prevention of Early Mucosal HIV-1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **31**(11), 1187-91.
- Su, B., Xu, K., Lederle, A., Peressin, M., Biedma, M. E., Laumond, G., Schmidt, S., Decoville, T., Proust, A., Lambotin, M., Holl, V., and Moog, C. (2012). Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* **120**(18), 3708-17.

T

- Takahashi K., Wesselingh S. L., Griffin D. E., McArthur J. C., Johnson R. T., Glass J. D. (1996). Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry. *Ann Neurol*. Jun;**39**(6):705-11.
- Tan, J., and Sattentau, Q. J. (2013). The HIV-1-containing macrophage compartment: a perfect cellular niche? *Trends Microbiol* **21**(8), 405-12.
- Taylor S., Davies S.(2010). Antiretroviral drug concentrations in the male and female genital tract: implications for the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. Jul;**5**(4):335-43. doi: 10.1097/COH.0b013e32833a0b69.
- Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**(8), 569-79.
- Thibodeau, V., Fourcade, L., Labbe, A. C., Alary, M., Guedou, F., Poudrier, J., and Roger, M. (2017). Highly-Exposed HIV-1 seronegative Female Commercial Sex Workers sustain in their genital mucosa increased frequencies of tolerogenic myeloid and regulatory T-cells. *Sci Rep* **7**, 43857.
- Thordardottir, S., Hangalapura, B. N., Hutten, T., Cossu, M., Spanholtz, J., Schaap, N., Radstake, T. R., van der Voort, R., and Dolstra, H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor antagonist StemRegenin 1 promotes human plasmacytoid and myeloid dendritic cell development from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev* **23**(9), 955-67.
- Thurman, A. R., Chandra, N., Yousefieh, N., Zalenskaya, I., Kimble, T., Asin, S., Rollenhagen, C., Anderson, S. M., Herold, B., Mesquita, P. M., Richardson-Harman, N., Cunningham, T., Schwartz, J. L., and Doncel, G. F. (2016). Comparison of Follicular and Luteal Phase Mucosal Markers of HIV Susceptibility in Healthy Women. *AIDS Res Hum Retroviruses* **32**(6), 547-60.
- Tjomsland, V., Ellegard, R., Kjolhede, P., Wodlin, N. B., Hinkula, J., Lifson, J. D., and Larsson, M. (2013). Blocking of integrins inhibits HIV-1 infection of human cervical mucosa immune cells with free and complement-opsonized virions. *Eur J Immunol* **43**(9), 2361-72.
- Tomaras, G. D., Yates, N. L., Liu, P., Qin, L., Fouda, G. G., Chavez, L. L., Decamp, A. C., Parks, R. J., Ashley, V. C., Lucas, J. T., Cohen, M., Eron, J., Hicks, C. B., Liao, H. X., Self, S. G., Landucci, G., Forthal, D. N., Weinhold, K. J., Keele, B. F., Hahn, B. H., Greenberg, M. L., Morris, L., Karim, S. S., Blattner, W. A., Montefiori, D. C., Shaw, G. M., Perelson, A. S., and Haynes, B. F. (2008). Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* **82**(24), 12449-63.
- 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**(3), 252-64.
- Tuero, I., Mohanram, V., Musich, T., Miller, L., Vargas-Inchaustegui, D. A., Demberg, T., Venzon, D., Kalisz, I., Kalyanaraman, V. S., Pal, R., Ferrari, M. G., LaBranche, C., Montefiori, D. C., Rao, M., Vaccari, M., Franchini, G., Barnett, S. W., and Robert-Guroff, M. (2015). Mucosal B Cells Are Associated with Delayed SIV Acquisition in Vaccinated Female but Not Male Rhesus Macaques Following SIVmac251 Rectal Challenge. *PLoS Pathog* **11**(8), e1005101.
- Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pohlmann, S., Doms, R. W., and Cunningham, A. L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* **3**(10), 975-83.
- Turville, S. G., Santos, J. J., Frank, I., Cameron, P. U., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., Dable, J., Stossel, H., Romani, N., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Pope, M., and Cunningham, A. L. (2004). Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**(6), 2170-9.

U, V

- Veazey, R. S., Marx, P. A., and Lackner, A. A. (2003). Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **187**(5), 769-76.
- Veillette, M., Richard, J., Pazgier, M., Lewis, G. K., Parsons, M. S., and Finzi, A. (2016). Role of HIV-1 Envelope Glycoproteins Conformation and Accessory Proteins on ADCC Responses. *Curr HIV Res* **14**(1), 9-23.
- Villanueva, J. M., Ellerbrock, T. V., Lennox, J. L., Bush, T. J., Wright, T. C., Pratt-Palmore, M., Evans-Strickfaden, T., Conley, L. J., Schnell, C., and Hart, C. E. (2002). The menstrual cycle does not affect human immunodeficiency virus type 1 levels in vaginal secretions. *J Infect Dis* **185**(2), 170-7.
- Vogt, M. W., Witt, D. J., Craven, D. E., Byington, R., Crawford, D. F., Schooley, R. T., and Hirsch, M. S. (1986). Isolation of HTLV-III/LAV from cervical secretions of women at risk for AIDS. *Lancet* **1**(8480), 525-7.

W

- Walker, L. M., Huber, M., Doores, K. J., Falkowska, E., Pejchal, R., Julien, J. P., Wang, S. K., Ramos, A., Chan-Hui, P. Y., Moyle, M., Mitcham, J. L., Hammond, P. W., Olsen, O. A., Phung, P., Fling, S., Wong, C. H., Phogat, S., Wrin, T., Simek, M. D., Koff, W. C., Wilson, I. A., Burton, D. R., and Poignard, P. (2011). Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**(7365), 466-70.
- Wang J. H, Janas A. M., Olson W. J., Wu L. (2007). Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J Virol*. Sep;**81**(17):8933-43. Epub 2007 Jun 13.
- Watkins, J. D., Sholukh, A. M., Mukhtar, M. M., Siddappa, N. B., Lakhashe, S. K., Kim, M., Reinherz, E. L., Gupta, S., Forthal, D. N., Sattentau, Q. J., Villinger, F., Corti, D., and Ruprecht, R. M. (2013). Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. *Aids* **27**(9), F13-20.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., and Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**(6929), 307-12.
- Welsch S., Keppler O. T., Habermann A., Allespach I., Krijnse-Locker J., et al. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog*. 3:e36
- 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**(3), 738-43.
- Wira, C. R., Fahey, J. V., Sentman, C. L., Pioli, P. A., and Shen, L. (2005). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* **206**, 306-35.
- 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**(4), 217-30.
- de Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TB. (2008). Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends Mol Med*. Jan;**14**(1):12-9. Epub 2007 Dec 4.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* **13**(3), 367-71.
- Wofsy, C. B., Cohen, J. B., Hauer, L. B., Padian, N. S., Michaelis, B. A., Evans, L. A., and Levy, J. A. (1986). Isolation of AIDS-associated retrovirus from genital secretions of women with antibodies to the virus. *Lancet* **1**(8480), 527-9.
- Wren, L. H., Chung, A. W., Isitman, G., Kelleher, A. D., Parsons, M. S., Amin, J., Cooper, D. A., Stratov, I., Navis, M., and Kent, S. J. (2013). Specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses associated with slow progression of HIV infection. *Immunology* **138**(2), 116-23.
- Wu, L., and KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* **6**(11), 859-68.
- Wu Z., Chen Z., 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*. Nov 15;**188**(10):1473-82. Epub 2003 Oct 31.

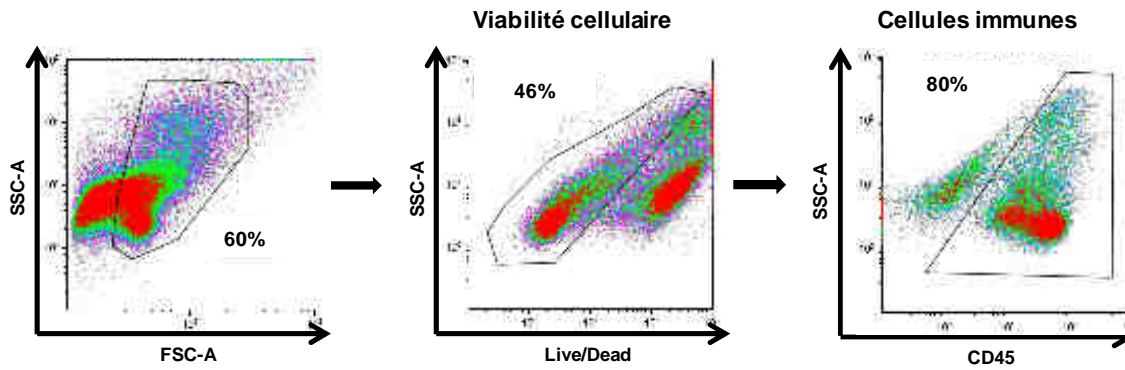
X, Y, Z

- Yang, E. J., Quick, M. C., Hanamornroongruang, S., Lai, K., Doyle, L. A., McKeon, F. D., Xian, W., Crum, C. P., and Herfs, M. (2015). Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Mod Pathol* **28**(7), 994-1000.
- Yeaman G. R., Asin S., Weldon S., Demian D. J., Collins J. E., Gonzalez J. L., Wira C. R., Fanger M. W., Howell A. L. (2004). Chemokine receptor expression in the human ectocervix: implications for infection by the human immunodeficiency virus-type 1. *Immunology*. Dec;**113**(4):524-33.
- Yoshida, M., Claypool, S. M., Wagner, J. S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D. C., Lencer, W. I., and Blumberg, R. S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* **20**(6), 769-83.
- 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**(8), e1000134.
- Zhang L., He T., Talal A., Wang G., Frankel S. S., Ho D. D.(1998). In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J Virol*. Jun;**72**(6):5035-45.
- Zhang, M., Gaschen, B., Blay, W., Foley, B., Haigwood, N., Kuiken, C., and Korber, B. (2004). Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* **14**(12), 1229-46.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K. A., Reimann, K. A., Reinhart, T. A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C. J., Veazey, R. S., Notermans, D., Little, S., Danner, S. A., Richman, D. D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H. L., Schacker, T. W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N. L., Wolinsky, S., and Haase, A. T. (1999). Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* **286**(5443), 1353-7.
- Zhong, P., Agosto, L. M., Ilinskaya, A., Dorjbal, B., Truong, R., Derse, D., Uchil, P. D., Heidecker, G., and Mothes, W. (2013). Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. *PLoS One* **8**(1), e53138.
- Zhou, M., and Ruprecht, R. M. (2014). Are anti-HIV IgAs good guys or bad guys? *Retrovirology* **11**, 109.
- Zolla-Pazner, S., deCamp, A., Gilbert, P. B., Williams, C., Yates, N. L., Williams, W. T., Howington, R., Fong, Y., Morris, D. E., Soderberg, K. A., Irene, C., Reichman, C., Pinter, A., Parks, R., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Rerks-Ngarm, S., Nitayaphan, S., Andrews, C., O'Connell, R. J., Yang, Z. Y., Nabel, G. J., Kim, J. H., Michael, N. L., Montefiori, D. C., Liao, H. X., Haynes, B. F., and Tomaras, G. D. (2014). Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. *PLoS One* **9**(2), e87572.

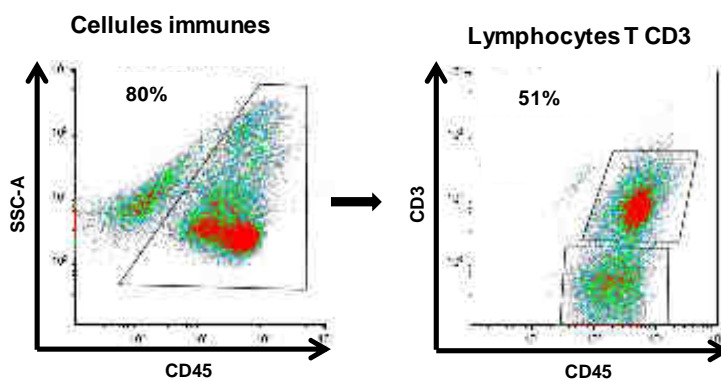
Annexes

Annexe 1 : Détection des cellules immunes par cytométrie en flux

A. Caractérisation des cellules immunes



B. Caractérisation des lymphocytes T



C. Caractérisation des DC et des macrophages

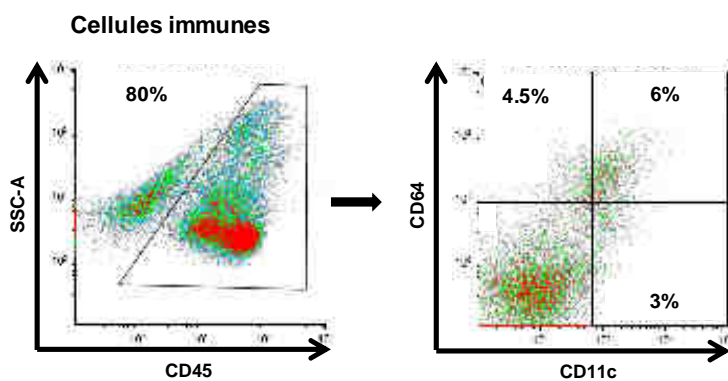


Figure 1 : Représentation par cytométrie en flux des cellules immunitaires dans l'endomètre. A) Après exclusion des doublets, la sélection des cellules s'effectue en fonction de la taille (FSC) et de la structure (SSC). Les cellules mortes sont exclues par le Live/Dead. Les fibroblastes et les cellules épithéliales sont exclus par le marqueur CD45. B) les lymphocytes T sont discriminés par l'expression du marqueur CD3. C) les macrophages et les cellules dendritiques sont détectés par l'expression des marqueurs CD64 et CD11c.

Annexe 2 : Participation à une étude collaborative

Le Vpr du VIH-1 neutralise la réponse cellulaire médiée par CTIP2 pour l'infection virale

HIV-1 Vpr counteracts CTIP2-mediated cellular response to viral infections.

Faezeh Forouzanfar, Sultan Ali, Camille Ducloy, Hala El Mekdad, Mahmoud El Maassarani, Emmanuel Boutant, Fadoua Daouad, Florence Margottin-Goguet, Christiane Moog, Carine Van Lint, Christian Schwartz and Olivier Rohr.

Soumis dans EMBO, 2018

Les études précédentes ont montré que CTIP2 favorise l'établissement et la persistance des gènes de latence du VIH-1 dans les cellules microgliales : cellules du VIH-1 dans le cerveau.

Dans cette étude, différentes cellules sont utilisées (cellules microgliales, lignées LT CD4 et des LT CD4 primaires) traitées ou non à l'interféron- α . Cette étude a pour objectif de déterminer le mécanisme d'échappement du VIH-1 pour CTIP2.

Cette étude est la première à montrer que l'expression de CTIP2 peut être induite par l'interféron- α . Nous montrons que l'infection productive des LT CD4 induit une diminution de l'expression de CTIP2. Cette diminution peut être associée à la dégradation de la protéine CTIP2 par la voie du protéasome induite par la protéine virale accessoire Vpr.

Dans cette étude, j'ai développé le modèle d'infection sur cellules primaires et analysé l'expression de CTIP2 dans ces cellules.

Cette étude montre que Vpr représente la protéine virale accessoire capable de neutraliser le facteur de restriction CTIP2 favorisant la latence du VIH-1 dans ces cellules cibles et la persistance des réservoirs viraux.

HIV-1 Vpr counteracts CTIP2-mediated cellular response to viral infections.

Forouzanfar F.¹, Ali S.¹, Ducloy C.², El Mekdad H.¹, El Maasarani M.¹, Boutant E.³, Daouad F.¹, Margotin-Goguet F.⁴, Moog C.², Van Lint C.^{5*}, Schwartz C.^{1*} and Rohr O^{1*}.

¹Université de Strasbourg, EA7292, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France; ²INSERM U1109, Fédération de médecine translationnelle (FMTS), Université de Strasbourg, INSERM U1109, Strasbourg, France ; ³ Université de Strasbourg, UMR 7213 CNRS, Illkirch, France ; ⁴ INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France ; ⁵ Université Libre de Bruxelles (ULB), Service of Molecular Virology, Department of Molecular Biology (DBM), Gosselies, Belgium. * Equal contributions

INTRODUCTION

Jawed vertebrates including mammals have developed innate and acquired immune responses to fight against infections. Against viral infections, mammals have evolved specific antiviral factors that restrict the virus expression and prevent the disease breakout. These host restriction factors have at least three features (i) they restrict the virus infectivity (ii) they show signature of rapid evolution and (iii) they are inducible by interferon (Harris et al., 2012). Several host restriction factors fulfilling these criteria have been described for HIV infection. APOBEC3G, a member of the APOBEC3 DNA deaminase, induces hypermutations of the viral genome by catalyzing Cytosine deamination (Harris et al., 2002). Tetherin (or BST-2), an integral membrane protein, has been shown to impede virus release by bridging the newly synthesized virions to the cell membrane and promotes its lysosomal degradation (Van Damme et al., 2008)(Perez-Caballero et al., 2009). TRIM5 α , a member of the TRIM family, has been described to prevent HIV infection in old world monkeys by targeting the reverse transcriptase complex to proteasomal degradation (Stremlau et al., 2004)(Yamauchi et al., 2008). SAMDH1 inhibits HIV infection in myeloid and resting CD4⁺ T cell types by decreasing the pool of dNTPs which are essential for reverse transcription (Laguetta et al., 2011) (Descours et al., 2012)(Lahouassa et al., 2012). Finally, the SERINC3/5 proteins were recently shown to restrict the fusion of the virus (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). In addition to these already characterized restriction factors, others ones are known to impact the virus replication but still need to be identified and characterized (ie (Mashiba et al., 2014)(Collins et al., 2015)).

Lentiviruses such as SIV and HIV have developed many mechanisms to evade innate and adaptive immune responses. “Accessory” proteins (nef, vif, vpu, vpx) are encoded by these viruses to allow the immune evasion. Vif and Vpx are involved in the degradation of APOBEC3G and SAMDH1, respectively, via the use of the proteasome pathway (reviewed in (Mashiba and Collins, 2013)). One strategy of the virus to ensure its persistence is remodeling plasma membrane of the cell by Nef and vpu. Tetherin is targeted by Vpu to proteasome degradation (Douglas et al., 2009; Mitchell et al., 2009) and SERINC3/5 by Nef to a lysosomal degradation (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). Proteasome-mediated degradation is a privileged pathway subverted by the HIV-1 to counteract cellular defenses. Found associated with the E3 ubiquitin ligase complex, the viral accessory protein Vpr has long been hypothesized to target a not yet discovered host restriction factor to degradation via the proteasome pathway (Romani and Cohen, 2012). Indeed, Vpr promotes the degradation of

cellular factors including UNG2 (Wen et al., 2012), Dicer (Casey Klockow et al., 2013), IRF3 (Okumura et al., 2008), ZIP (Maudet et al., 2013) and the translocase HTLF (Lahouassa et al., 2016). In association with DCAF1 (VprBP), Vpr activates the SLX4 complex which promotes a G2/M arrest and prevents appropriate innate immune response (Laguette et al., 2014). Recently, Vpr has been shown to repress HIV-1 expression by targeting APOBEC3G (Zhou et al., 2014) and a not yet identified macrophage restriction factor (Mashiba et al., 2014). However, Vpr also favors cell to cell spread from macrophage to CD4+ T lymphocytes (Collins et al., 2015).

We have reported that the cellular cofactor CTIP2 (Bcl11b) favors the establishment and the persistence of HIV-1 post-integration latency in microglial cells, the main target of the virus in the brain (Le Douce et al., 2014, 2016; Marban et al., 2016). We demonstrated that CTIP2 works as a scaffold to recruit at least two different complexes. Working in synergy with the lysin demethylase LSD1, CTIP2 recruits a chromatin remodeling complex at cellular and HIV-1 gene promoters to silence gene transcription. CTIP2 associates with LSD1, histone deacetylases and histone methyltransferases to promote the formation of heterochromatin structures and silence cellular and HIV-1 gene expressions in microglial cells (Le Douce et al., 2011; Marban et al., 2007a)(Cherrier et al., 2009; Le Douce et al., 2014). In CD4+ T cells, CTIP2 associates with the chromatin remodeling complex NurD (Cismasiu et al., 2005). CTIP2 also contributes to control the elongation process of gene transcription. We found CTIP2-associated with an inactive PTEFb complex including HEXIM1, HMGA1 and the snRNA 7SK (Cherrier et al., 2013)(Eilebrecht et al., 2014). As part of this new complex, CTIP2 represses PTEFb functions and thereby contribute to limit the reactivation of latently integrated HIV-1. Altogether, we demonstrated that the cellular cofactor CTIP2 contributes to the establishment and the persistence of HIV-1 gene latency in microglial cells.

In the present article, we first report that CTIP2 expression is induced by interferon alpha suggesting that it may contribute to the cellular response to a viral infection. Since CTIP2 restricts HIV-1 expression, we postulate that the HIV-1 may have developed a strategy to counteract CTIP2-mediated repression in productively infected cells. Indeed, we found that productive infections of CD4+ T cells resulted in a deep decrease of CTIP2 expression. We report that the viral accessory protein Vpr targets CTIP2 to degradation by interacting with the Cul4A-DDB1-DCAF1 complex in order to counteract its effects on HIV-1 replication in microglial cells and CD4+T cells. Vpr enhances the turnover of CTIP2 to counteract its detrimental effects on the virus expression. Importantly, the Cul4-DDB1-DCAF1ubiquitin ligase targets CTIP2 proteins associated with the heterochromatin-modifying complex,

therefore impeding the transcriptional silencing of the virus and favoring the HIV-1 replication.

RESULTS

CTIP2 CONTRIBUTES TO THE CELLULAR ANTI-VIRAL RESPONSE

Since we have previously described CTIP2 as a repressor of HIV-1 gene transcription, we have further investigated on its contribution in the cellular response to HIV-1 infection. As shown, 24 h infections strongly induced CTIP2 mRNA and protein expressions in Jurkat T cell- and microglial cell-lines (Figure 1A and D) suggesting that CTIP2 may contribute to the cellular response to a viral aggression. Interferon-sensitive genes (ISG) are major contributors to this anti-viral response. To investigate the contribution of Interferon (IFN) signaling on CTIP2 expression, microglial cells were treated 6h and 24h with IFN α (Figure 1G). In agreement with the observations made upon HIV-1 infections, IFN α treatments strongly induced CTIP2 expression making this protein a new member of the anti-HIV ISG. As a control, the expression of SAMHD1, a well-described IFN-inducible HIV-1 restriction factor, is induced concomitantly to CTIP2 (Figure 1G). These results suggest that CTIP2 contributes to the anti-viral responses against HIV-1 infection. Interestingly, as widely reported for SAMHD1, the HIV has developed counteraction mechanisms to bypass anti-viral restrictions. We then logically focused on the impact of a productive HIV-1 infection on CTIP2 expression and function.

HIV-1 EXPRESSION PROMOTES A VPR-DEPENDENT DEGRADATION OF CTIP2.

First, we looked at CTIP2 expression upon HIV-1 replication. After 96h of infections with a VSV-G-pseudotyped pNL4.3 Δ Env-Luc virus (WT), expression of CTIP2 protein was significantly reduced in Jurkat T cells (Figure 1B WT panel) and microglial cells (Figure 1E, WT panel). As shown, levels of CTIP2 mRNA were not significantly affected upon the time course (from 24h to 96h of infection) suggesting an impact on CTIP2 protein stability. Interestingly, CTIP2 expression was not affected by infections with a Vpr-deleted virus (Δ Vpr) (Figure 1B and 1E Δ Vpr Panels). Moreover, comparisons of CTIP2 expression upon infections with WT and Δ Vpr viruses confirmed a strong and significant Vpr-dependent reduction of CTIP2 protein expression (Figure 1C and 1F). To confirm that the Vpr-dependent depletion of CTIP2 is post-transcriptional, we next overexpressed a flag-CTIP2 protein in the presence of normalized quantities of WT and Δ Vpr proviruses. The WT- but not

the Δ Vpr provirus, promotes a strong depletion of CTIP2 (Figure 1H). As a control, the luciferase activities were quantified to ensure the equal expression of the viruses. To confirm these observations in the context of primary CD4+T cells, we next infected cells with different primary HIV-1 isolates: two R5 viruses, HIV-1Bal and a transmitted founder HIV-1 pREJO, and one X4 virus HIV-1_{KON} (Figure 2A-B and C). As expected, productive infections induced a strong depletion of CTIP2 expression. We found that CTIP2 was barely detectable in p24 positive CD4+T cells (p24+) compared to uninfected cells from the same samples (p24-) and compared to control samples that have not been subjected to viral infections (NI) (Figure 2A, B and C). To further confirm the role of Vpr in the depletion of CTIP2 in primary CD4+ T cells, we next infected the cells with VLP-HA and VLP-HA-Vpr virus like particles. As shown in figure 2D, the delivery of Vpr induced a depletion of CTIP2 suggesting that incoming Vpr particles contribute to the degradation of the transcriptional repressor.

Altogether, these results suggest that Vpr mediates CTIP2 depletion in infected cells. To validate this observation, we next expressed increasing amount of Vpr in CTIP2 expressing cells. As expected Vpr expression promoted a dose-dependent depletion of CTIP2 (Figure 3A). Of note, levels of CTIP2 mRNA from control- or from CTIP2-overexpressing cells were not affected by Vpr (Figure 3B and 2C respectively). Thereby, the above-described Vpr-dependent depletion of CTIP2 protein was indeed not related to a transcriptional silencing. Logically, we next investigated on the influence of Vpr on the control of CTIP2 degradation by the proteasome pathway (Figure 3D). Treatments with the proteasome inhibitor MG132 increased the level of endogenous CTIP2 in nuclear extracts from microglial cells (Figure 3D, row 7 vs 5) suggesting that the physiological turnover of CTIP2 needs a functional proteasome pathway. Moreover, the MG132 treatment counteracted Vpr-mediated depletion of CTIP2 (Figure 3D, row3 vs 1). These observations plaid for a proteasome-mediated degradation of CTIP2 in physiological- and Vpr-dependent conditions. To control that this degradation occurs in the nuclei, cells were treated with leptomycin B (LMB). As shown, LMB treatment increased CTIP2 detection in the nuclei (Figure 3D, row 6 vs 5) but did not significantly affect the level of CTIP2 degradation by Vpr (Figure 3D, row 2 vs 1). We next quantified the protein expressions relative to the loading control and we compared CTIP2 expression upon GFP-Vpr and GFP expressions. Vpr expression promoted a more than two folds repression of CTIP2 expression in microglial cells nuclei (Figure 3E). As expected, MG132 abolished the Vpr-mediated depletion in the presence or not of leptomicin B (figure 3E).

CTIP2 INTERACTS WITH THE CULL4/DDB1-DCAF1 UBIQUITIN LIGASE COMPLEX

Vpr has been reported to target restriction factors to degradation through the recruitment of the Culin 4/DDB1-DCAF1 complex. Since the level of CTIP2 in nuclear extracts was increased by counteracting the proteasome pathway, we first look at a potential association of CTIP2 with the Ubiquitin ligase complex. Confocal observations were performed on microglial cells expressing RFP-CTIP2, GFP-DCAF1, and HA-Vpr alone (Figure 4A) and in combination (Figure 4B). As previously described, CTIP2 is localized in dense- and structured- nuclear domains. Expressions of HA-Vpr and GFP-DCAF1 were mainly nuclear. However, the combined expression of RFP-CTIP2 with GFP-DCAF1 promoted a relocation of DCAF proteins to CTIP2-induced structures (Figure 4B upper panel). The yellow staining of the CTIP2-induced structures results from this colocalization. Interestingly, Vpr expression further turned the staining of CTIP2 structures in white suggesting a triple colocalization of Vpr, DCAF1 and CTIP2 (Figure 4B lower panel). We next performed FRET experiments. As shown on figure 4C, the presence of RFP-CTIP2 reduced significantly the GFP-DCAF1 lifetime in the absence or in the presence of Vpr. To confirm biochemically DCAF1 and CTIP2 physical interactions, we next performed co-immunoprecipitation experiments targeting first CTIP2. DCAF1 and DDB1 were found in association with CTIP2 (Figure 4D). These associations are in accordance with the increased CTIP2 expression observed following a MG132 treatment. In addition, we found Vpr associated with CTIP2 and the DDB1-DCAF1 complex in nuclear extracts from MG132 treated cells (Figure 4E). Our results suggest that the turnover of the CTIP2 protein is regulated by its degradation via the proteasome pathway and that Vpr takes profit of this physiological mechanism to deplete CTIP2 from HIV-1 infected cells.

We have reported that CTIP2 associates with two different and exclusive complexes: The first one includes Chromatin modifying enzymes (Marban et al., 2007a) and the second one includes the 7SK snRNA and an inactive form of the elongation factor P-TEFb (Cherrier et al., 2013). To characterize CTIP2-associated DCAF1 containing complexes, we performed sequential Immunoprecipitation (IP) experiments (Figure 4F). In the first IP that targeted DCAF1-associated complexes, we found CTIP2 and HDAC2 (Chromatin-modifying enzyme) but not CDK9 (P-TEFb complex). This result suggests that DCAF1 may interact with CTIP2 and its chromatin-modifying complex. To confirm that CTIP2, HDCA2 and DCAF1 are associated in the same complex, they were eluted and submitted to a second IP targeting CTIP2. DCAF1 and HDAC2 were found associated with CTIP2 in the eluted-DCAF1

containing complex suggesting that CTIP2, DCAF1 and HDAC2 are members of the same complex (Figure 4F). Altogether, these results suggested that DCAF1 interacts with and degrade CTIP2 bound to the chromatin modifying enzymes including complex (HDAC1/2, SUV39H1) but not with CTIP2 bound to the inactive P-TEFb complex. This conclusion is in accordance with the concomitant degradations of CTIP2 and HDAC1 by Vpr shown in the Supplementary figure S1.

ASSOCIATION WITH DCAF1 IS CRUCIAL FOR VPR-MEDIATED DEGRADATION OF CTIP2

To further define mechanistically Vpr-mediated degradation of CTIP2, we next performed degradation tests in the presence of WT or mutated Vpr proteins (Figure 5A). As expected, the WT and the R80A Vpr mutants that are both known to interact with DCAF1 promoted CTIP2 degradation (Figure 5A). However, the Q65R mutation, known to abrogate DCAF1 binding, abolished Vpr-mediated degradation of CTIP2. Interestingly, upon a strong overexpression of CTIP2 which allows its detection in the presence of Vpr, we were able to find WT, R80A and Q65R Vpr proteins associated with CTIP2 (Figure 5B). Thereby, DCAF1 is not needed to allow the interaction between Vpr and CTIP2 but it should contribute to Vpr-mediated degradation. To strength this conclusion, we looked at the need of DCAF1 in the Vpr-mediated degradation process. Vpr promoted a potent degradation of CTIP2 (Figure 5C raw 2 vs 1). However, knocking down DCAF1 abrogated this degradation (Figure 5C raw 4 vs 2). Altogether, DCAF1 is crucial to ensure Vpr-mediated degradation even if it appeared to be dispensable for Vpr-binding to CTIP2.

VPR DEPLETES CTIP2 FROM THE HIV-1 PROMOTER AND COUNTERACTS THE SUBSEQUENT CTIP2-MEDIATED HIV-1 GENE SILENCING.

To correlate the failure of the viral restriction with the degradation of CTIP2 by Vpr, we performed chromatin immuno-precipitation experiments targeting CTIP2 and the HIV-1 promoter (Figure 6A). As previously described, CTIP2 was found associated with the viral promoter but not with the LUC region of a chromatinized episomal LTR-luciferase construct. As a result of CTIP2 degradation, Vpr significantly reduced the binding of CTIP2 at the viral promoter. In addition, MG132 abrogated Vpr-induced depletion of CTIP2 binding and potently favored endogenous CTIP2 association in the absence of Vpr (Figure 6A). Looking at the activity of the HIV-1 promoter, we found that MG132 disfavored Tat transactivation and that Vpr expression strongly potentiated Tat function (Figure 6B). Moreover, MG132

treatment repressed Vpr-mediated potentiation of Tat function. Since we have previously reported that CTIP2 is a repressor of Tat function, these observations are consistent with the above-described nuclear stabilization of CTIP2 following a treatment with MG132.

DISCUSSION

CTIP2/Bcl11B is a key factor involved both in the establishment and persistence of HIV latency in two of the main cellular reservoirs, CD4⁺ T cells and microglial cells (Cismasiu et al., 2008)(Le Douce et al., 2011; Marban et al., 2007a)(Cherrier et al., 2013). By favoring the silencing of the latently integrated HIV-1 and disfavoring its reactivation, this cellular cofactor constitutes a major block to the viral expression. Here we first report that the expression of CTIP2 is induced upon interferon alpha treatment. Following infections, innate immune response occurs through the production of interferon. Thereby, our observations suggested us that CTIP2-mediated blocks to the HIV-1 expression may contribute to the cellular response of a viral infection. Indeed, we observed that CTIP2 mRNA and CTIP2 protein expressions are stimulated at early time points of HIV-1 infections in microglial and T cells. Beside its contribution to the cellular defense against the virus and according to stochastic gene expression (Elowitz et al., 2002), this overexpression of CTIP2 may also contribute to induce a state of latency, especially in cells where stochastic fluctuations in Tat expression influence the viral status (Weinberger et al., 2005). To prevent abortive infections HIV has evolved sophisticated mechanisms to evade innate and adaptive immune responses. Accessory proteins such as Nef, Vif, Vpu, Vpx and Vpr are dedicated to some aspects of this immune evasion. Indeed, several restriction factors induced by interferon alpha are targeted to degradation by these accessory proteins. Vif targets APOBEC3G, Vpu and Nef the tetherin and Vpx SAMHD1. Among the so called accessory proteins which have to be rather considered as key virulence factors, Vpr remained enigmatic. Vpr is a small protein (around 14kDa) which is involved in several biological functions including nuclear import of preintegration complex (Popov et al., 1998); envelope protein expression and virion production (Mashiba et al., 2014); HIV-1 transcription (Kino et al., 2002) ; HIV-1 gene splicing (Kuramitsu et al., 2005) ; induction of apoptosis (Nishizawa et al., 2000) and cell cycle arrest at the G2/M phase (Laguet et al., 2014) (reviewed in (Guenzel et al., 2014b)). Recently, Vpr has been described to unlock HIV-1 gene transcription in dendritic cells (Miller et al., 2017). We report that Vpr expressed in infected cells and incoming-Vpr molecules favored the degradation of CTIP2 as previously described for HTLF (Lahouassa et al., 2016).

Interestingly, incoming Vpr is necessary to overcome the HIV-1 transcriptional block observed in dendritic cells (Miller et al., 2017). The influence of CTIP2 in dendritic cells has yet not been studied. However, our results suggest that Vpr contributes to unlock CTIP2-mediated blocks to HIV-1 gene transcription at least in microglial- and CD4⁺ T cells. Vpr has been described associated with the E3 ubiquitin ligase complex to promote a proteasome-mediated degradation of cellular targets (for review (Romani and Cohen, 2012)). CTIP2 was found in interaction with this ubiquitin ligase complex via DCAF1/VprBP. Since MG132 treatments stabilized CTIP2 expression in non-infected cells, we concluded that the proteasome pathway contributes to control the half-life of the protein. We found, Vpr, CTIP2 and DCAF1 colocalized in dense nuclear structures. In addition, FRET studies demonstrated a direct association of CTIP2 with DCAF. Altogether, these observations suggested that Vpr may subvert the proteasome pathway to increase the turnover of CTIP2. We further report that Vpr targets CTIP2 to proteasomal degradation in the nucleus and that this degradation is associated to a reduced-recruitment of CTIP2 recruitment at the HIV-1 promoter. This observation strongly argues for an indirect impact of Vpr on HIV-1 gene transcription. As a consequence of CTIP2 degradation, Vpr contributes to overcome the transcriptional silencing induced by CTIP2-associated complexes. Interestingly, we found CTIP2, HDAC2 and DCAF1 in the same complex. Since P-TEFb is excluded from this complex, our results suggest that Vpr promotes the degradation of CTIP2 associated with the complex comprising the chromatin modifying enzymes. The concomitant degradations of CTIP2 and HDAC1 and the recent demonstration that Vpr targets HDAC1 to a proteasome-mediated degradation further support these conclusions (Romani et al., 2016). There is now several evidences that make Vpr a key virulence factor. It has been shown to disturb several cellular pathway including cell cycle arrest (reviewed in (Guenzel et al., 2014b)) and DNA repair (reviewed in (Brégnard et al., 2014)). The involvement of Vpr in the later pathway has been associated to the viral escape from innate immune sensing (Laguette et al., 2014). We and others reported that Vpr is involved in the epigenetic regulation of HIV-1 gene transcription. Vpr promotes the degradation of members of chromatin remodeling complexes such as CTIP2, HDAC1 (Romani et al., 2016) or ZIP and sZIP which are adaptors of the NurD complex (Maudet et al., 2013). Interestingly CTIP2 recruits NurD to silence HIV-1 gene transcription in CD4⁺ T cells (Cismasiu et al., 2005). Recently, we have shown that PKC-mediated Ser2 phosphorylation of CTIP2 negatively regulates this interaction with NurD upon activations via the TCR (Dubuissez et al., 2016). Post-translational modifications drive CTIP2

associations with different complexes and thereby determine CTIP2 functions. Whether Vpr is able to discriminate between the diverse forms of CTIP2 will need more investigations.

CTIP2 might not yet be considered as a true restriction factor even if it fulfils three of the four described criteria: (i) the ability to repress the virus expression, (ii) its induction by interferon, and (iii) its degradation by Vpr. The signature of a positive selection in CTIP2 sequences from various mammalian sequences is the last criteria. However, further phylogenetical analysis will be needed to determine the evolution of the sequences in mammalian species. The recognition of Vpr functions in the viral escape of the immune responses in general and in preventing HIV-1 latency, as described in the present article, may have profound therapeutic implications.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids: Most of the constructs used in our assays have been described previously: pcDNA3, pNTAP, pFLAG-CTIP2, pRFP-CTIP2, pNTAP-CTIP2 in were used in ((Le Douce et al., 2011; Marban et al., 2007a)(Cherrier et al., 2013). pGFP-Vpr wt, pNL- 4.3 Δ Env-luc wt, pNL-4.3 Δ Env-luc Δ Vpr and pMyc-DDB1, pFLAG-DCAF1, pHA- Vpr wt, pHA-Vpr Q65R were kindly provided by F. Margottin-Goguet.

Cell Culture: The human microglial (provided by M. Tardieu, Paris, France) (Janabi et al. 1995), HEK293T and Jurkat cells lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and RPMI 1640 containing 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin/streptomycin. When indicated, the cells were treated with MG132 (5 μ g/ μ l) for 6hr, 10.0 ng/ml leptomycin B (LMB) for 5hr and IFN- α (1000U/ml) for 24 h before harvesting the cells.

Antibodies and Reagents: CTIP2 (ab18465) and HIV1 P24 (ab63913) antibodies were purchased from Abcam, BCL11b (A300-384A) from Bethyl Laboratories, CDK9 (SC-8338), Myc epitope (9 E10), Mouse and rat HRP-conjugated from Santa Cruz Biotechnology, anti-FLAG M2 affinity gel and β -actin (A5441) from Sigma-Aldrich and anti-HA.11 Tag Antibody (AFC-101P) was from Eurogentec. Rabbit HRP-conjugated antibodies were provided by Thermo Fisher Scientific, anti-GFP (632592) by Clontech and Protein G Magnetic beads by Millipore. IFN- α , MG132 and leptomycin B molecules were provided by Sigma and Protease inhibitor mixture by Roche. VprBP (DCAF1) and non-targeting siRNAs were from Dharmacon. SYBR Select Master Mix used for Q-PCR was from Life Technologies.

Mouse anti-human CD3-PE (UCHT1) was purchased from BD Biosciences. HIV-1 core antigen (Ag) p24 FITC (KC57) human antibody was purchased from Beckman Coulter. CTIP2-FITC (25B6) ab123449 and IgG control were purchased from Abcam.

HIV-1 infections and viral production in cell lines: The VSV-G pseudotyped Δ Env-LUC HIV-1 viruses were produced by transfecting the pNL4.3 Δ Env Δ Vpr-LUC HIV-1 (WT) or

pNL4.3 Δ Env Δ Vpr-LUC HIV-1 (Δ Vpr) constructs together with the VSV-G expression plasmid in 293T cells. 48h after transfection, the culture supernatants were collected and viral productions were measured by clinical HIV1 viral load test (Quantification of the genomic RNAs).

CTIP2 expression in HIV-1 infected primary CD4+ T cells:

Primary CD4⁺ T cells were isolated and purified from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy blood donors by positive selection using CD4 Microbeads selection kits and AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) as previously described (Holl et al., 2010; Su et al., 2012). CD4⁺ T lymphocytes were activated with phytohemagglutinin A (PHA) (2 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) for 3 days in RPMI 1640 plus GlutaMAX medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were stored frozen. They were thawed the night before use. CD4 T cells were incubated with 1.2 and 0,6 μ g/ml of primary R5 HIV-1_{Bal} (NIH, Bethesda, MD) and a transmitted founder virus HIV-1_{PREJO} (NIH, Bethesda, MD), or with primary X4 HIV-1_{KON} (1 μ g/ml) during 1 to 7 days until infection was recorded as previously described (Holl et al., 2010; Su et al., 2012). Detection of intracellular CTIP2 expression was performed on infected cells. Briefly, cells were incubated for 10 min at 4°C with CD3 cell surface molecules before fixation with the Cytifix solution (BD Biosciences) and permeabilized with a Triton solution at 0,1%. CTIP2 or IgG control isotype were incubated for 30 min at 4°C. Cells were washed and the HIV core p24 antibody was added. The percentage of CD3-PE T cells positive for p24 and CTIP2 expression were defined by flow cytometry (MacQuant, Miltenyi) and analyzed with Kaluza software.

When indicated, CD4 T cells were incubated with pseudo like-particles VLP-HA or VLP-Vpr obtained from Margotin-Goguet at 0,1 μ g for 0,1 millions of cells for 1 days. VLP-HA was used as a control of the expression of CTIP2. The expression of CTIP2 was determined as described before.

Co-immunoprecipitation Assays and Western Blotting: Cells cultured in 150-mm diameter dishes were transfected using calcium phosphate co-precipitation method with the indicated plasmids. lysates were prepared two days post-transfection as previously described (Cherrier et al., 2013). Immunoprecipitations were performed using the standard technique as in (Cherrier et al., 2013). Finally, the immunoprecipitated complexes were processed for SDS-PAGE and immunoblot analysis. Proteins were detected in Western blot analyses using antibodies indicated and then were visualized by chemiluminescence using the Super Signal Chemiluminescence Detection System (Pierce, Rockford, IL, USA).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP):

Cells expressing the chromatinized HIV-1 epizomal LTR-luciferase construct were subjected to ChIP experiments with IgG control or anti-CTIP2 IgG antibodies as in (Le Douce et al., 2011; Marban et al., 2007a). The presence of CTIP2 at the promoter- or the luciferase gene-regions were quantified by Q-PCR. Results are presented as % of inputs. Values are representative of three independent experiments.

Confocal microscopy – Microglial cells were transfected in 24-well plates glass bottom (Greiner bio-one, Ref. 662892) with a DNA mixture containing eGFP-DCAF1, mRFP-CTIP2 or HA-Vpr. At 24 h post-transfection, cells were extensively washed, fixed with 4% PFA/PBS solution and kept in 1X PBS at 4°C until observation with a Leica SPE equipped with a Leica 63x 1.4NA oil immersion objective (HXC PL APO 63x /1.40 OIL CS).

Immunofluorescence staining – Microglial cells expressing HA-tagged Vpr were immunodetected as described before (Joëlle V Fritz, et al., retrovirology 2008). Anti-HA (BioLegend, 901501) was diluted 1/1000 and Alexa Fluor goat anti-mouse (Invitrogen, A-21237) 1/250. Cells were analysed by confocal microscopy.

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) – Time-correlated single-photon counting FLIM was performed on a home-build system laser scanning set-up based on an Olympus IX70 inverted microscope with an olympus 60X 1.2NA water immersion objective as described (Fritz JV, et al. 2008 Retrovirology). Two-photon excitation at 900 nm was provided by an insight Deep see laser (Spectra Physics). For FLIM, the laser power was adjusted to give count rates with peaks up to as few as 10^6 photons.s⁻¹, so that the pile-up effect can be neglected. Photons were collected using a short pass filter with a cut-off wavelength of 680 nm (F75-680, AHF, Germany), and a band-pass filter of 520 ± 17 nm (F37-520, AHF, Germany). The fluorescence was directed to a fiber coupled APD (SPCM-AQR-14-FC, Perkin Elmer), which was connected to a time-correlated single photon counting module (SPC83, Becker and Hickl, Germany). Typically, the samples were scanned continuously for about 60s to achieve appropriate photon statistics to analyze the fluorescence decays. The FRET phenomenon causes a decrease in the fluorescent lifetime (τ) of the donor, which can be measured by the FLIM technique at each pixel or group of pixels. Experiments were performed with eGFP as a FRET donor and mRFP as acceptor. The FRET efficiency (E) was calculated according to :

$E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D = 1/(1+(R/R_0)^6)$ where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor. A Förster R_0 distance (where the transfer efficiency is 50%) of 56 \AA was calculated between eGFP used as a donor and mRFP used as acceptor.

Luciferase assays: Microglial cells cultured in 48-well plates were transfected with the indicated vectors and the CMV-Renilla luciferase control vector using the calcium phosphate co-precipitation method. Two days later, cells were collected and firefly luciferase activity was determined using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) and normalized to the Renilla luciferase activity. Values correspond to an average of at least three independent experiments performed in triplicates.

mRNA Quantification: The total RNA was extracted with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)12–18 Primers (Invitrogen), RNA was reverse transcribed into cDNA. The cDNA was diluted 10-fold with DNase-free water. Quantitative PCR was performed on the diluted cDNA using SYBR Select Master Mix. Primers used in qPCR include: CTIP2-F 5'- ATTGGAACCTGCCACTTG -3', CTIP2-R 5'- TTTGCCTGTGTTCCACGA-3' GAPDH-F5'- GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3', GAPDH-R 5'- GCAGTGATGGCATGGACTGT-3'. Data were normalized to GAPDH and calculated using the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method.

Statistical Analysis: Data were statistically analysed by using *t* tests with Exel (Microsoft) or StatView (SAS Institute Inc.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results were expressed as mean \pm S.E.M. or mean \pm S.D., and represent data from a minimum of two independent experiments.

Working Draft

BIBLIOGRAPHY

- Brégnard, C., Benkirane, M., and Laguette, N. (2014). DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front. Microbiol.* *5*, 176.
- Casey Klockow, L., Sharifi, H.J., Wen, X., Flagg, M., Furuya, A.K.M., Nekorchuk, M., and de Noronha, C.M.C. (2013). The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology* *444*, 191–202.
- Cherrier, T., Suzanne, S., Redel, L., Calao, M., Marban, C., Samah, B., Mukerjee, R., Schwartz, C., Gras, G., Sawaya, B.E., et al. (2009). p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* *28*, 3380–3389.
- Cherrier, T., Le Douce, V., Eilebrecht, S., Riclet, R., Marban, C., Dequiedt, F., Goumon, Y., Paillart, J.C., Mericskay, M., Parlakian, A., et al. (2013). CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 12655–12660.
- Cismasiu, V.B., Adamo, K., Gecewicz, J., Duque, J., Lin, Q., and Avram, D. (2005). BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* *24*, 6753–6764.
- Cismasiu, V.B., Paskaleva, E., Suman Daya, S., Canki, M., Duus, K., and Avram, D. (2008). BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* *380*, 173–181.
- Collins, D.R., Lubow, J., Lukic, Z., Mashiba, M., and Collins, K.L. (2015). Vpr Promotes Macrophage-Dependent HIV-1 Infection of CD4+ T Lymphocytes. *PLoS Pathog.* *11*, e1005054.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* *3*, 245–252.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology* *9*, 87.
- Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2011). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res* 1904–1915.
- Le Douce, V., Cherrier, T., Riclet, R., Rohr, O., and Schwartz, C. (2014). The many lives of CTIP2: from AIDS to cancer and cardiac hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* *229*, 533–537.
- Le Douce, V., Forouzanfar, F., Eilebrecht, S., Van Driessche, B., Ait-Ammar, A., Verdikt, R., Kurashige, Y., Marban, C., Gautier, V., Candolfi, E., et al. (2016). HIC1 controls cellular- and HIV-1- gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci. Rep.* *6*, 34920.
- Douglas, J.L., Viswanathan, K., McCarroll, M.N., Gustin, J.K., Fröh, K., and Moses, A. V (2009). Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-dependent mechanism. *J. Virol.* *83*, 7931–7947.
- Dubuissez, M., Loison, I., Paget, S., Vorng, H., Ait-Yahia, S., Rohr, O., Tscopoulos, A., and LePrince, D. (2016). Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of BCL11B at Serine 2 Negatively Regulates Its Interaction with NuRD Complexes during CD4+ T-Cell Activation. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 1881–1898.
- Eilebrecht, S., Le Douce, V., Riclet, R., Targat, B., Hallay, H., Van Driessche, B., Schwartz, C., Robette, G., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2014). HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4962–4971.
- Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., and Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science* *297*, 1183–1186.
- Guenzel, C.A., Hératé, C., and Benichou, S. (2014a). HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker.” *Front. Microbiol.* *5*, 127.
- Guenzel, C.A., Hératé, C., and Benichou, S. (2014b). HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker.” *Front. Microbiol.* *5*, 127.
- Harris, R.S., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2002). RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol. Cell* *10*, 1247–1253.
- Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* *287*, 40875–40883.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* *474*, 658–661.
- Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K.H., and Tardieu, M. (1995). Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.* *195*, 105–108.
- Kino, T., Gragerov, A., Slobodskaya, O., Tsopanomalou, M., Chrousos, G.P., and Pavlakis, G.N. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J. Virol.* *76*, 9724–9734.

Kuramitsu, M., Hashizume, C., Yamamoto, N., Azuma, A., Kamata, M., Yamamoto, N., Tanaka, Y., and Aida, Y. (2005). A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 7, 1150–1160.

Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringard, 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.

Laguet, N., Brégnard, C., Hue, P., Basbous, J., Yatim, A., Larroque, M., Kirchhoff, F., Constantinou, A., Sobhian, B., and Benkirane, M. (2014). Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* 156, 134–145.

Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.

Lahouassa, H., Blondot, M.-L., Chauveau, L., Chougui, G., Morel, M., Leduc, M., Guillonnet, F., Ramirez, B.C., Schwartz, O., and Margottin-Goguet, F. (2016). HIV-1 Vpr degrades the HLTf DNA translocase in T cells and macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 5311–5316.

Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007a). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 26, 412–423.

Marban, C., Forouzanfar, F., Ait-Ammar, A., Fahmi, F., El Mekdad, H., Daouad, F., Rohr, O., and Schwartz, C. (2016). Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. *Front. Immunol.* 7, 397.

Mashiba, M., and Collins, K.L. (2013). Molecular mechanisms of HIV immune evasion of the innate immune response in myeloid cells. *Viruses* 5, 1–14.

Mashiba, M., Collins, D.R., Terry, V.H., and Collins, K.L. (2014). Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. *Cell Host Microbe* 16, 722–735.

Maudet, C., Sourisce, A., Dragin, L., Lahouassa, H., Rain, J.-C., Bouaziz, S., Ramirez, B.C., and Margottin-Goguet, F. (2013). HIV-1 Vpr induces the degradation of ZIP and sZIP, adaptors of the NuRD chromatin remodeling complex, by hijacking DCAF1/VprBP. *PLoS One* 8, e77320.

Miller, C.M., Akiyama, H., Agosto, L.M., Emery, A., Ettinger, C.R., Swanstrom, R.I., Henderson, A.J., and Gummuru, S. (2017). Virion-Associated Vpr Alleviates a Postintegration Block to HIV-1 Infection of Dendritic Cells. *J. Virol.* 91, e00051–17.

Mitchell, R.S., Katsura, C., Skasko, M.A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E.B., Margottin-Goguet, F., Benarous, R., and Guatelli, J.C. (2009). Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* 5, e1000450.

Nishizawa, M., Kamata, M., Mojin, T., Nakai, Y., and Aida, Y. (2000). Induction of apoptosis by the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 occurs independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology* 276, 16–26.

Okumura, A., Alce, T., Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., and Pitha, P.M. (2008). HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* 373, 85–97.

Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M.W., Gregory, D.A., Johnson, M.C., and Bieniasz, P.D. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell* 139, 499–511.

Popov, S., Rexach, M., Zybarch, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* 17, 909–917.

Romani, B., and Cohen, E.A. (2012). Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr. Opin. Virol.* 2, 755–763.

Romani, B., Baygloo, N.S., Hamidi-Fard, M., Aghasadeghi, M.R., and Allahbakhshi, E. (2016). HIV-1 Vpr Protein Induces Proteasomal Degradation of Chromatin-associated Class I HDACs to Overcome Latent Infection of Macrophages. *J. Biol. Chem.* 291, 2696–2711.

Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., et al. (2015). HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526, 212–217.

Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.

Usami, Y., Wu, Y., and Göttlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526, 218–223.

Weinberger, L.S., Burnett, J.C., Toettcher, J.E., Arkin, A.P., and Schaffer, D. V (2005). Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell* 122, 169–182.

Wen, X., Casey Klockow, L., Nekorchuk, M., Sharifi, H.J., and de Noronha, C.M.C. (2012). The HIV1 protein Vpr acts to enhance constitutive DCAF1-dependent UNG2 turnover. *PLoS One* 7, e30939.

Yamauchi, K., Wada, K., Tanji, K., Tanaka, M., and Kamitani, T. (2008). Ubiquitination of E3 ubiquitin ligase TRIM5 alpha and its potential role. *FEBS J.* 275, 1540–1555.

Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun, B., and Yang, R. (2014). The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.*

Holl, V., Xu, K., Peressin, M., Lederle, A., Biedma, M.E., Delaporte, M., Decoville, T., Schmidt, S., Laumond, G., Aubertin, A.M., *et al.* (2010). Stimulation of HIV-1 replication in immature dendritic cells in contact with primary CD4 T or B lymphocytes. *J Virol* 84, 4172-4182.

Su, B., Xu, K., Lederle, A., Peressin, M., Biedma, M.E., Laumond, G., Schmidt, S., Decoville, T., Proust, A., Lambotin, M., *et al.* (2012). Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* 120, 3708-3717.

Working Draft

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CTIP2 induced expression in infected cells is counteracted by HIV-1 replication in a Vpr dependent manner

A,D) Jurkat T cells (A) and Microglial cells (D) were infected with 25.10^3 copies/ml of a VSV-G pseudotyped NL4.3 Δ Env-LUC provirus for 24h. The presence of CTIP2 in infected cells has been assessed by western blot and the CTIP2 mRNA quantified by RT-Q-PCR.

B,E) Jurkat T cells (B) and Microglial cells (E) were infected with 150 copies/ml of a VSV-G pseudotyped NL4.3 Δ Env-LUC (WT) and a NL4.3 Δ Env Δ Vpr -LUC (Δ Vpr) provirus for 24, 48 and 96h. The presence of CTIP2 in infected cells has been assessed by western blot and the viral expression has been quantified by luciferase assay. The quantifications are presented relative to the quantities obtained after 24h of infection.

C,F) CTIP2 protein quantified after infections with the WT virus are presented relative to quantities observed after infection with the Δ Vpr virus in Jurkat T cells (C) and Microglial cells (F).

G) Microglial cells were subjected to $\text{INF}\alpha$ treatment (1000U/ml) for 6 and 24h. Nuclear extracts were analysed for the presence of CTIP2, SAMHD1 and β -actin (loading control) by Western blot.

H) HEK cells were transfected with a flag-CTIP2 expression plasmid and normalized quantities of pNL4.3 Δ ENV-LUC and pNL4.3 Δ Env Δ Vpr -LUC. The presence of CTIP2 has been analyzed by Western blot and the expression of the two viruses by luciferase assay. β -actin is presented as a loading control.

The results are representative of at least two independent experiments.

Figure 2: HIV-1 promotes a depletion of CTIP2 in infected primary CD4+ T cells

A-B-C) Detection of intracellular CTIP2 expression in uninfected CD4 T cells or following infection with primary viruses (A) HIV-1_{Bal}, (B) transmitted founder HIV-1_{pREJO} (C) HIV-1_{KON}.

D) Percentage of CTIP2 expression in CD4 T cells incubated with pseudo like-particles VLP-Vpr compared to the control VLP-HA particles.

Figure 3: Vpr targets nuclear CTIP2 to degradation via the proteasome pathway

A) Nuclear extracts from HEK cells expressing CTIP2 and increasing amount of GFP-Vpr were analyzed by Western blot for the presence of the indicated proteins.

B-C) Endogenous (B) and overexpressed (C) CTIP2 mRNA were quantified by RT-Q-PCR in the presence or not of Vpr. The results are presented relative to the pCDNA3 control vector taken as one.

D) Endogenous CTIP2 expression has been analyzed by Western blot in extracts from cells expressing GFP-Vpr or the control GFP and subjected to the indicated treatments. Cells were treated with 10.0 ng/ml leptomycin B for 4h and then with MG132 (5 μ g/ μ l) for 6h before lysis and nuclear protein extractions. Protein expressions have been assessed by Western blot.

E) Expression of CTIP2 in the presence of GFP-Vpr has been quantified relative to β -actin and presented relative to the quantities obtained in the presence of the GFP control protein. Results are representative to three independent experiments.

Figure 4: CTIP2 interacts with the Cull4/DDB1-DCAF1 ubiquitin ligase complex.

A,B) Microglial cells expressing RFP-CTIP2, HA-Vpr and GFP-DCAF1 alone (panel A) or in combination (panel B) were subjected to confocal microscopy. Scale bars are set to 5 μ m.

C) Lifetimes from GFP proteins FRET experiments are presented for each conditions. The results are representative of 5 independent experiments and from 6 to 10 quantifications for each condition per experiments.

D,E) Nuclear extracts from cells expressing the indicated proteins were subjected to immune-precipitation experiments targeting CTIP2 (A) and Vpr (B). The inputs and the immune-precipitated complexes were analyzed by Western blot.

F) Nuclear extracts from cells expressing the indicated proteins were subjected to a first immune-precipitation targeting f-DCAF1 (anti-Flag). The DCAF1 associated complexes were eluted by incubation with flag peptides and subjected to a second immuno-precipitation targeting CTIP2. The presence of the indicated proteins was analyzed at each step by Western blot.

Figure 5: DCAF1 binding is necessary to Vpr-mediated degradation of CTIP2

A) Nuclear extracts from cells expressing the indicated proteins were analyzed by Western blot. β -actin is presented as a loading control

B) Nuclear extracts from cells expressing large amount of CTIP2 and the indicated Vpr proteins were subjected to immune-precipitation experiments targeting Vpr. The input and the Vpr-associated complexes were analyzed for the presence of CTIP2 by Western blot.

C) Nuclear extracts from control or DCAF1 knock-down cells were analyzed by Western blot for the presence of the indicated proteins in the presence of GFP-Vpr and the control GFP. CTIP2 expression has been quantified relative to the loading control by Image j software.

Figure 6: Vpr counteracts CTIP2 binding to the HIV-1 promoter and the subsequent CTIP2-mediated repression

A) Chromatin Immuno-precipitation experiments targeting endogenous CTIP2 at the HIV-1 promoter were performed with chromatin from cells expressing the chromatinized LTR-LUC epizomal vector and Vpr as indicated. The cells were subjected or not to MG132 treatment. Enrichments are presented as % of the inputs. As a control, the presence of CTIP2 has been concomitantly quantified at the luciferase gene region.

B) As previously described, activities of HIV-1 promoter have been quantified by luciferase assays in extracts from cells expressing the epizomal LTR-LUC reporter construct, the Tat and the Vpr expression vectors as indicated. Cells were treated or not by MG132 for 6h as indicated. Luciferase activities were quantified relative to the renilla luciferase activities according to the manufacturer recommendations and the results are presented relative to the luciferase activities quantified with the control pCND3 vector taken as one.

Results are representative to at least three independent experiments performed in triplicate.

Figure 1

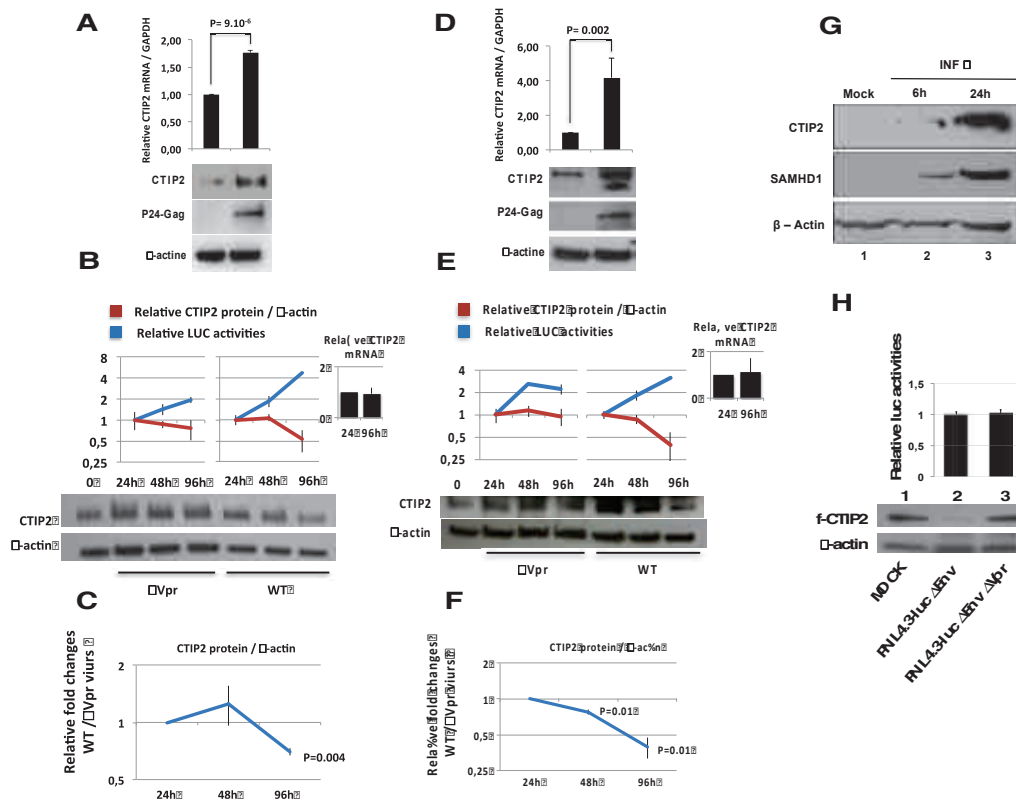
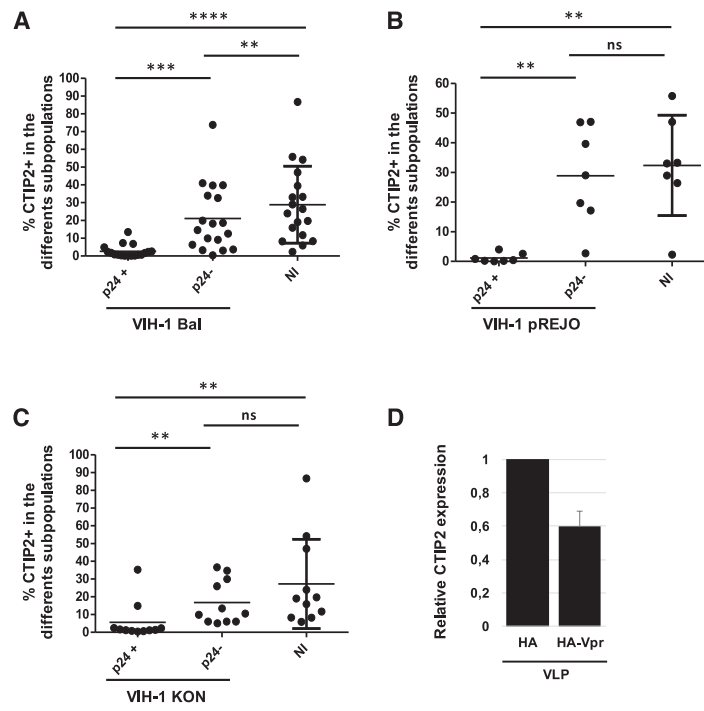
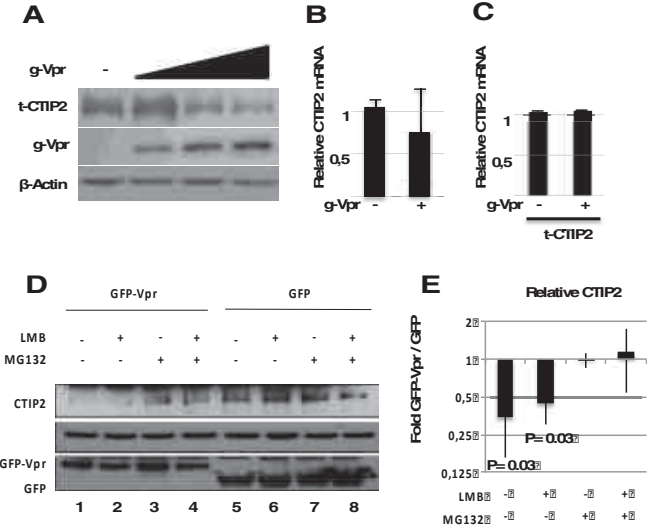


Figure 2



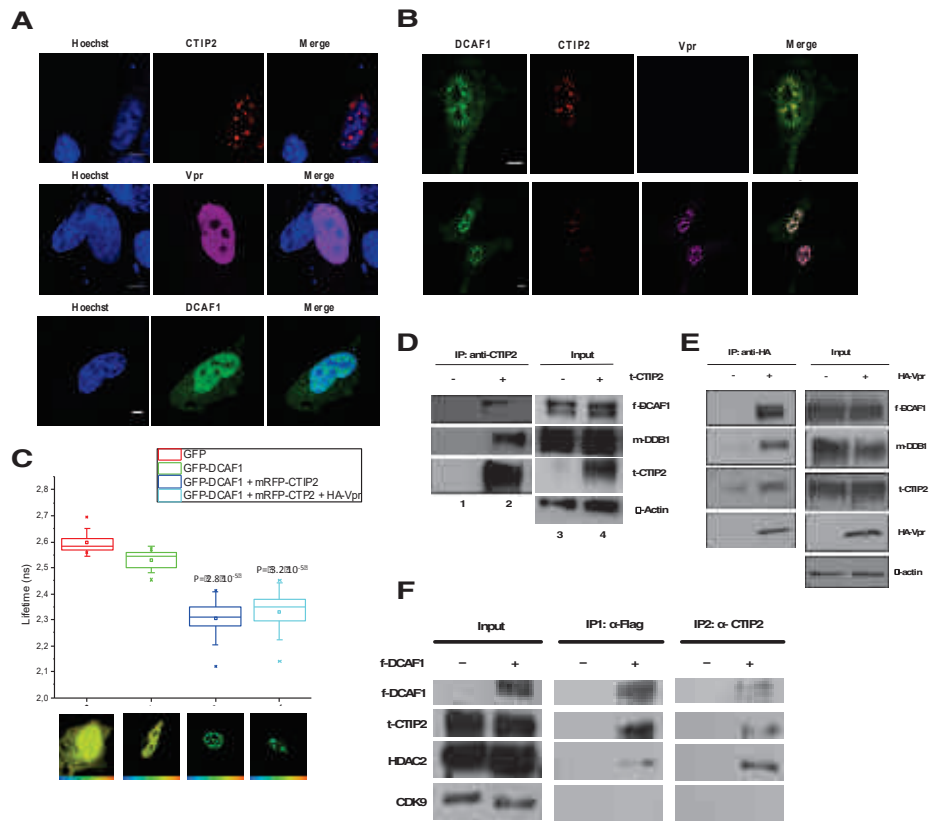
Working

Figure 3



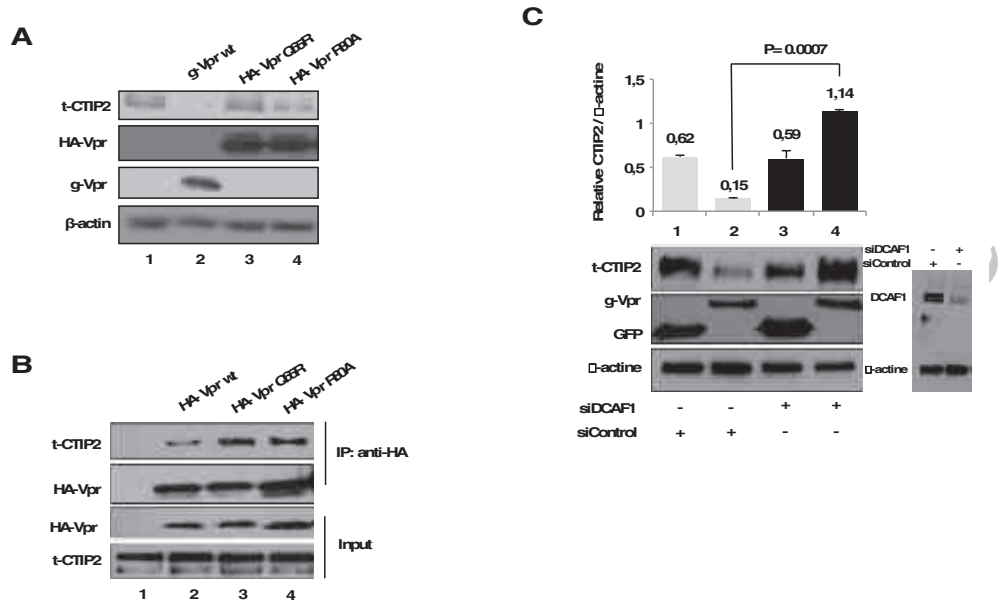
Working

Figure 4



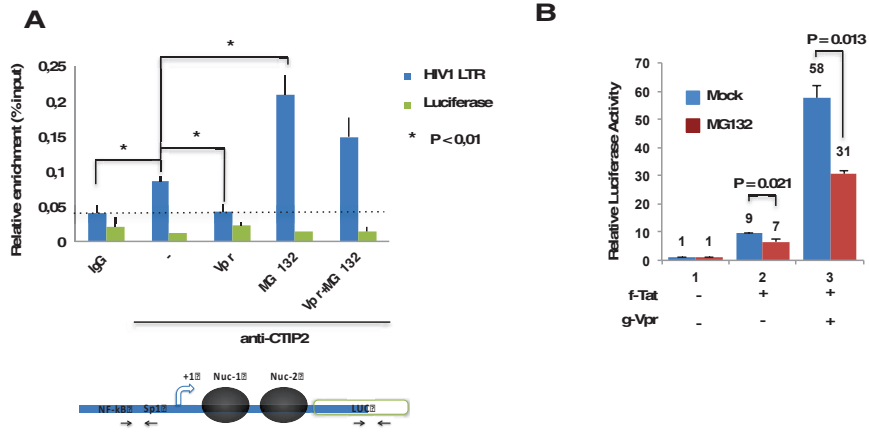
Working

Figure 5



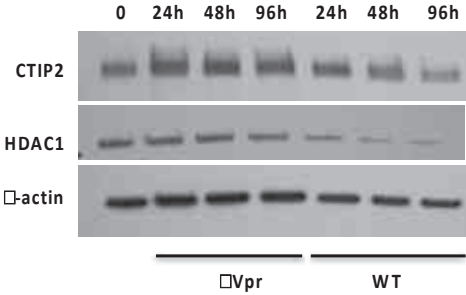
Working

Figure 6



Working

Figure S1



Working



Camille DUCLOY

Etude des premiers évènements d'infection par le VIH-1 dans les tissus du tractus génital féminin



Inhibition par les anticorps

Résumé

Lors d'un rapport sexuel, le VIH-1, sous forme libre ou associé aux cellules, pénètre dans les tissus du tractus génital féminin. Les premières étapes de l'infection par le VIH-1 dans ces tissus sont très controversées. Afin d'analyser ces premiers évènements impliqués dans la transmission sexuelle, nous avons développé au cours de ma thèse, deux modèles d'infection de cellules isolées de tissu. Nous avons montré que les cellules dendritiques sont préférentiellement infectées et que les anticorps neutralisants inhibent ces premiers évènements de transmission du VIH-1.

Dans le cadre de nouvelles stratégies vaccinales, l'inhibition de l'infection des cellules dendritiques sera à considérer afin de prévenir la transmission par voie sexuelle.

Mots clés : VIH-1, cellules dendritiques, anticorps neutralisant, inhibition, transmission, tissus.

Résumé en anglais

During intercourse, HIV free virus particles and cell-associated virus, penetrate into the female genital mucosa. The first events following HIV transmission in tissues are still controversial. In order to analyze these first events of transmission, two different models were developed during my thesis : a heterologous model of HIV transmission with cells generated from blood and a model with cells isolated from cervico-vaginal tissues. We found that dendritic cells are preferentially infected. Moreover, neutralizing antibodies efficiently inhibit these first events of HIV transmission.

Future HIV prophylactic vaccine design should take into account the potential infection of dendritic cells and new strategies should be developed to prevent the infection of these particular cell populations.

Keywords : HIV-1, dendritic cells, neutralizing antibodies, inhibition, transmission, tissues.