



**HAL**  
open science

# Rôle du réservoir viral et de l'immunité humorale du sperme dans la transmission sexuelle de HIV

Amandine Gagneux-Brunon

► **To cite this version:**

Amandine Gagneux-Brunon. Rôle du réservoir viral et de l'immunité humorale du sperme dans la transmission sexuelle de HIV. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSES050 . tel-01894286

**HAL Id: tel-01894286**

**<https://theses.hal.science/tel-01894286>**

Submitted on 12 Oct 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.



Thèse de Doctorat de l'Université de LYON

Opérée au sein de l'Université Jean Monnet

Ecole Doctorale 488

Sciences, Ingénierie, Santé

Présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2016 par

Amandine Gagneux-Brunon

## Rôle du réservoir viral et de l'immunité humorale du sperme dans la transmission sexuelle de HIV

Devant le juru composé de :

Pr Bruno Pozzetto président	EA 3064- UJM-Université de Lyon
Pr Pierre-Marie Girard rapporteur	Université Pierre et Marie Curie
Pr Philippe Van de Perre rapporteur	Inserm U1058 – Université de Montpellier 1
Pr Christine Rouzioux examinateur	EA 7327- Université Paris Descartes
Pr Thomas Bourlet directeur	EA 3064- UJM-Université de Lyon
Pr Frédéric Lucht co-directeur	EA 3064- UJM-Université de Lyon



Remerciements .....	5
Abréviations .....	8
Introduction.....	9
1. Contexte épidémiologique.....	10
2. Mécanismes de transmission sexuelle de HIV .....	14
2.1. Franchissement muqueux de HIV .....	14
2.2. Virus et sperme : particules virales libres et virus associé aux cellules.....	16
2.3. Le tractus génital masculin: un compartiment pour HIV.....	19
2.4. Réservoir de HIV dans le tractus génital masculin.....	25
2.5. Le tractus génital masculin : un environnement immunitaire à part entière .....	30
2.6. Le sperme : un acteur dans la transmission sexuelle de HIV.....	33
3. Stratégies de prévention de la transmission sexuelle de HIV.....	35
3.1. Préservatifs.....	35
3.2. La circoncision masculine.....	36
3.3. Traitements des IST.....	36
3.4. Anti-rétroviraux et prévention de la transmission sexuelle de HIV.....	37
3.5. Anticorps et vaccins pour prévenir la transmission sexuelle de HIV.....	47
Objectifs de cette thèse .....	53
Patients et méthodes .....	55
Population étudiée.....	56
Méthodes .....	57
1. Echantillons .....	57
2. Biologie moléculaire.....	57
3. Culture des NSMC de sujets infectés .....	59
4. Quantification des cytokines.....	59

5. Dosage des antirétroviraux .....	59
6. Immunoglobulines dirigées contre HIV dans le plasma sanguin et le plasma séminal : identification, quantification, purification .....	60
7. Transmigration des IgG et IgA présentes dans le plasma séminal .....	61
8. Test de Neutralisation .....	62
Résultats.....	63
Article 1. Persistent but not replicating HIV-1 cell-associated DNA in semen of long-term ART experienced men.....	64
Article 2. Seminal anti-HIV IgG and IgA able to cross a tight epithelial barrier: another potential risk for HIV transmission ?.....	77
Article 3. Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies.....	98
Conclusions et Perspectives .....	127
Autres publications en lien avec la thématique.....	132
Article 4 : Current and future microbicide approaches aimed at preventing HIV infection in Women.....	133
Article 5 : A stable genotyping resistance profile on <i>pol</i> gene is archived in the gut of HIV-1 infected men whatever time of initiation of HAART.....	151
Autres publications au cours de la période de Thèse .....	168
Références.....	175
Résumé.....	200

Figure 1. Evolution de l'incidence de l'infection par HIV chez les adultes âgés de plus de 15 ans. .....	13
Figure 2. Mécanismes de franchissement muqueux de HIV: exemple du tractus génital féminin .....	14
Figure 3. Mécanismes de sélection des souches R5 au cours de la transmission sexuelle .....	16
Figure 4. Barrière hémato-testiculaire: passage des particules virales libres et cellules infectées par HIV.....	22
Figure 5. Notion de compartimentation de HIV dans le tractus génital masculin.....	23
Figure 6. Facteurs pouvant influencer le risque de transmission sexuelle de HIV.....	34
Figure 7. Stratégies de prévention de la transmission sexuelle de HIV.....	35
Figure 8. Cascade de prise en charge de l'infection par HIV en France et dans un comté du Kenya.....	41
Figure 9. Corrélation entre observance et efficacité dans les principales études de PrEP. ....	43

## Remerciements

A Monsieur le Professeur Bruno Pozzetto, pour m'avoir accueilli au sein du GIMAP, et m'avoir soutenu dans mes multiples projets tant personnels, que professionnels.

A Madame le Professeur Christine Rouzioux, à Messieurs les Professeurs Van de Perre et Girard pour avoir accepté de juger ce travail, et d'être venus en Terre Stéphanoise.

A Monsieur le Professeur Thomas Bourlet, pour nous avoir guidé dans ces travaux, pour avoir partagé quelques moments inoubliables place Navone ou dans le Trastevere, et pour votre sens de l'humour.

A Monsieur le Professeur Lucht, pour nous avoir ouvert les portes de votre service et nous avoir intégrée dans votre équipe, pour votre confiance. Grâce à vous, je ne pars jamais à reculons le matin.

A Maman, tu me manques, Merci de m'avoir appris que le travail pouvait rendre heureuse, merci d'avoir été « toi », merci de m'avoir initiée à la médecine.

A Thibaut, car tu es mon cœur, mon amour et que tu me tires toujours vers le haut (parfois un peu maladroitement) toujours avec amour.

A Papa, pour être toujours optimiste et me soutenir au quotidien, je t'aime. A Monique, pour être aux côtés de Papa, et me rappeler aussi que nous pouvons prendre soins de soi malgré une vie professionnelle, un peu trop chargée.

A Baptiste et Pierre, pour être des petits garçons curieux de tout, accepter une Maman qui arrive « trop tard » ou dort à l'hôpital pour faire des « bisous guérisseurs » à des patients inconnus.

A mes beaux-parents, pour être toujours disponibles et apporter aux enfants, ce que Maman et Papa ne leur apporte pas toujours.

A Lise-Hélène, Nicolas, Alexandre, et Clémentine, pour me supporter au milieu de leur salon à chaque fois que je visite Paris pour me former, et surtout pour me soutenir au quotidien, et être des supers Tantes, Oncles, Cousins et Parrains pour Baptiste et Pierre.

A Guillaume, Dominique, pour votre soutien, votre aide quand la médecine humaine vient à la rencontre de la médecine vétérinaire. A Pauline et Mathieu, pour être de supers neveux.

A Maud, Guillaume et Mélanie, pour vous farcir la Belle-Sœur et sa recherche.

A Mamé, A Grand-Mère, pour être toujours là, même si vous ne comprenez pas pourquoi Amandine n'a toujours pas fini ses études.

A mes Oncles et Tantes, Mes Cousins et leurs Enfants, pour être une belle famille.

A Madame le Docteur Frésard, pour être un peu notre ‘Maman Médecin’, vous nous avez tellement appris, et nous apprendrez encore tellement. Nous sommes fière de vous suivre dans la prise en charge de nos patients infectés par HIV.

A Madame le Docteur Botelho-Nevers, nous sommes si proches et si différentes, j’espère que nous resterons à l’avenir toujours aussi complices, et que notre collaboration restera toujours aussi stimulante.

A Madame le Docteur Cazorla, vous êtes notre héroïne des temps modernes, médecin hyper- investie, mère de famille nombreuse, sportive, et toujours le sourire.

A Madame le Docteur Lutz, une autre héroïne des temps modernes, nous sommes heureuse de travailler avec vous.

A Mesdames les Dr Daoud, Fouilloux, Guglielminotti et Defontaine, car vous êtes un maillon essentiel pour la recherche dans notre service. Nous sommes fière de travailler avec vous.

Aux infirmières du service de Maladies Infectieuses et Tropicales, pour votre professionnalisme et votre dynamisme (à l’étage comme en hôpital de jour, c’est aussi un peu grâce à vous si je suis toujours ou presque toujours heureuse à l’hôpital).

A tous les patients qui participent aux études, et avec lesquels il est toujours enrichissant d’échanger.

A tous les patients que j’ai la chance de suivre, chaque jour est différent grâce à vous.

A toute l’équipe du GIMAP Hind, Fabrice, Olivier, Charles-Antoine, Marie-Ange, Agathe et surtout Blandine, Fabienne et Nico pour votre aide technique. Rassurez-vous ce n’est pas fini. A tous les stagiaires et Thésards que j’ai croisés depuis 2009, en particulier Fahd, Alexandre et Adrien pour le Café toujours prêt, Delphine et Amélie pour être les filles.

A Benoît, Chloé pour avoir largement contribué à ce travail et à m’avoir supporté et toléré mon absence.

## Abréviations

ADCC : antibody-dependant cell cytotoxicity

ADN : acide désoxyribonucléique

AMP : assistance médicale à la procréation

ARN : acide ribonucléique

HIV : *Human immunodeficiency virus*

HENI : hautement exposés non infectés

HSH : hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes

HSV : *Herpes simplex virus*

Ig : immunoglobulines

NK : natural killer

NSMC : non spermatozoal mononuclear cells

PCR : polymerase chain reaction

PEP : prophylaxie post-exposition

PrEP : prophylaxie pré-exposition

RT : reverse transcription

SIV : *Simian immunodeficiency virus*

TARV : traitement antirétroviral

TasP : treatment as prevention

TPE : traitement post-exposition

## Introduction



## 1. Contexte épidémiologique

Les principales sources de données épidémiologiques concernant l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) sont les données du programme des Nations Unies de lutte contre HIV (Human Immunodeficiency Virus) (ONUSIDA) et celles récemment publiées de la Global Burden of Disease Study 2015 (GBD). Ces dernières reposent sur les méthodes de calcul des rapports de l'ONUSIDA, auxquelles sont ajoutées des données de séroprévalence, de mortalité et de couverture par les traitements antirétroviraux pour obtenir des données épidémiologiques plus précises. A l'heure actuelle, il est estimé qu'entre 34 et 40 millions de personnes sont infectées par HIV dans le Monde (1,2). L'incidence globale estimée de l'infection par HIV varie entre 2 et 2,8 millions de nouveaux cas par an, selon la méthodologie utilisée (1,2). Le nombre de décès imputables est, quant à lui, estimé à 1,2 à 1,5 millions par an (1,2). Les données de la GBD mettent en évidence une stagnation de l'incidence de l'infection par HIV et démontrent que l'épidémie d'infections par HIV n'est pas encore enrayée (2). L'Afrique sub-saharienne reste la zone géographique la plus touchée par l'épidémie, et 58 % des personnes vivant avec HIV en Afrique sub-saharienne sont des femmes.

Le virus HIV est transmis par voie parentérale (exposition à du sang contaminé), verticalement (*in utero*), horizontalement au cours de l'allaitement maternel, et par voie sexuelle. Le risque de transmission de HIV varie en fonction du type d'exposition. Une récente méta-analyse a estimé le risque de transmission pour chaque type d'exposition en l'absence de mesure de prévention (3) (Tableau 1). Les résultats de telles analyses doivent être considérés avec précaution, il existe une grande hétérogénéité des études prises en compte (par exemple zones géographiques, études interventionnelles versus études observationnelles).

Type d'exposition	Risque pour 10000 expositions
Transfusion sanguine	9250
Partage de matériel d'injection chez les usagers de drogue par voie intra-veineuse	63
Transmission mère-enfant	2260
Rapport anal réceptif	138
Rapport anal insertif	11
Rapport vaginal réceptif	8
Rapport vaginal insertif	4

Tableau 1. Risque estimé de transmission d'HIV par acte en fonction du type d'exposition (d'après Patel et al. AIDS 2014).

Certaines populations sont plus vulnérables à l'infection par HIV, il est admis que le risque d'être contaminé par HIV est 10 fois supérieur chez les travailleurs du sexe et 24 fois supérieur chez les usagers de drogue par voie intraveineuse et les HSH que dans la population générale (4).

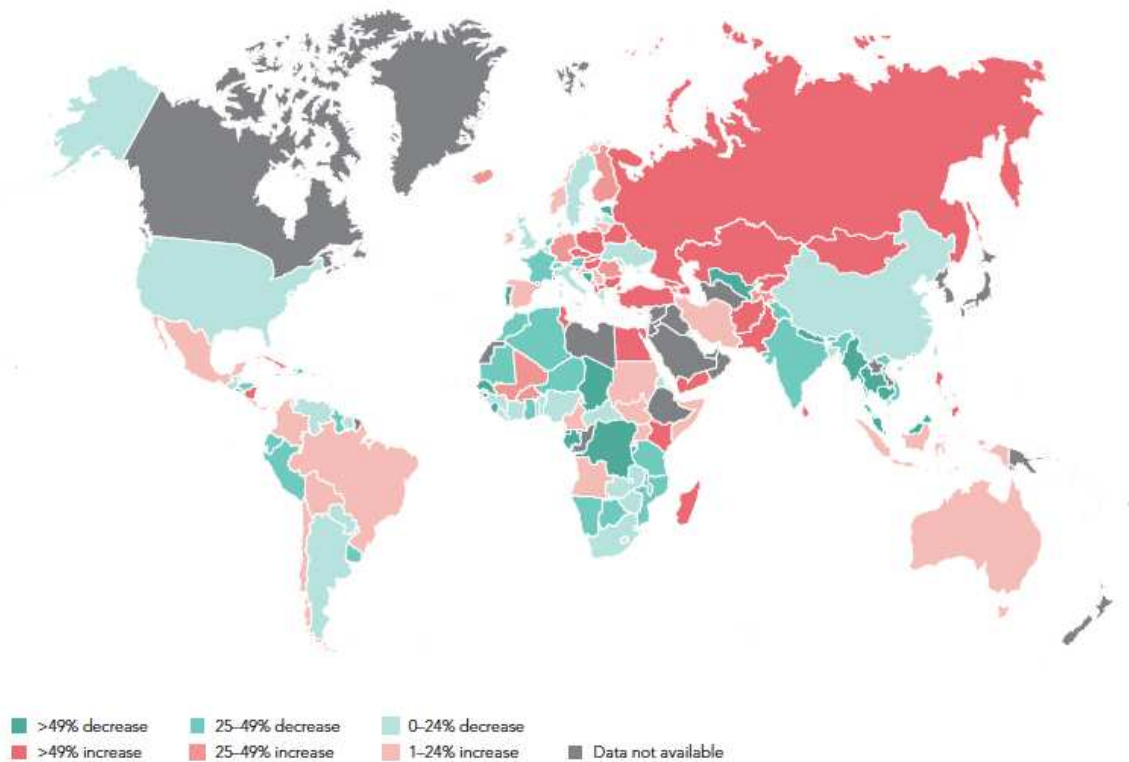
Les premières stratégies de prévention instaurées ont permis de très nettement réduire le risque de transmission par voie parentérale. Le dépistage systématique dans le cadre du don de sang et les programmes de réduction des risques (échanges de seringues, substitution aux opiacés) ont rapidement été mis en place (5). L'expansion du traitement des femmes enceintes et le traitement préventif des nourrissons nés de mères infectées par HIV ont également très nettement réduit le nombre de transmission verticale de HIV (6). En conséquence, à l'heure actuelle, près de 80 % des nouvelles infections sont liées à une transmission sexuelle. En 2014, l'ONUSIDA soulignait dans son rapport annuel un recul de l'épidémie à l'échelle mondiale (7). Malheureusement, des données plus récentes et plus précises mettent en évidence une stagnation de l'incidence de l'infection par HIV depuis 2005 (8).

En Europe (Union Européenne, Europe Centrale et Europe de l'Est), l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) relevait une hausse de 80% des nouveaux diagnostics d'infection par HIV entre 2004 et 2013 (9). Le nombre de nouveaux cas d'infection par HIV dépistés s'est porté à 136 000 par an en Europe. Cette hausse de l'incidence en Europe est en lien avec l'augmentation des cas de transmission sexuelle. Quarante deux pourcents des nouveaux diagnostics concernent des hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH), 32 % des cas relevaient d'une transmission au cours de rapports hétérosexuels, 5 % des nouveaux diagnostics étaient en lien avec l'usage de drogues par voie intraveineuse, moins de 1 % des nouvelles infections étaient liées à une transmission materno-fœtale, et le mode de transmission restait indéterminé dans 20 % des cas. L'augmentation du nombre de nouveaux diagnostics en Europe est surtout liée à une forte augmentation du nombre de cas en Europe de l'Est. Dans les régions les plus orientales de l'Europe, les nouveaux diagnostics sont essentiellement liés à des transmissions hétérosexuelles. En revanche, en France le nombre de découverte de séropositivité chaque année reste stable depuis 2007. En 2012, environ 6400 nouveaux cas ont été déclarés, la maladie à HIV faisant l'objet d'une déclaration obligatoire (10). Quarante deux pourcents des patients nouvellement diagnostiqués étaient des HSH, et 55 % des nouveaux diagnostics étaient liés à des rapports hétérosexuels.

L'ONUSIDA a fixé, en Juin 2016, l'objectif d'une réduction du nombre de nouvelles infections par an à moins de 500 000 d'ici 2020, afin de mettre fin à l'épidémie d'ici 2030. L'augmentation nette de l'incidence de l'infection à HIV dans certaines régions met l'accent sur une grande disparité d'accessibilité aux outils de prévention (Figure 1) (4). Pour réduire ces inégalités d'accès aux outils de prévention, l'ONUSIDA a fixé 5 piliers :

- L'éducation sexuelle des adolescentes et jeunes femmes et de leurs partenaires
- L'accessibilité des services de prévention

- La mise à disposition des préservatifs
- La circoncision masculine
- La prophylaxie pré-exposition



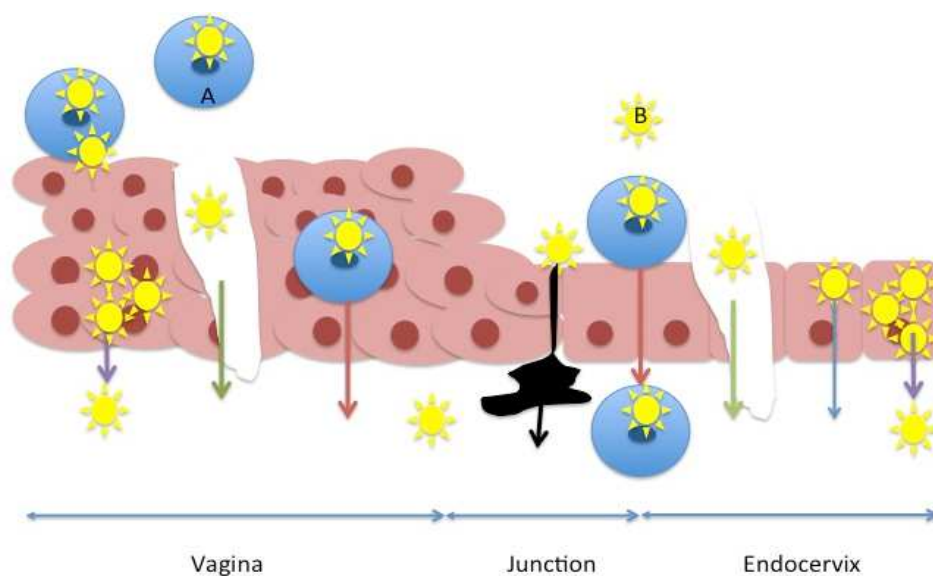
**Figure 1. Evolution de l'incidence de l'infection par HIV chez les adultes âgés de plus de 15 ans** (source ONUSIDA Prevention Gap report).

Ces données épidémiologiques et les objectifs fixés pour endiguer l'épidémie d'infections par HIV incitent à mieux comprendre les mécanismes de transmission sexuelle et à développer de nouvelles stratégies de prévention de la transmission sexuelle (vaccins, prophylaxie pré-exposition par antirétroviraux, prophylaxie pré-exposition -PrEP- par anticorps neutralisants et/ou microbicides, traitement antirétroviral comme outil de prévention -TasP-).

## 2. Mécanismes de transmission sexuelle de HIV

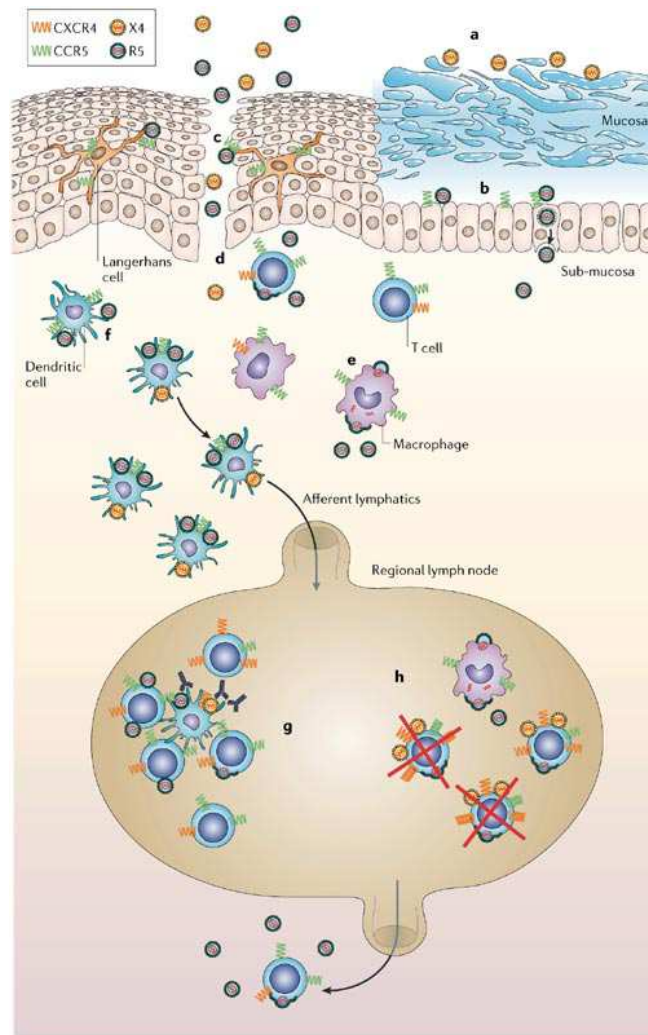
### 2.1. Franchissement muqueux de HIV

La transmission sexuelle de HIV fait appel à de multiples mécanismes : le passage de particules virales libres au travers de brèches au sein des muqueuses vaginales et anales, la transcytose de particules virales au travers des épithéliums monostratifiés (endocol, muqueuse anale), transmigration de cellules infectées au travers des épithéliums génitaux et digestifs, interaction entre des cellules infectées par HIV et les cellules épithéliales, interaction entre particules virales, cellules dendritiques, cellules de Langerhans et lymphocytes sous-muqueux (Figure 2) (11). Afin d'établir une infection, le virus HIV sous forme libre ou sous forme associée aux cellules interagit avec les cellules hôtes de la muqueuse génitale ou digestive, est ensuite transmis vers les ganglions lymphatiques, où il se réplique rapidement avant la dissémination à tout l'organisme.



**Figure 2. Mécanismes de franchissement muqueux de HIV: exemple du tractus génital féminin** (A : Virus associé aux cellules, B : particules virales libres, mécanismes verts : passage par brèche muqueuse, mécanismes rouges : transmigration de cellules infectées, mécanisme noir : prise en charge des particules virales par les cellules dendritiques, mécanismes violets : infection des cellules épithéliales, mécanisme bleu : transcytose de particules virales libres).

Au cours de la transmission sexuelle, il existe une sélection de variants souvent minoritaires (12) chez le partenaire à l'origine de la contamination, caractérisés par une signature génotypique particulière et l'utilisation du corécepteur CCR5. De nombreuses hypothèses sont avancées pour expliquer cette sélection des souches dites « R5-tropiques » au cours de la transmission sexuelle (13) : sélection chez le partenaire à l'origine de la contamination, sélection au niveau de la muqueuse digestive ou génitale chez le partenaire infecté, et/ou sélection après le franchissement muqueux (Figure 3). Chez le sujet infecté, les souches virales transmises par voie sexuelle sont caractérisées par un faible nombre de sites de glycosylation (14), réduisant ainsi leur susceptibilité vis à vis des anticorps neutralisants (15). Les virus X4 expriment une glycoprotéine d'enveloppe : la gp120 dont la charge cationique est supérieure à celle des souches R5, ce qui favorise leur interaction avec les mucines et donc leur clairance par le mucus, avant tout franchissement muqueux. Les cellules endocervicales sécrètent un ligand naturel du CXCR4 : le SDF-1(16). Le SDF-1 entraîne l'internalisation du co-récepteur CXCR4 au sein de la cellule, réduisant ainsi le nombre de co-récepteurs disponibles pour les souches X4 (16). Après franchissement de la muqueuse génitale, les lymphocytes CD4 sous-muqueux expriment souvent le corécepteur CCR5. Les macrophages, le plus souvent infectés par des cellules R5-tropiques seraient moins sensibles à la réponse immunitaire que les lymphocytes. L'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  jouerait un rôle capital dans l'infection des lymphocytes et est le plus souvent coexprimée avec CCR5 (17). Les cellules de Langerhans sont rapidement infectées par HIV et ces cellules expriment le corécepteur CCR5 et en moindre mesure le co-récepteur CXCR4. Cependant, il semblerait que seules les souches à tropisme R5 soit transmises entre les cellules de Langerhans et les lymphocytes T (18). L'ensemble de ces mécanismes semble contribuer à la sélection de ces souches R5-tropiques au cours de l'événement de transmission.



**Figure 3. Mécanismes de sélection des souches R5 au cours de la transmission sexuelle :** (a) liaison et inactivation préférentielles des souches X4 par le mucus, (b) Transcytose préférentielle des souches R5, (c) expression du co-récepteur CCR5 par les cellules de Langerhans infectables par HIV dans la muqueuse, (d) expression du co-récepteur CCR5 par les lymphocytes CD4 mémoires sous muqueux, (e) les macrophages expriment préférentiellement les CCR5, (f) les cellules dendritiques expriment CCR5, (g) les souches X4 sont plus susceptibles aux anticorps neutralisants que les souches R5, (h) les macrophages constituent un réservoir de HIV moins vulnérable que les lymphocytes CD4 à la réponse cytotoxique.

## 2.2. Virus et sperme : particules virales libres et virus associé aux cellules

Dans les sécrétions génitales (sécrétions cervico-vaginales et sperme), HIV est présent sous deux formes : sous forme de virions libres et sous forme de particules virales associées aux cellules. Le sperme contient effectivement des globules blancs en quantité variable : principalement des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes CD4 (19). Ces deux derniers types cellulaires peuvent être infectés par HIV (20). Dans la plupart des publications, ces cellules cibles sont regroupées sous le terme de NSMC (Non

Spermatozoal Mononuclear Cells). Dans ces cellules, HIV peut être présents sous forme d'ADN proviral, en partie intégré à l'ADN cellulaire, et sous forme d'ARN intracellulaire. L'ADN total, l'ADN intégré et les l'ARN intracellulaire sont mesurables.

Concernant la capacité des spermatozoïdes à être infectés par HIV, des travaux ont identifié de l'ADN proviral dans les spermatozoïdes. Cependant, cette détection semble la plupart du temps relever d'une contamination par des NSMC dans les fractions cellulaires examinées (21). Néanmoins, il est possible que de l'ADN proviral soit présent dans des spermatozoïdes présentant des anomalies (22). Les spermatozoïdes normaux ne semblent pas être des cibles pour HIV, l'ADN de celui-ci n'étant pas détectable dans ce type cellulaire (20). Néanmoins, l'expression de certains récepteurs à leur surface leur permet de se lier à des particules virales. S'ils ne sont pas réellement infectables par HIV, ils pourraient constituer des véhicules pour les particules virales (21). Les spermatozoïdes n'expriment pas le récepteur CD4 mais un récepteur dit alternatif appelé GalAAG (23). Plusieurs corécepteurs de HIV ont également été mis en évidence à la surface des spermatozoïdes, le CCR5 (24), un récepteur mannose (25) et l'héparane sulfate (26). Le virus lié aux spermatozoïdes *via* l'héparane sulfate est capable, dans des modèles *in vitro*, d'être transmis aux cellules dendritiques. Cette transmission est d'ailleurs augmentée à pH 6,5 (pH vaginal) (26).

La concentration en leucocytes du sperme est hautement variable, chez les sujets infectés comme les sujets non infectés par HIV. Les macrophages constituent le type cellulaire majoritairement infecté par HIV dans le sperme (27). Une infection sexuellement transmissible concomitante est associée à une augmentation de la concentration en globules blancs du sperme et donc de cellules potentiellement infectées par HIV (28,29). De plus, les infections sexuellement transmissibles asymptomatiques sont fréquentes chez les patients infectés par HIV (30). En l'absence de traitement ARV, l'infection par HIV entraîne une déplétion en lymphocytes CD4 dans le sperme.



Il est aujourd'hui fortement suggéré que le virus associé aux cellules est plus facilement transmis que le virus libre. Plusieurs observations vont dans ce sens. *In vitro*, du virus cultivé à partir de NSMC développe de meilleures capacités répliquatives que du virus libre provenant du plasma séminal (28), malgré des quantités importantes de particules virales libres dans le plasma séminal. De plus, l'analyse phylogénétique comparative des virus isolés chez des femmes récemment infectées par HIV avec les souches isolées chez leur partenaire à l'origine de la contamination (virus libre et virus associé aux NSMC) a montré de grandes similitudes entre les souches des NSMC et les souches mises en évidence en phase de primo-infection (31). Plus récemment, des marquages isotopiques de cellules mimant une infection par HIV ont permis de visualiser la présence de cellules infectées dans des biopsies vaginales, et leur persistance dans les heures qui suivent l'exposition vaginale au virus (32).

Chez la femme, le tissu vaginal et cervical contient des monocytes, des lymphocytes CD4, des macrophages et des cellules dendritiques. Les lymphocytes T contenus dans les sécrétions cervico-vaginales expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , le co-récepteur CCR5 (19). Le pH acide des sécrétions cervico-vaginales des femmes en âge de procréer pourrait être associé à une inactivation des leucocytes infectés. Par contre, un pH moins acide lié à la baisse du taux d'œstrogène ou à une vaginose bactérienne pourrait limiter l'inactivation de ces leucocytes infectés et favoriser la transmission de HIV associé aux cellules entre une femme infectée par HIV et son partenaire séronégatif (28).

Chez l'homme, comme chez la femme, le TARV n'élimine pas complètement le réservoir cellulaire de HIV des sécrétions génitales.

### 2.3. Le tractus génital masculin: un compartiment pour HIV

Le tractus génital masculin constitue à la fois un compartiment et un réservoir à part entière de HIV (Figures 4 et 5). La notion de compartiment peut se définir comme un site anatomique dans lequel les échanges viraux avec les autres sites sont limités (33). Plusieurs éléments semblent confirmer que le tractus génital masculin est un compartiment à part entière :

- Les analyses phylogénétiques après séquençage du gène *env*, les génotypages de résistance entre les populations virales du sang et du sperme ont montré que les populations virales de certains patients sont distinctes entre le plasma sanguin et le plasma séminal (34–37). Les souches virales mises en évidence dans le sperme ont des signatures génétiques différentes, une diversité génétique moins importante et moins de sites de glycosylation que les souches isolées à partir du sang (38). Ces virus isolés du sperme utilisent préférentiellement le corécepteur CCR5 à la surface des cellules cibles (39).
- La persistance de charge virale détectable dans le plasma séminal, et l'excrétion intermittente de particules virales dans le sperme, malgré un contrôle de la charge virale dans le plasma sanguin par un TARV plaide également pour l'existence d'une véritable compartimentation de HIV dans le tractus génital masculin (40–57). Les principales études évaluant la persistance de HIV dans le sperme sous traitement antirétroviral sont présentées dans le tableau 2.

Le virus présent dans le sperme sous forme de particules libres et associées aux cellules provient à la fois du compartiment systémique et du compartiment génital (58). Une forte corrélation entre les taux d'ARN HIV du plasma séminal et les charges ADN HIV dans les NSMC dans le sperme de sujets efficacement traités, suggère que les particules virales

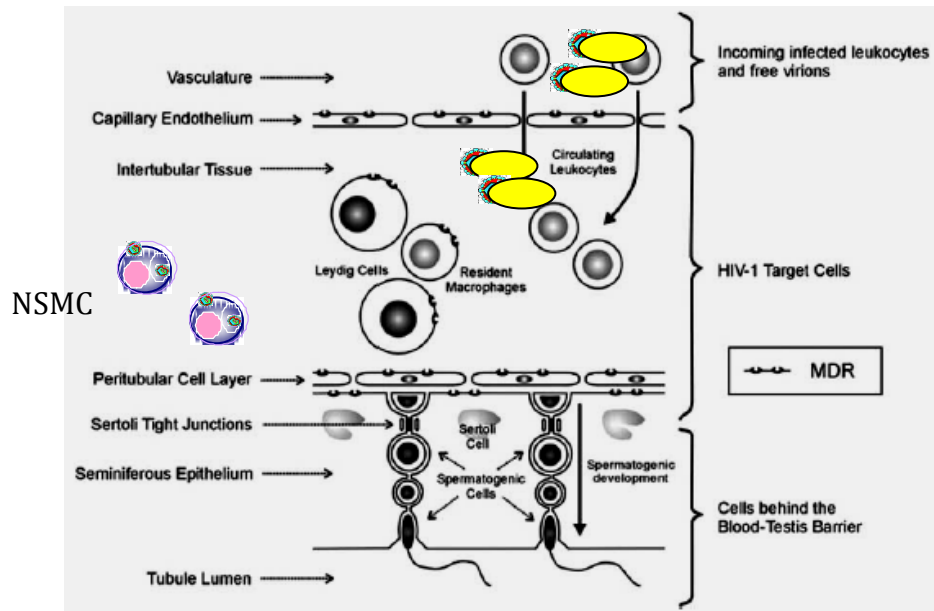
libres détectables dans le sperme proviennent d'une répllication virale locale dans le compartiment génital (56). Au-delà de ces données *in vivo*, il a été montré *in vitro* et *ex vivo* que les vésicules séminales contiennent des cellules infectables et infectées par HIV (59). Les sécrétions des vésicules séminales constituent près de 60 % du sperme.

Cette compartimentation et l'existence d'une barrière hémato-testiculaire pose la question de l'efficacité des antirétroviraux pour limiter la répllication virale dans ce compartiment. Effectivement, la diffusion des antirétroviraux dans le tractus génital masculin est extrêmement variable en fonction des molécules. Cette diffusion est habituellement évaluée par le rapport des concentrations dans le sperme ou le liquide cervico-vaginal sur les concentrations les concentrations plasmatiques sanguines. Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse, le raltégravir et le maraviroc diffusent facilement dans le tractus génital, avec des concentrations observées dans le plasma séminal et le liquide cervico-vaginal supérieure à celle observée dans le sang (60). A contrario, les inhibiteurs de protéase (en dehors de l'atazanavir) et les inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse diffusent peu dans le tractus génital (60). Ces observations suggèrent que le tractus génital n'est pas exposé à une trithérapie lorsque les patients reçoivent comme troisième agent des inhibiteurs de protéase ou de l'efavirenz. L'impact des concentrations d'ARV dans le tractus génital sur la persistance d'HIV reste discuté. L'utilisation d'un schéma thérapeutique associant une trithérapie conventionnelle à du maraviroc et du raltégravir chez des patients naïfs n'a pas montré de supériorité à un schéma conventionnel pour réduire le risque de portage intermittent de HIV dans le sperme (48). De plus, deux études ont évalué la présence de HIV dans le sperme dans des schémas de simplification thérapeutique par monothérapie d'inhibiteurs de protéase, et l'utilisation de cette stratégie ne semble pas être associée à une augmentation du risque de charge virale détectable dans le sperme (53,57).

L'absence de traitement antirétroviral n'est pas le seul facteur associé à un portage de HIV. L'existence d'une infection sexuellement transmissible bactérienne (urétrite) semble associée à la détection de HIV dans le sperme (61). Cependant des études plus récentes n'ont pas retrouvé d'association entre une co-infection par *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* et une production de HIV dans le sperme. En revanche une association a été décrite avec une infection ou une réactivation à par Herpes Virus, en particulier *Cytomegalovirus* (CMV) et *Epstein-Barr Virus* (EBV) (49,62). La réactivation d'une infection à par CMV et/ou EBV au niveau génital semble être associée à des modifications de l'environnement cytokinique du tractus génital masculin stimulant une réplication locale de HIV dans le sperme (63). Cependant, une étude cas contrôle n'a pas identifié d'association entre la présence de CMV et de HIV dans le sperme de patients traités efficacement de leur infection HIV, alors que près de 40 % des patients inclus avaient une charge virale CMV détectable dans le sperme (56). Le rôle potentiel de ces Herpes Virus dans l'activation de la production d'HIV a conduit à évaluer l'efficacité d'antiviraux comme le valacyclovir et le valganciclovir sur le portage génital de HIV. L'utilisation de ces molécules a été associée avec une réduction de la charge virale HIV dans le sperme(64,65). Néanmoins, il est difficile de différencier un effet direct sur HIV, d'un effet indirect par modification de l'environnement cytokinique liée à la réduction des charges virales CMV et HSV-2 au niveau génital.

L'activation immunitaire dans le tractus génital masculin est possiblement associée à la réplication virale dans le tractus génital masculin et donc à la détection de HIV dans le sperme. Chez des patients naïfs de TARV, le niveau de charge virale HIV dans le sperme semble corrélé à la proportion de lymphocytes CD4 activés mesurés par cytométrie en flux (66). L'infection par HIV impacte aussi sur la richesse et la diversité du microbiote génital, le traitement antirétroviral semblant associé à une restauration de ce microbiote (67). Dans cette

étude, la « charge bactérienne » séminale et le taux d'IL-1 $\beta$  étaient corrélés avec la charge virale HIV dans le sperme (67). Récemment, la consommation de cannabis a aussi été montrée comme associée à la détection de HIV dans le sperme, par un mécanisme non clairement identifié (51).



**Figure 4. Barrière hématotesticulaire: passage des particules virales libres et cellules infectées par HIV** (d'après Shehu-Xhilaga M et al. (68))

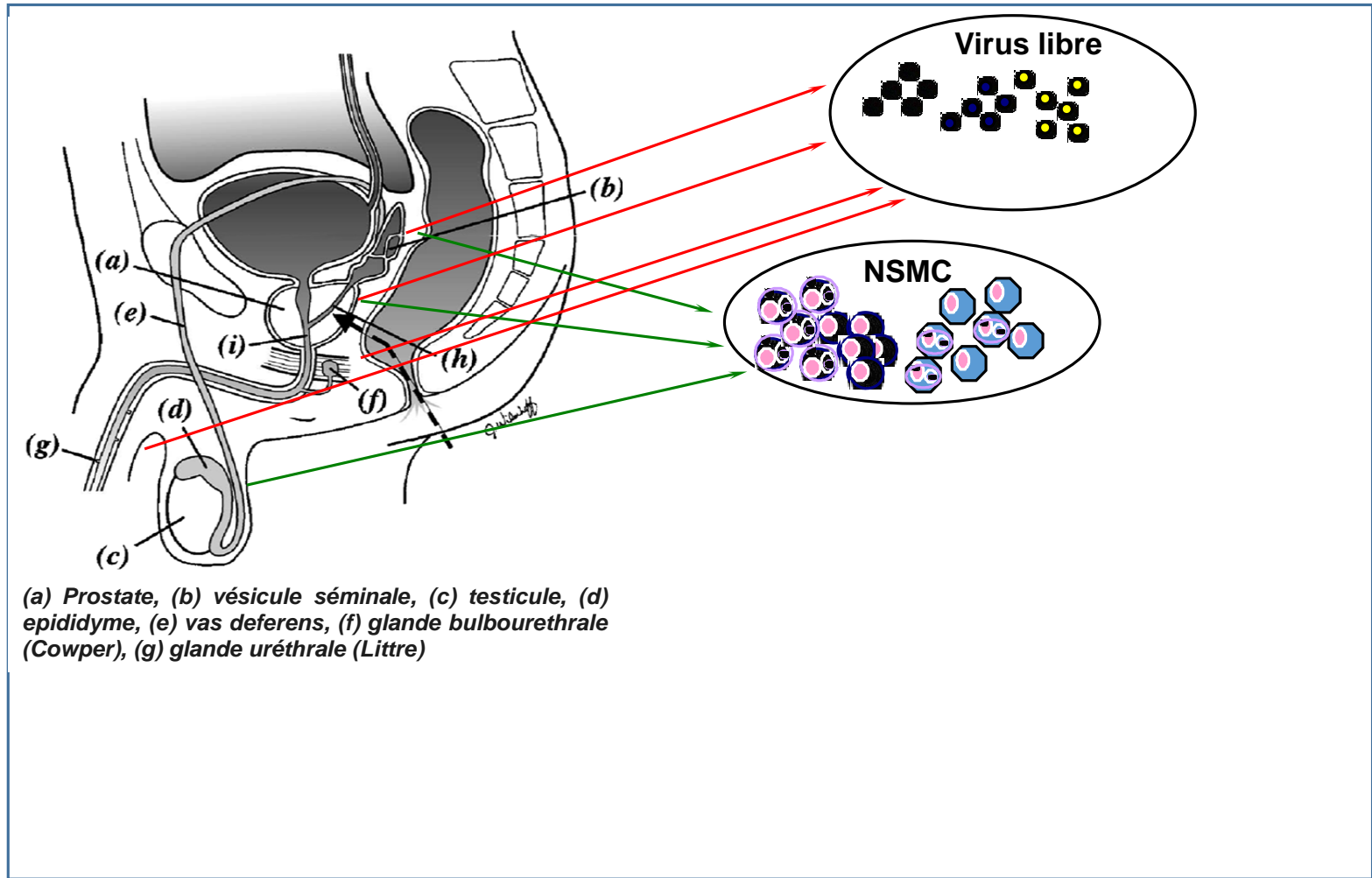


Figure 5. Notion de compartimentation de HIV dans le tractus génital masculin (d'après Coombs et al. (69) et Le tortorec et al. (21)).

Auteurs	Année de publication	Population étudiée	Variables mesurées	Prévalence du portage de HIV dans le sperme
Zhang <i>et al.</i> (40)	1998	Patients sous TARV avec CV dans le sang indétectable N=7	ADN HIV dans le sperme Culture de HIV à partir de NSMC	4/7 2/3
Nunnari <i>et al.</i> (41)	2002	Patients sous TARV efficace N=28	2LTR ADN-HIV circulaire Culture de HIV à partir du sperme	8%
Bujan <i>et al.</i> (42)	2002	AMP N=94 (281 échantillons)	ARN-HIV	14% des échantillons
Marcelin <i>et al.</i> (43)	2008	AMP N= 145	ARN-HIV	5%
Sheth <i>et al.</i> (44)	2009	Hommes débutant un TARV N=25	ARN-HIV	48%
Halfon <i>et al.</i> (45)	2010	AMP N=332 (394 échantillons) ARN HIV dans le sang < 50 copies/mL depuis plus de 6 mois	ARN-HIV	3% des échantillons
Duloust <i>et al.</i> (46)	2010	AMP N=541 Hommes (1049 échantillons)	ARN-HIV	0%
Politch <i>et al.</i> (47)	2012	HSH sous TARV N=101	ARN-HIV	30% des sujets et 25% des participants dont la CV dans le sang est indétectable
Osborne <i>et al.</i> (48)	2013	HSH sous TARV (standard ou intensif) N= 38 (116 samples)	ARN-HIV	16.4% des échantillons
Gianella <i>et al.</i> (49)	2013	HSH sous TARV avec CV indétectable dans le sang N=100	ARN-HIV	6%
Ferraretto <i>et al.</i> (50)	2014	AMP N=88	ARN-HIV	19.3%
Ghosn <i>et al.</i> (51)	2014	HSH sous TARV avec CV indétectable depuis plus de 6 mois dans le sang N=157 (304 échantillons)	ARN-HIV	7.6% des échantillons
Mujugira <i>et al.</i> (52)	2016	231 patients débutant une thérapie conventionnelle	ARN-HIV	24 % avant 3 mois de TARV, 10 % entre 4 et 6 mois de TARV, 8 % si CV indétectable dans le sang
Torres-Cornejo <i>et al.</i> (53)	2016	66 patients recevant une monothérapie d'IP/r 61 patients sous trithérapies conventionnelle	ARN-HIV	16 % des patients en monothérapie 28,6 % des patients en thérapie conventionnelle
Du <i>et al.</i> (54)	2016	19 patients sous TARV depuis plus de 6 mois 17 avec une charge virale indétectable	ARN-HIV	16/19
Politch <i>et al</i> (55)	2016	60 patients sous TARV conventionnel 8 avec CV plasmatique détectable 52 avec CV plasmatique indétectable	ARN-HIV dans le pré-éjaculat et le sperme	4 des 8 patients avec CV détectable dans le sang 1/8 dans le pré-éjaculat 10 % des patients avec CV indétectable dans le sang ont une CV détectable dans le sperme, 0 dans le pré-éjaculat
Gantner <i>et al</i> (56)	2016	HSH sous TARV Etudes cas contrôles (20 patients avec CV détectable dans le sperme et 60 avec CV indétectable dans le sperme)	ARN-HIV dans le sperme ADN-HIV dans la fraction cellulaire du sperme	Corrélation entre HIV-DNA et HIV-RNA
Lopez-Ruz <i>et al</i> (57)	2016	Étude de Switch d'une trithérapie conventionnelle vers une monothérapie d'IP/r N=28 avec CV indétectable dans le sang	ARN-HIV	10 % à l'inclusion 3 % après 48 semaines de monothérapie

**Tableau 2. Principales études évaluant la persistance de HIV dans le sperme sous thérapie antirétrovirale** (AMP : Assistance Médicale à la Procréation, HSH : hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes, TARV : traitement antirétroviral, CV : charge virale).

## 2.4. Réservoir de HIV dans le tractus génital masculin

Le TARV est capable de rendre indétectable la charge virale HIV dans le sang. Cependant, une reprise d'une réplication virale forte après interruption du traitement témoigne de l'existence d'un réservoir cellulaire de HIV. Au cours du TARV, HIV est présent sous forme latente dans divers types cellulaires (70,71) : lymphocytes T mémoires, monocytes, macrophages, cellules microgliales dans le système nerveux central (72,73). Ces formes latentes contribuent à la persistance d'une activation immunitaire, et sont capables de se répliquer à bas bruit pour entretenir une virémie résiduelle (70), après stimulation d'une cellule infectée ou par transmission de cellule à cellule. Les souches virales de ces réservoirs sont à l'origine de la reprise de la réplication virale après interruption du TARV et contribuent à repeupler les virus du compartiment sanguin (70,74). Le réservoir cellulaire de HIV se constitue, dès la primo-infection dans des lymphocytes T CD4+ (75). Les différences de *ratio* entre les quantités d'ADN et d'ARN HIV détectées dans les cellules de divers compartiments anatomiques (tractus digestif, tractus génital, rate, ganglions lymphatiques et sang) suggèrent que les capacités répliquatives des virus latents sont variables dans les différents tissus (76). Cette réplication conduit à la production de virus dits défectifs ou de particules aux capacités répliquatives conservées (73).

L'infection du tractus génital est un événement précoce après transmission sexuelle de HIV (77). Par des expérimentations *ex vivo*, il a été établi que les testicules, la prostate, l'urètre sont permissifs à l'infection par HIV, et constituent des réservoirs à part entière pour ce virus (59). La présence d'un réservoir viral dans le tractus génital masculin a été également observée *in vivo* dans un modèle simien (76). Dans ce modèle, l'instauration d'un TARV précoce limite mais n'élimine pas la constitution du réservoir viral dans le tractus génital mâle (78).



Comprendre les mécanismes de constitution de ce réservoir est nécessaire afin d'évaluer les stratégies d'éradication du virus (72). Le réservoir cellulaire latent de HIV est constitué d'ADN viral total comprenant les formes intégrées, de l'ADN circulaire 2-LTR, de l'ADN linéaire, et d'ARN intra-cellulaire non épissé ou multi-épissé (79). Quantifier et évaluer par biologie moléculaire de manière fiable le réservoir de HIV dans le tractus génital masculin pose quelques difficultés. Les méthodes de mesure de ces formes virales restent peu standardisées et présentent chacune leurs limites (72,79,80) (Tableau 3). De plus, elles n'ont pas toutes été évaluées dans le tractus génital masculin. Récemment, une approche originale par imagerie nucléaire a été proposée afin de visualiser la persistance de HIV dans le tractus génital de macaques traités par antirétroviraux avec une charge virale plasmatique indétectable, et de macaques « Elite controllers » (81).

De plus, de nombreux facteurs affectent la dynamique des réservoirs de HIV : compartimentation, nature des cellules infectées, capacités répliquatives du virus intégré dans les cellules, statut des cellules infectées (actives, ou quiescentes) (73) (Tableau 4). Au-delà de la réplication virale, il a été montré qu'il existe une prolifération clonale des cellules infectées probablement influencées par les sites d'intégration de HIV dans le génome cellulaire. Cette prolifération participe à la persistance virale (82,83).

Méthodes	Éléments mesurés / description	Utilisation pour la quantification du réservoir génital	Commentaires
<b>IUPM</b>	Co-culture de lymphocytes CD4 latents avec des PBMC de sujets séronégatifs	Non	Gold standard
<b>PCR Alu-LTR</b>	Quantification de l'ADN viral intégré	Oui	Variabilité entre les laboratoires
<b>PCR 2 LTR-circulaires</b>	Marqueurs d'infection récente	Oui	Variabilité entre les laboratoires
<b>Quantification de l'ADN viral total</b>	Mesure l'ADN intégré et l'ADN 2-LTR circulaires	Oui	Bonne corrélation entre ADN-HIV total et ADN-HIV intégré  Protocole standardisé disponible
<b>ARN-HIV non épissé et multiépissé</b>	Evaluation de cellules infectées productives	Oui	
<b>PCR HIV-RNA ultrasensible (permet de quantifier 1 à 2 copies/mL d'ARN HIV)</b>	Production virale résiduelle chez les patients sous thérapie antirétrovirale en lien avec le réservoir de HIV	Non	Nécessite de gros volumes d'échantillons

Tableau 3. Méthodes d'évaluation des réservoirs de HIV (d'après Lewin et Rouzioux (79)).

## Facteurs contribuant à la dynamique du réservoir de HIV

Compartiments	Types cellulaires	Virus	Statut des cellules
	Infectés		infectées
Sang	Lymphocytes T CD4 mémoires centraux	Défectifs	Active
Tissu lymphoïde associé au tractus digestif (GALT)	Lymphocytes T CD4 effecteurs	Réplicatifs	Quiescente
Tissu lymphoïde (rate, ganglions)	Lymphocytes T CD4 mémoires transitionnels		
Système nerveux central	Lymphocytes CD4 Naïfs		
Tractuts génital	Lymphocytes T CD4 mémoires médullaire Monocytes et macrophages		

Tableau 4. Facteurs influençant la dynamique du réservoir viral de HIV (d'après Chun *et al.* (73)).

La purge des réservoirs de HIV est actuellement une des voies de recherche dans la perspective de l'éradication de l'épidémie, afin de permettre aux patients d'arrêter le TARV et de limiter l'activation immunitaire (responsable de la morbidité cardiovasculaire dans l'infection par HIV). Plusieurs stratégies sont en cours d'évaluation dont l'intensification thérapeutique (84) (Tableau 5) par ajout de maraviroc, un antagoniste du co-récepteur CCR5, ou de raltégravir, un inhibiteur de l'intégrase à une trithérapie par inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse associés à un inhibiteur non nucléotidiques ou un inhibiteur de

protéase. Cette stratégie d'intensification n'a pas montré d'effet sur le réservoir génital comparativement à une thérapie standard (48).

Stratégie	Description	Effet sur le réservoir génital
<b>Greffe de cellules souches hématopoïétiques <math>\Delta 32</math> CCR5</b>	Greffe de CSH à partir d'un donneur homozygote $\Delta 32$ CCR5	Non évalué
<b>Traitement à la primo-infection</b>	Traitement précoce de l'infection par HIV conduit à un contrôle de la réplication virale post-traitement	Non publié
<b>Intensification thérapeutique</b>	OKT-3, IL-2 (85)	Echec
	Maraviroc Raltégravir(48)	Pas d'effet
<b>Vaccinations thérapeutiques</b>	Protocole de vaccination chez des patients infectés par HIV pour éradiquer les réservoirs	Etudes en cours
<b>Inhibiteurs des histones déacétylases ou histones acétyl transferase</b>	Molécules susceptibles de relancer une réplication virale à partir des réservoirs cellulaires dans l'objectif d'intensifier leTARV sur les formes répliquatives de HIV	Etudes en cours
<b>Bloquage de PD-1</b>	Anticorps anti-PD-1, anticorps anti-récepteurs de PD-1 Objectif : restaurer une réponse cellulaire anti-HIV essentiellement <i>via</i> les lymphocytes CD8	Etudes en cours

**Tableau 5. Principales stratégies d'éradication des réservoirs viraux de HIV** (d'après Passaes et Saez-Cirion (84) et Velu *et al.* (86))

## **2.5. Le tractus génital masculin : un environnement immunitaire à part entière**

A l'instar de ce qui est observé dans le tractus digestif, l'infection par HIV conduit à une déplétion en lymphocytes CD4 au niveau du tractus génital masculin (27). La réponse immunitaire dirigée contre HIV dans le tractus génital diffère de celle observée dans le sang, les organes lymphoïdes et le tractus digestif. La déplétion précoce en lymphocytes CD4 muqueux favorise rapidement la constitution du réservoir viral au niveau génital (27,87).

### **2.5.1. Anticorps dirigés contre HIV dans le sperme**

A la différence du tractus digestif, la réponse immunitaire humorale au niveau du tractus génital masculin fait appel essentiellement aux IgG (87). La concentration d'immunoglobulines dans le sperme est très variable et dépend en grande partie des techniques de recueil et de dosages (87). Ces immunoglobulines présentes dans le sperme sont le fruit d'une production locale et proviennent aussi d'un transfert passif depuis le compartiment sanguin (87). Les cellules productrices d'anticorps sont essentiellement situées au niveau des glandes de Littre et produisent majoritairement des IgA (87). Les IgG anti-HIV sont majoritaires par rapport aux IgA anti-HIV dans le sperme, le rapport des concentrations IgA/IgG dans le sperme étant d'environ 1:10 (87,88).

Chez les patients chroniquement infectés et chez des sujets hautement exposés non infectés (HENI), des immunoglobulines anti-HIV ont été détectées dans le tractus génital (lavages cervico-vaginaux, sperme) (89–97). Ainsi, des IgA dirigées contre HIV ont été identifiées dans les lavages cervico-vaginaux de personnes en situation de prostitution (considérées comme sujets HENI), suggérant un rôle protecteur des IgA dirigées contre HIV dans le tractus génital féminin pour prévenir l'infection par HIV (90,98) (Tableau 8). Néanmoins, des épitopes neutralisant des ces IgA du tractus génital féminin n'ont pas été formellement identifiés, suggérant que les IgA observées dans le tractus génital féminin pouvaient cibler

d'autres structures comme les récepteurs et corécepteurs de HIV à la surface des cellules cibles. Un rôle protecteur des IgA dans le tractus génital masculin n'est pas encore clairement établi. Cependant, des IgA dirigées contre HIV ont été identifiées dans des écouillons urétraux d'hommes considérés comme HENI (96), laissant supposer que les IgA sont corrélées à une certaine protection contre HIV. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'exposition répétée à HIV est nécessaire à la production des IgA dirigées contre HIV (96). Il a été observé des IgA neutralisant HIV dans le prépuce des hommes les plus exposés à HIV (99). Il a été montré que la réduction du taux d'IgA neutralisant HIV au niveau du prépuce était associée à une augmentation du risque d'infection (100) (Tableau 8). Ces résultats sont issus de travaux ancillaires à une étude d'efficacité de la circoncision menée chez des hommes du District de Rakai en Ouganda. Par technique ELISA, peu de ces IgA neutralisant HIV ont une spécificité pour la gp120, suggérant que ces IgA capables de neutraliser l'infection seraient dirigées contre les co-récepteurs de HIV sur les cellules cibles, CCR-5 et intégrine  $\alpha 4\beta 7$  en particulier.

Les immunoglobulines de type IgA peuvent également jouer un rôle protecteur au niveau muqueux en inhibant la transcytose de particules virales, comme cela a été démontré pour les IgA présentes dans le colostrum ou le liquide cervico-vaginal (91,101). Ces observations n'ont pas été confirmées chez l'homme. *A contrario*, il a été montré que des IgG dirigées contre HIV du sperme étaient capables d'augmenter la transcytose de particules virales à un pH acide (similaire à celui du milieu vaginal) *via* le Fc-recepteur néonatal (102). Cet effet semble concentration-dépendant (102).

A l'instar du lait maternel et du liquide cervico-vaginal, le sperme pourrait également contenir des immunoglobulines capables de stimuler un effet cytotoxique des cellules NK sur les cellules infectées par HIV (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC) (103,104). Cet effet ADCC a été observé dans le sang des sujets vaccinés dans l'essai

RV144, et associé à la protection modérée observée dans cet essai vaccinal (105). Une étude a identifié une activité ADCC dans le sperme de 9 sujets chroniquement infectés sur 11 (106). Les auteurs de cette étude suggèrent que cette activité ADCC pourrait contribuer au faible taux de transmission sexuelle.

Au total, le sperme pourrait ainsi contenir des Ig neutralisant HIV, des IG inhibant et/ou facilitant la transcytose de particules virales et/ou des Ig susceptibles d'entraîner un effet ADCC. La réponse humorale au niveau de tractus génital masculin est donc complexe mais encore peu explorée.

### ***2.5.2. L'environnement cytokinique du sperme***

Le sperme contient de nombreuses cytokines à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, produites dans les testicules essentiellement par les cellules de Leydig et Sertoli, la prostate, les vésicules séminales et l'épididyme. Ces cytokines et leur concentration semblent influencer la fertilité masculine. Les infections sexuellement transmissibles entraînent un déséquilibre en augmentant les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (107). L'infection par HIV est également associée à des modifications de l'environnement cytokinique dans le sperme avec une augmentation des concentrations en cytokines pro-inflammatoires, en particulier aux stades les plus avancés de l'infection (108). Les cytokines du sperme pourraient influencer le portage de HIV dans le sperme et moduler la transmission sexuelle de HIV en participant au recrutement des cellules dendritiques et à l'activation immunitaire au niveau de la muqueuse chez le partenaire sexuel en participant au recrutement des cellules immunitaires (cellules dendritiques) et leur activation au niveau de la muqueuse du partenaire (109–111).

## 2.6. Le sperme : un acteur dans la transmission sexuelle de HIV

Le sperme contient une quantité variable de virus HIV sous forme particules virales libres et associées aux cellules. De nombreux facteurs peuvent influencer la concentration virale dans le sperme : l'environnement cytokinique, la taille du réservoir viral, les coinfections par les Herpesvirus, la réponse immunitaire. Le sperme lui-même pourrait moduler la transmission et le franchissement muqueux des particules virales. En effet, sa composition est complexe. Les analyses protéomiques ont permis d'identifier plus de 2000 voir 2500 protéines dans le sperme : des enzymes, mais également des cytokines (112,113) qui peuvent jouer un rôle facilitant ou protecteur dans la transmission sexuelle (114). Par exemple, le plasma séminal induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le tractus génital féminin pouvant favoriser la transmission sexuelle de HIV (115). Le plasma séminal module également l'expression des co-récepteurs de HIV au niveau des cellules épithéliales du col de l'utérus (116). La charge virale HIV dans le plasma séminal et la charge provirale dans les NSMC ne sont donc pas les seuls déterminants du risque de transmission sexuelle. L'ensemble des facteurs du sperme susceptibles de favoriser ou réduire la transmission sexuelle de HIV est présenté dans le tableau 6.

La transmission sexuelle de HIV est donc un phénomène complexe qui résulte effectivement de la présence de particules virales ou de virus associé aux cellules mais aussi d'une conjonction entre des facteurs favorisants ou inhibiteurs à la fois chez le partenaire infecté et le partenaire exposé (Figure 6).



Facteurs	Rôle facilitant	Rôle inhibiteur	Références
Complément			(117)
Semen-derived enhancer of virus infection fibrils (SEVI)			(118,119)
IL-1 $\beta$			(120)
$\beta$ -défensines			(121)
Cathélicidines			(122)
Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SPLI)			(123)
Lactoferrine			(124)
TGF- $\beta$			(111,125)

Tableau 6. Facteurs séminaux susceptibles d'influencer la transmission sexuelle de HIV.

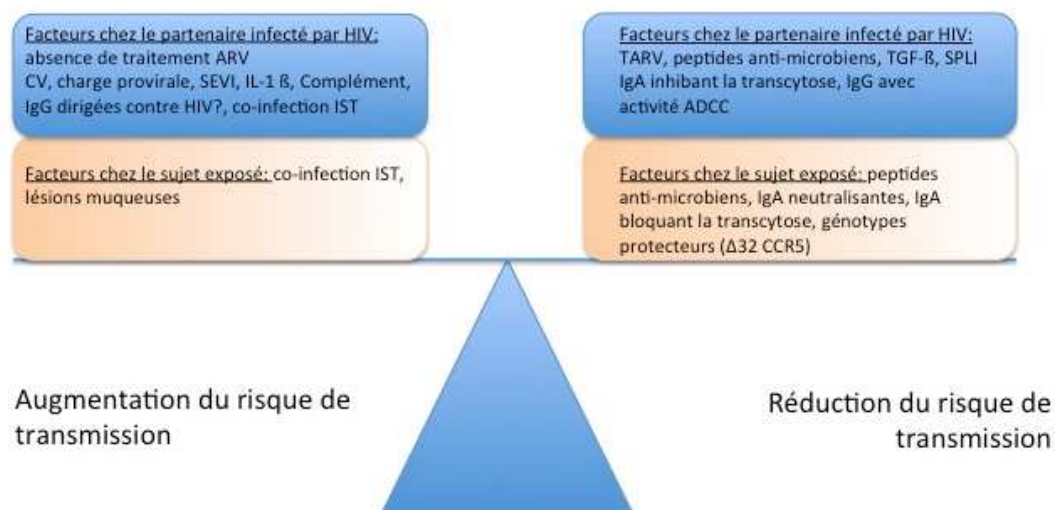


Figure 6. Facteurs pouvant influencer le risque de transmission sexuelle de HIV.

### 3. Stratégies de prévention de la transmission sexuelle de HIV

Nous disposons, à l'heure actuelle, de nombreux outils de prévention de la transmission sexuelle de HIV, qui peuvent se regrouper au sein de 4 stratégies (Figure 7).

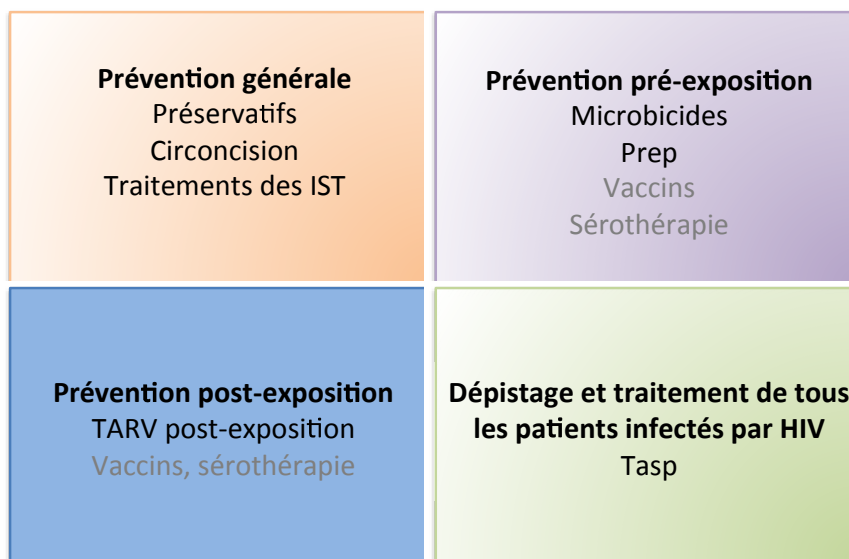


Figure 7. Stratégies de prévention de la transmission sexuelle de HIV (en noir, les stratégies disponibles, en gris, les stratégies en développement).

#### 3.1. Préservatifs

Une utilisation continue du préservatif au cours des rapports sexuels aurait une efficacité de 80 à 95 % pour réduire le risque de transmission (126). L'ONUSIDA estime que près de 50 millions de contaminations ont été évitées grâce à son utilisation (127). Il s'agit de la seule stratégie permettant de prévenir les grossesses non désirées ainsi que les autres IST. L'accessibilité des services de prévention et la disponibilité des préservatifs restent insuffisantes, en particulier dans les populations les plus vulnérables : transgenres, prostitué-e-s (128). Lors des enquêtes conduites par l'ONUSIDA, les sujets interrogés (HSH et travailleurs du sexe) ne rapportent l'usage du préservatif que dans 50 à 60 % des cas lors du dernier rapport sexuel à risque (7).

### 3.2. La circoncision masculine

La circoncision masculine permet de réduire le risque d'infection par HIV de 50 à 60 % chez l'homme (129). La présence d'un épithélium pseudo-stratifié non kératinisé, d'un milieu humide, riche en cellules cibles de HIV au niveau du prépuce explique en partie l'intérêt de la circoncision (130). Les études randomisées qui ont montré une efficacité notable de la circoncision, ont été effectuées en Afrique sub-saharienne, chez des sujets majoritairement hétérosexuels. L'efficacité de la circoncision pour prévenir l'infection par HIV chez les HSH semble moins évidente (131,132). De même, la circoncision d'un homme infecté par HIV ne semble pas réduire le risque de transmission à sa partenaire (133–135). Néanmoins, l'augmentation de la prévalence de la circoncision impacte actuellement l'incidence globale de l'infection par HIV (136).

### 3.3. Traitements des IST

L'existence d'une infection génitale par gonocoque, *Chlamydia* ou HSV-2 augmente à la fois le risque de transmettre HIV et celui d'être infecté au cours d'un rapport sexuel (137–139). Ces observations ont donc naturellement suggéré que le traitement des infections sexuellement transmissibles réduirait le risque d'infection par HIV. Malheureusement, les études cliniques de traitement des IST n'ont pas montrée une efficacité notable de cette stratégie dans la réduction du risque d'infection par HIV (140). Bien que le traitement par aciclovir (traitement anti-herpétique) soit associé à une réduction des charges virales plasmatiques et génitales de HIV, les études cliniques n'ont pas permis de prouver son efficacité pour prévenir la transmission sexuelle de HIV (141–143).

### 3.4. Anti-rétroviraux et prévention de la transmission sexuelle de HIV

#### 3.4.1. Prophylaxie post-exposition

Les antirétroviraux dirigés contre HIV ont rapidement, au-delà de leur intérêt thérapeutique, été mis en avant dans des stratégies de prévention de la transmission sexuelle. La première stratégie utilisant des antirétroviraux, a concerné la prophylaxie post-exposition dans le cadre des accidents d'exposition au sang ou à un liquide biologique, et des accidents d'exposition sexuelle (144). Le traitement post-exposition (TPE) après une exposition sexuelle est ainsi recommandé dans les 48 heures après le rapport à risque (145). En France, le TPE sexuelle est indiqué après évaluation du risque, en prenant en compte le type de rapport sexuel, le statut sérologique du partenaire ou son appartenance à un groupe à risque (partenaires sexuels multiples, originaire d'une zone à forte prévalence, usager de drogues) (145). Des facteurs de risque d'acquisition de HIV comme des ulcérations génitales ou le viol chez le sujet exposé conduit à la prescription d'un TPE. Les recommandations européennes, britanniques et américaines sont unanimes concernant l'évaluation individuelle du risque de transmission ou d'acquisition de HIV avant de débiter un TPE (146–148). Concernant le délai entre le rapport sexuel et l'initiation du TPE, il peut être étendu à 72 heures. Cette stratégie d'évaluation individuelle du risque est justifiée par des études de coût-efficacité, qui avaient pointé le coût élevé de stratégies plus universelles : TPE systématique devant tout exposition sexuelle (149,150). Dans l'ensemble des recommandations, aucun TPE n'est recommandé si le sujet source est infecté par HIV mais avec une charge virale indétectable depuis plus de 6 mois dans le sang.

### 3.4.2. « Treatment as Prevention » ou TasP

La corrélation entre la charge virale HIV plasmatique et le risque de transmission a rapidement suggéré que la réduction de cette charge virale grâce à la thérapie antirétrovirale permettrait de réduire le risque de transmission sexuelle. Une méta-analyse regroupant de multiples études observationnelles a même conclu à l'absence de risque de transmission de HIV par voie sexuelle lorsque la charge virale dans le plasma sanguin était inférieure à 450 copies/mL (151). Cette méta-analyse ne regroupe que des études chez des couples sérodiscordants hétérosexuels (151). L'ère du traitement comme outil de prévention de la transmission ou « Treatment as Prevention-TasP » a alors débuté (152). L'essai HPTN 052 figure comme l'essai clinique pilier en matière de TasP. Dans une cohorte de 1763 couples sérodiscordants hétérosexuels, un démarrage immédiat, après le diagnostic de séropositivité, comparé à une initiation guidée par le compte de lymphocytes CD4 ( $350/\text{mm}^3$  selon l'Organisation Mondiale de la Santé en 2011) de la thérapie antirétrovirale hautement active réduisait de plus de 96 % le risque de transmission au partenaire séronégatif (153). Ces résultats intermédiaires ont conduit à proposer à l'ensemble des participants l'initiation du TARV. Les résultats définitifs d'HPTN 052 ont été publiés en Juillet 2016. Le traitement antirétroviral instauré dès le diagnostic de séropositivité réduit le risque de transmission de HIV, cet effet est immédiat et persiste dans le temps (154). Les cas de transmission ont été observés dans les 90 premiers jours de traitement antirétroviral chez le sujet index ou après un échec de ce traitement. De plus, un diagnostic et un traitement précoce réduisent la charge virale communautaire ainsi que l'incidence de la maladie dans une population (155). Cette stratégie ne peut être payante que si le dépistage est systématique. HPTN-052 a apporté une preuve de concept pour la stratégie de TasP. Des études cliniques en conditions réelles sont actuellement en cours (156,157). L'ONUSIDA a fixé des objectifs chiffrés pour 2020 :

- 90 % des personnes infectées par HIV, dépistées
- 90 % d'entre eux recevant un traitement antirétroviral
- 90 % des patients traités avec une charge virale dans le sang indétectable.

Afin d'atteindre de tels objectifs, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande un traitement universel depuis 2015. Une telle stratégie ne peut être efficace sur l'épidémie que si le dépistage est effectivement universel, et le traitement débuté dès le diagnostic établi. Les données épidémiologiques françaises démontrent que même dans un pays industrialisé, il existe une divergence notable entre le nombre d'individus infectés et le nombre de patients traités efficacement par traitement antirétroviral hautement actif (145). En France, environ 50 % des sujets infectés par HIV reçoivent un traitement antirétroviral efficace avec une charge virale sanguine indétectable. Cette proportion est légèrement inférieure dans les pays de haute endémicité comme le Kenya (158) (Figure 8). Dans les pays à faible et moyen niveau de vie, la proportion de patients traités est plus importante dans les pays à forte prévalence pour HIV (159). En France, près de 20 % des sujets infectés par HIV ignorent, leur séropositivité et sont à l'origine de près de 60 % des nouvelles contaminations (160).

Pour impacter fortement l'épidémie, une stratégie de TasP nécessiterait que plus de 80 % des patients infectés soient dépistés et traités. Le dépistage devrait être réalisé tous les ans chez les plus de 15 ans et le traitement débuté dès le diagnostic dans les zones de forte endémicité (161).

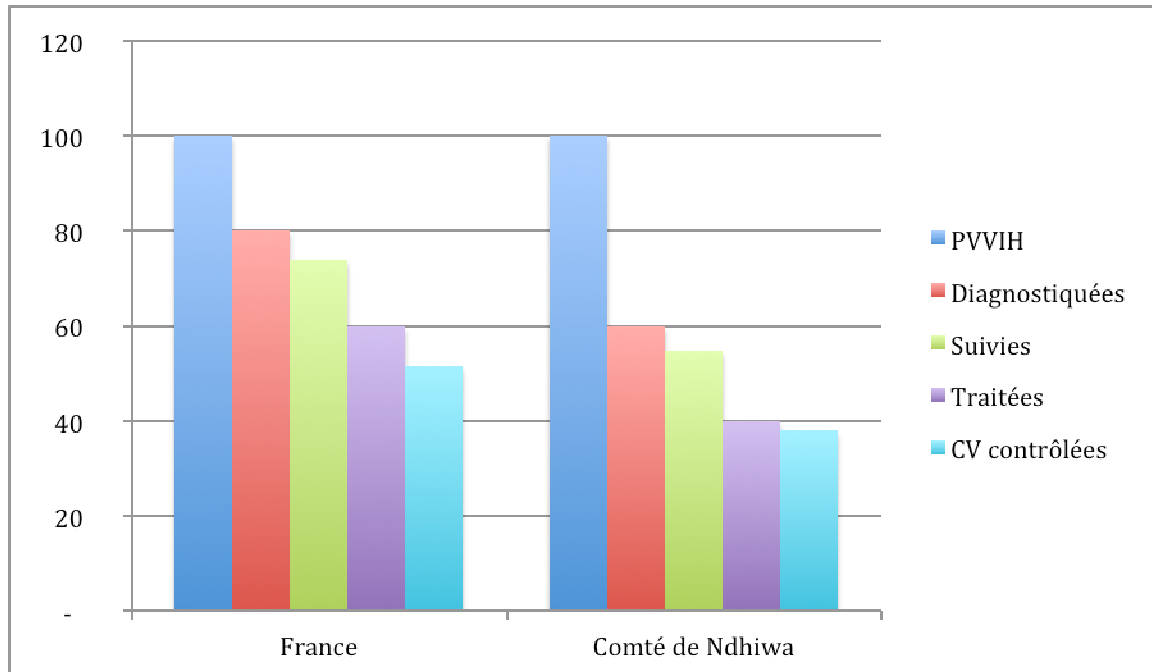
Cette stratégie de prévention apparaît dans les études cliniques comme l'une des plus prometteuses, mais elle est conditionnée par un dépistage universel, et la réduction du délai entre l'infection par HIV, le diagnostic et le contrôle de la charge virale par le traitement antirétroviral (145). En France, le dépistage universel s'est heurté à de multiples difficultés, et le faible nombre de diagnostics établis dans des populations à faible risque a conduit à retirer cette stratégie des recommandations actuelles (145). Les dernières recommandations

encouragent le dépistage ciblé dans les populations les plus à risque : migrants, HSH et milieu carcéral. Ce dépistage peut faire appel aux tests rapides à orientation diagnostique (TROD) réalisables hors les murs, en particulier dans les lieux de rencontre des ces populations à risque (145). Raccourcir le délai entre la contamination par HIV et le contrôle de la charge virale reste un vrai enjeu, en France, le délai médian entre l'infection par HIV et l'obtention d'une charge virale indétectable s'élevant encore à 6,1 ans (162). Le délai entre contamination et réalisation du dépistage impacte fortement le délai entre contamination et obtention d'une charge virale indétectable.

A l'échelle individuelle et à long terme, le TARV d'un partenaire séropositif réduit le risque de transmission au partenaire séronégatif mais ne l'élimine pas complètement. Dans une récente étude, le risque de transmission à court, moyen et long terme de HIV dans un couple sérodiscordant a été modélisé en fonction des stratégies utilisées (utilisation du préservatif, traitement du sujet infecté, combinaison du traitement du sujet infecté et de l'utilisation du préservatif) (163). A moyen et long terme, malgré l'utilisation de stratégies combinées, le risque d'infection du partenaire séronégatif ne semble pas nul (163). Plusieurs facteurs peuvent expliquer les quelques échecs comme la compartimentation de HIV et l'existence d'un réservoir de HIV dans le tractus génital.

De plus, il est important d'observer que la plupart des études cliniques de TasP se sont attachées à des couples sérodiscordants, le plus souvent hétérosexuels (plus de 90 % dans l'essai HPTN 052) (153). Le risque accru d'infection par HIV au cours des rapports anaux réceptifs, la prévalence plus importante des infections sexuellement transmissibles, comme la syphilis chez les HSH, conduit à craindre une moindre efficacité de cette stratégie dans cette population. Dans l'étude internationale Partner, dont l'objectif est d'évaluer l'impact d'un TARV sur le risque de transmission dans un couple sérodiscordant, cette stratégie est très efficace dans les couples hétérosexuels, mais son efficacité est plus incertaine chez les

couples HSH (164). Afin d'éclaircir ces résultats, un deuxième volet de l'étude intitulé « Partner 2 » sera poursuivi jusqu'en 2017 chez les couples HSH.



**Figure 8. Cascade de prise en charge de l'infection par HIV en France et dans un comté du Kenya** (d'après Supervie *et al.* The spectrum of engagement in HIV care in France: strengths and gaps. 20<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2013 et Maman *et al.* (158)). (Charge virale contrôlée: CV HIV <40 copies/mL pour la France, <1000 copies/mL pour le Kenya. PVVIH : personnes vivant avec le VIH.).



### **3.4.3. Antirétroviraux et Prophylaxie pré-exposition (PrEP)**

Avec 6000 nouvelles infections par jour dans le monde, les stratégies de prévention de la transmission sexuelle de HIV doivent être combinées. La PrEP utilisant des antirétroviraux constitue une approche intéressante. Les premiers modèles chez les primates ont permis d'établir que l'administration de ténofovir disproxil fumarate et d'emtricitabine avant l'exposition était efficace pour réduire le risque de transmission de HIV par voie génitale et rectale (165). Le premier essai clinique a été publié en 2010 avec l'étude CAPRISA 004 (166). Cette étude menée en Afrique du Sud avait pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un gel topique de Ténofovir 1%, appliqué au niveau vaginal. Les résultats présentés à l'International AIDS Society (IAS) en Juillet 2010 étaient impressionnants en comparaison aux données habituelles des études de prévention de la transmission. Le risque d'infection par HIV était réduit de 39 % dans le groupe utilisant le gel à base de tenofovir. Dès cette première étude, le lien entre observance et efficacité des stratégies de PrEP semble établi. L'efficacité de cette stratégie atteint 54 % dans le groupe de femmes dont l'observance est la plus importante et descend à 28 % dans le groupe de femmes avec l'observance la moins bonne (166). L'utilisation d'un gel vaginal se justifie par des données pharmacologiques, les concentrations vaginales de ténofovir obtenues après une prise orale sont moins importantes que les concentrations observées après l'application du gel de ténofovir à 1 %, évalué dans cette étude (167). Depuis les études de PrEP se multiplient, leurs principaux résultats sont présentés dans le tableau 7. L'efficacité de ces stratégies de PrEP varie en fonction des études. Les études objectivant la plus grande efficacité ont été conduites chez les HSH. Cette stratégie semble moins efficace chez les femmes, plusieurs explications peuvent être avancées : moindre diffusion du TDF dans la muqueuse vaginale que dans la muqueuses anale (168), moindre perception du risque, crainte de la stigmatisation (169). L'observance

est un élément clé de la PrEP (Figure 9). De plus, si lors d'évaluations *in vitro* certains microbicides apparaissent efficaces, le sperme (en particulier du fait du SEVI) semble réduire l'activité de ces composés (antirétroviraux ou des anticorps neutralisant) appliqués localement, expliquant en partie des résultats parfois discordants chez les femmes (170). Seule l'activité du maraviroc semble préservée dans ce contexte (170).

Dans un couple sérodiscordant, le risque de transmission persiste dans les 6 premiers mois de traitement antirétroviral du sujet infecté (171). Ainsi, la PrEP peut aussi être envisagée en association à une stratégie de TasP. Dans une étude conduite au Kenya et en Ouganda dans le Partners Demonstration Project et présentée à la CROI en 2015, l'utilisation du TDF+FTC chez le partenaire séronégatif d'un patient infecté par HIV traité depuis moins de 6 mois par ARV réduit le risque de transmission de 96 % (172). Ces résultats, obtenus dans des pays de haute prévalence avec une cohorte constituée de 33 % de femmes, sont encourageants. Dans cette situation, la PrEP est utilisée en attendant la pleine efficacité du traitement antirétroviral chez le partenaire séropositif.

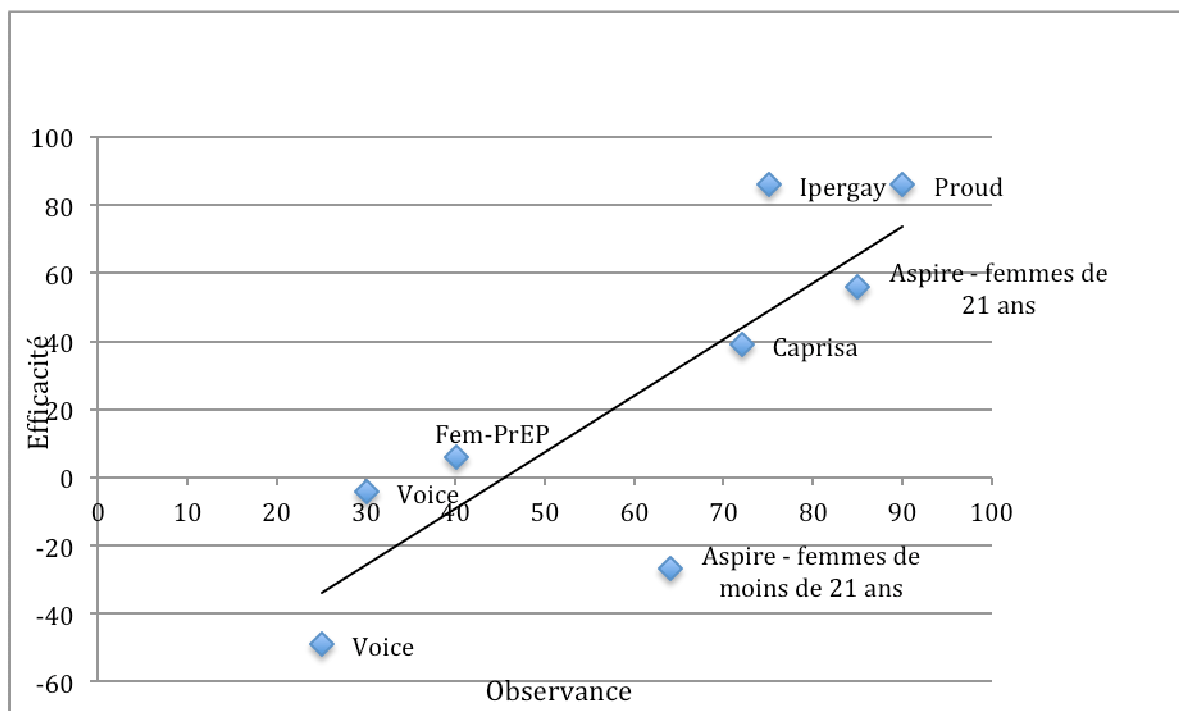


Figure 9. Corrélation entre observance et efficacité dans les principales études de PrEP.

La plupart des études de PrEP reposent sur l'utilisation de l'association d'antirétroviraux : ténofovir et emtricitabine. Des essais sont actuellement en cours avec la rilpivirine en particulier lorsque celle-ci est administrée par voie injectable et à longue durée d'action. Le maraviroc, un antagoniste du récepteur CCR5, est également en cours d'évaluation dans plusieurs études. De même, le cabotégravir, un inhibiteur d'intégrase qui sera aussi disponible par voie injectable et à longue durée d'action, est testé dans des essais pour le moment essentiellement de pharmacocinétique.

L'observance aux PrEP utilisant des antirétroviraux est extrêmement variable en fonction de la population à risque traitée. Les résultats semblent excellents chez les HSH et beaucoup moins bons chez les femmes africaines. Des stratégies basées sur d'autres molécules (antirétroviraux et composés non spécifiques d'HIV) et d'autres mode d'administration (anneau vaginal, hydrogels, nanoparticules, films, comprimés) pourraient limiter les difficultés d'observance (173).

La PrEP est aujourd'hui recommandée chez les HSH rapportant des rapports sexuels non protégés avec des partenaires multiples ou avec des antécédents d'IST, chez les personnes vulnérables ayant des rapports sexuels à risque et chez les personnes transgenres.

La PrEP basée sur les antirétroviraux pose plusieurs questions. Cette stratégie est-elle coût-efficace ? La relation coût-efficacité de la PrEP a surtout été évaluée dans des populations d'HSH à haut risque. Dans cette population, cette stratégie semble coût-efficace, en particulier lorsqu'elle est limitée aux HSH en couple avec un sujet séropositif pour HIV (174). Qui seront les prescripteurs d'une telle stratégie ? Quels seront les effets secondaires de ces médicaments hautement efficaces prescrits à des sujets sains ? Il a été montré que l'exposition au ténofovir en PrEP est associée à une baisse du débit de filtration glomérulaire (175). D'autre part, quel sera l'impact de la PrEP sur l'émergence de résistance aux antirétroviraux, en particulier lorsque le traitement sera poursuivi au cours de laprimo-

infection en cas de transmission ? Des données de résistance ont été recueillies chez les sujets ayant présenté une séroconversion HIV au cours de leur participation à l'étude Partners PrEP (176) . Une résistance à l'emtricitabine (FTC) (M184V) a été décrite chez 57 % des sujets ayant reçu l'association TDF/FTC, alors que le monitoring pharmacologique était en faveur d'une observance (176). Quelle sera l'observance en vie réelle et à très long terme des sujets (177)?

Enfin, les antirétroviraux auraient une efficacité variable sur la transmission de cellule à cellule de HIV qui pourrait être l'un de modes de transmission du virus associé aux cellules au cours de la transmission sexuelle (178). De plus, se pose la question de la transmission des autres IST et du virus de l'hépatite C chez les HSH.

En somme, compte-tenu de leurs limites, l'efficacité majeure de stratégie comme le TasP ou la PrEP ne doit pas pour autant faire oublier les intérêts de stratégies vaccinales ou d'immunothérapie.

Etude	Molécules évaluées	Année de publication	Population étudiée	Réduction du risque	Observance	Echec/ réussite
<b>Caprisa 004 (166)</b>	TDF gel	2010	Femmes Afrique du Sud	39 %	70 %	Réussite
<b>Iprex (179)</b>	TDF-FTC oral	2010	HSH et femmes transgenres	44 %		Echec (objectifs non atteints)
<b>FEM-PrEP(180)</b>	TDF-FTC oral	2012	Femmes Afrique du Sud, Kenya et Tanzanie	6 %	<40 %	Echec
<b>Partners PrEP (181)</b>	TDF oral TDF-FTC oral	2014	Couples sérodiscordants Hétérosexuels en Ouganda et Kenya 62 % d'hommes	67 % 75 %	92 %	Réussite
<b>Voice (182)</b>	TDF oral TDF-FTC oral TFV gel	2015	Femmes Afrique du Sud, Ouganda, Zimbabwe	-49 % -4,4 % 14,5 %	25 à 30 %	Echec
<b>Proud (183)</b>	TDF-FTC oral	2015	HSH au Royaume-Uni	86 %	88 %	Réussite
<b>Ipergay (184)</b>	TDF-FTC oral Intermittente	2015	HSH en France	86 %	72-80%	Réussite
<b>Aspire (185)</b>	Anneau vaginal de dapivirine	2016	Femmes Malawi, Afrique du Sud, Ouganda et Zimbabwe	27 %	60 à 80 %	Efficacité variable dans les différents groupes d'âge

**Tableau 7. Principales études de prophylaxie pré-exposition faisant appel à des antirétroviraux (TFV : ténofovir, TDF : ténofovir disoproxil fumarate, FTC : emtricitabine, HSH : hommes ayant des rapports sexuels avec les hommes).**

### 3.5. Anticorps et vaccins pour prévenir la transmission sexuelle de HIV

#### 3.5.1. Vaccins

L'infection par HIV est une infection avant tout muqueuse. Le premier contact entre HIV et les cellules cibles se fait à ce niveau. La muqueuse génitale ou anale doit donc constituer le premier rempart à l'infection par HIV. L'absence de thérapie curative contre HIV a conduit à ce que la recherche d'un vaccin débute rapidement, mais plus de 30 ans après la découverte de HIV, aucun candidat vaccin n'a atteint les seuils d'efficacité fixés dans les études cliniques.

Les sujets HENI, les patients dits « Elite controllers », capables de maintenir une charge virale indétectable en l'absence de thérapie antirétrovirale, et les patients non progresseurs à long terme constituent des modèles de protection naturelle. Comprendre les mécanismes de leur résistance à l'infection est un élément primordial au développement de stratégies vaccinales. Les mécanismes de résistance mis en évidence dans ces populations particulières sont présentés dans le tableau 8. Une autre population de patients reste à mieux caractériser : les contrôleurs post-traitement. Ils ont été identifiés dès 2010 au sein des patients ayant reçu un TARV dès la phase de primo-infection (186). A l'interruption de celui-ci, ces patients ne développent pas de rebond virologique et leur réservoir cellulaire de HIV est très limité. On estime que près de 15 % des patients traités en primo-infection pourrait être des contrôleurs post-traitement (187).

Les sujets HENI ont rapidement constitué un groupe d'intérêt pour identifier des corrélats de protection, vers lesquels la vaccination devrait tendre. La résistance à l'infection par HIV chez des prostituées kényanes a été décrite en 1996 (188). Plusieurs mécanismes semblent en cause, le premier décrit est une mutation homozygote du gène codant pour le récepteur CCR5 : mutation  $\Delta 32$  CCR5 (189). Cette mutation reste rare chez les sujets noirs et ne constitue donc pas le seul mécanisme protecteur chez les prostituées kényanes. Plusieurs

études ont montré un rôle protecteur d'IgA présentant une spécificité vis-à-vis de certains épitopes du virus et capables de neutraliser sa réplacation, et/ou étant capables d'inhiber la transcytose de particules virales (89–96,100) (tableau 8). De même, l'infection par HIV conduit chez une minorité de patients dits « Elite Neutralizers » à la production d'anticorps neutralisants dans un délai rapide après la contamination (190). Ces anticorps neutralisants agissent sur une grande diversité de souches virales, contrairement à ceux isolés de sujets chroniquement infectés. Ces anticorps d'intérêt pourraient être utilisés en prévention de la transmission sexuelle de deux façons : une immunisation dite passive par transfert par voie générale ou locale d'anticorps neutralisants, ou la vaccination, dont l'objectif est d'obtenir une production prolongée d'anticorps neutralisant par l'individu. L'association d'un vaccin ALVAC-HIV (Vecteur Canaripox exprimant la protéine Gag d'un sous-type B et de la gp120 d'un sous-type recombinant CRF01-AE) au vaccin AIDSVAX constitué d'un antigène de type gp120 d'un virus de sous-type B dans l'essai de phase III RV144, est à ce jour la seule combinaison ayant démontré une efficacité partielle (191). Il s'agit de la plus grande étude de phase III de vaccins préventifs contre l'infection par HIV. Elle a permis de mieux appréhender les facteurs de protection ou de risque de l'infection par HIV sur le plan immunologique. En particulier, le facteur génétique HLA A02 et le polymorphisme des gènes codants les Fc récepteurs contribuent à une protection dans cet essai (105). Les travaux complémentaires ont montré que l'activité neutralisante des Ig dirigées contre HIV obtenues après vaccination n'était pas le facteur majeur de protection (192). Les corrélats de protection, observés dans les études ancillaires, sont essentiellement le développement d'IgG dirigées contre les régions V1-V2 de la gp120 et la capacité des IgG à médier une activité ADCC (193). Au décours de cet essai, la présence systémique d'IgA dirigées contre l'enveloppe de HIV était associée à une réduction de l'efficacité vaccinale, et l'hypothèse

retenue sera celle d'une compétition entre ces IgA et les IgG capables de médier un cytotoxicité des cellules NK sur les cellules infectées (193).

Plusieurs vaccins font l'objet d'études de Phase I, et II. Ces études mesurent la capacité des vaccins à être immunogènes mais n'en évaluent pas l'efficacité à partir d'un critère de jugement dit « dur » : la réduction du risque d'infection par HIV. Une étude de phase III (HVTN 702), dont l'objectif est d'évaluer la réduction du risque, va débiter en Afrique du Sud fin 2016 (données [www.avac.org](http://www.avac.org)).



	Sujets non progressseurs à long terme	Sujets « Elite controllers »	Sujets hautement exposés non infectés
<b>Définition</b>	CD4 durablement > 500 /mm <sup>3</sup> Charge virale HIV < 10 000 copies/mL en l'absence de traitement Progression lente et retardée vers le stade SIDA	CD4 durablement > 500 /mm <sup>3</sup> Charge virale HIV < 50 copies/mL en l'absence de traitement Progression possible et parfois rapide vers le stade SIDA	Sujets qui demeurent séronégatifs malgré des expositions répétées
<b>Facteurs virologiques</b>	Infection par des souches moins virulentes ou mutation précoce au décours de l'infection conduisant à une réduction des capacités répliquatives du virus	Infection par des souches moins virulentes ou mutation précoce au décours de l'infection conduisant à une réduction des capacités répliquatives du virus	
<b>Facteurs génétiques</b>	Polymorphisme de MIP-1 $\alpha$ , CC3L1, RANTES, APOBEC		Polymorphisme de MIP-1 $\alpha$ , CC3L1, RANTES, APOBEC Forte concentration de protéase au niveau de la muqueuse génitale féminine : Lactoferrine, secretory leukocyte protease inhibitor
<b>Rôle de l'immunité innée</b>	Impact du polymorphisme des Toll Like récepteurs, polymorphisme de Mannose-binding Lectin	Maintien du niveau de cellules dendritiques Rôle des Cellules NK	Rôle des cellules dendritiques au niveau muqueux, Rôle des cellules NK au niveau muqueux
<b>Rôle de l'immunité humorale</b>	Faible rôle des anticorps neutralisants mais mise en évidence d'une population d' « Elite Neutralizers »	Faible rôle des Anticorps neutralisant Activité ADCC ?	IgA neutralisantes dirigées contre HIV Inhibition de la transcytose par les IgA Augmentation de l'ADCC par les IgG
<b>Rôle de l'immunité adaptative</b>	Mutation hétérozygote $\Delta$ 32 CCR5 Polymorphismes génétiques des co-récepteurs CCR2 Rôle des lymphocytes T cytotoxiques (Patient HLA-B57, ou HLA-B27)	Maintien des capacités de prolifération des Lymphocytes CD4 ? Maintien des Lymphocytes T-Régulateurs ? Mutation hétérozygote $\Delta$ 32 CCR5 Rôle des lymphocytes T cytotoxiques (Patient HLA-B57, ou HLA-B27)	Mutation homozygote $\Delta$ 32 du co-récepteur CCR5 Prolifération de lymphocytes CD4 au niveau de la muqueuse génitale Réponse lymphocytes T cytotoxiques au niveau de la muqueuse liée à l'exposition à risque

**Tableau 8. Facteurs identifiés comme protecteurs chez les patients non progressseurs, « elite controllers » et HENI (d'après Poropatch et Sullivan (194) , Blankson et al. (195), Poudrier et al. (196)).**

### 3.5.2. Anticorps monoclonaux

Obtenir une réponse immunitaire efficace et surtout des anticorps neutralisants inhibant la majorité des souches de HIV transmises semble difficile. Néanmoins, l'immunisation passive à partir d'anticorps neutralisants constitue une piste en terme de prévention. Les principales cibles des anticorps neutralisants sont les sous-unités gp120 et gp41 de la glycoprotéine d'enveloppe, dont la grande variabilité est à l'origine de la diversité génétique des souches de HIV. Peu d'anticorps présentent un large spectre de neutralisation vis-à-vis d'isolats primaires. Les principaux anticorps monoclonaux possédant ce type de caractéristiques sont présentés dans le tableau 9. A l'heure actuelle, trois d'entre eux sont en cours d'évaluation chez l'homme dans des stratégies d'immunisation passive (essentiellement essai de phase I et II) : VRC01 dans l'essai HVTN 703, 10-1074 essai MCA-0885, et enfin P2G12 essai CRC 282 (données clinicaltrials.gov). Les anticorps 4E10 et le 2F5 ont également été évalués chez l'homme dans des études de phase I essentiellement (197). Dans des modèles de primates non humains, certains de ces anticorps ont été évalués en combinaison en prévention de la transmission sexuelle de HIV (198,199).

Ces anticorps sont spécifiquement dirigés contre HIV et les épitopes cibles sont essentiellement la gp120, et la région MPER de la gp41. Cependant, d'autres stratégies peuvent être envisagées, notamment l'utilisation d'anticorps interférant avec les co-récepteurs de HIV à la surface des cellules cibles (CCR5 et intégrine  $\alpha 4\beta 7$  en particulier). Cette approche a été évaluée récemment dans un modèle macaque en utilisant une eCD4-IgG combinée à un sulfopeptide mimant le co-récepteur CCR5 (200). Cette construction a été insérée dans un vecteur adénovirus puis administrée à 4 macaques. Ces derniers ont ensuite reçu 6 injections par voie intraveineuse de virus à dose croissante. Aucun macaque traité n'a développé d'infection par SIV contrairement à 4 macaques contrôles. L'avantage de cet anticorps est un effet neutralisant sur de nombreux isolats primaires compte-tenu de sa

capacité à se lier à une zone conservée de la gp120, et une capacité de neutralisation à faible concentration. *In vitro*, cet anticorps a montré des capacités de neutralisation supérieures aux anticorps monoclonaux habituellement utilisés : 2F5, VRC01, 10E8 (200). Par ailleurs, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  semblerait, toujours dans un modèle macaque, réduire le risque d'infection après challenge viral par voie vaginale, et, en cas d'infection, impacter la taille du réservoir cellulaire de HIV en particulier au niveau de la muqueuse digestive (201).

Anticorps	Site de reconnaissance de HIV	Dépendance des sites de glycosylation de la gp	Pourcentage des isolats primaires neutralisés
<b>B12</b>	gp120	non	48 %
<b>PG9-PG16</b>	gp120	oui	70-80%
<b>4E10</b>	gp41 MPER	non	96 %
<b>2F5</b>	gp41 MPER	non	58 %
<b>VRC01</b>	gp120	non	90 %
<b>10E8</b>	gp41 MPER		98 %
<b>2G12</b>	gp120	oui	27 %

Tableau 9. Principaux anticorps monoclonaux à large spectre dirigés contre HIV (d'après Hefferon (202))

## **Objectifs de cette thèse**

Ce travail de thèse est dans la continuité de travaux dédiés à la visualisation et la modélisation de l'infection par HIV de la muqueuse mono et pluristratifiée génitale féminine et d'études sur le rôle du sperme dans la transmission.

Dans ce contexte et dans un premier volet, compte-tenu des éléments plaidant pour une transmission de virus associé aux cellules, nous avons souhaité évaluer la compartimentation de HIV dans le sperme, et en particulier dans le réservoir cellulaire. A l'ère du TasP, évaluer la dynamique de ce réservoir cellulaire sous traitement antirétroviral efficace nous semblait important. Dans un second volet, alors que plusieurs travaux au GIMAP se sont intéressés à l'effet de certains composants du plasma séminal (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1) sur la transmission sexuelle de HIV (111,120), nous avons cherché à évaluer le rôle facilitateur (augmentation de la transcytose de particules virales) et/ou protecteur (neutralisation ou effet ADCC).

Cette thèse a été réalisée au sein du groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (EA 3064) de l'Université Jean Monnet, PRES Université de Lyon. La compréhension des mécanismes de transmission sexuelle de HIV, l'étude de la réponse immunitaire mucale vis-à-vis de cet agent et l'évaluation de stratégies de prévention (substances à visée microbicide, immunothérapie et vaccination par voie muqueuse) sont d'importantes thématiques développées au sein du groupe.

## **Patients et méthodes**

## Population étudiée

Les travaux de cette thèse ont été réalisés à partir de prélèvements de sang et de sérum de patients infectés par HIV ou de sujets considérés exposés non infectés.

Les patients infectés par HIV ont été inclus à partir de la cohorte de patients suivis dans le service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Saint-Etienne (Pr Lucht). L'étude était proposée à l'ensemble des sujets de sexe masculin. La période d'inclusion s'est étendue de 2009 à 2014. Le consentement écrit des patients était recueilli. L'étude a reçu l'avis favorable du CPP Sud-Est I. Le seul facteur d'exclusion était l'incapacité à recueillir le consentement du patient (patient sous protection juridique).

Le sperme de sujets non infectés par HIV mais exposés provenait de sujets inclus dans l'étude Ipergay, dans le centre investigateur de Lyon (Pr Chidiac, Dr Cotte). L'étude Ipergay est une étude clinique dont l'objectif était d'évaluer l'efficacité d'une prophylaxie à la demande par Tenofovir disoproxil fumarate et emtricitabine chez des HSH à risque élevé d'infection par HIV. Il s'agissait d'une étude multicentrique, randomisée en double aveugle. Le risque élevé d'infection par HIV était retenu lorsque les sujets rapportaient au moins deux rapports sexuels anaux non protégés dans les 6 derniers mois avant l'inclusion. Les participants à l'étude Ipergay rapportaient en moyenne une dizaine de rapports sexuels dans les 4 semaines précédant l'inclusion et 8 partenaires sexuels différents dans les 2 mois précédant l'inclusion. Nous ne disposons pas de données spécifiques concernant les participants à Ipergay dont les prélèvements de sérum et de sperme ont été utilisés dans notre travail.

## Méthodes

### 1. Echantillons

Le sang a été recueilli par ponction veineuse (environ 4 mL) dans des tubes contenant de l'EDTA. Les PBMC et le plasma sanguin ont été séparés du sang total par gradient de densité (Ficoll Lymphoprep®, Abcys, France). Le plasma sanguin a été recueilli dans certains cas après une simple centrifugation (450 x g pendant 10 min).

Les différentes fractions du sperme ont été séparées (spermatozoïdes, NSMC et plasma séminal) par un gradient de densité Puresperm® (Nidacon, Suède) après centrifugation (400 x g, 20 min). Les NSMC ont été dénombrées sur des cellules de KOVA sous microscope optique, puis aliquotées par million de cellules. Pour certains sujets, une simple centrifugation du sperme a été réalisée pour récolter uniquement le plasma séminal (400 x g, 20 min).

L'ensemble des prélèvements ont été conservés à -80°C pendant toute la durée de l'étude.

### 2. Biologie moléculaire

L'ARN viral a été quantifié par RT-PCR en temps réel dans le plasma sanguin, le plasma séminal et le surnageant de culture cellulaire avec le protocole Abbott m2000 real-time HIV-1 assay (Abbott molecular, Rungis, France).

L'ARN intracellulaire a d'abord été extrait à partir d'aliquots de  $10^6$  cellules (PBMC, NSMC) à l'aide de la trousse RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) puis quantifié en utilisant la trousse Biocentric Generic HIV Viral Load assay (Biocentric, Bandol, France).



Afin d'évaluer l'activité de l'ARN HIV intracellulaire, l'ARNmessenger de *tat/rev/nef* a été amplifié par RT-PCR en deux étapes. Le gène de la  $\beta$ -globine était utilisé comme contrôle interne cellulaire. La taille des produits de PCR obtenus était respectivement de 402, 219, 225 et 203 paires de bases pour *tat, rev, nef* et  $\beta$ -globine (203).

L'ADN total de HIV a été extrait des PBMC et NSMC à partir d'aliqots de  $10^6$  cellules grâce au kit QIAamp® DNA mini Kit (Qiagen). La région Long Terminal Repeat (LTR) a été quantifiée d'après le protocole décrit par Viard *et al.* (204). Une gamme étalon a été utilisée pour établir la courbe standard à partir d'une dilution en série de cellules 8E5 (cellules lymphoblastiques intégrant une copie de HIV par cellule). Le seuil de détection de cette PCR en temps réel a été établi à 100 copies d'ADN/ $10^6$  cellules. Lorsqu'un signal était détecté en PCR mais en dessous de la valeur seuil, le résultat était rapporté comme détecté mais non quantifié.

Afin de quantifier l'ADN HIV intégré, une PCR nichée en temps réel détectant les séquences *alu*-LTR a été réalisée sur un automate Light Cycler (Roche Applied Science) selon le protocole développé par le laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse (Dr Sauné, Pr Izopet). La première PCR a été réalisée à partir d'ADN extrait dilué au  $1/50^{\text{ème}}$  dans 20  $\mu$ L d'un mélange de réactifs contenant les amorces sens L-M667 à la concentration de 100 nM et une amorce Alu primers à la concentration de 300 nM. Le produit de cette première PCR a été dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  dans un mélange contenant des amorces sens Lambda à 500 nM et antisens AA55 M à 500nM associé à une sonde d'hybridation LTR FL à 500 nM. Le nombre de copies d'ADN intégré a été déterminé à partir d'une gamme de dilutions en séries d'un standard d'ADN HIV-1 intégré préalablement décrit (205).

### 3. Culture des NSMC de sujets infectés

Afin d'évaluer la capacité répliquative de HIV-1 contenu dans les NSMC, nous avons cultivé les fractions de NSMC isolées à partir de 3 spermés (détectés positifs pour l'ADN total et intégré de HIV). Les cellules ont été cultivées pendant 7 jours dans un milieu contenant du RPMI et du sérum foetal bovin à 10 %, et un mélange d'antibiotiques. Les NSMC ont été activés à J0 avec de la Phytohémagglutinine A (5µg/mL), de l'interleukine 1 (100pg/mL) et du récepteur à l'interleukine 2 (50 U/mL). Le milieu était remplacé quotidiennement. A J7, les surnageants ont été récoltés et la charge virale HIV-1 a été mesurée dans ces surnageants par RT-PCR.

### 4. Quantification des cytokines

Afin d'évaluer l'impact de l'environnement inflammatoire sur le réservoir viral, les cytokines suivantes : GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-α et IL-10 ont été dosées dans le plasma séminal et le sang par Bio-Plex® Array System (BioRad, Marnes la Coquette, France).

### 5. Dosage des antirétroviraux

Dans la première partie de cette thèse, nous avons cherché à évaluer le réservoir viral de HIV dans le tractus génital masculin de patients contrôlant leur charge virale sanguine sous TARV. Nous avons donc pris en compte la diffusion des antirétroviraux dans le tractus génital masculin en rapportant la concentration mesurée dans le plasma séminal à la concentration mesurée dans le sang au même moment. Les concentrations d'antirétroviraux ont été mesurées dans le sang et le plasma séminal par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (Laboratoire de Pharmacologie, Dr

Gagnieu, CHU de Lyon). Les concentrations mesurées dans le plasma séminal ont été comparées aux concentrations minimales efficaces définies dans le sang.

## **6. Immunoglobulines dirigées contre HIV dans le plasma sanguin et le plasma séminal :**

### **identification, quantification, purification**

La spécificité des immunoglobulines A, G, et M vis à vis de la gp120, gp41, p31, p24 et p17 a été recherchée par ImmunoBlot, en utilisant la trousse commerciale New LAV Blot I Biorad (Marnes la Coquette, France). Ces protocoles ont été adaptés pour détecter les anticorps de type IgG. Pour les IgA et les IgM, nous avons utilisé un conjugué anti-IgA humaine et anti-IgM humaine de chèvre, couplé à la phosphatase alcaline (MP biomedical, Illkirch, France).

Les IgG et les IgA ont été dosées dans le plasma sanguin et le plasma séminal par une technique ELISA « maison ». Une courbe étalon a été réalisée à partir d'un pool de sérum dont le dosage des IgG, IgA avait été réalisé par méthode standardisée au Laboratoire de Biochimie du CHU de Saint-Etienne (ELISA Automatisé).

Les IgG et IgA du plasma séminal ont été purifiées, dans le même temps, sur billes magnétiques composées de protéine G (Thermoscientific, Illkirch, France). Le plasma séminal a été dilué au 1/2 avant d'être purifié. Le rendement de la purification a été évalué par ELISA en comparant la quantité d'Ig obtenue dans l'éluat avec la quantité d'Ig dans le plasma séminal avant purification. Le rendement global a été de l'ordre de 80 %.

## 7. Transmigration des IgG et IgA présentes dans le plasma séminal

Nous avons évalué la capacité des immunoglobulines à traverser un épithélium monocouche. Ces cellules HEC-1A permettent de réaliser un modèle simplifié d'épithélium génital féminin monocouche. Elles ont été cultivées avec du milieu Mc Coy, avec 10 % de serum foetal bovin et des antibiotiques. Les cellules HEC-1A ont été déposées sur des filtres disposés au sein de plaques 6, 24 à 96 puits selon la manipulation. La transmigration a été évaluée dans deux conditions de pH : neutre à 7,4 et acide à 6 (pH observé au niveau vaginal). Des IgA1, IgA2, et IgG couplées à une luciférase (non spécifiques de HIV), précédemment décrites pour leur capacité à franchir une monocouche cellulaire par transcytose (Invivogen, Toulouse, France) ont été utilisées dans un premier temps (206). Ces immunoglobulines ont été placées au niveau du pôle apical, puis la luminescence a été évaluée dans le milieu basal et le milieu apical après 24 heures de contact entre Ig et cellules HEC-1A. La luminescence étant corrélée à la concentration des Ig, le rapport de concentration entre pôle apical et pôle basal a été établi afin d'évaluer le pourcentage d'Igs ayant traversé la monocouche. L'intégrité de cette dernière a été évaluée de deux façons différentes : (1) mesure de la résistance électrique transépithéliale avant et après transmigration, (2) utilisation de billes fluorescentes de 0,2  $\mu\text{m}$ . Nous avons, dans un second temps, effectué la même manipulation en ajoutant du plasma séminal de sujets infectés par HIV contenant des Ig G et de des IgA spécifiques de HIV afin de mettre en évidence un éventuel effet de compétition entre les IgA1, IgA2 et IgG et les Ig du plasma séminal. Dans un dernier temps, nous avons réalisé la même manipulation de transcytose, en utilisant du plasma séminal seul. La révélation des Igs du plasma séminal ayant transmigré a été réalisée par western blot à partir des milieux recueillis au pôle basal et au pôle apical.

## 8. Test de Neutralisation

L'effet neutralisant des anticorps du plasma séminal a été évalué sur des cellules reportrices TZM-bl et en utilisant deux pseudovirus, l'un avec un tropisme pour le co-récepteur CXCR4 (LAI), dilué au 1/1000, le second présentant un tropisme pour le co-récepteur CCR5 (SF162), dilué au 1/600. Les manipulations ont été effectuées à partir de 3 pools d'anticorps. Le premier était constitué d'Ig purifiés provenant du plasma séminal de 6 patients chroniquement infectés. Le deuxième était composé de plasmas séminaux de 4 patients HENI. Le troisième était constitué de 2 plasma séminaux de patients HENI, contenant des IgA mis en évidence par western-blot . Après incubation des cellules à 37 °C pendant 48 heures en présence du virus et des anticorps, la luminescence a été mesurée dans les surnageant à l'aide d'un luminomètre, (Berthold, Allemagne). Nous avons retenu un effet neutralisant lorsque nous observions une réduction de 2/3 au moins de la luminescence par rapport au contrôle (cellules +virus).

## Résultats

**Article 1. Persistent but not replicating HIV-1 cell-associated DNA in semen of long-term ART experienced men**

# Persistent but not replicating HIV-1 cell-associated DNA in semen of long-term ART experienced men

Amandine Gagneux-Brunon<sup>a,b</sup>, Dorsaf Nasri<sup>a,c†</sup>, Rachel Terrasse<sup>a†</sup>, Karine Sauné<sup>d</sup>, Marie-Claude Gagnieu<sup>c</sup>, Anne Frésard<sup>b</sup>, Olivier Delezay<sup>a</sup>, Jacques Izopet<sup>d</sup>, Bruno Pozzetto<sup>a,c</sup>, Frédéric Lucht<sup>a,b</sup> and Thomas Bourlet<sup>\*a,c</sup>



<sup>a</sup> Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes–GIMAP EA3064, CIC1408, Université de Saint-Etienne, Université de Lyon, Saint-Etienne, France; <sup>b</sup>Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France; <sup>c</sup>Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France; <sup>d</sup>INSERM U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, France; <sup>e</sup>Laboratoire de Pharmacologie, Centre Hospitalo-Universitaire de Lyon, France. †Participated equally to this work

**Background.** The semen of HIV-1 infected men represents the main vector of HIV-1 spread following sexual transmission of cell-free or cell-associated virions. **Objective.** The present study aimed to assess the impact of HAART on HIV-1 RNA/DNA and on inflammatory environment in the semen of long-term HAART-experienced men. **Methods:** Forty-five paired samples of semen and blood were obtained from 37 consenting men, 10 untreated and 27 under HAART. Blood and seminal HIV RNA and DNA loads were quantified by the Abbott RealTime m2000rt assay and an in-house real-time PCR protocol, respectively. Tat/rev/nef intra-cellular mRNA was tested by qualitative PCR. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, GM-CSF and TNF $\alpha$  were quantified in 20 paired samples by Bio-plex® assay. **Results:** No semen was found HIV RNA positive in men under HAART. Twenty-six percent of semen samples from HAART-experienced men remained positive for HIV DNA. Seminal HIV DNA was significantly associated with the duration of infection and the HIV DNA load in blood. No seminal mononuclear cells were found positive for intracellular HIV RNA in HAART experienced men. All the tested chemokines exhibited significantly higher concentration in semen than in blood in both treated and untreated men. No effect of HAART on cytokines/chemokines loads was observed. **Conclusion.** These results demonstrate the efficacy of HAART on the reduction of seminal RNA HIV-1 loads despite the persistence of local inflammation. Moreover, in our hands the seminal cell-associated virus reservoir was not reactivated in an inflammatory environment.

**Keywords:** HIV-1; semen; viral load; antiretroviral therapy; HIV DNA; genital tract.

## 1. INTRODUCTION

Worldwide, semen represents the main vector for HIV-1 spreading. It is well established that the risk of sexual transmission is associated with a high blood HIV-RNA load [1]. In serodiscordant couples, the early treatment of the infected partner reduces dramatically the risk of HIV-1 transmission [2]. The success of this so-called "treatment as prevention" (TasP) strategy may be related to the efficacy of HAART on the reduction of HIV RNA viral loads. However, discrepancies between blood and seminal HIV viral loads are reported in different clinical studies, suggesting the existence of intermittent shedding of HIV-1 in semen, related to a local replication in the genital reservoir [3–10]. Several factors have been associated with a persistence or a reactivation of HIV replication in semen, namely sexually transmitted infections (STI), genital inflammation, high-risk sex

behavior, and, recently, cannabis use in men who have sex with men (MSM) [11–13].

The effect of HAART on seminal HIV DNA reservoir has been poorly investigated. Nevertheless, this point is crucial since several studies have recently suggested that seminal cell-associated particles are preferentially transmitted through the cervicovaginal mucosa [14–16].

At the era of TasP combined to an early initiation of HAART, it is essential to evaluate the efficacy of prolonged therapy on HIV shedding in semen. Our study aimed to assess the impact of HAART on HIV-1 RNA and DNA, and on inflammatory environment in the semen of long-term treated men.

\*Address correspondence to this author at the GIMAP, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Faculté de Médecine J. Lisfranc 42023 Saint-Etienne, Cedex 02, France;



## 2.1 Patients

Thirty-seven consenting HIV-1 infected men followed at the Infectious Diseases Department of the University Hospital of Saint-Etienne were enrolled. The following criteria were collected: age, clinical stage, route of transmission, duration since the diagnosis of HIV-1 infection, duration of HAART, history of STI.

## 2.2 Methods

### 2.2.1. Samples

Forty-five paired samples of semen and blood were obtained. Semen was collected by masturbation into a sterile container after at least 24h of sexual abstinence. Three men gave sequential samples. Blood was collected in EDTA-coated tubes. Samples were processed within 4h of collection. Blood plasma and PBMC fractions were separated by gradient of density (Lymphoprep™, Stemcell Technologies, Grenoble, France). The seminal plasma was collected after centrifugation of one milliliter of semen at 800xg for 10 min. The non spermatozoal mononuclear cell (NSMC) fraction was collected after centrifugation through a three-layer discontinuous Pure-Sperm® gradient (Nidacon, Gothenburg, Sweden) and washing three-times in BM1 medium (Ellios Biotek Laboratories, Paris, France). All fractions were stored at -80°C until use.

### 2.2.2. Quantification of HIV-1 RNA

HIV-1 RNA was quantified in blood, seminal plasma and culture supernatants by the Abbott m2000 real-time HIV-1 assay (Abbott molecular, Rungis, France). Intracellular RNA was extracted from aliquot fractions of 10<sup>6</sup> cells by the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified by the Biocentric® Generic HIV Viral Load assay (Biocentric®, Bandol, France).

Detection of HIV *tat/rev/nef* mRNA in PBMC and NSMC

*Tat/rev/nef* mRNA was amplified by using a two-step RT-PCR protocol, as previously described [17]. The size of the PCR products was 402, 219-225 and 203 bp for *tat*, *rev*, *nef* and  $\beta$ -globin, respectively.

### 2.2.3. Quantification of HIV-1 total DNA

Total DNA was extracted from aliquot fractions of 10<sup>6</sup> cells by the QIAamp® DNA mini Kit (Qiagen) and LTR HIV-1 DNA was quantified by real-time PCR, according to a protocol described by Viard et al [18]. The quantification was done by reference to a standard curve based on serial dilutions of 8E5 cells. Results were expressed as number of DNA copies/10<sup>6</sup> cells. The threshold of detection was established at 100 copies

(data not shown). When a signal was detected under this threshold, the result was considered as “detected but not quantified”.

### 2.2.4. Quantification of HIV-1 cell-integrated DNA

A real-time nested PCR assay detecting alu-LTR sequences was performed on a Light-Cycler Instrument (Roche Applied Science). Briefly, the first round of PCR was carried out from cell DNA diluted 1:50 in a 20  $\mu$ l reaction mixture comprising 100 nM L-M667 forward and 300 nM Alu primers, respectively. The PCR products were then diluted 1:10 in a reaction mixture comprising 500 nM Lambda forward, AA55 M 500 nM reverse primers and 500 nM LTR FL hybridization probe. The integrated HIV DNA copy number was determined in reference to a standard curve generated by serial dilutions of an integrated HIV DNA standard, as described elsewhere[19].

### 2.2.5. Culture of NSMC fractions

Three NSMC fractions-tested positive for HIV DNA were cultivated for 7 days in RPMI 1640 supplemented with 10%-fetal bovine serum and antibiotics and activated at day 0 by PHA (5 $\mu$ g/ml), IL1 (100 pg/ml) and rIL-2 (50 U/ml). The medium and IL-2 were replaced daily. At day 7, supernatants were recovered and tested for HIV-1 RNA loads.

### 2.2.6. Quantification of cytokines

GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- $\alpha$  and IL-10 factors were quantified in blood and seminal plasma by using the Bio-Plex® Array System (BioRad, Marnes la Coquette, France).

### 2.2.7. Dosage of antiretroviral drugs

The concentration of antiretroviral (ARV) drugs was determined in 20 paired samples of blood and seminal plasma by HPLC/MS/MS. Their rate of diffusion in MGT was obtained by calculating the [seminal plasma concentration]/[blood plasma concentration] ratio. The observed concentrations in seminal plasma were compared to the minimal efficient concentration (MEC) defined in blood.

### 2.2.8. Statistical analysis

A chi-square test was used for the comparison of categorical variables. Student T or non-parametric Mann-Whitney tests were used for the comparison of continuous variables. Statistical analyses and box-plot diagrams were done by using the R Studio program.

## 3. RESULTS

### 3.1 Patients' characteristics

Thirty-seven men participated to the study, 27 under HAART (median of duration: 8 years and 9 months [6 months-19 years]) and 10 untreated. Mean age was 45.4 ( $\pm 7.5$ ) years in patients receiving HAART, and 41.6 ( $\pm 8.4$ ) years in HAART naïve patients ( $p=0.22$ ), time since diagnosis of HIV infection was respectively 9.41 ( $\pm 5.9$ ) and 4.5 ( $\pm 4.4$ ) years in HAART recipients and HAART naïve patients ( $p=0.03$ ), blood CD4 positive cells count was not significantly different between the two groups ( $654 \pm 260$  vs  $504 \pm 377$ ). Routes of transmission by HIV were homosexual (27), heterosexual (7), intra-venous drug injection (1), blood products transfusion (1) and unknown (1). No clinical STI was evidenced at the time of sampling for any patient.

### 3.2 Effect of HAART on HIV RNA and DNA loads in blood and semen

The mean (sd) of HIV RNA load in blood was 165,700 (839,159), 744,980 (1,740,090) and 160 (520) copies/ml in all 37, 10 untreated and 27 HAART-treated men, respectively. Three out of 9 (33.3%) semen from untreated and none from HAART-treated men were found positive for HIV RNA (positive values: 170, 2235 and 7570 copies/ml).

Total HIV DNA was detected positive in 20 out of 34 (58.8%) [ $<100$ -271,405 copies/ $10^6$  cells] and in 6 out of 9 (66.6%) [ $<100$ -26176 copies/ $10^6$  cells] PBMC fractions of treated and untreated patients, respectively. It was detected positive in 9 out of 34 (26.5%) [ $<100$  detected-271,405 copies/ $10^6$  cells] and in 2 out of 10 (20%) [ $<100$  detected-26176 copies/ $10^6$  cells] NSMC fractions of treated and untreated patients, respectively.

HIV RNA loads in blood and semen of untreated men were strongly correlated ( $r=0.93$ ,  $p<0.005$ ). PBMC and NSMC HIV DNA loads were correlated in all patients ( $r=0.85$ ,  $p<0.05$ ).

The following parameters were significantly higher in untreated than in treated men: duration of infection and HIV RNA loads in blood and semen. No difference was found for HIV DNA loads in PBMCs and NSMCs between treated and untreated patients. In all patients, the means of concentrations of GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- $\alpha$  pro-inflammatory and IL-10 anti-inflammatory factors were significantly higher in semen than in blood. No effect of HAART was observed on these factors neither in blood nor in semen (Figure 1).

### 3.3 Parameters associated with the presence of HIV DNA in semen (Table 1)

The following parameters were found associated with the presence of HIV DNA in sperm of HAART

experienced men: duration since HIV diagnosis without HAART and total HIV DNA in blood at the time of sampling. Higher concentrations of pro-inflammatory cytokines were quantified in semen exhibiting HIV DNA, but the differences were not statistically significant between the 2 studied groups.

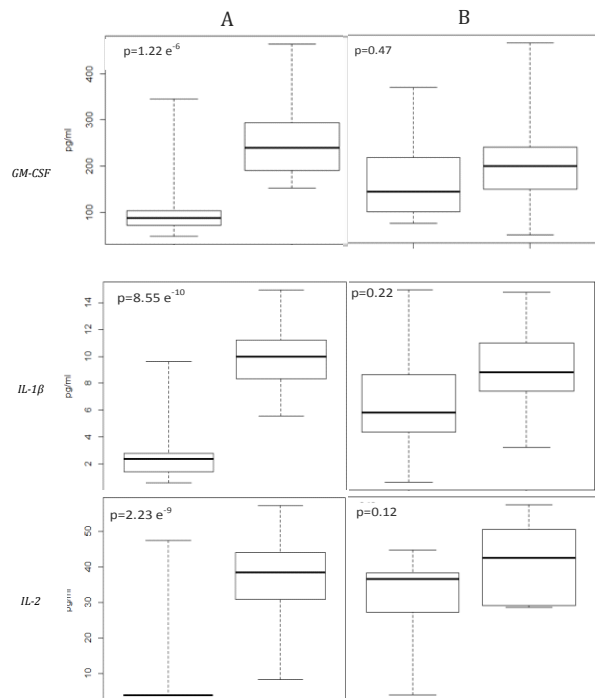
### 3.4 Diffusion of antiretroviral drugs in semen

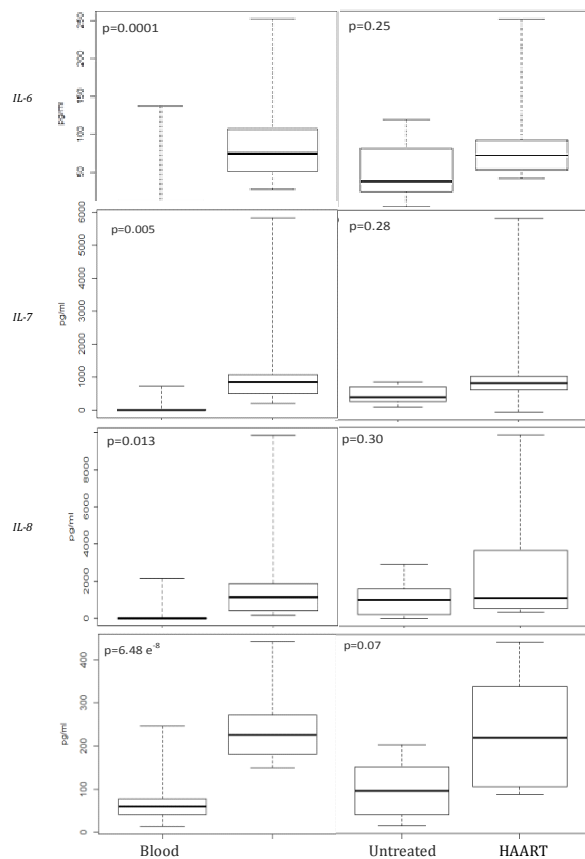
ARV drug concentrations were obtained for 19 men. The ratio between seminal and blood concentrations was superior than 1 for RAL, TFV, FTC and 3TC. None, one, and more than 2 out of 3 drugs, reached the MEC in the semen of 2, 5 and 10 men, respectively. In all patients receiving a TDF/FTC combination, the MEC was reached in semen. The diffusion rate of ARV drugs was not associated with HIV in semen.

### 3.5 Markers of viral replication in NSMC fractions (Table 2)

Integrated HIV DNA was quantified in 3 NSMC fractions tested positive for total HIV DNA. The integrated/total DNA ratio was 0.94 and 0.44 in 2 treated men and  $<0.05$  in an untreated one. One NSMC fraction was found positive for intracellular HIV RNA (untreated patient). The *tat/rev/nef* mRNA was detected in 6 out of 7 NSMC fractions.

To check the ability of HIV DNA to produce particles, batches of 500,000 NSMCs from 3 HIV DNA positive samples (patients 1, 7 and 8) were cultured 10 days with IL-1 $\beta$  and rIL-2. No RNA production was detected in culture supernatants at day 10.





**FIG. (1).** Concentration of chemo cytokines in blood and semen of all patients (column A) and in semen of ART experienced vs untreated men (column B); p values were calculated by using Student t test, boxplots display whiskers with min and max values.

**Table 1.** Univariate analysis of risk factors associated with the presence of HIV DNA in the semen of the 27 HAART experienced men.

HIV genotype (n)			
<i>B</i>	6	8	0.07
<i>Non B</i>	4	0	
Peripheral CD4 cells count (/mm <sup>3</sup> ) <sup>c</sup>			
Mean (sd)	318 (191)	230 (125)	
<200 (n)	3	4	0.25
>200 (n)	13	4	0.51
Total HIV DNA in blood (logcopies/10 <sup>6</sup> cells)			
Mean (sd)	2.72 (1.12)	2 (0.43)	<b>0.04<sup>b</sup></b>
Cytokines in blood (pg/l)			
Mean (sd)			
<i>IL-1β</i>	1.67 (0.94)	2.58 (0.70)	0.14
<i>IL-2</i>	2.08 (0.21)	<2	0.45
<i>IL-6</i>	7.18 (4.11)	10.27 (3.39)	0.25
<i>IL-8</i>	12.61 (6.87)	11.96 (4.42)	0.87
<i>IL-10</i>	15.93 (7.55)	14.77 (3.76)	0.79
<i>TNF-α</i>	2.65 (3.97)	1.76 (1.53)	0.68
	48.27 (27.54)	70.58 (24.5)	0.23
Cytokines in semen (pg/l)			
Mean (sd)			
<i>IL-1β</i>	9.06 (3.49)	10.17 (1.68)	0.58
<i>IL-2</i>	29.41 (11.48)	39.34 (7.56)	0.17
<i>IL-6</i>	52.14 (48.45)	89.78 (48.45)	0.12
<i>IL-7</i>	20.56 (20.56)	781 (314)	0.54
<i>IL-8</i>	661 (274)	1244 (1228)	0.61
<i>IL-10</i>	910 (761)	49.21 (2.91)	0.08
<i>TNF-α</i>	45.60 (3.88)	234 (48)	0.16
	188 (44)		
≥ 2 ARV drugs over the threshold of therapeutical conc. in semen (n/%)	12/80	4/66.6	0.48

n: number tested; <sup>a</sup> delay between HIV seropositivity diagnosis and start of HAART; <sup>b</sup> by Mann Whitney test; <sup>c</sup> at the time of starting HAART.

Criteria	HIV DNA in semen		P
	Negative	Positive	
Duration of infection without HAART <sup>a</sup> Median in months [range] (n)	1 [1-96] (18)	4 [1-120] (9)	<b>0.04<sup>b</sup></b>
Duration of HAART Median in months [range] (n)	132 [6-228] (18)	94 [14-228] (9)	0.47 <sup>b</sup>
Period with detectable RNAemia Median in months [range] (n)	25 [1-192] (18)	63 [1-144] (9)	0.25 <sup>b</sup>
AIDS clinical stage <sup>c</sup> (n/%)	4/18	5/9	0.29
Route of transmission (n)			0.90
MSM or bisexual	12	6	
Heterosexual	5	2	
Others	1	1	

### 3.6 Sequential longitudinal samples

Sequential paired samples were obtained from 3 men. Five seminal specimens were obtained from the first case, one before and 4 after the initiation of HAART. Seminal viral loads were 3.35 logcopies/ml before and not detected at months 1, 2, 6 and 9 after initiation of HAART. HIV DNA in NSMCs was not detected in any sample. Four samples were obtained from the second case, one before and 3 after the initiation of HAART. Seminal viral loads were 3.88 log copies/ml before and not detected at months 1, 3 and 6 after HAART initiation. HIV DNA was detectable but under 100 copies/ml in NSMCs before therapy and undetectable after. In the third case, 2 samples were obtained, one before and another 12 months after the initiation of

HAART. Seminal viral loads were  $<0.6$  logcopies/ml in both samples. The HIV DNA value was 2.16 log copies/ml in the first sample and could not be tested on the second one (insufficient quantity of cells).

#### 4. DISCUSSIONS

Our study aimed to investigate the effect of HAART on HIV in semen of long-term treated men. We confirmed that HAART is effective to reduce HIV-1 RNA load in semen, since none of the 27 HAART-experienced MSM was positive for HIV RNA in semen, contrary to previous studies reporting a residual replication in a weak proportion of treated patients [3, 6–8, 10] (Table 3). The mean duration of drugs exposure in our patients was greater than 8 years. It is in accordance with other studies suggesting that HAART exposure exceeding three years is effective to reduce HIV-1 shedding in semen [20]. The absence of viral free particles in our patients could also be explained by a low baseline seminal viral load (data not available), in agreement with Marcelin et al who suggested that seminal HIV shedding in men under HAART could be correlated to the baseline seminal viral load before HAART [5]. Three men were prospectively tested for the presence of HIV in semen before and until 12 months after initiation of HAART. No reactivation or intermittent shedding of HIV RNA in semen was observed in these 3 men. These findings are in agreement with those of other studies [21, 22] but not with that of Sheth et al. [7] describing isolated seminal HIV shedding in 48% of men, within 6 months after starting HAART, with a close relationship between the baseline seminal viral load before HAART (at least 4 logcopies/ml) and these isolated shedding. In our study, the absence of viral free particles in HAART-experienced men could be explained by a low baseline seminal viral load (although this data was not available for confirming this hypothesis). As described by Osborne et al., the duration of HAART seems to play a major role in the reduction of intermittent shedding in semen since no isolated shedding was observed in subjects from this study after 3 years of HAART [20]. Our findings are in agreement with this observation since the median of HAART duration was more than 8 years. The time intervals between samples seems have to be taken into consideration since intermittent shedding of HIV-1 in semen was recently reported by analyzing semen sampled at short intervals (1 hour) [13].

We failed to observe an association between inflammatory environment and HIV-1 shedding in semen, in contrast with a previous study [11]. Higher concentrations of GM-CSF, of pro-inflammatory IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, TNF- $\alpha$  and of anti-inflammatory IL-10 cytokines/chemokines were observed in semen than in blood. No differences were found between seminal cytokine levels of treated and untreated

patients, suggesting a limited effect of therapy on the inflammatory status in this reservoir. Interestingly, a persistent high-level of IL-7 in the semen of HAART-experienced men was found. Similarly, a previous study described levels of IL-7 around 200 times higher in semen than in blood [23]. This cytokine is known to play a role in the persistence of memory T cells potentially harboring cell-associated HIV. It is also well established that primary infection by- or reactivation of- sexually transmitted agents favors HIV-1 replication [24–26]. A significant link between the microbiome load, the level pro-inflammatory cytokines and HIV shedding in semen was recently described [27]. In our study, no clinical STI symptoms were identified at the time of sampling. However, STIs may be asymptomatic and no routine screening was performed.

Achieving optimal ARV drug concentration in seminal reservoir is an important goal to reach for preventing HIV replication. Except for abacavir, our drug concentrations in semen are similar to those of others [28]. However, no clear correlation between seminal drug concentration and HIV RNA shedding could be established, particularly in 7 out of 19 men in whom zero or only one drug reached the MEC. This observation suggests the blood compartment as the primary source of seminal virus. Altogether, these observations address the question of the origin of HIV in semen. Moreover, the definition of MEC of drugs in MGT needs further investigations. In our work, no difference was observed between HIV-1 DNA loads in semen of HAART-treated patients and untreated ones, suggesting the persistence of a seminal cellular reservoir despite therapy. This persistence of HIV-DNA in NSMC has already been described [26]. Interestingly, in one patient treated at the time of primary infection, we did not detect HIV-1 DNA in NSMC at the time of HAART initiation and 6 months after. By contrast, HIV-1 DNA remained detectable in the semen of patients starting HAART at later stages of infection (data not shown). Early HAART may contribute to a reduction of seminal reservoir of HIV. We observed strong correlations between HIV-1 RNA viral load in blood and semen, and between HIV-1 DNA viral load in blood and semen. In a recent study, HIV-1 RNA in semen of HAART treated patients was associated with HIV-1 DNA in PBMC, and cannabis use [13]. Both observations encourage using HIV-1 DNA load in PBMC as a predictive marker of HIV-1 in semen.

High percentage values of hiv dna integrated forms were obtained in nsmc fractions. Moreover, no intracellular rna could be quantified in these fractions. At the opposite, *tat/rev/nef* mrna was detected in all but one of these cell fractions. This could be due to the retention of mrna in the nucleus of resting cells, as previously described [27]. These observations are

consistent with the work of nunnari et al., suggesting that hiv persistence in nsmcs of haart-experienced men is mostly due to proviral latency [29]. As the ability of the seminal provirus to be reactivated and to produce cell-free virions is of high importance, we attempted to cultivate hiv dna positive nsmc batches stimulated by inflammatory cytokines. In our hands, no viral production was observed until 10 days of culture. Our goal was to check the ability of nsmcs to produce free particles under an inflammatory environment, as that caused by an sti agent. We did not analyze the cell to cell transmission from hiv positive seminal cells. It was previously shown that hiv could be successfully transmitted from nsmcs to fresh pbmcs despite effective haart, although no hiv-1 ltr forms, signs of newly infected cells, was detected [29, 30]. In this study, the mean duration of undetectable viral load in blood was only 41 months (more than 8 years in our).

## CONCLUSION

Our results confirm the ability of HAART to control HIV loads in semen and are reassuring in the context of a long-term HAART experienced population, without evidence of concomitant STI. In this situation, the absence of HIV RNA in the semen could be explained by several independent or cumulated mechanisms: (i) the cell-free viruses present in semen originate mainly by passive diffusion from blood, (ii) the absence of HIV replication in NSMC is linked to local efficient ARV concentrations, (iii) the amounts of pro- and anti-inflammatory factors are well balanced in semen and (iv) the absence of co-infection by STI agents is an additional reason for the absence of HIV reservoir reactivation.

We also demonstrated the poor impact of haart on hiv-1 dna in the semen of men diagnosed at chronic stages of hiv-1 infection. The present data plead for an early initiation of haart in patients recently infected, to limit the size and the risk of reactivation of the hiv proviral reservoir in mgt. Ambitious policies of hiv-1 testing during early stages of infection are needed to reinforce the efficacy of tarp strategies.

## 5. ETHICAL APPROVAL

This study was approved by the Ethical Committee Sud-Est 1.

## CONFLICT OF INTEREST

Competing interests: none declared.

Funding: this work was supported by University of Saint-Etienne and Lyon, and by Saint-Etienne Metropole.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Dr Marius Dorkenoo for excellent assistance in statistical analysis.

## REFERENCES

- [1] Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2009; 23: 1397–1404.
- [2] Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, *et al.* Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *New Engl J Med* 2011; 365: 493–505.
- [3] Zhang H, Dornadula G, Beumont M, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1998; 339: 1803–9.
- [4] Bujan L, Daudin M, Alvarez M, *et al.* Intermittent human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) shedding in semen and efficiency of sperm processing despite high seminal HIV-1 RNA levels. *Fertil Steril* 2002; 78: 1321–3.
- [5] Marcelin A-G, Tubiana R, Lambert-Niclot S, *et al.* Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS* 2008; 22: 1677–9.
- [6] Pasquier CJ-M, Moinard N, Sauné K, *et al.* Persistent differences in the antiviral effects of highly active antiretroviral therapy in the blood and male genital tract. *AIDS* 2008; 22: 1894–6.
- [7] Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, *et al.* Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009; 23: 2050–4.
- [8] Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, *et al.* Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle. *PLoS ONE* 2010; 5: e10569.
- [9] Dulioust E, Leruez-Ville M, Guibert J, *et al.* No detection of HIV 1-RNA in semen of men on efficient HAART in the past 4 years of a 2002-2009 survey. *AIDS* 2010; 24: 1595–8.
- [10] Ferraretto X, Estellat C, Damond F, *et al.* Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *PLoS ONE* 2014; 9: e88922.
- [11] Politch JA, Mayer KH, Welles SL, *et al.* Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men. *AIDS* 2012; 26: 1535–43.
- [12] Mayer KH, Wheeler DP, Bekker L-G, *et al.* Overcoming biological, behavioral, and structural vulnerabilities: new directions in research to decrease HIV transmission in men who have sex with men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63 Suppl 2: S161–7.

- [13] Ghosn J, Leruez-Ville M, Blanche J, *et al.* HIV-1 DNA levels in peripheral blood mononuclear cells and cannabis use are associated with intermittent HIV shedding in semen of men who have sex with men on successful antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 1763–70.
- [14] Anderson JA, Ping L-H, Dibben O, *et al.* HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms. *PLoS Pathog* 2010; 6(8): 1001053.
- [15] Sallé B, Brochard P, Bourry O, *et al.* Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2010; 202: 337–44.
- [16] Lawrence P, Portran D, Terrasse R, *et al.* Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. *AIDS* 2012; 26: 785–96.
- [17] Zhang J, Crumpacker CS. Human immunodeficiency virus type 1 RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients receiving prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 184: 1341–4.
- [18] Viard J-P, Burgard M, Hubert J-B, *et al.* Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS* 2004; 18: 45–9.
- [19] Brussel A, Sonigo P. Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol* 2004; 78: 11263–71.
- [20] Osborne BJW, Sheth PM, Yi TJ, *et al.* Impact of antiretroviral therapy duration and intensification on isolated shedding of HIV-1 RNA in semen. *J Infect Dis* 2013; 207: 1226–34.
- [21] Leruez-Ville M, Dulioust E, Costabliola D, *et al.* Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study (ANRS EP012). *AIDS* 2002; 16: 486–8.
- [22] Barroso PF, Schechter M, Gupta P, *et al.* Effect of antiretroviral therapy on HIV shedding in semen. *Ann Intern Med* 2000; 133: 280–284.
- [23] Lisco A, Munawwar A, Introini A, *et al.* Semen of HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. *J Infect Dis* 2012; 205: 97–105.
- [24] Chu K, Jiamton S, Pepin J, *et al.* Association between HSV-2 and HIV-1 viral load in semen, cervico-vaginal secretions and genital ulcers of Thai men and women. *Int J STD AIDS* 2006; 17: 681–6.
- [25] Manhart LE, Mostad SB, Baeten JM, *et al.* High Mycoplasma genitalium organism burden is associated with shedding of HIV-1 DNA from the cervix. *J Infect Dis* 2008; 197: 733–6.
- [26] Gianella S, Massanella M, Richman DD, *et al.* Cytomegalovirus Replication in Semen is Associated with Higher Levels of Proviral HIV DNA and CD4+ T cell Activation during Antiretroviral Treatment. *J Virol* 2014; 88: 7818–27.
- [27] Liu CM, Osborne BJW, Hungate BA, *et al.* The Semen Microbiome and Its Relationship with Local Immunology and Viral Load in HIV Infection. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004262.
- [28] Else LJ, Taylor S, Back DJ, Khoo SH. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract. *Antivir Ther* 2011; 16: 1149–67.
- [29] Nunnari G, Otero M, Dornadula G, *et al.* Residual HIV-1 disease in seminal cells of HIV-1-infected men on suppressive HAART: latency without on-going cellular infections. *AIDS* 2002; 16: 39–45.
- [30] Coombs RW, Speck CE, Hughes JP, *et al.* Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *J Infect Dis* 1998; 177: 320–30.

**Table 2.** Virological markers in 8 semen from men tested positive for RNA or DNA in seminal plasma or NSMC.

Patient	ARV regimen		RNA VL in semen	Total DNA logcopies/ml	Integrated/Total DNA ratio	Intracellular RNA	<i>Tat, rev, nef</i> mRNA	NSMC culture
	Ongoing therapy	Duration (months)						
1	FTC/TFV/EFV	14	<1.6	2.39	0.94	<1.6	POS	Negative
2	None	/	3.35	<2	nd	<1.6	POS	nd
3	FTC/TFV/EFV	48	<1.6	<2d <sup>1</sup>	nd	<1.6	NEG	nd
4	FTC/TFV/EFV	60	<1.6	<2d	nd	<1.6	POS	nd
5	FTC/TFV/EFV	31	<1.6	<2d	nd	<1.6	POS	nd
6	None	/	3.88	<2d	nd	POS	POS	Nd
7	FTC/TFV/DRV/RAL	176	<1.6	2.39	0.44	IQ	IQ	Negative
8	None	/	<1.6	2.16	<0.05	<1.6	POS	Negative

ARV: antiretroviral; VL: viral load; nd: not done; NSMC: non spermatozoal mononuclear cells; IQ: insufficient quantity; FTC: emtricitabine; TFV: tenofovir; EFV: efavirenz; DRV: darunavir; RAL: raltegravir.

<sup>1</sup> detected but not quantified (signal under the threshold of 100 copies/10<sup>6</sup> cells).

Authors	Date	Study population	End-point	Prevalence of HIV shedding
Zhang <i>et al.</i> [3]	1998	Patients under ART with undetectable blood HIV-RNA load N=7	HIV-DNA in semen Culture of HIV from seminal cells	4/7 2/3
Nunnari <i>et al.</i> [29]	2002	Patients receiving HAART N=28	HIV-1 2LTR circular DNA Culture of HIV from semen	8%
Bujan <i>et al.</i> [4]	2004	Assisted reproduction program N=94 (281 samples)	HIV-1 RNA	14% of the samples
Marcelin <i>et al.</i> [5]	2008	Assisted reproduction program N= 145	HIV-1 RNA	5%
Sheth <i>et al.</i> [7]	2009	Men starting HAART N=25	HIV-1 RNA	48%
Halfon <i>et al.</i> [8]	2010	Assisted reproduction program N=332 (394 samples) Blood HIV-RNA <50 copies/mL for at least 6 months	HIV-1 RNA	3% of samples
Duloust <i>et al.</i> [9]	2010	Assisted reproduction program N=541 men (1049 samples)	HIV-1 RNA	0%
Politch <i>et al.</i> [11]	2012	MSM Receiving HAART N=101	HIV-1 RNA	30% (overall) and 25% undetectable blood HIV-RNA
Osborne <i>et al.</i> [20]	2013	MSM receiving HAART (standard or intensive) N= 38 (116 samples)	HIV-1 RNA	16.4% of the samples
Gianella <i>et al.</i> [26]	2013	MSM receiving HAART with undetectable blood HIV-RNA load N=100	HIV-1 RNA	6%
Ferraretto <i>et al.</i> [10]	2014	Assisted reproduction program N=88	HIV-1 RNA	19.3%
Ghosn <i>et al.</i> [13]	2014	MSM receiving HAART Blood HIV-RNA <50 copies/mL for at least 6 months N=157 a(304 samples)	HIV-1 RNA	7.6% of the samples

Table 3: Principal studies evaluating HIV-1 shedding in HAART treated HIV-infected patients (HAART: highly active anti-retroviral therapies, MSM: men having sex with men, ART: antiretroviral therapies)



Au total, trente sept patients ont été inclus dans l'étude (27 patients traités, 10 patients non traités). La charge virale HIV dans le sperme des sujets traités était indétectable, seulement 3 patients non traités avaient une charge virale HIV > 40 copies/mL dans le plasma séminal. Pour ces 3 patients, la charge virale HIV dans le sang était de 913 000 (sperme 7 570), 20 200 (sperme 2 235), 170 (3 330 copies) copies/mL. Parmi les patients non traités, 3 ont eu des prélèvements après mise sous TARV, dans un délai variant de 2 à 6 mois après mise sous TARV. Dès le premier prélèvement sous TARV, la charge virale HIV dans le plasma séminal était en dessous du seuil de 40 copies/mL. De l'ADN total HIV a été détecté dans les NSMC chez 26,5 % des patients traités, et 20 % des patients non traités. Il n'y avait pas de différence significative entre les patients traités et non traités pour l'ADN total HIV dans les NSMC, ni dans les PBMC. Nous avons mesuré l'ADN HIV intégré dans les NSMC chez 3 patients : 2 patients traités et 1 patient non traité. Chez les patients traités, la proportion d'ADN HIV intégré variait de 44 à 94 %, et n'était que de 5% chez le patient non traité. De l'ARNm *tat/rev/nef* a été identifié dans les NSMC, mais seul un patient non traité présentait une charge virale HIV intracellulaire positive dans les NSMC. Nous avons tenté de réactiver les NSMC de trois sujets traités pour lesquels de l'ADN HIV avait été détecté *in vitro*, et aucune production virale n'a été observée. Le tractus génital masculin constituant un compartiment en part entière, nous avons évalué la diffusion des antirétroviraux dans le sperme en comparant les concentrations dans le plasma sanguin à celles observées dans le plasma séminal chez 19 patients. Les concentrations minimales effectrices étaient obtenues dans le plasma séminal pour les 3 molécules du TARV chez 10 patients ; chez 2 patients, aucune des molécules n'avait atteint les concentrations effectrices. Cependant, nous n'avons pas identifié d'association entre des concentrations infra-thérapeutiques dans le tractus génital masculin et la présence de particules virales dans le sperme. Nous avons également évalué

l'impact de l'environnement inflammatoire sur la présence de particules virales HIV dans le sperme, en dosant les principales cytokines dans le plasma séminal. Nous n'avons pas identifié d'association significative entre la présence de particules virales HIV et une augmentation de concentration des cytokines pro-inflammatoires.

Notre travail présente plusieurs limites. Les outils de quantification du réservoir cellulaire ne sont pas parfaits : l'ADN HIV total mesure de l'ADN intégré et non intégré dans des cellules avec une infection à HIV productive, ou dans des cellules latentes. La quantification de l'ADN intégré est difficile. De plus, l'ARNm *tat/rev/nef* et l'ARN intracellulaire peuvent aussi être identifiés dans des cellules à l'état de latence. L'utilisation d'une PCR HIV ultrasensible avec un seuil inférieur à 1 copies/mL dans le plasma sanguin aurait pu permettre une quantification plus précise. L'effectif de notre étude était limité. Pour l'étude pharmacologique, nous n'avons réalisé que des dosages à un instant donné, l'idéal pour ce type d'étude aurait été de réaliser des dosages répétés dans le plasma sanguin et le plasma séminal sur 24 heures pour réaliser des aires sous la courbe. Cependant, il est difficile de réaliser chez un nombre important de patients des dosages répétés dans le plasma séminal afin de comparer l'exposition du tractus génital masculin au compartiment sanguin. La diffusion des antirétroviraux fait appel à des mécanismes de transport passif et des mécanismes de transport actif. Au-delà des rapports de concentrations dans le plasma séminal et le plasma sanguin, d'autres paramètres sont à prendre en compte, des molécules diffusant peu comme le dolutegravir atteignent néanmoins des concentrations suffisantes pour inhiber la réplication virale dans le tractus génital masculin. De plus, les capacités de liaisons aux protéines du plasma séminal sont variables selon les molécules et impactent sur les concentrations de molécules libres actives.

En conclusion, nos résultats montrent globalement une bonne efficacité des traitements antirétroviraux actuels sur le virus libre au niveau sérial chez des patients compliants et traités depuis plusieurs années. Surveiller aussi IST facteur de réactivation. Question de la transmissibilité des NSMC infectés ?

<b>Ratio [plasma sérial]/[plasma sanguin]</b>		
<b>&lt;1</b>	<b>=1</b>	<b>&gt; 1</b>
<b>Inhibiteurs de protéase</b>	Maraviroc	Emtrictabine
<b>Efavirenz</b>	Abacavir	Tenofovir disproxil fumarate
<b>Enfuvirtide</b>	AZT	Didanosine
<b>Rilpivirine</b>	Indinavir	Raltégravir
<b>Dolutegravir</b>	Névirapine	Lamivudine
<b>Elvitegravir</b>		

**Tableau 10. Diffusion des antirétroviraux dans le tractus génital masculin (ratio plasma sérial/plasma sanguin)** d'après Else *et al.*(60),Greener *et al.* (207), Imaz *et al.* (208), Mora-Peris (209).

**Article 2. Seminal anti-HIV IgG and IgA able to cross a tight epithelial barrier: another potential risk for HIV transmission ?**

Soumis

Le sperme est un environnement complexe qui contient à la fois des facteurs favorisant ou limitant l'infection par HIV. Il renferme notamment des immunoglobulines dirigées contre HIV dont le rôle dans la transmission sexuelle de HIV reste peu décrit. Il a été montré *in vitro* que des IgG d'origine séminale dirigées contre HIV favorisaient la transcytose de particules virales. Dans cette étude, nous avons souhaité explorer la prévalence des anticorps spécifiques de HIV dans le plasma séminal de sujets chroniquement infectés, et d'hommes exposés non infectés. Dix-huit patients chroniquement infectés suivis dans le service de Maladies Infectieuses et Tropicales du CHU de Saint-Etienne ont été inclus. Six patients participant à l'étude Ipergay ont également participé. Les données présentées dans l'article 2 sont issues des patients chroniquement infectés.

La prévalence des anticorps dirigés contre HIV dans le sang et le plasma séminal des 18 patients chroniquement infectés est présentée dans le tableau 11.

	IgG		IgA		IgM	
	Sang	Sperme	Sang	Sperme	Sang	Sperme
<b>gp120</b>	18 (100)	14 (78)	13 (72)	10 (56)	16 (89)	6 (33)
<b>gp41</b>	18 (100)	18 (100)	18 (100)	17 (94)	18 (100)	13 (72)
<b>p31</b>	15 (83)	14 (78)	8 (44)	4 (22)	13 (72)	3 (17)
<b>p24</b>	18 (100)	12 (67)	14 (78)	11 (61)	13 (72)	8 (44)
<b>p17</b>	17 (94)	8 (44)	9 (50)	6 (33)	15 (83)	7 (39)

Tableau 11. Prévalence des anticorps dirigés contre HIV dans le sang et le sperme de sujets chroniquement infectés (n (%)).

Concernant les 6 patients non infectés de l'étude Ipergay, des IgA anti-HIV ont été mises en évidence dans le sang et le plasma séminal de 3 d'entre eux. L'absence d'infection par HIV chez ces patients a été démontrée par la réalisation de sérologie et western-blot dans le sang, et une mesure de la charge virale HIV plasmatique. Ces immunoglobulines spécifiques étaient essentiellement dirigées contre la gp120. Les immunoglobulines des plasmas séminaux de ces trois patients exposés non infectés ont été purifiées puis poolés, et nous avons réalisé un test de neutralisation sur les souches LAI et SF162. Une faible activité de neutralisation a été identifiée à l'encontre de la souche LAI à tropisme X4. L'origine des ces

IgA du sperme de sujets exposés non-infectés n'est malheureusement pas aisée à préciser :  
une production locale dans le tractus génital est possible.

1 *Brief report*

2  
3 **Seminal anti-HIV IgG and IgA able to cross a tight epithelial barrier: another potential**  
4 **risk for HIV transmission ?**

5 Amandine Gagneux-Brunon, MD<sup>1,2</sup>, Benoît Dechaumet<sup>1</sup>, Nicolas Rochereau, PhD<sup>1</sup>, Frédéric  
6 Lucht, MD PhD<sup>1,2</sup>, Laurent Cotte, MD<sup>3</sup>, Bruno Pozzetto, MD PhD<sup>1,4</sup>, Stéphane Paul, PhD<sup>1,5</sup>,  
7 Thomas Bourlet, PharmD PhD<sup>1,4</sup>

8 <sup>1</sup>Groupe Immunité Muqueuse et Agents Pathogènes, GIMAP EA 3064, CIC 1408, University  
9 of Saint-Etienne, Université de Lyon, France; <sup>2</sup>Department of Infectious and Tropical  
10 Diseases, University Hospital of Saint-Etienne, France; <sup>3</sup>Department of Infectious and  
11 Tropical Diseases, University Hospital of Lyon, France; <sup>4</sup>Laboratory of Infectious Agents and  
12 Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, France; <sup>5</sup>Laboratory of Immunology,  
13 University Hospital of Saint-Etienne, France

14  
15 Name and address for correspondence:

16 Prof. Thomas Bourlet

17 GIMAP EA 3064, Faculté de Médecine J. Lisfranc

18 Université de Saint-Etienne, Université de Lyon

19 42023 Saint-Etienne cedex 02, France

20 Tel : +3-347-742-1467 Fax : +3-347-742-1486 [thomas.bourlet@chu-st-etienne.fr](mailto:thomas.bourlet@chu-st-etienne.fr)

21 Parts of this work were previously presented at the Congress on HIV and Emerging Infectious  
22 Diseases (ISHEID), 25<sup>th</sup> - 27<sup>th</sup> of May 2016. Abstract 021.

23 Conflicts of Interest and Source of Funding: Authors declare no conflict of Interest. This  
24 work was partly financed by research grants from MSD Company.

25 Running head: Role of seminal IgA in HIV transmission

26 **Abstract**

27 Semen of HIV-1 infected men contains HIV-1 specific IgG and IgA mostly directed against  
28 envelope glycoproteins. We described here the ability of seminal HIV-specific IgG and IgA to  
29 cross a tight epithelial monolayer barrier. Interestingly, purified IgG and/or IgA fractions  
30 exhibited a high rate of neutralization of a X4 but not R5-tropic HIV strain suggesting that  
31 HIV-specific immunoglobulins may be involved in the selection of R5-tropic strains during  
32 transmission. These findings demonstrate that seminal HIV-specific antibodies may play a  
33 dual role by facilitating the transcytosis of HIV-particles through the mucosal barrier and by  
34 neutralizing X4-tropic HIV strains in semen.

35



36  
37

## **Introduction**

38 Although new strategies as pre-exposure prophylaxis (PrEP) and treatment as prevention  
39 (TasP) are successful to prevent HIV new infections <sup>1,2</sup>, an HIV-vaccine is still needed to  
40 circumvent the difficulties in adherence and acceptability of PrEP or TasP <sup>3</sup>. According to the  
41 UNAIDS, in 2013, eighty to ninety percent of the new infections were related to sexual  
42 transmission <sup>4</sup>, via semen and cervicovaginal fluid (CVF), which may harbor cell-free and/or  
43 cell-associated HIV forms. Semen and CVF are complex fluids, containing antimicrobial  
44 peptides, antibodies and various factors such as cytokines and chemokines <sup>5</sup> that may  
45 influence HIV-infection. The semen of HIV-1 infected men contains anti-HIV-1 specific  
46 immunoglobulins, that may play a dual role in HIV transmission <sup>6</sup>. On the one hand, anti-  
47 HIV-1 specific immunoglobulins may protect individuals from HIV acquisition <sup>7</sup> or HIV  
48 disease progression <sup>8</sup> by several mechanisms: inhibiting HIV transcytosis, neutralizing HIV  
49 particles, or favoring in combination with Natural Killer cells an antibody-dependent cell  
50 cytotoxicity (ADCC) <sup>9</sup>. On the other hand, it was previously demonstrated anti-HIV-1  
51 specific IgG purified from semen, are *in vitro* able to enhance HIV-1 transcytosis <sup>10</sup>.  
52 Obtaining anti-HIV specific protective Igs at mucosal sites after vaccination is a goal to  
53 achieve but could be a double-edged sword. Better understanding about the role of HIV-1  
54 specific mucosal derived Igs is needed. Our aim was to assess the prevalence and the  
55 functionality of anti-HIV-1 specific immunoglobulins (IgG and IgA) purified from the semen  
56 of HIV-infected patients to cross an intact genital epithelium.

57 **Key-words:** HIV-1, semen, IgG, IgA, sexual transmission.

58

59 **Methods**

60  
61 *Studied population*

62 Eighteen consenting men chronically infected by HIV-1 and followed at the departments of  
63 Infectious Diseases of the University Hospital of Saint-Etienne, and of the University  
64 Hospital of Lyon (France), were enrolled in the study between 2010 and 2015. Their clinical  
65 and immune-virological characteristics are depicted in supplemental Table 1.

66 *Samples collection and processing*

67 Semen was obtained by masturbation in a sterile container after three days of sexual  
68 abstinence. After liquefaction at room temperature, seminal plasma was separated by  
69 centrifugation (450 g for 20 minutes). Whole blood was sampled by venipuncture and blood  
70 plasma was separated by centrifugation (480 g for 10 minutes). All samples were stored  
71 before processing at -80°C.

72 *Detection of anti-HIV-1 antibodies*

73 The specificity of antibodies towards HIV-1 proteins was detected by using NEW LAV  
74 BLOT I assay (Biorad, Marnes la Coquette, France). For the detection of IgG and IgA  
75 isotypes, the manufacturer's conjugate and a phosphatase alkaline labeled anti-human goat  
76 IgA (MP biomedical, Illkirch, France) were used, respectively.

77 *Quantification of total IgG and IgA in blood and semen*

78 Concentrations of total IgG and IgA were measured by an in-house immunocapture ELISA in  
79 blood and seminal plasma. Plates were coated with goat anti-human IgG and an IgA (MP  
80 biomedical, Illkirch, France), both 1:300 diluted and incubated overnight at 4°C. Plates were  
81 washed with phosphate buffer saline and 0.05% Tween 20. The plates were saturated for one  
82 hour at 37°C with PBS and 4 % bovine serum albumin. After 3 washes, 1:100, 1:10,000,  
83 1:20,000 diluted seminal plasmas were incubated at 37 °C for 2 hours. After 3 steps of

84 washing, a horseradish peroxidase labeled anti-human IgA and alkaline phosphatase labeled  
85 anti-human IgG conjugates (both 1:10,000 diluted) were added. The plates were incubated for  
86 one hour at 37°C. After 3 steps of washing, pNPP and TMB substrates were added for IgA  
87 and IgG detection, respectively. A standard curve was build with serial dilutions of a  
88 calibrated pooled serum (concentrations ranging from 132 µg/mL to 0.00129 µg/mL for IgG  
89 and from 13.7 µg/mL to 0,00013 µg/mL for IgA). After a neutralization step with HCl 1M,  
90 the optical density was measured at a wavelength of 450 nm. The threshold of detection was  
91 established at 0.5 µg/L for IgG and IgA.

## 92 *Transmigration Assay*

93  
94 HEC-1A (endometrial derived) cells were cultivated in modified Mc Coy's 5A medium  
95 supplemented with 10 % fetal bovine serum, and 1 % mix of antimicrobials (amphotericin B  
96 25 µg/mL, streptomycin 10 mg/mL, penicillin 10,000 U/mL). Fifty thousands HEC-1A cells  
97 were added in 0.4 mm membrane hanging transwell inserts (Millipore, Saint Quentin en  
98 Yvelines, France), inserted in a 96-well plate. Two hundred microliters of culture medium  
99 were placed in the lower chamber of the insert. The cell monolayer integrity was assessed by  
100 the measurement of transepithelial electrical resistance (TEER) before and after the  
101 transmigration assay and by checking the inability of luminescent microbeads to cross the  
102 monolayer. To validate our model, we first used non HIV-specific luciferase-labeled IgG, and  
103 IgA1 and IgA2 (Invivogen, Toulouse, France), able to cross a cell monolayer as previously  
104 described <sup>11</sup>. Three different concentrations of Ig were tested (10, 1 and 0.1 µg/mL). The  
105 experiment was repeated in the presence of seminal plasma from an HIV-infected patient.  
106 Under the same conditions, we next tested antibodies from 4 seminal samples. Seminal  
107 plasmas were 1:50 diluted and placed in the upper chamber. After 24 hours, fluids were  
108 collected from the upper and lower chambers and HIV-1 specific IgG and IgA were detected  
109 by immunoblotting, as previously described.

110 *Purification of IgG and IgA from semen*

111 IgG and IgA fractions were purified from the 4 semen, previously used in transmigration  
112 assay and 1:2 diluted by Thermoscientific Pierce protein L magnetic beads<sup>TM</sup> (Illkirch,  
113 France). After purification, antibodies were concentrated on 30 K Amicon Ultra-4 centrifugal  
114 filter (Millipore, Molsheim, France). Final concentrations of purified immunoglobulins  
115 ranged between 250 and 400 µg/mL.

116 *Neutralization assay*

117 To evaluate the ability of seminal anti-HIV IgG and IgA to neutralize HIV-1 infectivity, we  
118 performed a neutralization assay based on the use of test using TZM-bl cells. Briefly, ten  
119 thousands cells diluted in 200 µL of DMEM high glucose were coated in each well of a 96-  
120 well plate, and incubated for 24 hours at 37°C. SF 162 a R5-tropic strain (500 pg/mL) and  
121 LAI a X4- tropic strain (50 pg/mL) 1:1 diluted in DEAE dextran, were first added to cells.  
122 Then, 1:2, and 1:3 diluted purified IgG and IgA fractions were added to cells and virus. After  
123 48 hours of incubation, infection levels were determined by measuring the luciferase activity  
124 of cell lysates using the luciferase assay system (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France).  
125 A strong neutralizing effect was defined when the viral infectivity was decreased by more  
126 than 2/3 in the presence of antibodies. A monoclonal antibody IgG1 B12 was used as control  
127 (NIH, USA).

128

129

130

131

132

133

134

## 135 **Results**

### 136 *Prevalence of HIV specific antibodies in blood and semen*

137 Total IgG and IgA amounts were evaluated in the semen of the 18 enrolled men. The mean  
138 ( $\pm$ SD) were 199 ( $\pm$  122.3) and 20.8 ( $\pm$ 17.6)  $\mu$ g/mL for IgG and IgA, respectively.

139 Anti-gp120 IgG and IgA were detected by immunoblotting in 14 (78%) and 9 (50%) seminal  
140 samples, respectively. Anti-gp41 IgG and IgA were observed in 18 (100%) and 17 (94%)  
141 seminal samples, respectively. Distinct profiles of HIV antibodies between blood and semen  
142 were observed in 3 patients (some antibodies detected in semen but not in blood), one for IgG  
143 (anti-gp120) and 2 IgA (anti-gp41) (data not shown).

### 144 *Transmigration of IgA and IgG through a HEC-1A cells monolayer (Figure 1)*

145 To validate our model, we first demonstrated that luciferase labeled IgA1, IgA2 and IgG were  
146 able to cross a HEC-1A cells monolayer, as previously described<sup>11</sup>. TEER remains stable  
147 during the transmigration assay (170 mOhms), and no microbeads crossed the monolayer  
148 confirming the monolayer integrity. The concentrations of transmigrated of IgG were  
149 significantly higher at pH=6 than at pH=7.4 ( $p$ <0.001) whatever the concentration tested, At  
150 pH=6, the percentage of Igs transmigrated ranged from 0.48 to 0.65 for IgG, from 0.1 to  
151 0.619 for IgA1, from 0.046 to 0.546 for IgA2. As shown in figure 1, the percentage of  
152 transmigrated IgG and IgA1 was significantly higher at the concentration of 10  $\mu$ g/mL. In the  
153 presence of HIV positive seminal plasma, the transmigration of luciferase labeled IgA1, IgA2,  
154 and IgG was reduced by 87 to 98 %.

### 155 *Transmigration of HIV-1 specific semen derived antibodies (IgG and IgA) across an* 156 *epithelial monolayer*

157 In this assay, 4 seminal plasma were tested. For three of them (1, 8, 18), a transmigration of  
158 HIV-1 specific IgG and IgA was observed, mainly for Igs directed towards gp41 IgG and IgA

159 (Table 1). In one patient, the immunoblot assay was negative at the basal level suggesting no  
160 or very low quantities IgG and IgA which crossed the barrier.

161 *HIV-1 specific Igs purified from semen may exhibit neutralizing activities*

162  
163 The percentage of neutralization was different between patients ranging from 4 % to 42 % for  
164 SF162 and from 37 % to 68 % for LAI (figure 2). The ability of to neutralize X4 strain was  
165 significantly higher in 2 seminal samples of pooled IgG and IgA (patients 1 and 8).

166

167 **Discussions**

168 In this study, we confirmed the presence of anti-HIV-1 specific antibodies directed against  
169 gp120, gp41, and p24 in the semen of men chronically infected by HIV-1. IgG was the main  
170 isotype concentrated almost 10 fold more than IgA, confirming previous findings<sup>12-14</sup>.

171 Recent observations have suggested that HIV-specific IgG may facilitate HIV transcytosis<sup>10</sup>.

172 In our study, we evaluated the ability of semen derived IgG and IgA to transmigrate through  
173 an HEC-1A cells monolayer, mimicking an endocervical epithelium. We first demonstrated  
174 that non HIV-specific IgG and also IgA1 and IgA2 were able to transmigrate, particularly  
175 under acidic conditions as found in cervicovaginal fluids. The decrease of the rate of  
176 transmigrating non HIV-specific Igs in presence of a seminal plasma from HIV-infected man  
177 might be due to a competition between seminal and tested Igs, or to an increase in pH due by  
178 adding semen. Secondly, we found that anti-HIV-1 specific IgG and IgA from 3 out of 4  
179 semen were able to transmigrate through an epithelial monolayer both under neutral and  
180 acidic conditions. Gupta *et al.* previously suggested that anti-HIV-1 specific IgG are able to  
181 bind viral particles and enhance HIV sexual transmission<sup>10</sup>. Our findings demonstrate that the  
182 same mechanism may involve IgA under acidic (vaginal) and neutral (seminal plasma)  
183 conditions. It has also been previously shown that mucosal HIV-specific IgA may contribute  
184 to the protection in highly exposed seronegative women by inhibiting HIV particles

185 transcytosis <sup>15</sup>, but data are missing for HIV-specific IgA derived from semen of CI men.  
186 However, we do not evaluate the ability of IgG and IgA to bind HIV particles, and to favor or  
187 block HIV transcytosis.

188 In addition to the ability to transmigrate, we observed a strong neutralizing activity of Igs  
189 purified from the semen of one patient. Interestingly, this activity was observed on a X4-  
190 tropic virus suggesting that this phenomenon may be involved in the preferentially  
191 transmission of R5-tropic strains. It could be interesting to test ADCC properties of semen  
192 derived antibodies described in our study. Recently, antibody-cellular cytotoxicity of HIV-  
193 specific IgG in semen was described <sup>16</sup> suggesting that seminal anti-HIV-1 Igs may modulate  
194 sexual transmission and in part explain the relative low risk of transmission per sexual act.

195 On the one side, the ability of HIV-1 specific antibodies to cross genital epithelium have to be  
196 taken into consideration for the development of vaccines aiming to elicit a protection at the  
197 mucosal level <sup>17,18</sup>. Such deleterious properties have to be screened in preclinical studies. On  
198 the other side, the use of IgAs able to cross a monolayer epithelium as a vector for various  
199 antigens is an interesting way to explore in vaccinology <sup>19</sup>. Our data confirm the dual role of  
200 anti-HIV-1 seminal antibodies in HIV-sexual transmission. Complementary studies are  
201 needed to better characterize their properties especially on cell-associated viral forms, which  
202 are probably preferentially transmitted by sexual route.

203

- 204  
205 1. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, et al. Effectiveness and safety of  
206 tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in  
207 women. *Science*. 2010;329:1168-1174.
- 208 2. Cohen MS, Smith MK, Muessig KE, Hallett TB, Powers KA, Kashuba AD.  
209 Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from  
210 here? *The Lancet*. 2013;382:1515-1524.
- 211 3. Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, et al. Tenofovir-based preexposure  
212 prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med*. 2015;372:509-518.
- 213 4. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. available at  
214 [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf)  
215 [013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf).
- 216 5. Barreto-de-Souza V, Arakelyan A, Margolis L, Vanpouille C. HIV-1 vaginal  
217 transmission: cell-free or cell-associated virus? *Am J Reprod Immunol*. 2014;71:589-  
218 599.
- 219 6. Raux M, Finkielsztejn L, Salmon-Céron D, et al. IgG subclass distribution in serum and  
220 various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*.  
221 2000;16:583-594.
- 222 7. Mestecky J, Moldoveanu Z, Smith PD, Hel Z, Alexander RC. Mucosal immunology of  
223 the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *J Reprod Immunol*.  
224 2009;83:196-200.
- 225 8. Simek MD, Rida W, Priddy FH, et al. Human immunodeficiency virus type 1 elite  
226 neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a



- 227 high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J*  
228 *Viol.* 2009;83:7337-7348.
- 229 9. Su B, Moog C. Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front*  
230 *Immunol.* 2014;5:289.
- 231 10. Gupta S, Gach JS, Becerra JC, et al. The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human  
232 immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS*  
233 *Pathog.* 2013;9:e1003776.
- 234 11. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, et al. Dectin-1 Is Essential for Reverse  
235 Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS*  
236 *Biol.* 2013;11(9).
- 237 12. Russell MW, Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the  
238 genital tract. *Microbes Infect.* 2002;4:667-677.
- 239 13. Mestecky J, Jackson S, Moldoveanu Z, et al. Paucity of antigen-specific IgA responses  
240 in sera and external secretions of HIV-type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum*  
241 *Retroviruses.* 2004;20:972-988.
- 242 14. Haimovici F, Mayer KH, Anderson DJ. Quantitation of HIV-1-specific IgG, IgA, and  
243 IgM antibodies in human genital tract secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum.*  
244 1997;15:185-191.
- 245 15. Bélec L, Ghys PD, Hocini H, et al. Cervicovaginal secretory antibodies to human  
246 immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight  
247 epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis.*  
248 2001;184:1412-1422.

- 249 16. Parsons MS, Madhavi V, Ana-Sosa-Batiz F, et al. Brief Report: Seminal Plasma Anti-  
250 HIV Antibodies Trigger Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity: Implications for  
251 HIV Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;71:17-23.
- 252 17. Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1  
253 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl*  
254 *Acad Sci*. 2013;110:9019-9024.
- 255 18. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1  
256 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med*. 2012;366:1275-1286.
- 257 19. Rochereau N, Pavot V, Verrier B, et al. Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of  
258 HIV antigen to M cells. *Eur J Immunol*. 2015;45:773-779.
- 259

Patient	HIV acquisition route	Time since HIV diagnosis (years)	Stage of infection <sup>1</sup>	HIV viral load (Copies/mL)		CD4 lymphocytes count per mm <sup>3</sup>
				Blood	Semen	
1	MSM	1	A	130	<40	615
2	MSM	10	A	<40	<40	441
3	MSM	11	C	<40	<40	521
4	MSM	20	C	<40	<40	606
5	ND	1	C	41	<40	233
6	MSM	8	A	<40	<40	451
7	MSM	5	A	<40	<40	1242
8	MSM	5	A	<40	<40	428
9	Blood transfusion	26	A	147	<40	727
10	MSM	8	A	<40	<40	927
11	MSM	19	A	<40	<40	333
12	MSM	1	A	40	<40	1292
13	MSM	6	C	40	<40	232
14	MSM	21	C	<40	<40	606
15	heterosexual	4	C	89	<40	82
16	MSM	7	C	<40	<40	112
17	heterosexual	5	A	<40	<40	615
18	MSM	2	A	<40	<40	779

**Supplemental Table 1 Characteristics of 18 chronically HIV-1 infected men enrolled in the study** <sup>1</sup> CDC classification, MSM: men having sex with men

Patient	HIV-1 glycoproteins	IgG				IgA			
		pH=7.4		pH=6		pH=7.4		pH=6	
		Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal
1	gp120	+	+	+	+	+	-	+	-
	gp41	+	+	+	+	+	+	+	+
	p31	+	+	+	+	+	-	+	-
	p24	+	+	+	+	+	+	+	+
	p17	-	-	-	-	+	-	+	-
8	gp120	+	+	+	+	-	-	-	-
	gp41	+	+	+	+	+	-	+	+
	p31	+	+	+	+	-	-	-	-
	p24	+	+	+	+	-	-	-	-
	p17	-	-	-	-	-	-	-	-
11	gp120	+	-	+	-	+	-	+	-
	gp41	+	-	+	-	+	-	+	-
	p31	+	-	+	-	+	-	+	-
	p24	+	-	+	-	+	-	+	-
	p17	+	-	+	-	+	-	+	-
18	gp120	+	+	+	+	+	-	+	-
	gp41	+	+	+	+	+	+	+	-
	p31	+	+	+	+	-	-	-	-
	p24	-	-	-	-	-	-	-	-
	p17	+	-	+	-	-	-	-	-

**Table 1** Characterization by immunoblotting assay of HIV-specific IgG and IgA before (apical chamber) and after transmigration (basal chamber) through a HEC-1A cells monolayer under neutral and acidic conditions

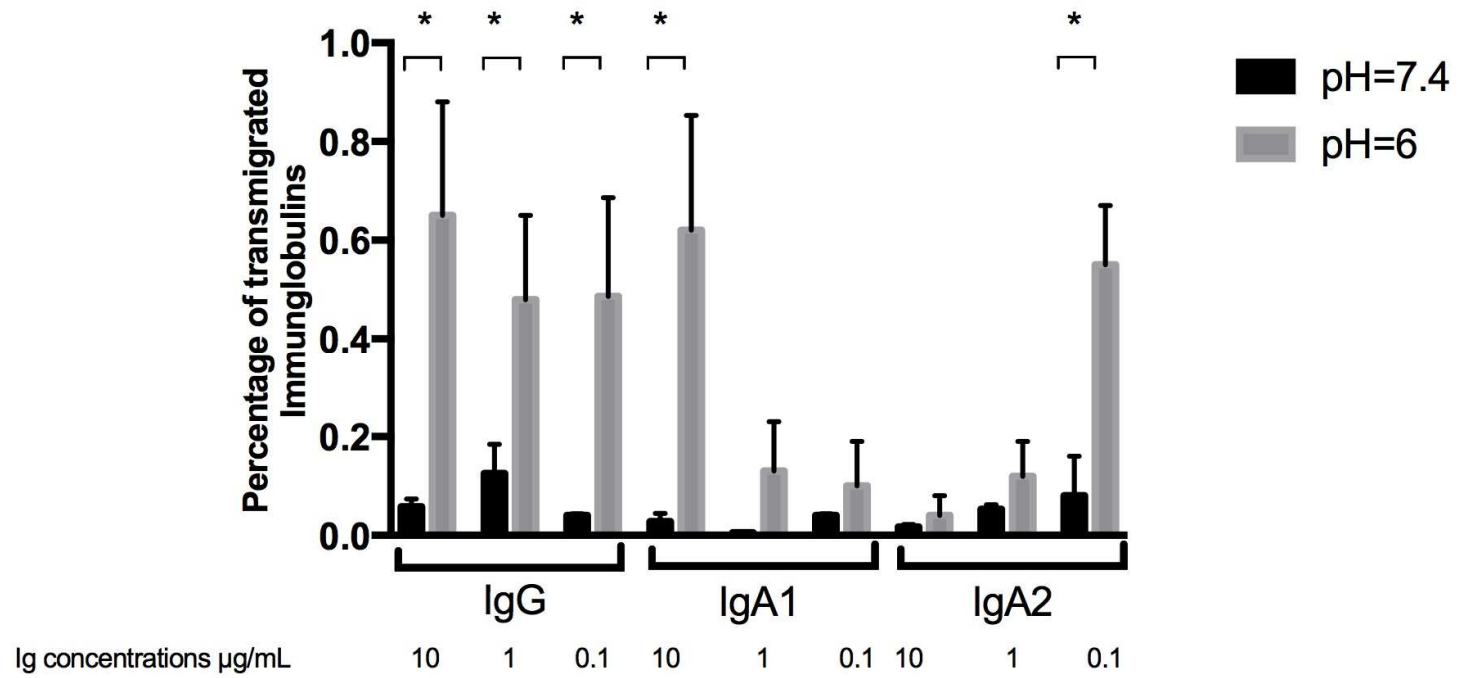


Figure 1 Transmigration of IgG, IgA1 and IgA2 across HEC1-A cells monolayer at pH=7.4 and pH=6 (\*  $p < 0.05$ )

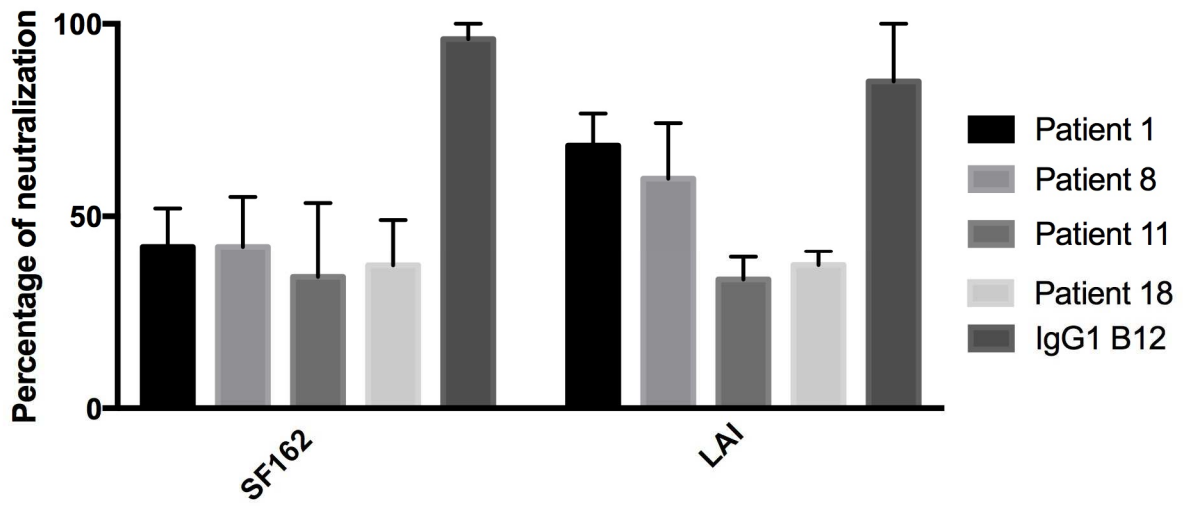
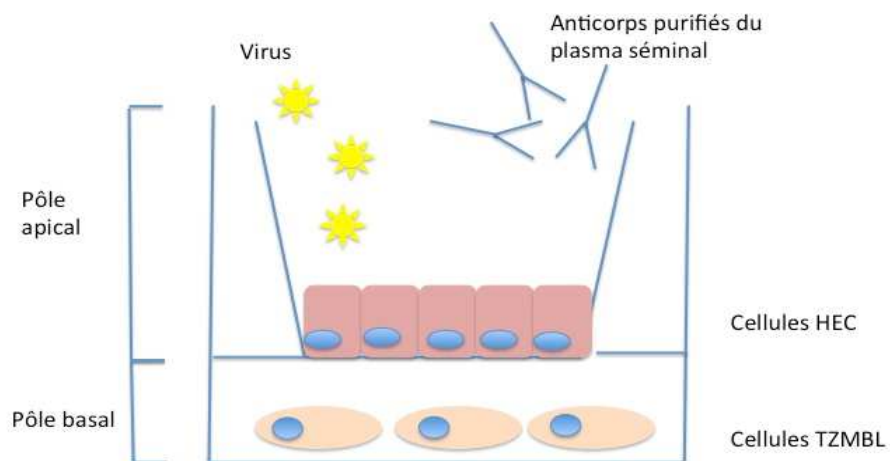


Figure 2 Assessment of neutralizing effects of anti-HIV-1 IgG and IgA purified from 4 seminal samples (tested in triplicate)

Dans ce second travail, nous avons montré que les anticorps dirigés contre HIV du plasma séminal étaient capables de traverser un épithélium monocouche mimant l'endocervix. Ce phénomène pourrait favoriser la transmission de HIV si ces anticorps se liaient à des particules virales libres présentes dans le sperme. Pour compléter cette observation et confirmer cette hypothèse, une manipulation de transcytose en présence de particules virales est nécessaire. Idéalement, pour évaluer le caractère infectieux de ce virus lié aux anticorps du plasma séminal des cellules reproductrices telles que des TZM-BL pourraient être ajoutée au pôle basal (Figure 8).



**Figure 8. Manipulation de transcytose de particules virales en présence d'anticorps du plasma séminal.**

Nous avons également montré dans ce travail que des anticorps dirigés contre HIV dans le plasma séminal pouvaient avoir un effet neutralisant, en particulier sur une souche à tropisme X4. La question de l'impact des ces immunoglobulines dirigées contre HIV du plasma séminal sur la sélection des souches à tropisme R5 au cours de la transmission sexuelle se pose. Sur cet aspect, notre travail a des limites, nous n'avons réalisé nos tests neutralisation qu'à partir de deux souches LAI et BAL, facilement neutralisables. L'utilisation d'autres

souches et surtout d'isolats primaires dans des travaux ultérieurs permettrait de mieux explorer cet effet. Au-delà de cet effet de neutralisation, nous avons cherché à identifier une activité ADCC de ces anticorps dirigés contre HIV. Malheureusement, nous n'avons pas identifié cette activité mais les concentrations d'immunoglobulines purifiées dans le cadre de cette manipulation étaient faibles. Notre protocole de purification et de concentration des immunoglobulines du plasma séminal doit encore être amélioré.

Notre objectif initial était aussi d'identifier les épitopes cibles des anticorps neutralisant provenant du sperme. Malheureusement, la quantité de matériel et les concentrations d'anticorps du plasma séminal n'ont pas permis la réalisation de techniques de mapping. Une fois encore, l'amélioration de notre protocole de purification et de concentration pourrait permettre de réduire ces difficultés.



**Article 3. Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies**

## **Humoral responses against HIV in male genital tract: role in sexual transmission and perspectives for preventive strategies**

Amandine GAGNEUX-BRUNON<sup>1,2</sup>, Nicolas ROCHEREAU<sup>1</sup>, Elisabeth BOTELHO-NEVERS<sup>1,2</sup>, Frédéric LUCHT<sup>1,2</sup>, Bruno POZZETTO<sup>1,4</sup>, Stéphane PAUL<sup>1,3¶</sup>, Thomas BOURLET<sup>1,4¶</sup>

<sup>1</sup>Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes – GIMAP EA 3064, CIC 1408, Université de Saint-Etienne, Université de Lyon, France <sup>2</sup>Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne CEDEX 2, France; <sup>3</sup>Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne CEDEX 2, France; <sup>4</sup>Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, Centre Hospitalo-Universitaire de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne CEDEX 2, France.

¶ participated equally to this review

**Keywords:** HIV, sexual transmission, neutralizing antibodies, immunoglobulins, transcytosis, ADCC, vaccine

### **Abstract**

Most of the new HIV-1 infections occur by sexual route. The induction of protective anti-HIV antibodies in genital mucosa is an important goal to reduce HIV transmission. Mucosal HIV-antibodies may play a dual role by protecting for facilitating HIV infection. Protective properties against HIV-1 of mucosal IgGs and IgAs exhibiting neutralizing or Antibody Dependant Cells mediated Cytotoxicity (ADCC) activities have been described in Highly Exposed SeroNegative individuals. Conversely, some IgGs may facilitate the crossing of HIV-1 free particles through epithelial barriers by transcytosis. Therefore, the knowledge of the mechanisms underlying HIV-1 antibodies production in the genital tract and their exact role in sexual transmission may help to develop appropriated preventive strategies based on passive immunization or mucosal vaccination approaches. Our review focused on the

characteristics of the humoral immune responses against HIV-1 in the male genital tract and related prevention strategies.

## **Introduction**

Before Highly Active Antiretroviral Therapies era, the development of an effective vaccine against HIV was crucial to inflect to AIDS pandemic and it is still the case. Although new strategies as pre-exposure prophylaxis (PrEP) and treatment as prevention (TasP) are promising [1,2], a vaccine would circumvent the difficulties in adherence and acceptability [3]. More than 2 millions of people are newly infected each year [4,5], this incidence remains stable. These new infections are mostly related to sexual transmission. Per-act risk of HIV acquisition during sexual intercourse varies between 4 to 138 for 10,000 exposures [6]. Semen and cervicovaginal secretions are the main vectors of HIV. Both fluids are complex because they contained cell-free and/or cell-associated HIV forms, but also antimicrobial peptides, antibodies and various proteins, cytokines and chemokines [7]. These free-virions and infected cells are both able to cross the genital mucosa by different pathways: through disrupted epithelia, transcytosis across the monolayer cells, transmigration phenomenon, capture by sub mucosal immune cells, and/or after infection of epithelial cells (Figure 1). Consequently, obtaining an efficient immune response to block this crossing remains a challenge. Since 1996, individuals were identified as Highly Exposed and SeroNegative (HESN) [8]. Identifying correlates of protection in highly exposed seronegative women and men (sex workers or partners of seropositive individuals) became a priority for designing a vaccine against HIV. Different protective factors were identified including the genetic  $\Delta 32$  homozygous deletion in the CCR5-chemokine receptor gene [9], mucosal innate immunity, cell-mediated and humoral immune responses (particularly IgA secretion) [10]. Most of the studies dealing with anti-HIV response in genital tract included women but the knowledge about male genital tract (MGT) immunity against HIV remains limited. As HIV incidence

seems to increase in male having sex with men (MSM), a better understanding of MGT mucosal immunity mechanisms against HIV is needed. In this review, we focus on anti-HIV humoral response in MGT, its role in HIV transmission or acquisition and on the potential perspectives in the field of the prevention.

### **Measuring humoral response in male genital tract**

Semen contains immunoglobulins displaying different properties [11]. In contrast with intestinal tract, milk, saliva or tears exhibiting large amounts of secretory IgA (SIgA), the predominant isotype in genital tract is IgG. At this level, the observed IgG/SIgA *ratio* is around 10:1 [11,12]. The total amount of Igs was quantified in the semen of 14 HIV-infected men by Haimovici *et al* [12]. The mean ( $\pm$  SD) values were  $85.1 \pm 48.7$ ,  $4.3 \pm 5.4$ ,  $8 \pm 5.9$   $\mu\text{g/mL}$ , for IgG, A and M, respectively. Indeed, levels of immunoglobulins in genital tract are highly variable, depending on the method of collection and processing of samples [11]. In semen, the three molecular forms-secretory, dimeric and monomeric- of SIgA are present and IgA1 is the most predominant [11]. Sexually transmitted infections, intestinal pathogens and also systemic immunization lead to a humoral response in genital tract, suggesting that these mucosal Igs originate both from local and systemic compartments [13]. Urethral glands of Littre contains antibody secreting cells [12], blood derived antibody producing cells present in genital tract may locally produce Igs.

In HIV-infected men, HIV-specific IgGs were more often detected than HIV-specific IgAs and IgMs in semen and in larger concentrations [11,12]. The respective prevalence values of Igs reported by Haimovici *et al* were 93 %, 71 % and 71 % for HIV-1 specific IgGs, IgAs, and IgMs [12]. In this study, the seminal amounts of HIV-1 specific IgGs (mean concentration  $\pm$  SD  $54.4 \pm 20.9$   $\mu\text{g/mL}$ ) were higher than those of IgAs ( $1.1 \pm 1.1$   $\mu\text{g/mL}$ ) and IgMs ( $6.9 \pm 5.8$   $\mu\text{g/mL}$ ). In another work, a correlation between HIV-1 specific IgGs

concentrations in blood and semen was reported suggesting a systemic origin of IgGs [14]. By contrast, no correlation was observed between systemic and seminal HIV-1-specific IgAs concentrations.

There is a great heterogeneity in the results of studies evaluating mucosal responses in MGT of HIV-positive and HIV exposed subjects. These discrepancies may be first due to different factors. Study populations are different: sex workers, heterosexual men in regular partnership with HIV-infected women, MSM [15]. In clinical studies, acceptability of mucosal sampling is variable: great for oral fluids, lighter for semen, and CVF; and weak for rectal samples [16]. This difference of acceptability result in a reduced disponibility of mucosal samples, for subsequent studies. Elucidation of local immune response in mucosa requires standardized and reproducible methods for sampling[17]. Methods for fluids processing are extremely variable and may affect the ability to recover particularly IgA from seminal fluids [18]. Moreover, semen contains proteolytic enzymes, which particularly deteriorate IgG, IgM and monomeric IgA[18]. Semen also contains mucins and glycoproteins affecting quantitation and purification procedures. To preserve antibodies derived from semen, immediate addition of protease inhibitors, antibiotics and EDTA after seminal fluid isolation is probably useful to recover Igs [18]. Due to relative low levels of Igs in semen, methods for immunoglobulin purification are crucial, and multiple steps chromatographic purification are probably useful [18].

### **Seminal antibodies and selection of a transmitted/founder virus during sexual transmission**

HIV sexual transmission results in a selection of HIV variants exhibiting specific patterns especially on *env* gp120 (less glycosylation sites, shorter V1-V4 loops[19]). Differences in sensitivity to neutralizing antibodies were observed between transmitted/founder variants and

other variants in chronically infected subjects [20,21]. Curiously, transmitted/founder viruses were more sensitive to donor autologous antibodies derived from blood [22]. The role of antibodies in donor genital fluids in selection of transmitted/founder virus remains unclear. In a recent study in transmission pairs, no difference was observed for sensitivity to neutralizing antibodies and replicative capacity of recipients and transmitters virus [23].

### **Protective anti-HIV IgA in semen**

In 1997, the presence of HIV-specific IgAs in urine and cervicovaginal fluids (CVF) of seronegative women in a regular relationship with HIV-infected people was reported, suggesting that these antibodies could play a protective role against HIV infection [24]. Consequent studies reported higher concentrations of anti-HIV IgAs in CVF collected from HIV-uninfected sex workers than in HIV-infected or weakly exposed seronegative women [24]. These observations suggest that mucosal anti-HIV SIgA are protective. If no IgAs neutralizing epitopes were clearly evidenced in CVF samples, some as MPER were identified in serum, parotid saliva and breast-milk [25–29]. However, discrepancies between the lack of HIV-specific detectable IgA and the detection of neutralizing activities suggest that natural mucosal neutralizing IgA may target some cellular structures [30].

In 2003, Lo Caputo *et al.* first reported the presence of anti-HIV IgA in the semen of 11 on 14 HIV negative men with a prolonged history of unprotected insertive sex with HIV-infected women [31]. The protective role of anti-HIV IgA detected in urethral swabs was not clearly demonstrated, since the presence of IgAs of the infected partner was not completely ruled out. However, the absence of anti-HIV IgG in urethral swabs from HESN men, whereas CVF of seropositive partner contains both anti-HIV IgG and IgA, is not in favor of the partner origin of these IgA. In this report, other immune correlates of protection were observed: a high level of HIV-specific CD4 cells and HIV-specific interferon secreting CD8 cells in blood [31].

Moreover, the exact mechanism by which anti-HIV IgAs protect from HIV transmission (inhibition of viral transcytosis or neutralizing effect for example) was not explored in this study. The authors also observed that the amount of anti-HIV IgA was greater in men reporting having at-risk sex closer to the time of samples collection. This observation suggests that repeated HIV exposure is necessary to maintain a protective mucosal immunity in HESN [31]. This hypothesis is supported by previous reports in HESN women. In this population, a decline of IgAs levels in sera after cessation of high-risk sex suggest that the production of anti-HIV-1 specific IgAs is associated with repeated expositions to HIV-1 [15, 22]. However, this correlation between exposure to HIV and anti-HIV-1 specific IgAs in CVF was inconstantly observed [33,34].

The main described mechanism by which IgAs prevent from HIV-1 acquisition is their ability to neutralize viral strain activity. This phenomenon was first observed in CVF [35]. IgA were purified from blood, saliva and CVF from 15 sex workers (10 fulfilled criteria for being considered HESN) and in unexposed to HIV controls. Neutralizing activities (on a primary isolate Clade B) were observed in 73 % of blood samples, and 79 % of saliva and CVF samples, and no samples from lower risk women were found positive. To determine if neutralizing activity was related to IgA in fluids, saliva from HESN was IgA depleted, and no neutralizing activity was observed [35]. In men, HIV neutralizing IgA were first reported in saliva [36]. Saliva from HESN and from unexposed controls (blood donors) was analyzed in neutralization assay. Saliva from both groups exhibited neutralizing activity. After IgA1 purification, only IgA from HESN exhibited neutralizing activities. The presence of neutralizing IgAs in foreskin was also described as an immune correlate of protection of HESN men [37]. In this study, IgAs were purified from preputial swabs of 18 HESN and 37 controls circumcised people. HESN men was in relationship with HIV-positive women without antiretroviral therapies for a mean of 5 years and reported in most cases: unprotected



sexual intercourse. Fifty percent of them had neutralizing IgA whereas 10.8 % of controls (men in regular relationship with HIV-negative women) exhibited neutralizing activity against a R5-tropic primary isolates (clade C) [37]. Additional correlates of protection were also identified in HESN men: a decreased number of Th-17 T-cells, a greater amount of CD3 T-cells in foreskin, and a decreased production of the TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokine [37]. The exact epitopes of these neutralizing IgA on HIV particles at the seminal level has not been widely explored.

In another clinical trial evaluating the efficiency of male circumcision to prevent from HIV infection, a reduced neutralizing IgA level in the foreskin of uncircumcised men was associated to HIV acquisition [38]. Once again, the specificity of neutralizing IgA for HIV epitopes was not assessed. In this study, antimicrobials peptides *in vitro* inhibiting HIV infection were also measured in foreskin samples. Higher concentrations of human neutrophils peptides and serine protease inhibitor secretory leukocyte protease inhibitor were associated with an increased risk of HIV acquisition [38]. In the same way, another important factor that may influence HIV transmission and local immunity may be the semen microbiome, as recently suggested [39].

Since the first animal models of PreP, the ability of tenofovir to induce immune response to HIV in uninfected subjects was observed. In NHP, tenofovir may enhance T cells response in mucosal sites after a viral challenge [40–42]. In humans, this “vaccinal” effect of PreP was not confirmed but T cells activation was measured in blood [43]. In the same cohort of women, it was observed that 19 % of the PreP receiving tenofovir had IgA neutralizing IgA in CVF, whereas no women, receiving placebo, had neutralizing IgA in CVF [44]. In women receiving tenofovir, the level of neutralizing IgA was associated with HIV sexual exposure. To date, no data were published in men. Therefore, we analyzed semen samples from 6 subjects enrolled in Ipergay study [45] for presence of anti-HIV specific Ig. We observed HIV

specific IgA in 2 on 6 men (absence of infection was checked by HIV viral load quantification) and neutralizing activity was observed (unpublished data). These preliminary results must be confirmed in a greater population, and using several virus and primary isolates.

### **Anti-HIV seminal immunoglobulins facilitating HIV transcytosis**

Transcytosis is one of the mechanisms suggested to explain the passage of HIV free-particles across the genital mucosa. Free virions or HIV cell associated-particles, are able to enter and cross through epithelial cells without replicating [46,47] (**Figure 1**). Immunoglobulins may play a crucial role by facilitating or inhibiting this phenomenon. It was demonstrated that HIV specific secretory IgAs and IgGs purified from colostrum and CVF of infected women were able to inhibit HIV transcytosis *in vitro* [48]. In HESN, the ability of HIV-specific IgAs to block viral transcytosis may also participate in the protection against HIV-1 acquisition. This was evaluated for IgAs purified from plasma, cervicovaginal washes and saliva sampled in a HESN Kenyan sex workers cohort and in healthy uninfected low risk women [49–51]. Only IgAs purified from HESN women were able to inhibit HIV-1 clade B *in vitro* transcytosis across a tight epithelial monolayer constituted of Caco-2 intestinal cells [50,51]. Another report evidenced the ability of specific anti-HIV IgAs directed to the ELDKWA conserved epitope of gp41 to block the crossing of HIV free-particles through an epithelial monolayer by transcytosis [52,53]. However, this property is not restricted to anti-HIV specific Igs, since it has been shown that IgAs directed towards the first extracellular loop of CCR5 co-receptor were also able to block HIV-1 transcytosis [54]. As a whole, HIV specific and non-specific Igs isolated from CVF might be involved in inhibition of HIV-1 transcytosis. Similar studies dealing with Igs purified from male genital tract are missing.

Conversely, env-specific IgGs present in genital secretions seem to be unable to prevent sexual transmission but rather may facilitate HIV-1 mucosal transmission. A proportion of HIV virions may be coated to IgG in semen. Gupta et al. hypothesized that these immunological complexes may result in an increase in HIV transcytosis through a genital epithelium. They demonstrated that env-specific IgGs (monoclonal antibodies and semen or CVF derived IgG ranging from 50 to 200 µg/mL) enhance HIV-1 transcytosis in a dose dependent manner and at acidic pH [55] across epithelial cells (HEC-1A cells) forming tight junctions. This mechanism was confirmed with R5, X4 and dual tropic primary strains and pseudotyped viruses. The role of FcRn was confirmed by the absence of viral transcytosis across FcRN knocked down HEC-1A cells. This mechanism is related to the neonatal Fc receptor heavily in columnar epithelial cells expressed in endocervix and penile urethra. HIV and IgGs may form immune complex able to cross an epithelium, as it has been shown for anti-HIV-1 monoclonal broadly neutralizing antibodies [55]. However, in this study, the infectivity of the viral particle after transcytosis was reduced. These observations was not confirmed in a recent work also using HEC-1 A cells and similar methods and reagents [56]. Interestingly, in this latter study, authors used primary isolates from HIV positive subjects recently infected and isolates from the transmitting partners. They observed that HIV-Ig from transmitting partner decreased viral transcytosis (cell-free virions and cell-associated virus) at acidic pH [56].

#### **Antibody dependent cells-mediated cytotoxicity in semen**

Antibody-dependent cells-mediated cytotoxicity (ADCC) is mediated by specific antibodies and innate immunity cells (NK lymphocytes, monocytes, macrophages and polynuclear cells). ADCC activity was demonstrated in CVF from HIV-infected women [57], and was associated with a lower mucosal HIV viral load [58]. ADCC mediated by IgAs purified from CVF, was

observed in HESN women, and seemed to be associated with protection against HIV infection [59]. Similarly, an ADCC activity mediated by anti-HIV IgAs in breast milk was associated with a lower risk of mother-to-child transmission [60]. In RV 144 vaccine trial, the ability of IgG purified from blood to mediate ADCC was also associated with protection [61]. In RV 144 vaccine trial, the presence of systemic Env-specific monomeric IgAs was associated with a decrease in ADCC activity induced by Env-specific specific IgGs, and consequently with a loss of efficacy of the vaccine [62,63]. However, ADCC activity was not evaluated at mucosal sites . Only one study evaluated the ADCC activity mediated by seminal IgGs [64]. CEM.NK<sub>r</sub> CCR5 cells were coated with HIV-1<sub>BAL</sub> gp120. Antibodies were purified with protein G and enriched by ultracentrifugation diluted to observe ADCC. This study included 11 HIV-1 chronically infected men. ADCC activity was respectively identified in 11 blood and 9 semen samples, respectively. An ADCC activity was observed with 1:10 diluted seminal plasma and 1:1000 diluted blood plasma. Authors suggested that this phenomenon may, at least in part, explain the relative low rate of sexual transmission during sexual intercourse [64]. Furthermore, a greater ADCC activity in genital mucosal of HESn may in part in part explain resistance to HIV- infection. HESN subjects may have NK cells with a higher functional potential [65]. This ADCC property is also of high interest and to be taken into considerations for the development of mucosal vaccines.

Antibodies may also mediate phagocytosis: antibody-mediated virus internalization. This property may in part explain the protective effect of a vaccine against acquisition of neutralization virus in non-human primates [66]. In a recent study, this effect was observed with mucosal anti-HIV IgG from the genital tract of HIV-infected women [67]. This property was not to date described in semen.

## **Future perspectives for prevention strategies**

Far less is known about immune response in male genital tract than is known about immune response in female genital tract. The improved knowledge of the role of Igs, specific or non-specific for HIV-1, present at the genital tract level may help to develop more pertinent strategies in the field of HIV transmission prevention. Natural HIV infection leads to the production of neutralizing antibodies (NAbs) in some HIV-infected patients [68]. Most of the studies explore these NAbs in sera and not in genital fluids. One can expect that Igs in genital fluids might be more specific of sexually transmitted variants [69,70]. Therefore, identifying such antibodies able of ADCC and/or inhibiting HIV transcytosis is challenging in the aim to develop preventive strategies of HIV sexual transmission. More specifically, the following properties are desirable: (i) neutralizing IgA at mucosal surfaces, (ii) HIV-specific neutralizing antibodies targeting cell-free virus, (iii) neutralizing antibodies targeting cellular HIV receptor and co-receptors, (iv) antibodies able to initiate ADCC, (v) neutralizing antibodies or Fc $\gamma$ R-mediated antibodies inhibiting HIV cell-to-cell transmission [71].

Two crucial characteristics (the potency and the breadth) are needed for HIV specific Nabs. First, the potency is evaluated by the inhibitory concentrations rate and, secondly, the breadth is the ability to neutralize a large diversity of primary isolates [72]. It has been previously demonstrated that a passive transfer of broadly NAbs (2F5 and 2G12) protected non-human primates from HIV-infection after SHIV intra-vaginal challenges [73]. Since 2009, new broader and more potent monoclonal NAbs were identified [74]. Intravenous infusion of these antibodies (VRC01, PG9, 10E8) targeting CD4 binding site protects NHP from SHIV infection after intravaginal or intrarectal challenges [75]. After a successful evaluation phase of safety and tolerability of this approach, phase II trials are now in progress [76]. The list of NAbs currently evaluated in clinical trials is detailed in Table 1. To be used in PrEP strategies, NAbs need also to confer a protection against a large panel of primary isolates.

Combining different NAbs is an interesting alternative to circumvent the large diversity of HIV strains [77]. Moreover, NAbs should confer a long-term protection. It is therefore important to conduct longitudinal studies including repeated challenges to check this point [77]. If most of the studies were conducted with intravenous infusion of Nabs, a topical formulation of VRC01 demonstrated its efficacy to protect from HIV acquisition after vaginal challenge in a humanized mouse model [78]. The protective effect of NAbs locally applied was recently confirmed by *ex vivo* experiments [79]. The protective effects was not affected by semen, and was greater in colonic tissue than in ectocervical tissue [79]. Different isotypes and administration mode of NAbs might be combined in preventive strategies. It has been described that rectally applied dimeric IgA derived from bNAb HGN194 could effectively protect nonhuman primates from rectal challenge by SIV [80]. In a recent work, a 100 % protection from mucosal SHIV challenges in Rhesus macaques (RM) was observed after intravenous administration of IgG version of bNAb HGN194 associated with mucosal administration of the dIgA2 version of this bNAb [81], whereas only administration of IgG resulted in an infection of all treated RM, and the administration of only dIgA2 subtype of this bNabs resulted in the protection of only 17 % of the RM. Most of these previously developed NAbs originated from blood of HIV-infected patients. These observations suggest that broadly NAbs may be used in pre and post-exposure prophylaxis, after passive transfer or local application. PreP strategies using antibodies might be an alternative to drugs-based PreP, particularly in women. Indeed, it was reported that drugs-based PreP was less efficient in women than in men [3,82].

Mechanisms of bNabs protection are not fully understood. In a recent study in NHP, mechanisms of the bNAb PGT121 (intravenously administered) protection were evaluated [83]. All treated RM were protected against SHIV. First, SHIV-RNA and SHIV-DNA were detected in distal tissues (female reproductive tract, gastrointestinal tract, lymph nodes) in the

first day following intravaginal SHIV challenge in PGT121 treated rhesus monkeys (RM), and in controls. The SHIV-RNA viral load was greater in PGT121 treated RM than in controls. Authors suggested that PGT121 may facilitate mucosal translocation of SHIV. Secondly, they did not observe any difference in Lymphocytes T responses. Then, transcriptomic analysis demonstrated that PGT121 administration induced activation of innate immunity and of antiviral pathways. Ten days after SHIV challenge, SHIV was cleared from tissue previously exhibiting SHIV-RNA, or SHIV-DNA in treated RM. Furthermore, PGT121 did not affect the replicative capacity of SHIV in treated RM, as virus recovered from treated RM was replication-competent *in vitro* [83]. Further researches are needed to elucidate the mechanism of bNAbs protection.

The identification of mucosal IgA in HESN subjects and of highly neutralizing IgA in saliva [28] and milk [29] are in favor of a protective effect of IgA at mucosal sites. Female genital tract contains dendritic cells (DC) exerting antiviral responses [84] and these cells exhibit IgA receptors. Anti-HIV IgA may reinforce DC recruitment and antiviral activities. Moreover, bNAbs like 2F5 and 4E10 cross-react with self-antigens. Developing new bNAbs less autoreactive, than 2F5 and 4E10 with an IgA subtype, and easily producible is challenging. Using murine hybridoma, two new broadly neutralizing IgA1 were produced directed against conserved epitope of MPER region: F4.30, C6.11 [85].

Other antibodies mediated protection strategies with other targets were evaluated. Recently, an adeno-associated vectored eCD4 Ig, a fusion of CD4 Ig with a small CCR5 mimetic sulfopeptide, was demonstrated to be efficient by intramuscular route in a macaque model [86]. In addition to NAbs, antibodies targeting cellular HIV receptors and co-receptors may protect individual from HIV-acquisition. In a murine model, antibodies targeting  $\beta$  integrin used as candidate microbicides protected mice from HIV infection after vaginal challenges [87]. However, the disadvantage of passive transfer of HIV-specific NAbs, or NAbs targeting

cellular receptors and co-receptors is the risk of the rapid reduction of their concentrations at the mucosal sites, and a decrease in efficiency. To circumvent these difficulties, immunization remains the best alternative to achieve a durable mucosal immunity, but immune response in genital tract might be assessed in pre-clinical studies and clinical studies.

Then, as HIV is able to disrupt mucosal barrier after interaction between gp120 and HIV co-receptors on mucosa, molecules, able to block pro-inflammatory response and activation of different pathways involved in tight junctions disruption, might be alternative or additional strategies [88].

To date, antiretroviral based PrEP and TasP are the best preventive strategies for HIV sexual transmission. Identifying broadly neutralizing antibodies, antibodies able to interact with HIV receptors expressed at the surface of host cells, antibodies involved in ADCC and ADVI, and antibodies blocking viral transcytosis in HIV-infected or HESN individuals is crucial to develop immunological prophylactic approaches conferring long-term protection. Most studies focused on antibodies identified in sera. Antibodies identified in genital fluids might be more specific of HIV sexually transmitted variants, but their purification and analysis remain difficult. Evaluating the role of HIV-specific in genital fluids is challenging whereas genital tract is the primary source of HIV and one of the primary site of infection.



<b>Antibody</b>	<b>Target site</b>	<b>Breadth (percentage of neutralized primary isolates)</b>	<b>Evaluation to prevent HIV sexual transmission</b>
<b>B12</b>	gp120	48	Evaluated in a humanized mouse model in combination with B12, 2F5, 4E10, and 2G12 [78]
<b>4E10</b>	gp41 MPER	96	Evaluated in a humanized mouse model in combination with B12, 2F5, 4E10, and 2G12 [78], Phase I study [89]
<b>2F5</b>	gp41 MPER	58	Evaluated in NHP[73], Evaluated in a humanized mouse model in combination with B12, 2F5, 4E10, and 2G12 [78]
<b>VRC01</b>	gp120	90	Evaluated in a humanized mouse model [78] and in combination with 3BNC117, VRC01-LS, and 10-1074 in NHP [77] Demonstrated safety and tolerability [76] Starting Phase 2b in the USA and South Africa (HVTN 703 and HVTN 704)
<b>10E8</b>	gp41 MPER	98	Undergoing development
<b>3 BNC 117</b>	gp120	82	Evaluated in combination with 3BNC117, VRC01-LS, and 10-1074 in NHP [77] Undergoing Phase I trial in combination with 10-1074
<b>10-1074</b>	gp120	65	Undergoing Phase I trial alone and in combination with 3 BNC 117
<b>2G12</b>	gp120	27	Evaluated in NHP [73]

**Table 1 : Main neutralizing antibodies evaluated or under evaluation for prevention of HIV sexual transmission (adapted from Mascola and Haynes [72], [www.avac.org](http://www.avac.org) and <https://clinicaltrials.gov>)**

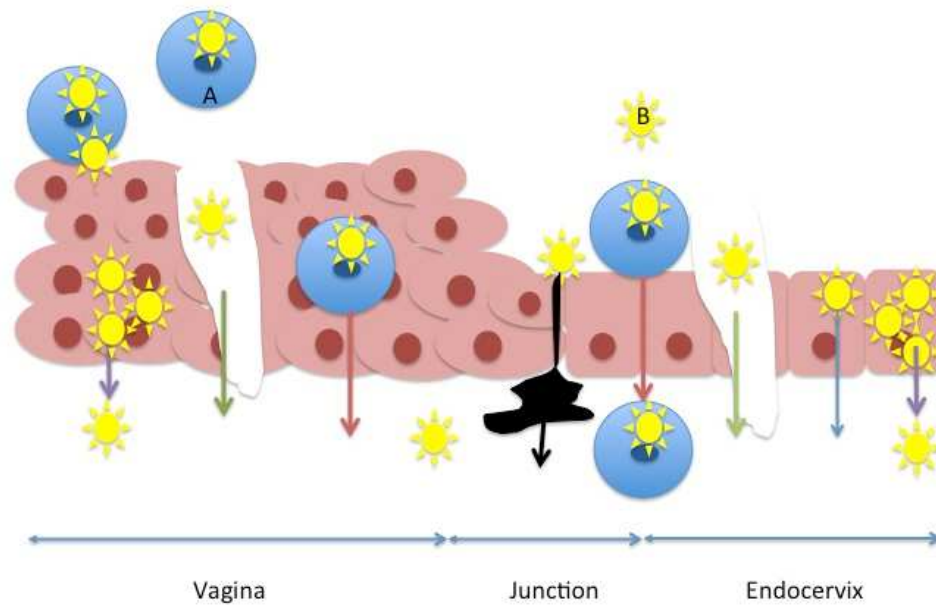


Figure 1: Mechanisms involved in HIV crossing women genital epithelia. A: Cell-associated HIV, B: free HIV virions, green lines: HIV crossing epithelia through disrupted epithelia, red lines: transmigration of infected cells, blue lines: transcytosis of free virions, purple lines: infection of epithelial cells, black line:

## References

- 1 Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 2010; **329**:1168–1174.
- 2 Cohen MS, Smith MK, Muessig KE, Hallett TB, Powers KA, Kashuba AD. Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here? *The Lancet* 2013; **382**:1515–1524.
- 3 Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, Gomez K, Mgodhi N, Nair G, *et al.* Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med* 2015; **372**:509–518.
- 4 Global AIDS update— UNAIDS | 2016. [http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-AIDS-update-2016\\_en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-AIDS-update-2016_en.pdf)
- 5 Wang H, Wolock TM, Carter A, Nguyen G, Kyu HH, Gakidou E, *et al.* Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV* doi:10.1016/S2352-3018(16)30087-X
- 6 Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS* 2014; **28**:1509–1519.
- 7 Barreto-de-Souza V, Arakelyan A, Margolis L, Vanpouille C. HIV-1 vaginal transmission: cell-free or cell-associated virus? *Am J Reprod Immunol* 2014; **71**:589–599.
- 8 Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, *et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1996; **348**:1347–1351.
- 9 Shen R, Smith PD. Mucosal Correlates of Protection in HIV-1-Exposed Sero-negative Persons. *Am J Reprod Immunol* 2014; **72**:219–227.
- 10 Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: A Delicate Balance between Strength and Control. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**. doi:10.1155/2012/875821

- 11 Mestecky J. Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. *J Reprod Immunol* 2007; **73**:86–97.
- 12 Haimovici F, Mayer KH, Anderson DJ. Quantitation of HIV-1-specific IgG, IgA, and IgM antibodies in human genital tract secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1997; **15**:185–191.
- 13 Russell MW, Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes Infect* 2002; **4**:667–677.
- 14 Mestecky J, Moldoveanu Z, Smith PD, Hel Z, Alexander RC. Mucosal immunology of the genital and gastrointestinal tracts and HIV-1 infection. *J Reprod Immunol* 2009; **83**:196–200.
- 15 Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo Caputo S, Veas F, Clerici M. The “immunologic advantage” of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 2009; **23**:161–175.
- 16 Omosa-Manyonyi G, Park H, Mutua G, Farah B, Bergin PJ, Laufer D, *et al.* Acceptability and feasibility of repeated mucosal specimen collection in clinical trial participants in Kenya. *PloS One* 2014; **9**:e110228.
- 17 Hildesheim A, McShane LM, Schiffman M, Bratti MC, Rodriguez AC, Herrero R, *et al.* Cytokine and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: reproducibility of the Weck-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J Immunol Methods* 1999; **225**:131–143.
- 18 Donadoni C, Bisighini C, Scotti L, Diomede L, Ngyen M, Nouhin J, *et al.* Setting of methods for analysis of mucosal antibodies in seminal and vaginal fluids of HIV seropositive subjects from Cambodian and Italian cohorts. *PloS One* 2010; **5**:e9920.
- 19 Li M, Salazar-Gonzalez JF, Derdeyn CA, Morris L, Williamson C, Robinson JE, *et al.* Genetic and Neutralization Properties of Subtype C Human Immunodeficiency Virus Type 1

Molecular env Clones from Acute and Early Heterosexually Acquired Infections in Southern Africa. *J Virol* 2006; **80**:11776–11790.

20 Frost SDW, Liu Y, Pond SLK, Chappey C, Wrin T, Petropoulos CJ, *et al.* Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Envelope Variation and Neutralizing Antibody Responses during Transmission of HIV-1 Subtype B. *J Virol* 2005; **79**:6523–6527.

21 Wilen CB, Parrish NF, Pfaff JM, Decker JM, Henning EA, Haim H, *et al.* Phenotypic and Immunologic Comparison of Clade B Transmitted/Founder and Chronic HIV-1 Envelope Glycoproteins. *J Virol* 2011; **85**:8514–8527.

22 Joseph SB, Swanstrom R, Kashuba ADM, Cohen MS. Bottlenecks in HIV-1 transmission: insights from the study of founder viruses. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**:414–425.

23 Oberle CS, Joos B, Rusert P, Campbell NK, Beauparlant D, Kuster H, *et al.* Tracing HIV-1 transmission: envelope traits of HIV-1 transmitter and recipient pairs. *Retrovirology* 2016; **13**. doi:10.1186/s12977-016-0299-0

24 Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, *et al.* HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; **13**:23–29.

25 Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, *et al.* Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41. *AIDS* 2002; **16**:1731–1741.

26 Cartry O, Moja P, Quesnel A, Pozzetto B, Lucht FR, Genin C. Quantification of IgA and IgG and specificities of antibodies to viral proteins in parotid saliva at different stages of HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**:47–53.

27 Vincent N, Malvoisin E, Pozzetto B, Lucht F, Genin C. Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-

infected patients. *AIDS* 2004; **18**:37–43.

28 Benjelloun F, Dawood R, Urcuqui-Inchima S, Rochereau N, Chanut B, Verrier B, *et al.* Secretory IgA specific for MPER can protect from HIV-1 infection in vitro. *AIDS* 2013; **27**:1992–1995.

29 Pollara J, McGuire E, Fouda GG, Rountree W, Eudailey J, Overman RG, *et al.* Association of HIV-1 Envelope-Specific Breast Milk IgA Responses with Reduced Risk of Postnatal Mother-to-Child Transmission of HIV-1. *J Virol* 2015; **89**:9952–9961.

30 Mestecky J, Wright PF, Lopalco L, Staats HF, Kozlowski PA, Moldoveanu Z, *et al.* Scarcity or absence of humoral immune responses in the plasma and cervicovaginal lavage fluids of heavily HIV-1-exposed but persistently seronegative women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; **27**:469–486.

31 Lo Caputo S, Trabattoni D, Vichi F, Piconi S, Lopalco L, Villa ML, *et al.* Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS* 2003; **17**:531–539.

32 Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, Trabattoni D, Lo Caputo S, Semplici F, *et al.* Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis* 1999; **180**:871–875.

33 Ghys PD, Bélec L, Diallo MO, Ettiègne-Traoré V, Becquart P, Maurice C, *et al.* Cervicovaginal anti-HIV antibodies in HIV-seronegative female sex workers in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS* 2000; **14**:2603–2608.

34 Horton RE, Ball TB, Wachichi C, Jaoko W, Rutherford WJ, Mckinnon L, *et al.* Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; **25**:83–92.

35 Devito C, Hinkula J, Kaul R, Lopalco L, Bwayo JJ, Plummer F, *et al.* Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. *AIDS* 2000; **14**:1917–1920.

- 36 Hasselrot K, Säberg P, Hirbod T, Söderlund J, Ehnlund M, Bratt G, *et al.* Oral HIV-exposure elicits mucosal HIV-neutralizing antibodies in uninfected men who have sex with men. *AIDS* 2009; **23**:329–333.
- 37 Prodger JL, Hirbod T, Kigozi G, Nalugoda F, Reynolds SJ, Galiwango R, *et al.* Immune correlates of HIV exposure without infection in foreskins of men from Rakai, Uganda. *Mucosal Immunol* 2014; **7**:634–644.
- 38 Hirbod T, Kong X, Kigozi G, Ndyanabo A, Serwadda D, Prodger JL, *et al.* HIV Acquisition Is Associated with Increased Antimicrobial Peptides and Reduced HIV Neutralizing IgA in the Foreskin Prepuce of Uncircumcised Men. *PLoS Pathog* 2014; **10**. doi:10.1371/journal.ppat.1004416
- 39 Liu CM, Osborne BJW, Hungate BA, Shahabi K, Huibner S, Lester R, *et al.* The Semen Microbiome and Its Relationship with Local Immunology and Viral Load in HIV Infection. *PLoS Pathog* 2014; **10**:e1004262.
- 40 Cranage M, Sharpe S, Herrera C, Cope A, Dennis M, Berry N, *et al.* Prevention of SIV rectal transmission and priming of T cell responses in macaques after local pre-exposure application of tenofovir gel. *PLoS Med* 2008; **5**:e157; discussion e157.
- 41 Kersh EN, Adams DR, Youngpairoj AS, Luo W, Zheng Q, Cong M, *et al.* T cell chemo-vaccination effects after repeated mucosal SHIV exposures and oral pre-exposure prophylaxis. *PloS One* 2011; **6**:e19295.
- 42 Tsegaye TS, Butler K, Luo W, Radzio J, Srinivasan P, Sharma S, *et al.* Repeated Vaginal SHIV Challenges in Macaques Receiving Oral or Topical Preexposure Prophylaxis Induce Virus-Specific T-Cell Responses. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2015; **69**:385–394.
- 43 Pattacini L, Murnane PM, Baeten JM, Fluharty TR, Thomas KK, Bukusi E, *et al.* Antiretroviral Pre-Exposure Prophylaxis Does Not Enhance Immune Responses to HIV in Exposed but Uninfected Persons. *J Infect Dis* 2015; **211**:1943–1952.

- 44 Lund JM, Broliden K, Pyra MN, Thomas KK, Donnell D, Irungu E, *et al.* HIV-1-neutralizing IgA is detected in genital secretions of highly HIV-1 exposed seronegative women on oral pre-exposure prophylaxis. *J Virol* 2016; :JVI.01482–16.
- 45 Molina J-M, Capitant C, Spire B, Pialoux G, Cotte L, Charreau I, *et al.* On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 2015; **373**:2237–2246.
- 46 Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997; **3**:42–47.
- 47 Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, Kahn B, *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *J Virol* 2007; **81**:395–405.
- 48 Hocini H, Bélec L, Ischaki S, Garin B, Pillot J, Becquart P, *et al.* High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; **13**:1179–1185.
- 49 Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, *et al.* Mucosal and Plasma IgA from HIV-1-Exposed Uninfected Individuals Inhibit HIV-1 Transcytosis Across Human Epithelial Cells. *J Immunol* 2000; **165**:5170–5176.
- 50 Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, *et al.* Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* 2000; **165**:5170–5176.
- 51 Broliden K, Hinkula J, Devito C, Kiama P, Kimani J, Trabattoni D, *et al.* Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett* 2001; **79**:29–36.
- 52 Alfsen A, Iniguez P, Bouguyon E, Bomsel M. Secretory IgA specific for a conserved epitope on gp41 envelope glycoprotein inhibits epithelial transcytosis of HIV-1. *J Immunol* 2001; **166**:6257–6265.



- 53 Bélec L, Ghys PD, Hocini H, Nkengasong JN, Tranchot-Diallo J, Diallo MO, *et al.* Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis* 2001; **184**:1412–1422.
- 54 Bomsel M, Pastori C, Tudor D, Alberti C, Garcia S, Ferrari D, *et al.* Natural mucosal antibodies reactive with first extracellular loop of CCR5 inhibit HIV-1 transport across human epithelial cells. *AIDS* 2007; **21**:13–22.
- 55 Gupta S, Gach JS, Becerra JC, Phan TB, Pudney J, Moldoveanu Z, *et al.* The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog* 2013; **9**:e1003776.
- 56 Gonzalez OA, Sagar M. Antibodies and Acidic Environment Do Not Enhance HIV-1 Transcytosis. *J Infect Dis* Published Online First: 4 August 2016. doi:10.1093/infdis/jiw354
- 57 Battle-Miller K, Eby CA, Landay AL, Cohen MH, Sha BE, Baum LL. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Cervical Lavage Fluids of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Women. *J Infect Dis* 2002; **185**:439–447.
- 58 Nag P, Kim J, Sapiega V, Landay AL, Bremer JW, Mestecky J, *et al.* Women with cervicovaginal antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity have lower genital HIV-1 RNA loads. *J Infect Dis* 2004; **190**:1970–1978.
- 59 M. Aziz, M. Mata, F. Mahmood, H. Durkin, C. Liu, R. Greenblatt, M. Nowicki, E. Golu, K. Anastos, A. French L. Baum1. Comparative activity of IgA mediated antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in the genital mucosa of HIV seroconverters and highly exposed seronegative women. AIDS 2012 Washington:
- 60 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* 2012; **8**:e1002739.
- 61 Kim JH, Excler J-L, Michael NL. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1

vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu Rev Med* 2015; **66**:423–437.

62 Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, Alam SM, Liao H-X, Pollara J, *et al.* Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc Natl Acad Sci* 2013; **110**:9019–9024.

63 Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 2012; **366**:1275–1286.

64 Parsons MS, Madhavi V, Ana-Sosa-Batiz F, Center RJ, Wilson KM, Bunupuradah T, *et al.* Brief Report: Seminal Plasma Anti-HIV Antibodies Trigger Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity: Implications for HIV Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 2016; **71**:17–23.

65 Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, David A, Luong TT, Nguyen NV, *et al.* Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J Immunol* 2003; **171**:5663–5667.

66 Barouch DH, Liu J, Li H, Maxfield LF, Abbink P, Lynch DM, *et al.* Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. *Nature* 2012; **482**:89–93.

67 Tay MZ, Liu P, Williams LD, McRaven MD, Sawant S, Gurley TC, *et al.* Antibody-Mediated Internalization of Infectious HIV-1 Virions Differs among Antibody Isotypes and Subclasses. *PLOS Pathog* 2016; **12**:e1005817.

68 Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 2009; **15**:866–870.

69 Sagar M, Laeyendecker O, Lee S, Gamiel J, Wawer MJ, Gray RH, *et al.* Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J Infect Dis* 2009; **199**:580–589.

- 70 Smith SA, Kilgore KM, Kasturi SP, Pulendran B, Hunter E, Amara RR, *et al.* Signatures in Simian Immunodeficiency Virus SIVsmE660 Envelope gp120 Are Associated with Mucosal Transmission but Not Vaccination Breakthrough in Rhesus Macaques. *J Virol* 2016; **90**:1880–1887.
- 71 Su B, Moog C. Which Antibody Functions are Important for an HIV Vaccine? *Front Immunol* 2014; **5**. doi:10.3389/fimmu.2014.00289
- 72 Mascola JR, Haynes BF. HIV-1 neutralizing antibodies: understanding nature's pathways. *Immunol Rev* 2013; **254**:225–244.
- 73 Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000; **6**:207–210.
- 74 Hefferon KL. Broadly neutralizing antibodies and the promise of universal vaccines: where are we now? *Immunotherapy* 2014; **6**:51–57.
- 75 Pegu A, Yang Z, Boyington JC, Wu L, Ko S-Y, Schmidt SD, *et al.* Neutralizing antibodies to HIV-1 envelope protect more effectively in vivo than those to the CD4 receptor. *Sci Transl Med* 2014; **6**:243ra88.
- 76 Ledgerwood JE, Coates EE, Yamshchikov G, Saunders JG, Holman L, Enama ME, *et al.* Safety, pharmacokinetics and neutralization of the broadly neutralizing HIV-1 human monoclonal antibody VRC01 in healthy adults. *Clin Exp Immunol* 2015; **182**:289–301.
- 77 Gautam R, Nishimura Y, Pegu A, Nason MC, Klein F, Gazumyan A, *et al.* A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges. *Nature* 2016; **533**:105–109.
- 78 Veselinovic M, Neff CP, Mulder LR, Akkina R. 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* 2012; **432**:505–510.
- 79 Scott YM, Park SY, Dezzutti CS. Broadly Neutralizing Anti-HIV Antibodies Prevent

- HIV Infection of Mucosal Tissue Ex Vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**:904–912.
- 80 Watkins JD, Sholukh AM, Mukhtar MM, Siddappa NB, Lakhashe SK, Kim M, *et al.* Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. *AIDS* 2013; **27**:F13–20.
- 81 Sholukh AM, Watkins JD, Vyas HK, Gupta S, Lakhashe SK, Thorat S, *et al.* Defense-in-depth by mucosally administered anti-HIV dimeric IgA2 and systemic IgG1 mAbs: complete protection of rhesus monkeys from mucosal SHIV challenge. *Vaccine* 2015; **33**:2086–2095.
- 82 Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, *et al.* Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med* 2010; **363**:2587–2599.
- 83 Liu J, Ghneim K, Sok D, Bosche WJ, Li Y, Chipriano E, *et al.* Antibody-mediated protection against SHIV challenge includes systemic clearance of distal virus. *Science* 2016; **353**:1045–1049.
- 84 Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Barr FD, Boesch AW, Ackerman ME, Kappes JC, *et al.* Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. *Mucosal Immunol* Published Online First: 31 August 2016. doi:10.1038/mi.2016.72
- 85 Benjelloun F, Oruc Z, Thielens N, Verrier B, Champier G, Vincent N, *et al.* First Membrane Proximal External Region-Specific Anti-HIV1 Broadly Neutralizing Monoclonal IgA1 Presenting Short CDRH3 and Low Somatic Mutations. *J Immunol* 2016; **197**:1979–1988.
- 86 Gardner MR, Kattenhorn LM, Kondur HR, von Schaewen M, Dorfman T, Chiang JJ, *et al.* AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature* 2015; **519**:87–91.
- 87 Guedon JT, Luo K, Zhang H, Markham RB. Monoclonal and Single Domain Antibodies Targeting  $\beta$ -Integrin Subunits Block Sexual Transmission of HIV-1 in In Vitro

and In Vivo Model Systems. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015; **69**:278–285.

88 Tugizov S. Human immunodeficiency virus-associated disruption of mucosal barriers and its role in HIV transmission and pathogenesis of HIV/AIDS disease. *Tissue Barriers* 2016; **4**:e1159276.

89 Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jäger W, Köller U, Jilch R, *et al.* Passive immunization with the anti-HIV-1 human monoclonal antibody (hMAb) 4E10 and the hMAb combination 4E10/2F5/2G12. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**:915–920.

## Conclusions et Perspectives

Au niveau mondial, l'épidémie liée à HIV est en recul. Néanmoins, avec 6 000 nouvelles infections par jour, touchant majoritairement des jeunes femmes dans les pays de forte endémicité et essentiellement des jeunes HSH dans les pays occidentaux, le développement de stratégies de prévention de la transmission sexuelle reste crucial. Le TasP donne d'excellents résultats dans les études cliniques, mais sur le terrain, une réduction du nombre de nouvelles contaminations nécessite—un dépistage efficace et une cascade de soins favorable avec une accessibilité majeure au TARV. La PrEP basée sur les ARV a montré son efficacité dans des populations HSH dans les pays occidentaux, les résultats dans les pays de forte endémicité et chez les femmes étant plus modestes. Ces discordances prouvent qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de stratégies de prévention unique de la transmission sexuelle universelle et qu'il convient d'une part de combiner les approches et d'autre part de proposer une solution adaptée à la population cible. En effet, à chaque profil de sujets à risque, une stratégie doit être proposée en tenant compte des particularités épidémiologiques et comportementales ainsi que des capacités d'observance.

Le sperme reste le principal vecteur de transmission de HIV. Les stratégies de TasP pourraient être mises en défaut du fait de la compartimentation entre le tractus génital masculin et le compartiment systémique ce qui pose le problème de la biodisponibilité des ARV au niveau tissulaire. Dans la première partie de notre travail, nous avons effectivement observé des concentrations d'ARV variables dans le plasma sérial (témoin de la diffusion dans le tractus génital masculin), avec des taux observés supérieurs aux concentrations systémiques efficaces requises pour seulement 1 à 2 ARV chez plusieurs patients. A l'ère des stratégies d'allègement thérapeutique, nos données soulignent la nécessité d'évaluer la présence de HIV dans le sperme, en particulier lorsque la stratégie d'allègement fait appel à une monothérapie d'inhibiteurs de protéase. La diffusion des inhibiteurs de protéase dans le tractus génital masculin est limitée.

De plus, les NSMC constituent un réservoir de virus HIV latents chez les patients traités, et

pourraient potentiellement jouer un rôle dans la transmission sexuelle, dans des conditions d'inflammation locale par exemple. Le TARV ne semble pas réduire le taux d'ADN viral dans les NSMC. L'impact de ce virus latent en terme de transmission reste une question majeure. Les virus latents sont le plus souvent des virus défectifs, incapables de se répliquer, en particulier lorsqu'ils présentent plusieurs sites d'intégration dans le génome cellulaire (152). Effectivement, nous avons tenté de cultiver des NSMC infectés purifiés à partir du sperme de patients traités, et nous n'avons pas observé de reprise d'une répllication virale en l'absence de TARV. Ces résultats sont à confirmer dans la mesure où seulement 3 spermatozoïdes ont été utilisés et que nous n'avons pas évalué le nombre et la nature des sites d'intégration de HIV dans ces NSMC. Nous n'avons pas non plus évalué la capacité de ces cellules à transmettre des virions par contact de cellule à cellule par des techniques de co-culture. De même, des marqueurs viraux complémentaires comme les formes 2LTR ou l'ARN multiépissé n'ont pas été utilisés pour évaluer la taille du réservoir génital. Cette latence virale est un obstacle majeur aux stratégies dites de « Cure » définitive du réservoir viral à l'origine d'une activation immunitaire persistante, ainsi que d'un rebond viral en cas d'interruption du TARV. De multiples stratégies sont en cours d'évaluation afin de réactiver ce réservoir latent pour mieux l'éradiquer. Seule la stratégie d'intensification thérapeutique (maraviroc et raltégravir en plus du TARV habituel) a été évaluée dans le tractus génital masculin, et n'a malheureusement pas été efficace pour éradiquer ce réservoir. A l'ère du TasP, il paraît essentiel et naturel d'évaluer l'évolution du réservoir génital de HIV dans les stratégies d'éradication virale ou pour la comparaison de différentes lignes thérapeutiques. Plusieurs études actuellement promues par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) comporte un volet sur cette évaluation.

Le TasP et la PrEP sont des stratégies efficaces mais le développement d'un vaccin préventif (conférent une protection prolongée) conserve bien sûr tout son intérêt dans la perspective de l'éradication de l'épidémie. Un des écueils est bien évidemment la grande



variabilité de HIV en particulier de la gp120, et de la gp41. Il est donc difficile d'obtenir des anticorps à large spectre capables de prévenir l'infection par le plus grand nombre de souches virales. Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes attachés à étudier la réponse humorale dirigée contre HIV dans le sperme. Nous avons formulé l'hypothèse que du fait de la compartimentation de la réponse humorale dans le tractus génital masculin, les anticorps produits localement pourraient avoir une grande affinité pour les souches virales transmises par voie sexuelle (souvent différentes et correspondant à un variant minoritaire chez le sujet source). Nous avons purifié les IgG et IgA du plasma séminal de patients CI et de sujets HENI. Les capacités de neutralisation de ces Ig ont été évaluées sur des souches virales de laboratoire (LAI X4-tropique, SF162 R5-tropique). Les Ig purifiées à partir du plasma séminal de sujets CI et de sujets exposés non infectés (présentant des IgA HIV spécifiques dans le plasma séminal,) ont été capables de neutraliser le virus LAI (à tropisme X4). Ces capacités de neutralisation devraient être explorées vis-à-vis d'isolats primaires, afin d'identifier des anticorps neutralisant à large spectre. Par ailleurs, la capacité des Ig G et A dirigées contre HIV à traverser un épithélium monocouche pose la question d'un rôle facilitateur des anticorps pour le franchissement muqueux des particules virales de HIV. Concernant les IgG, il a été montré que ce mécanisme dépendait du Fc-récepteur, qui pourrait donc être une cible pour une stratégie de prévention. Nous avons mis en évidence la capacité de transcytose des IgA. Ces IgA, en se liant aux particules virales HIV, pourraient aussi jouer un tel rôle facilitateur. Par ailleurs, Une meilleure compréhension des mécanismes de transcytose des IgA pourrait ouvrir la voie vers de nouvelles cibles. Ces capacités de transcytose pourraient aussi être utilisées comme moyen de transport et d'adressage d'antigènes pour entraîner une réponse immunitaire locale efficace. Ceci constitue un axe de recherche important développé actuellement au sein du GIMAP.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de Thèse doivent être poursuivis et complétés.

En particulier, l'évaluation du réservoir viral dans les NSMC et du risque de transmission

liée aux cellules infectées à partir du sperme doit se poursuivre. Les facteurs de risque pouvant entraîner une réactivation des formes latentes et donc conduire à la transmission des quasi-espèces de ce réservoir doivent être précisés, en particulier dans les populations infectées par HIV et contrôlées par un TARV efficace au niveau systémique. En effet, à l'heure où il semble admis, que le risque de transmission par voie sexuelle est limité lorsque le partenaire infecté est efficacement traité, il serait intéressant d'identifier des profils des patients « à risque de transmission » malgré une charge virale indétectable au niveau systémique (i) en terme de pratiques sexuelles à risque, (ii) consommation de drogues, (iii) nature du TARV, et sa biodisponibilité dans le tractus génital masculin, (iv) profil biologique avec possibilité d'établir un score à partir de différents facteurs mesurés dans le sperme (cytokines, complément, SEVI, ADN HIV total, ARN HIV ultrasensible). Nos travaux chez les patients infectés par HIV et chez des patients exposés non infectés de la cohorte IPERGAY concernant la caractérisation et l'étude de la fonctionnalité des anticorps dirigés contre HIV sont également à poursuivre, afin de mettre en évidence des anticorps à large spectre capables de neutraliser des souches d'origine séminales, et/ou d'entraîner une activité ADCC. Ces anticorps d'intérêt pourraient être utilisés dans des stratégies préventives à base de substances à visée microbicide, d'immunothérapie ou permettre de définir des épitopes d'intérêt pour des stratégies vaccinales. Notre implication dans le CIC INSERM 1408 Vaccinologie pourrait nous donner l'opportunité de participer à des essais de préventions et/ou thérapeutiques dédiés à ces approches innovantes.

## **Autres publications en lien avec la thématique**

## **Article 4 : Current and future microbicide approaches aimed at preventing HIV infection in Women**

# Current and future microbicide approaches aimed at preventing HIV infection in women

Expert Rev. Anti Infect. Ther. 10(2), 167–183 (2012)

**Bruno Pozzetto\***,  
**Olivier Delézay**,  
**Amandine  
Brunon-Gagneux**, **Hind  
Hamzeh-Cognasse**,  
**Frédéric Lucht** and  
**Thomas Bourlet**

Groupe Immunité des Muqueuses et  
Agents Pathogènes (GIMAP-EA 3064),  
PRES de Lyon, Université Jean Monnet,  
IFRESIS et CHU de Saint-Etienne,  
42023 Saint-Etienne cedex 02, France

\*Author for correspondence:

Tel.: +33 4 77 82 84 34

Fax: +33 4 77 82 84 60

bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

Women from developing countries, in which the prevalence of HIV infection is very high, are at risk of becoming infected without having the possibility of personally controlling this risk. Therefore, there is an urgent need to develop anti-HIV vaginal microbicide strategies. This review considers the modes of entry of HIV through the mucosa of the female genital tract, the different classes of vaginal microbicide compounds, the mode of delivery of these drugs, the aims and methods of *in vitro* and animal experiments at the preclinical stage, the results of the Phase III trials conducted in different countries, including the ongoing assays, and the future orientations for the next 5 years with a discussion relative to antiviral resistance, combination strategies and development of new-generation compounds.

**KEYWORDS:** antiretroviral • female genital tract • HIV • microbicide • pre-exposure prophylaxis • prevention • sexually transmitted diseases • woman

According to the latest evaluation of UNAIDS [201], a total of 33.3 million people are infected with HIV worldwide. In 2009, approximately 2.6 million individuals became newly infected with this agent. Most of the infections are acquired via heterosexual intercourse, most notably in the parts of the world where the number of HIV-infected people is particularly high, as in sub-Saharan Africa.

As depicted in TABLE 1, a large number of strategies have been proposed for controlling the spread of the HIV outbreak. Some of them have been shown to be very successful, as exemplified by the correct and consistent use of male condoms during sexual intercourse [1], the treatment of HIV-infected subjects with HAART combining at least three drugs since 1996 [2], the prevention of mother-to-child transmission of HIV by using short-term antiretroviral (ARV) prenatal treatment [3] or, more recently, circumcision of the male partner, which was found to reduce heterosexual transmission of HIV by 50% [4–6], as well as the oral prophylactic use of ARV, either before or after blood or sexual exposure [7–9]. By contrast, to date, most attempts to develop a global vaccination prophylaxis against HIV have failed [10,11].

In light of the above considerations, it is very important to stress that men and women are not equally concerned by the different strategies

listed in TABLE 1. In the regions of the world where HIV prevalence is highest, two-thirds of infected individuals are women. Several factors could explain this greater vulnerability of women to HIV infection in the case of sexual exposure:

- In unprotected heterosexual intercourse, the probability of getting infected is two- to four-times greater in women than men;
- The current means of HIV prevention (condoms and circumcision) are less easily controlled by women than men;
- Social, cultural and economic factors contribute to a greater exposure of women to sexually transmitted infections (STIs), including HIV;
- Additional physiological circumstances such as pregnancy [12,13] may increase the risk of getting infected by HIV.

All of these reasons plead for a special need of dedicated means of HIV prevention that could be under the exclusive control of women.

The concept of microbicides has been set up in this context of greater susceptibility of women to HIV infection, even if it can be extended to homosexual transmission. Topical microbicides can be defined as chemical entities that can be applied vaginally or anally with the aims of

preventing STIs, including HIV. This review will look at the evolution of vaginal microbicides, their rationale, preclinical and clinical trials demonstrating their safety and efficacy and the way forward towards their implementation in clinical practice. Until 2010, the prophylactic use of vaginal microbicides failed to demonstrate effectiveness [14]; with the CAPRISA 004 study [15], a new era has begun, which suggests that a validated use of vaginal microbicides could contribute to control the spread of HIV in women. The deceptions and hopes generated by anti-HIV vaginal microbicides strategies are outlined in the following sections.

#### Basic concepts regarding male-to-female sexual transmission of HIV

A description of the initial steps leading to HIV infection during heterosexual intercourse is useful to help develop drugs aimed to stop or at least reduce this transmission. It includes the mechanisms that explain the crossing of the female genital epithelial barrier by the virus and the modalities of viral entry into the cells (for reviews, see [16–18]).

#### Vehicles & targets of HIV at the mucosal level

At the tissue level, the virus load transmitted via ejaculate is constituted of both cell-free particles present in the seminal plasma and infected nonpermatzoal mononuclear cells (NSMCs); the respective role of these two populations is difficult to elicit precisely and depends in part on the integrity of the female epithelium, but both of them have been shown to be infectious in animal models [19,20] and in human cervical explant studies [21]. From an anatomical point of view, the virus can infect either the pluristratified vaginal and exocervical mucosa or the endocervical and endometrial monolayer. Whereas the multilayered squamous epithelium represents the largest area for virus entry, the columnar monolayer is particularly susceptible to HIV crossing, notably at the junction between exocervix and endocervix due to its thinness (despite the presence of tight junctions between cells), the frequency of ectopies that compromise the impermeability of the epithelium and the accumulation of target cells (Langerhans cells [LCs], macrophages and CD4<sup>+</sup> T cells) for HIV [22–24].

**Table 1. Synopsis of available or putative strategies for the prevention of HIV infection.**

Type of action	Means	Gender application
Global	Prophylactic vaccination HAART in infected subjects	Female, male Female, male
Specific risks (targeted populations; pregnant women, IDUs, blood exposure)	Prevention of mother-to-child transmission IDU programs Oral antiretroviral postexposure prophylaxis	Female Female, male Female, male
Sexual exposure	Abstinence/faithful Condoms Male circumcision Oral antiretroviral pre-exposure prophylaxis Oral antiretroviral postexposure prophylaxis Vaginal microbicides	Female, male Male, (female) Male Female, male Female, male Female

HAART: Highly active antiretroviral therapy; IDU: Injecting drug users.

#### Mechanisms of HIV crossing

Five main different mechanisms have been identified that could contribute to the crossing of HIV:

- Presence of breaches in the epithelium (favored by repeated microtraumas of the mucosa during sexual intercourse and by other STIs);
- More or less abortive infection of epithelial cells;
- Transcytosis of viral particles through epithelial cells without infection;
- Transmigration of NSMCs through the genital mucosa;
- Capture of virions by the dendrites of LCs that infiltrate the mucosa.

A clear understanding of the respective part played by these different mechanisms in HIV infection would be essential for proposing adapted local prophylactic strategies. In fact, except for the first mechanism, whose role in HIV passage seems evident, it is very difficult to delineate at the present time which of these strategies is/are privileged by the virus to cross the female genital mucosa.

#### HIV entry via CD4

At the cellular level, HIV entry is also very complex; the virion has to attach to various receptors before allowing the fusion of its envelope to the cell membrane. It has been shown relatively recently that the fusion process occurred after endocytosis of HIV into endosomes [25]. For cells equipped with this receptor at the mucosal level (T lymphocytes, macrophages, monocytes, dendritic cells [DCs] and LCs), the CD4 molecule interacts with the CD4 binding site of gp120, which initiates a series of events leading to the fusion process via the interaction between CXCR4 or CCR5 coreceptors and the gp41 protein of HIV.

#### HIV entry via alternative receptors

Besides CD4, alternative receptors can contribute to cell attachment and possibly entry of HIV into the cell. Galactoside ceramide (GalCer), present at the surface of epithelial cells [26,27], is able to recognize the V3 loop of gp120 or the ELDKWA epitope of gp41 [28]. DCs can bind to gp120 via type-C lectins such as macrophage-mannose receptor [29], mannose-binding lectin [30], DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) or langerin (a lectin specific of LC) [31]. Other alternative receptors have been identified: HSPG [32] or syndecan [33]; receptors for the Fc fragment of immunoglobulins and complement fractions; receptors able to recognize molecules inherited from the host cell present at the surface of HIV particles (LFA-1 targeting HIV ICAM-1, HLA-DR); gp340 located

at the surface of epithelial cells [34] or monocytes [35] and capable of attaching the V3 loop of gp120; or integrin  $\alpha 4\beta 7$  present at the surface of activated T lymphocytes [36] specific of the V2 loop of gp120. Even if all these interactions are responsible for a limited percentage of HIV infections, they constitute interesting pathways to be taken into consideration through microbicide strategies, notably for preventing HIV attaching to CD4 and crossing the mucosa, as described in the next section.

#### Role of environmental factors

To conclude this rapid overview of interactions between HIV and the female genital mucosa, it is noteworthy to stress the role of local conditions [37] and notably of the bacterial microflora, as well as the role of the hormonal impregnation and of adventitious STIs that can all create a favorable environment for HIV penetration and infection. Last but not least, the seminal plasma is not a passive carrier of virions [38]; it contributes to a reduction in the protective acidic pH of vagina [39], it favors the attachment of virions to target cells [40] and it enhances the production of epithelial chemokines that recruit new target cells [41].

#### Classification of anti-HIV vaginal microbicide compounds

The anti-HIV vaginal microbicide compounds include a great number of products (more than 50) that are very heterogeneous in both chemical composition and mode of action, from lime juice (a substance used by sex workers in Nigeria to prevent HIV infection and now formulated in a microbicide known as Unipron® [42]) to sophisticated nanoparticulate systems [43]. TABLE 2 summarizes some of these microbicide compounds classified according to their mode of action, when known. Basically, microbicide compounds can be classified into two groups according to the selectivity of their action against HIV.

#### HIV-nonspecific compounds

Most HIV-nonspecific compounds constitute first-generation compounds that failed to demonstrate an accurate effectiveness against HIV in clinical trials (see below). The potential interest lies in their capacity to be active against several agents of STIs and, for some of them, to have spermicidal activity.

The surfactants include compounds able to disrupt cellular and microbial membranes as well as viral envelopes. Despite this broad-spectrum activity, their relatively high toxicity has led to most of them being discarded (see below).

The vaginal defense enhancers are able to preserve the physiological acidity of the vagina despite the neutralizing effect of seminal plasma. Their activity against HIV is usually modest but they can be used as excipients to dilute more active compounds. Lactobacilli are responsible for the natural acidity of the vagina; substituting this flora by recombinant lactobacilli able to produce microbicide compounds such as cyanovirin [44], or to neutralize HIV virions has been suggested [45].

Polyanions are a class of microbicides that are not cytotoxic and are active against a wide variety of STI pathogens including viruses and bacteria. They interfere with microbial binding

to target cells via heparan sulfate receptors. In addition, many polyanions are contraceptive, notably by inducing premature acrosomal loss in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [46]. Different polyanions (PRO2000®, CAP, PPCM and so on) are intended to serve as excipients in combination with a more active anti-HIV compound.

Several other drugs act as nonspecific entry inhibitors of HIV. For instance, C5A is an 18-amino acid peptide derived from the NS5A protein of hepatitis C virus that was shown to disrupt the integrity of viral membranes, including HIV, by blocking dihydrosphingomyelin [47,48].

#### HIV-specific compounds

In contrast to the precedent category, these compounds are able to block at least one specific step of the HIV replication cycle. They are much more effective against HIV but usually lack activity against other STI agents and have spermicidal effects. Some of them are already used in HAART, whereas others are dedicated to a topical administration.

#### Inhibitors of HIV entry

As described in the previous section, HIV can bind to a large number of molecules at the surface of cells located within the vaginal mucosa. Many compounds have been shown to be able to link either to viral surface components (mainly gp120 and gp41) or cellular receptors (main receptor CD4, coreceptor CCR5 or alternative receptors).

The neutralization of HIV particles can be obtained via antibodies, although monoclonal antibodies are rarely neutralizing. Optimized dendrimers were specially constructed to achieve this goal. A dendrimer is a complex nanomolecule mimicking the structure of a tree (*dendron* in greek) and comprising a core, a branching unit and a dendrimer surface [43]. SPL7013, called VivaGel™, is the prototype of this new class of HIV entry inhibitors. After having proven successful protection of pig-tailed macaques treated by a vaginal route and challenged by SHIV, it was authorized for a Phase I trial on 61 women in the USA; the results should be available soon.

The gp120 protein of HIV is targeted by several microbicide candidates (TABLE 2), including notably monoclonal antibodies (mAbs), cyanovirin N (an 11-kDa protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*, eliciting a high affinity for gp120 [49]), the Griffithsin lectin derived from red algae [50], different oligonucleotides and syndecan (or HSPG) [51].

The gp41 protein of HIV is also a very interesting target for HIV microbicides since its inhibition can prevent the fusion between the viral envelope and the cell membrane. Besides peptides such as T20 already licensed for salvage HAART, retrocyclins deserve special attention. These small lectins, which belong to the  $\theta$ -defensin family, are tetracyclic 18-residue peptides with three cysteine disulfide bonds; they are not expressed in humans (unlike nonhuman primates) due to the presence of a stop codon. The products of these six pseudogenes were recreated synthetically and called 'retrocyclins'. They inhibit HIV replication by preventing six-helix bundle formation in gp41 [52,53].

**Table 2. Classification of a selection of microbicide compounds in the clinical or preclinical stage of development according to their mechanism of action towards HIV.**

Category	Compound	Stage of development	Selected references
<i>HIV-nonspecific compounds</i>			
Surfactants (nonspecific lysis of cellular and microbial membranes and of viral envelopes)	Nonoxinol-9 or N-9	Interrupted	[81–86]
	C31G (SAVVY®)	Interrupted	[87]
	Sodium lauryl sulfate (Invisible Condom®)	Phase II/III	[93]
	Octylglycerol	Preclinical	
Vaginal defense enhancers	Carbopol 974P (Buffer gel®)	Phase III	[90]
	ACIDFORM (Amphora®)	Phase I	[103]
	Unipron® (citric acid as main active drug)	Preclinical	[42]
Entry inhibitor polyanions	Cellulose sulfate (Ushercell®)	Interrupted	[88]
	Carrageenan (Carraguard®/PC-515)	Interrupted	[89]
	Naphtalene sulfonate (PRO 2000®)	Phase III/I	[90]
	Cellulose acetate phthalate (CAP)	Preclinical	
	Sodium rutin sulfate	Preclinical	[46]
	Dextrin sulfate	Preclinical	[104]
	PPCM (poly-acidic-oligomer also called SAMMA [sulfuric-acid modified mandelic acid])	Preclinical	[105–107]
Nonpolyanion entry inhibitors	C5A	Preclinical	[47,48]
	PEHMB (poly ethylic hexamethylene biguanide)	Preclinical	[108]
	Nisin (bacteriocin naturally produced by <i>Lactococcus lactis</i> )	Preclinical	[109]
<i>HIV-specific compounds</i>			
<b>Virus entry/fusion</b>			
HIV neutralization	Optimized dendrimers: SPL7013 (Vivagel®)	Phase I	[110]
	Recombinant <i>Lactobacillus</i> (x-REPLAB)	Preclinical	[45]
gp120 targeting	Monoclonal antibodies	Preclinical	
	Cyanovirin N	Preclinical	[44,49]
	Plant lectins (Griffithsin)	Preclinical	[50]
	Oligonucleotides		
	– BMS-599793	Preclinical	[111]
	– BMS-378806	Preclinical	
– ISIS-5320	Preclinical		
Syndecan (HSPG)	Preclinical	[51]	
gp41 targeting	Peptides		
	– Enfuvirtide (T20)	Preclinical	[112]
	– T1249	Preclinical	[112]
	– C52L	Preclinical	[96]
	– L'644 (L34-Chol)	Preclinical	
	Retrocyclins (RC101)	Preclinical	[52,53]
D-peptides (PIE-12)	Preclinical	[55]	
CD4 targeting	Monoclonal antibodies (ibalizumab)	Preclinical	[56]
	Green tea flavonoid (epigallocatechin gallate)	Preclinical	[57]
	Cyclotriazadisulfonamide (CADA)	Preclinical	[58]
CCR5 targeting	Maravinoc	Preclinical	[96]
	L860167	Preclinical	
	TAK 779	Preclinical	
	CPMD 167	Preclinical	
	RANTES-analogs	Preclinical	
	Monoclonal antibodies	Preclinical	
Targeting of alternative HIV receptors (notably at the surface of Langerhans cells)	Anti-DC-SIGN monoclonal antibodies	Preclinical	[59]
	Mannans	Preclinical	
	Syndecan-FC	Preclinical	
	Anti-ICAM-1 monoclonal antibodies	Preclinical	

RTI: Reverse transcriptase inhibitor.



**Table 2. Classification of a selection of microbicide compounds in the clinical or preclinical stage of development according to their mechanism of action towards HIV (cont.).**

Category	Compound	Stage of development	Selected references
<i>HIV-specific compounds (cont.)</i>			
<b>RTIs</b>			
Nucleotidic RTIs	Tenofovir gel/PMPA KP1/KP17	Phase III Preclinical	[15]
Nucleosidic RTIs	EFdA	Preclinical	
Non-nucleosidic RTIs	TMC-120 (dapivirine)	Phase III	[113,114]
	UC-781	Phase I	[113,115]
	MIV-150	Phase I	[73]
	Pyrimidinediones (IGQP-0528)	Preclinical	[116]
	DABO compounds	Preclinical	
<b>Integrase inhibitors</b>	Raltegravir	Preclinical	[61]
	GS9160	Preclinical	
	Diterpene (118-B-24)	Preclinical	
<b>Protease inhibitors</b>	Darunavir	Preclinical	[62]
	Ritonavir	Preclinical	
	Saquinavir	Preclinical	
	Lopinavir	Preclinical	
	Fullarenes	Preclinical	
<i>Unknown/complex mechanism of action</i>			
	Glycerol monolaurate	Preclinical	[63]
	Praneem polyherbal	Preclinical	[64]
	Zinc compounds	Preclinical	[65]
	Zinc tetra-ascorbo-camphorate derivative (C14)	Preclinical	[66]

RTI: Reverse transcriptase inhibitor.

RC-101, a microbicide candidate belonging to this family and developed as a film, was recently shown to exhibit excellent *in vitro* and *ex vivo* performances [54]. Another group of peptides called D-peptides, whose leader compound is called PIE-12, was found to be able to block HIV replication at the same level but with a very strong barrier of resistance by comparison to other fusion inhibitors [55].

The CD4 receptor was considered as a target for preventing HIV binding early on. Ibalizumab is a humanized IgG4 mAb that binds to the C2 domain of CD4 [56]; in contrast to attachment inhibitors, ibalizumab does not prevent gp120 binding to CD4, but is thought to decrease the flexibility of CD4, thereby hindering access of CD4-bound gp120 to CCR5 and CXCR4. Other CD4 inhibitors are listed in TABLE 2, namely the green tea flavonoid (epigallocatechin gallate) [57] and CADA [58].

Considering that R5 strains of HIV are preferentially transmitted during primary infection, it was logical to identify the CCR5 coreceptor as a privileged target in microbicide strategies. Different approaches have yielded a range of molecules that block the interaction between HIV and CCR5, including small molecule antagonists (maraviroc is the leader compound of this class), mAbs (Mapp66 combines two mAbs directed against CCR5 and herpes simplex, respectively) and covalently modified natural CCR5 ligands (e.g., RANTES analogs).

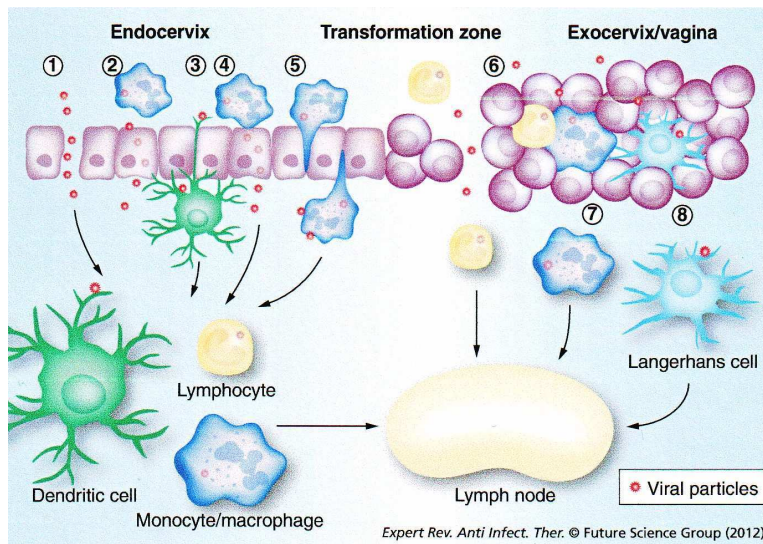
Finally, some compounds target alternative HIV receptors (DC-SIGN, HSPG or syndecan) located notably on LCs that play an important role in early HIV intake (FIGURE 1). Syndecan-Fc is an original compound that combines the ectodomain of syndecan-1 and the Fc domain of a human IgG and exhibits multiple attractive microbicidal properties on primary cellular targets including LCs [59].

#### Reverse transcriptase inhibitors

Tenofovir, a nucleotidic reverse transcriptase inhibitor (RTI), was the first drug administered intravaginally as a gel to demonstrate a significant protection to women against HIV (see below) [15]. Non-nucleosidic RTI (NNRTI) compounds are also good microbicide candidates because they possess a high therapeutic index, have an excellent diffusion in tissue and do not need previous metabolism [60]; several of them are already engaged in clinical trials (TABLE 2).

#### Protease & integrase inhibitors

More recently proposed as microbicide candidates, these two classes of potent HIV inhibitors were found able to significantly block HIV infection despite their relatively late intervention in the viral replication cycle [61]. Fullerenes belong to a family of nanomolecules (25–500 nm) originated from carbon-60; some of them were shown to inhibit the aspartic protease of HIV more



**Figure 1. Schematic representation of the epithelium crossing by cell-free or cell-associated HIV particles at the cervical/vaginal level.** The endocervical mucosa consists of a monolayer of epithelial cells (left) whereas the exocervical and vaginal mucosa is made of a multilayer of epithelial cells infiltrated by different mononuclear cells (right). The transformation zone corresponds to the junction between the exo- and the endocervix; it is frequently the place of ectopies that could facilitate HIV crossing. The region under the epithelial barrier is colonized by a great number of mononuclear cells that are able to capture the virions and migrate towards the lymph nodes in which the virus is considerably amplified before systemic spread. The numbers correspond to the respective mechanisms that have been evoked to explain HIV crossing: (1) crossing through (micro)breaches; (2) transcytosis through epithelial cells without infection; (3) capture of free virions by dendritic cells; (4) more or less abortive infection of epithelial cells; (5) transmigration of infected mononuclear cells of the semen from the apical pole of the mucosa to the submucosa; (6) infection of intraepithelial lymphocytes; (7) infection of intraepithelial monocytes; (8) capture and transport by Langerhans cells present inside the multilayer. The respective role of these different mechanisms in HIV entry at the genital level is not clearly determined at the present time.

efficiently than nevirapine [62]; however, the clinical impact of fullerenes could be compromised by possible carcinogenic and genotoxic side effects [43].

#### Compounds with uncharacterized mechanisms

Some microbicides that demonstrated at least partial activity against HIV exhibit a not-fully elucidated mode of action. This is the case for glycerol monolaurate [63], which is supposed to inhibit the inflammatory response generated by HIV-exposed epithelial cells, Praneem polyherbal [64], developed in India and containing several vegetal extracts, and zinc salts [65], including zinc tetra-ascorbo-camphorate [66], a terpen derivative.

#### Vaginal drug formulation & delivery systems

Several systems have been proposed to deliver microbicide drugs at the vaginal level (TABLE 3). Hydrogels or creams have been documented for many years and were the mode of administration of many compounds evaluated with various effectiveness in previous clinical trials (see next section). Vaginal rings benefit from

the experience of hormone vaginal delivery for more than 20 years. By contrast, films, tablets and nanoparticulate systems have been developed more recently, in great part for answering to the new needs generated by the progress of microbicide technology. Recent reviews have been dedicated to this topic [67–71]. TABLE 3 summarizes the respective advantages and limitations of these different delivery systems.

#### Hydrogels & creams

Hydrogels and creams were the substratum of most of the trials conducted in animals or in humans with nonspecific (the trial with sodium lauryl sulfate or Invisible Condom® is still in progress) as well as HIV-specific microbicide candidates, including the CAPRISA 004 study [15]. A gel consisting of hydroethylcellulose (HEC) has been proposed as a universal placebo in microbicide development [72]. Other nonspecific compounds initially tested as microbicide, including Buffer Gel®, PRO 2000® and Carrageenan (TABLE 2), are now proposed in combination with HIV-specific compounds [73,202]. Hydrogels and creams are easy to formulate at the pharmaceutical level, can be produced at low cost and are easy to store. The pharmacological stability of the active compound is well controlled. The main limits of gels are their short-lasting protection in a coitus-dependent manner and the risk of leakage that greatly reduce their acceptability. In different clinical trials,

side effects were reported in 18–85% of the women, according to the product and formulation [67].

#### Vaginal rings

In contrast to gels, elastomeric vaginal rings offer long-term coitus-independent release of the active compound in the vagina [70]. They are torus-shaped and constituted of either silicone or of thermoplastic urethane. Two kinds of devices are currently available corresponding to different technologies; for the simplest rings, the active compound is loaded within the matrix; whereas the other rings include a reservoir located inside the ring and are able to deliver the product at a constant rate for a very long period of time (FIGURE 2). In both cases, the compound diffuses through the polymer in the vagina. Due to its elasticity, the ring is easy to introduce by the woman into her vagina; the device must be inserted at the superior third of the cervix to avoid spontaneous expulsion. From a theoretical point of view, vaginal rings are very promising; several clinical trials are in progress to demonstrate their effectiveness (see next section).



**Table 3. Advantages and limitations of the different modes of microbicide delivery at the vaginal level.**

Device	Advantages	Limitations
Gels/creams	Easy to formulate at the pharmacological level Relatively low cost Well-experimented mode of delivery Good pharmacological stability for the active drug(s) Ease of storage	Risk of leakage and messy Use of an applicator that increase the cost of the device Short-lasting protection, which needs frequent applications (coitus-dependent system) Incompatible with hydrophobic compounds Difficult to hide from the partner
Rings	Easy to insert Long-lasting delivery system (coitus-independent) Well-experimented mode of delivery Good-to-excellent tolerance Hidden from the partner Progressive and possibly constant delivery of the compound(s) Ease of storage	Expensive devices (notably for unique-use rings) Unique size (risk of expulsion in a few women) Limited to compounds that can diffuse through the polymeric matrix Problem of high-scale production
Tablets	Easy to formulate at the pharmacological level Precise dosing Easy handling Easy to hide from the partner Low cost (possibility of high-scale production) Ease of storage	Coitus-dependent system Lack of experimental models, which makes the evaluation of vaginal disintegration and distribution difficult
Rapid dissolving polymeric films	Solid dry drug-delivery systems Rapid drug release Bio-adhesive properties that may increase protection Possible combination with contraceptive usage Good tolerance Ease of storage	Coitus-dependent system Sophisticated technology Difficult to hide from the partner
Nanoparticle encapsulation	Long-lasting delivery system (coitus-independent) Hidden from the partner Can encapsulate hydrophobic compounds	Experimental systems High-cost technology Safety concerns?

**Other devices**

Vaginal tablets are a good alternative to gels, avoiding leakage and any mess. From a pharmaceutical point of view, they are easy to formulate. However, there is no experimental model that allows a systematic evaluation of the pharmacokinetics of the active compound, which limits the clinical development of this formulation. Work is in progress to produce fast-dissolving tablets [69].

Vaginal films constitute another interesting alternative to gels. Rapid-dissolving polymeric films are now available due to the progress in polymer sciences; they are able to adhere rapidly to the vaginal mucosa and release the active compound without leakage. A Phase I trial has validated the good tolerance and acceptability of this device [69]. The film may also provide contraceptive activity.

Finally, nanoparticles constitute a promising vehicle for delivering microbicide candidates, including those that are not soluble in water. Encapsulation of the compound in different nanoparticle vectors, including cyclodextrins, gold or silver nanocarriers and polystyrene nanospheres [43], is hoped to allow its long-lasting delivery at the mucosal level. However, this technology is relatively new and still requires a full demonstration of its effectiveness and safety.

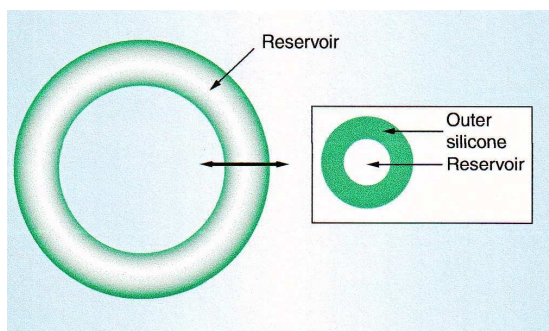
**Preclinical evaluation of microbicides**

Lessons learned from the development and testing of some compounds described in the next section have led to the need

for careful evaluation of microbicide candidates at the preclinical stage with a definition of standardized criteria allowing a clear selection of the compounds that merit introduction in the clinical pipeline. In 2004, the International Working Group on Microbicides published recommendations regarding the preclinical evaluation of microbicides [74] and recent reviews have been dedicated, at least in part, to this important subject [37,68,75,76].

Doncel and Clark defined the different steps required for the preclinical evaluation of microbicide compounds; most of them are common to all drugs whereas some others are specific to topical compounds [76]. Three levels of investigations can be defined:

- *In vitro* studies, including the evaluation of the physico-chemical properties of the compound, its release rates, its spectrum of action (on a wide panel of HIV strains, including seminal isolates and, depending on its mode of action, on other infectious agents and spermatozoa) and toxicity on cells and tissue;
- *Ex vivo* and animal studies for evaluating organ toxicity together with pharmacodynamic and pharmacokinetic properties;
- Safety and efficacy studies in animal models.



**Figure 2. Representation of a silicone vaginal ring equipped with a central reservoir aimed to contain the microbicide compound.** The figure on the right shows a transverse view of the ring. Thanks to the reservoir, the product is delivered at a constant rate through the silicone matrix.

#### *In vitro* preclinical evaluation

Different cell models (in suspension, as monolayer or as multi-layer) can be used to assess the ability of the compound to block viral infection using different HIV strains. Regarding toxicity, the assays are usually performed using a dual-chamber model in which epithelial cells are cultivated on a filter exhibiting micropores of defined size [77,78]; the compound to be tested is placed at the apical surface of the cells and different tests (schematically shown in FIGURE 3) can be used to evaluate the integrity of the mono- or multi-layer, the recruitment of immune cells and the secretion of chemokines in the basal compartment of the chamber (FIGURE 3). This model can also allow the evaluation of the role of adventitious factors such as seminal plasma, female genital tract secretions [37] or HIV-opsonization by complement fragments [79]. An example of an algorithm used for the *in vitro* selection of microbicide compounds is depicted in FIGURE 4.

#### *Ex vivo* & animal models

Some tests are common to those required for any drug, including standard toxicology performed in small rodent and non-rodent models, hypersensitivity studies performed in guinea pigs and reproductive toxicology (reproductive toxicology, teratology, peri- and post-natal toxicity) – particularly important for products intended to be used in women of child-bearing-age – in rodent and nonrodent models [76].

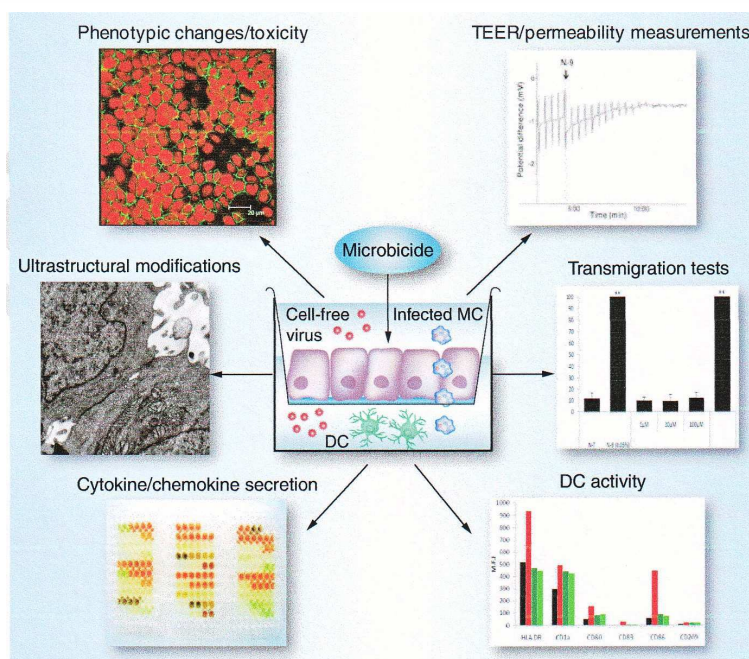
The toxicity of microbicides on vaginal tissue is currently evaluated by measuring the irritation induced on an explanted

rabbit vaginal mucosa [80]; nonhuman primates or sheep offer more adapted models with regard to physiological and anatomical conditions. The latter models are also useful for pharmacokinetics, pharmacodynamic and effectiveness studies. In the future, humanized mice could replace nonhuman primates for some of these evaluations [76].

#### Clinical considerations

##### *The perfect microbicide candidate*

Ideally, an HIV microbicide must combine a great number of properties. From a virological point of view, it must be active at the nanomolar scale with a high therapeutic index; it must be able to prevent HIV integration; it must be active against all the strains of HIV-1, including the seminal variants, cell-free and cell-associated virus, and virus of R5 and X4 tropism; it must keep its entire effectiveness in the presence of seminal plasma and vaginal secretions; it must exhibit a post-exposure effectiveness and not induce viral resistance when used by an HIV-infected woman. Regarding side effects, it must be nontoxic at the mucosal level, either directly or indirectly via the activation of inflammatory response (see previous section). In terms of spectrum of activity, the perfect microbicide would be active against other agents of STIs and could also possess spermicidal



**Figure 3. Schematic representation of a two-compartment chamber with a filter on which the cells are cultivated (the picture shows a monolayer but multilayers can be cultivated as well).** The microbicide and the virus are applied at the apical side of the chamber. The immune cells are deposited either inside the mucosa or at the basal side. Different measures can be performed to evaluate the safety of the compound; their results are schematically represented around the chamber. DC: Dendritic cell; MC: Monocyte.



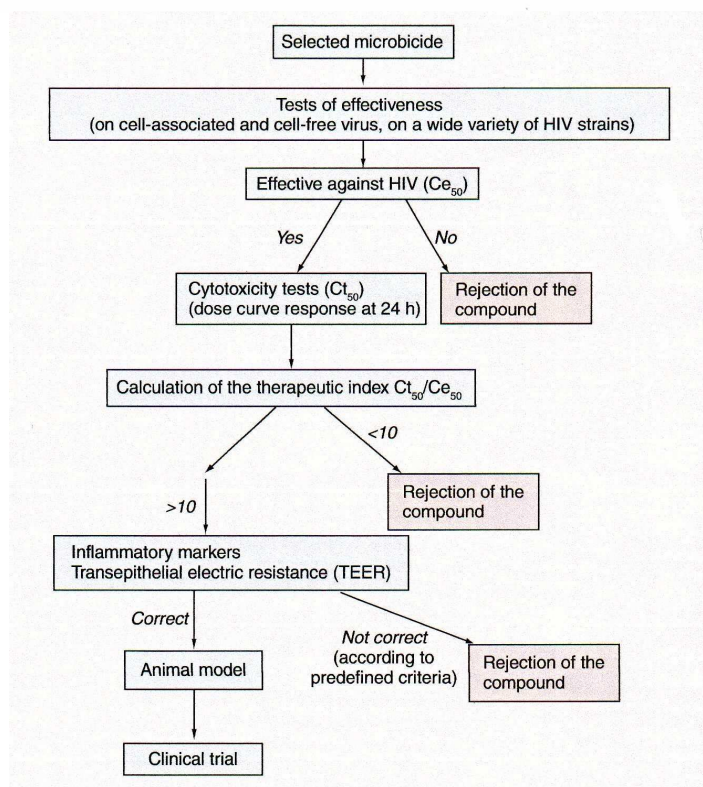
properties if needed. To be used world-wide at a very large scale, especially in poor countries, the whole device must be easy to produce at high cadence and low price and present an excellent stability, notably under tropical climates. For customers, the compound must be colorless, odorless and tasteless, be formulated in a convenient way (TABLE 3), have a long-lasting action and not interfere with sexual pleasure [68]. Some of these properties are more or less contradictory, at least for a single compound, such as: to be active against HIV in a specific way and to have a large spectrum against other agents of STIs; to result of a high technology and to be produced at a low price; or to be highly active against HIV and to exhibit no toxicity at the mucosal level.

#### Previous trials: from original sin to early stages of redemption

Although no current microbicide compound fits all of the above properties, considerable progress has been made during the last 20 years in terms of microbicide safety and effectiveness.

The microbicide story started in the early 1990s with the report of a possible protective effect against HIV infection in women treated topically in Kenya (sponge) and Cameroon (film) by nonoxynol-9 (N9), a surfactant compound, during Phase I/II studies [81,82]. A large-scale Phase III study conducted in thousands of female sex workers from Côte d'Ivoire, South Africa and Thailand severely contradicted these early results, with a rate of HIV seroconversion twice as high in the treated group by comparison to placebo [83]. It is noteworthy that the huge toxicity of the compound for the vaginal mucosa [84,85] had already been reported in 1964 [86]. A clinical trial conducted in Nigerian women with another surfactant compound, C31G, formulated as SAVVY® vaginal gel [87], was closed prematurely due to the inability of the compound to prevent HIV infection (there was even a trend for a higher number of new HIV infections in the treated group).

Cellulose sulfate (Ushershell®) and carrageenan (Carraguard®), two polyanion derivatives (TABLE 2), also exhibited deceiving results in large clinical trials, with no protective effect by comparison with placebo [88,89]. Less pessimistic results had been presented in 2009 for the PRO 2000 0.5% gel with a trend to protect women treated with this gel by comparison to placebo or Buffer Gel, a vaginal defense enhancer (TABLE 2) [90]. However, the future of polyanions, at least in monotherapy, seems compromised: cellulose sulfate was shown to enhance *in vitro* HIV infection, notably for R5 strains [91] and seminal plasma was shown to reduce



**Figure 4.** Example of an algorithm used for *in vitro* selection of microbicide candidates according to both results of infectivity reduction and toxicity. It is noteworthy to mention that this selection is also needed for the excipients that enter into the formulation of microbicides.

the effectiveness of polyanion microbicides in a model of herpes simplex type 2 infection [92].

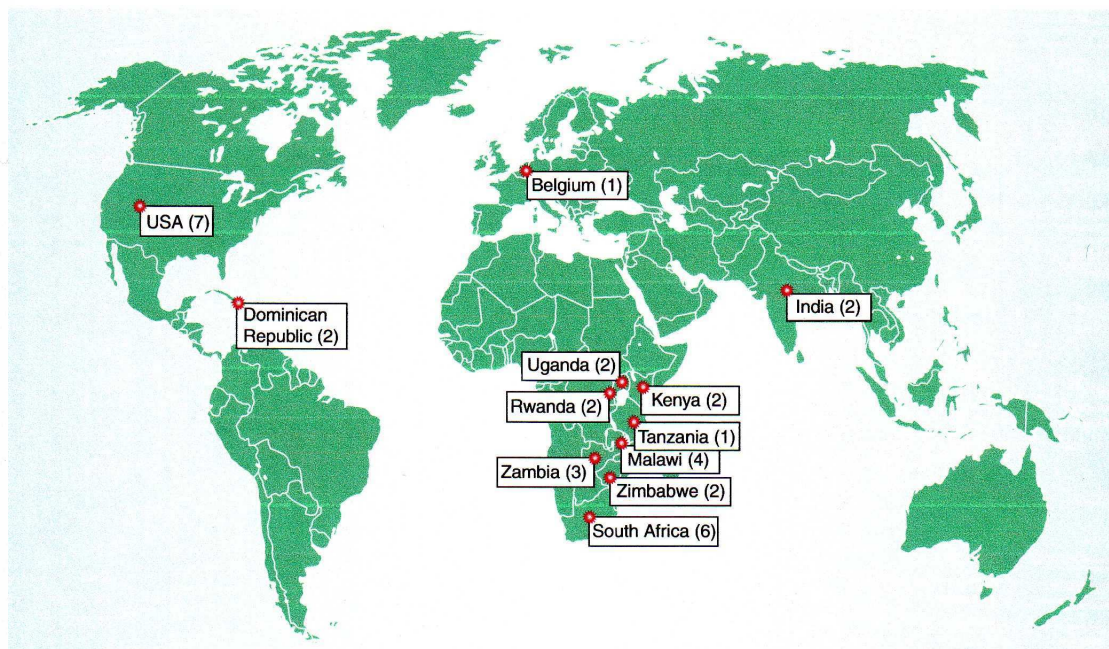
After all these disillusion and some controversies [14,93], the strategy for preventing HIV infection via vaginal microbicides moved to drugs able to block the replication cycle of HIV in a more specific way (TABLE 2). After 20 years of ineffective results, the CAPRISA 004 study presented enthusiastically at the 2010 International AIDS Society Conference in Vienna, Austria, and published simultaneously in *Science* [15], finally brought the proof-of-concept of effectiveness of vaginal microbicide prophylactic strategy. A double-blind, randomized controlled trial was conducted comparing tenofovir gel ( $n = 445$ ) with placebo gel ( $n = 444$ ) in sexually active, HIV-uninfected 18–40-year-old women in urban and rural KwaZulu-Natal, South Africa. HIV serostatus, safety, sexual behavior and gel and condom use were assessed at monthly follow-up visits for 30 months. In those women receiving the tenofovir gel, there was no increase in the overall adverse event rates; no changes in viral load and no tenofovir resistance was observed in HIV seroconverters. HIV incidence in the tenofovir gel arm was 5.6 per 100 women-years

Table 4. List of ongoing or planned clinical trials of topical microbicide candidates worldwide in women.

Study name	Stage	Compound(s)	Participants	Countries	Date	
					Beginning	End
FACTS 001	3	Tenofovir gel	2200 females with hepatitis B	South Africa	Mid-2011	2013
MTN-007	1	Tenofovir gel	63 females and males	USA	Oct 2009	2011
MTN-008	1	Tenofovir gel	230 females <sup>†</sup>	USA	Planned	
Vaginal Application Study	1	Tenofovir gel	25 females	Dominican Republic	Planned	
MTN-004	1	Vivage <sup>™</sup> (SPL7013 gel)	61 females	USA	Jul 2007	2011
IPM-013 (pharmacokinetics study)	1	Dapivirine: ring	48 females	Belgium	Aug 2009	2011
IPM-014A	1/2	Dapivirine: gel	320 females	Kenya, Malawi, Rwanda, South Africa	Nov 2009	2011
IPM-014B	1/2	Dapivirine: gel	320 females	South Africa	Jul 2009	2011
IPM-015	1/2	Dapivirine: ring	280 females	Kenya, Malawi, Rwanda, South Africa, Tanzania	Apr 2010	2011
IPM-020	1/2	Dapivirine: gel	180 females	USA	Jun 2009	2011
PK/PD Mucosal Safety Study	1	UC-781	50 females	Dominican Republic, USA	Planned	
MIV-150/Zinc Salt Gel Study	1	MIV-150 zinc acetate gel	ND	ND	Planned	
Zinc Salt Gel Study	1	Zinc acetate gel	ND	ND	Planned	
AF020	1	Amphora <sup>™</sup> /(ACIDFORM) gel	36 females	USA	Feb 2009	
MTN-005	1A	Placebo: ring	252 females	India, USA	Planned	
Adherence in sex workers	NA	Placebo: gel	ND	India	Jan 2008	
Adherence simulated trial	NA	Placebo: gel and ring	ND	Zambia	Planned	
MTN-015	NA	Seroconverter protocol	500 females (HIV+)	Malawi, South Africa, Uganda, Zambia, Zimbabwe	Aug 2008	2011
MTN-016 (EMBRACE)	NA	Pregnant women exposed to microbicide and their children	500 females	Malawi, South Africa, Uganda, Zambia, Zimbabwe	Oct 2009	2013

<sup>†</sup>All participants are pregnant or breastfeeding.  
 IPW: International Partnership for Microbicides; MTN: Microbicide Trials Network; NA: Not applicable; ND: Not determined.  
 Data taken from [204].





**Figure 5. Country distribution of the clinical trials listed in TABLE 4.** The figures in brackets correspond to the number of ongoing or planned trials.

compared with 9.1 per 100 women-years in the placebo gel arm ( $p = 0.017$ ). Tenofovir gel reduced HIV acquisition by an estimated 39% overall, and by 54% in women with high gel adherence. These results are very significant because it must be kept in mind that, as stressed by Whaley *et al.* [71], microbicide trials have limited statistical power due to the strong recommendation of the simultaneous use of a male condom (in another trial, only 9% of sex acts were shown to involve the gel in the absence of a condom) [87]. Moreover, in studies testing coitus-dependent strategies, the adherence to gel use may be very low (43% in the Carraguard trial [71]).

#### Ongoing trials

In the pursuit of this reference study, several other clinical trials evaluating vaginal HIV-specific drugs have been undertaken worldwide. The VOICE study involved approximately 5000 women and was comparing a local strategy using 1% tenofovir gel to an oral pre-exposure prophylaxis using mono- (tenofovir) or bitherapy (tenofovir + emtricitabine); the first two arms were prematurely stopped in September and November 2011, respectively, because of their absence of efficacy. Other trials are investigating NNRTI compounds either as gels (UC-781, MIV-150, dapivirine) or rings (dapivirine); for some of them, results will be available soon (TABLE 4 & FIGURE 5).

Trials with gels targeting the entry of HIV, either specifically (SPI7013 or Vivigel™) or less specifically (Acidform or AMPHORA™), are conducted in parallel (TABLE 4 & FIGURE 5). The interest for broad-spectrum products has been renewed by a

macaque study demonstrating the ability of glycerol monolaurate (a compound that may act as a modulator of the inflammatory answer) delivered in the vagina, to protect the animals against SIV infection [63].

#### Expert commentary & five-year view

Despite their empirical use for a very long time, microbicides have entered into the area of scientific investigation relatively recently and many questions are still pending regarding their use on a very large scale. The last section of this review addresses those of major concern.

#### Avoiding viral resistance

With the use of compounds that are specific for HIV and that are already licensed for oral HAART, which is the case for many of the products listed in TABLE 2, the spectrum of HIV resistance must be evoked because these drugs, if effective, are intended to be used on a very large scale in populations exhibiting a high prevalence of HIV infection, without preliminary screening of HIV status. At the genital level, the relatively low viral loads observed in semen seem sufficient to contain the emergence of resistant mutants when using a single drug. However, if the compounds, which are often small molecules, can diffuse from the vagina to the blood, there is a risk of selecting resistant mutants at the systemic level in persons already infected with HIV. This problem is particularly sensitive for NNRTI compounds that are largely used both as first-line treatment in HAART and as microbicides (TABLE 4), and that exhibit frequent cross-resistance within the family [94]. Another concern is





**Figure 6. Model of a vaginal ring allowing the simultaneous delivery of three different compounds.** The ring is made of long-lasting silicone. The different drugs are filled in the separate tanks located inside the ring. The molecules diffuse continuously through the silicone for periods of several months. Figure courtesy of Blaise Figueero (University of Saint-Etienne, France).

the interaction between HIV-seronegative women and viral strains already resistant to the drug used as microbicide. These questions, unanswered at this time, are crucial because the use of the same drugs for curative treatment and prevention could impair both of them in case of selection of resistant mutants; this would be particularly tragic in low-income countries where the number of available ARV drugs is limited.

#### **Increasing adherence & efficiency by combination studies**

The way to circumvent viral resistance is the combination of several drugs, which is the best way for increasing genetic barriers. In addition, the simultaneous use of compounds with different modes of action could help to prevent HIV transmission more efficiently. Furthermore, with a selection of adequate compounds, this strategy could combine the prevention of HIV transmission, the prevention of other STIs and, if wished, contraceptive properties [95].

Different assays conducted in macaques have shown the effectiveness of the combination approach regarding SHIV transmission, as exemplified by the study of Veazey *et al.* combining three anti-HIV peptides (CMPD167, BMS-378806 and C52L) targeting different entry molecules [96] or the study by Kenney *et al.* combining carrageenan, zinc acetate and MIV-150, an NNRTI compound [73]. Future clinical trials are planned that combine at least two antiviral compounds (for a list of these associations, see Appendix 2 in [202]).

In addition to gels, new delivery devices have been imagined to fit with these combined strategies, including vaginal preservatives [95], 'intelligent' diaphragms able to deliver microbicidal gel [97,98] or rings with multiple reservoirs (FIGURE 6).

Another strategy would consist of the use of both oral and vaginal PrEP [8]. Oral PrEP, initially limited to serodiscordant couples, has been shown to be able to protect women from HIV infection in two independent studies presented in July 2011 at the International AIDS Society Conference of Rome, Italy [99,100]. The addition of topical PrEP to oral PrEP could contribute to improve the effectiveness of this strategy (but also the selection of resistant mutants in monotherapies).

#### **Developing promising new-generation technologies**

After the previous era dedicated to broad-range spectrum compounds and the current one experimenting topically anti-HIV drugs used in systemic curative therapy (a strategy that could not be found to be the best option due to the risk of selection of resistant viruses as discussed above), a third generation of anti-HIV microbicides is in development [43,71,101]. Based on various biotechnologies, they include notably nanomicrobicides (i.e., dendrimers and fullerenes listed in TABLE 2), nanobodies (monovalent immunoglobulins derived from camelids), RNA silencing (siRNA) and recombinant lactobacilli expressing anti-HIV compounds (RANTES, cyanovirin-N). One of the main challenges is to combine high technology and low cost; the use of bioengineered plants, bacteria or yeasts to produce these compounds could help to solve this paradox, even if the acceptance of the public to prophylactic strategies using genetically modified organisms is questionable.

With regard to new technologies, an ultimate strategy would consist of combining topical and/or oral PrEP to prophylactic vaccination [71]. According to this scenario, the presence of vaginal microbicide(s) would protect against HIV contamination in the early phase of vaccination; the safe contact with wild HIV strains could enhance and broaden the immune response to HIV vaccinal epitopes; reciprocally, the vaccination could allow discontinuing PrEP in those subjects with a good responder profile (if, of course, this goal could be met).

#### **Concluding remarks**

At the beginning of this century, a study predicted that a microbicide with an effectiveness of 60% against HIV and used in 73 low-income countries by 20% of the population in half of the unprotected sexual acts for a period of 3 years would avoid 2.5 million new cases of HIV infection and save US\$2.7 billion and US\$1 billion in terms of healthcare costs and economic productivity, respectively [203]. Very recently, a model based on the results of the CAPRISA 004 trial predicted that, if women used tenofovir gel in 80% of sexual encounters (high coverage), it could avert 2.33 million new infections and save 1.30 million lives. Furthermore, if used in 25% of sexual encounters (low coverage), it could avert 0.50 million new infections and save 0.29 million lives, during the next 20 years in South Africa [102]. These relatively convergent estimations in an interval of 10 years acknowledge that the anti-HIV microbicide strategy is cost effective for women residing in countries where the prevalence of HIV infection is the highest. Much work is still needed both to fully understand the early mechanisms of HIV infection and to design the optimal topical PrEP that would protect the maximum number of women with more safety and less discomfort, at the lowest cost. With the data already available, it can be reasonably hoped that, in the next



5–10-year period, the combination of different strategies using an association of vaginal microbicides to vaccination or oral PrEP will contribute significantly to the control of HIV spread in women.

#### Acknowledgements

We are indebted to Philip Lawrence, Didier Portran, Noura Addad and Ludovic Morot-Sibilot who implemented *in vitro* techniques for the evaluation of the toxicity of microbicides. We also acknowledge Guido Vanham and Christiane Moog for very helpful discussions.

#### Financial & competing interests disclosure

The work of the authors on microbicides has been funded by the French agency ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### Key issues

- Women from parts of the world with a high prevalence of HIV infection are very vulnerable to HIV infection; in contrast to men who can utilize condoms and circumcision, women have no safe means for controlling the risk of HIV. This situation justifies efforts to develop anti-HIV vaginal microbicide strategies as a priority.
- The crossing of HIV through the mucosa of the female genital tract is complex and not fully understood; many adventitious factors can interfere, notably seminal plasma and the vaginal environment. These factors are important to elucidate for improving the effectiveness of topical microbicide prophylaxis.
- A great number of compounds have been identified as microbicide candidates. They can be roughly classified in two groups: non-HIV-specific and HIV-specific compounds. The latter are the more potent against HIV but their combination with compounds of the former could be helpful to combat other sexually transmitted infections in parallel.
- The most popular way to deliver vaginal microbicides is hydrogels (or creams) with or without an applicator, but a number of coitus-dependent (tablets, films) or -independent (rings, nanocompounds) systems are developing very fast.
- The disillusion resulting from several unsuccessful clinical trials have reinforced the importance of selection of microbicide candidates at the preclinical stage, notably by careful *in vitro* studies; if the benefit–risk balance is positive, it may be useful to conduct trials in experimental models (monkeys or humanized mice) to confirm the results.
- In less than 10 years, the results of Phase III clinical trials (mostly conducted in African women) passed from catastrophic, with the nonoxynol-9 trial in 2002 showing an excess of HIV contaminations in the treated group, to very encouraging, with the CAPRISA 004 study in 2010 showing a 39% protection in the group of women receiving the 1% tenofovir gel versus placebo. Ongoing trials are aimed to confirm these positive results.
- With the intensive use of a single antiretroviral drug in potentially HIV-infected persons, the risk of selecting resistant mutants is troublesome. Data are presently insufficient to document this risk correctly. The surveillance of resistant strains in women receiving prophylactic topical anti-HIV drugs will be one of the major goals in future years.
- Combination strategies appear to be very promising; HIV-specific microbicides could be combined with oral pre-exposure prophylaxis, other wide-spectrum compounds active against other infectious agents or eliciting spermicidal properties, and even prophylactic vaccination. All these strategies will need to be carefully evaluated in the next 5 years.

#### References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Davis KR, Weller SC. The effectiveness of condoms in reducing heterosexual transmission of HIV. *Fam. Plan. Perspect.* 31, 272–279 (1999).
- 2 Granich R, Crowley S, Vitoria M *et al.* Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. *Curr. Opin. HIV AIDS* 5, 298–304 (2010).
- 3 Mepham SO, Bland RM, Newell ML. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in resource-rich and -poor settings. *BJOG* 118, 202–218 (2011).
- 4 Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R, Puren A. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 trial. *PLoS Med.* 2(11), e298 (2005).
- 5 Bailey RC, Moses S, Parker CB *et al.* Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet* 369, 643–656 (2007).
- 6 Gray RH, Kigozi G, Serwadda D *et al.* Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* 369, 657–666 (2007).
- 7 Dumond JB, Yeh RF, Patterson KB *et al.* Antiretroviral drug exposure in the female genital tract: implications for oral pre- and post-exposure prophylaxis. *AIDS* 21, 1899–1907 (2007).
- 8 Chirenje ZM, Marrazzo J, Parikh UM. Antiretroviral-based HIV prevention strategies for women. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8(10), 1177–1186 (2010).
- 9 De Clercq E. Pre-exposure chemoprophylaxis of HIV infection: quo vadis? *Biochem. Pharmacol.* doi:10.1016/j.bcp.2011.10.016 (2011) (Epub ahead of print).
- 10 Cohen J. Is an effective HIV vaccine feasible? *Science* 309, 99 (2005).
- 11 Kaiser J. AIDS research. Review of vaccine failure prompts a return to basics. *Science* 320, 30–31 (2008).
- 12 Gray RH, Li X, Kigozi G *et al.* Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: a prospective study. *Lancet* 366, 1182–1188 (2005).
- 13 Dinh FH, Goya A, Jackson D *et al.* HIV acquired during pregnancy: finding from the national prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) survey in South Africa (2010). Presented at: *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. Rome, Italy, 17–20 July 2011.

- 14 Grant RM, Hamer D, Hope T *et al.* Whither or wither microbicides? *Science* 321, 532–534 (2008).
- 15 Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA *et al.* Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 329, 1168–1174 (2010).
- **First trial that demonstrated the effectiveness of a vaginal microbicide to prevent HIV infection in seronegative women. This paper brings the proof-of-concept of the relevance of the topical pre-exposure prophylaxis.**
- 16 Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 25–34 (2003).
- 17 Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 447–457 (2008).
- 18 Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 6, 20–28 (2009).
- 19 Khanna KV, Whaley KJ, Zeitlin L *et al.* Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *J. Clin. Invest.* 109, 205–211 (2002).
- 20 Kaizu M, Weiler AM, Weisgrau KL *et al.* Repeated intravaginal inoculation with cell-associated simian immunodeficiency virus results in persistent infection of nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 194, 912–916 (2006).
- 21 Gupta P, Collins KB, Ratner D *et al.* Memory CD4<sup>+</sup> 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, 9868–9876 (2002).
- 22 Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* 3, 42–47 (1997).
- 23 Patterson BK, Landay A, Andersson J *et al.* Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *Am. J. Pathol.* 153, 481–490 (1998).
- 24 Yeaman GR, Asin S, Weldon S *et al.* Chemokine receptor expression in the human ectocervix: implications for infection by the human immunodeficiency virus-type 1. *Immunology* 113, 524–533 (2004).
- 25 Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137, 433–444 (2009).
- 26 Yahi N, Baghdiguian S, Moreau H, Fantini J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J. Virol.* 66, 4848–4854 (1992).
- 27 Fantini J, Yahi N, Delezay O, Gonzalez-Scarano F. GalCer, CD26 and HIV infection of intestinal epithelial cells. *AIDS* 8, 1347–1348 (1994).
- 28 Alfsen A, Bomsel M. HIV-1 gp41 envelope residues 650–685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 25649–25659 (2002).
- 29 Nguyen DG, Hildreth JEK. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33, 483–493 (2003).
- 30 Ji X, Gewurz H, Spear GT. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol. Immunol.* 42, 145–152 (2005).
- 31 Turville SG, Cameron PU, Handley A *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 3, 975–983 (2002).
- 32 Vidricaire G, Gauthier S, Tremblay MJ. HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J. Infect. Dis.* 195, 1461–1471 (2007).
- 33 de Witte L, Bobardt M, Chatterji U *et al.* Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 19464–19469 (2007).
- 34 Stoddard E, Cannon G, Ni H *et al.* gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission. *J. Immunol.* 179, 3126–3132 (2007).
- 35 Cannon G, Yi Y, Ni H *et al.* HIV envelope binding by macrophage-expressed gp340 promotes HIV-1 infection. *J. Immunol.* 181, 2065–2070 (2008).
- 36 Arthos J, Cicala C, Martinelli E *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin  $\alpha 4\beta 7$ , the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* 9, 301–309 (2008).
- 37 Herold BC, Mesquita PM, Madan RP, Keller MJ. Female genital tract secretions and semen impact the development of microbicides for the prevention of HIV and other sexually transmitted infections. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 325–333 (2011).
- **Excellent review on the role of adventitious factors interfering with HIV transmission and modulating the action of microbicide compounds in the vagina.**
- 38 Hladik F, Doncel GF. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: challenges and opportunities. *Antiviral Res.* 88, S3–S9 (2010).
- 39 Tevi-Bénissan C, Bélec L, Lévy M *et al.* *In vivo* semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 367–374 (1997).
- 40 Kim KA, Yolamanova M, Zirafi O *et al.* Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 7, 55 (2010).
- 41 Berlier W, Cremel M, Hamzeh H *et al.* Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum. Reprod.* 21, 1135–1142 (2006).
- 42 Mburu N, Obiero JA, Waititu K *et al.* Safety studies of a recently developed microbicide contraceptive gel (UniPron) in female baboons (*Papio anubis*). *Afr. J. Reprod. Health* 13, 95–104 (2009).
- 43 du Toit LC, Pillay V, Choonara YE. Nano-microbicides: challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 532–546 (2010).
- **Well-documented and exhaustive review on the fast-growing field of nano-microbicides.**
- 44 Pusch O, Boden D, Hannify S *et al.* Bioengineering lactic acid bacteria to secrete the HIV-1 virucide cyanovirin. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* 40, 512–520 (2005).
- 45 Wayengera M. Why bacteria derived R-M nucleic enzymatic peptides are likely efficient therapeutic molecules for use in the design and development of novel HIV inhibitory strategies. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1791–1796 (2008).
- 46 Tao J, Hu Q, Yang J *et al.* *In vitro* anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. *Antiviral Res.* 75, 227–233 (2007).
- 47 Cheng G, Montero A, Gastaminza P *et al.* A virocidal amphipathic  $\{\alpha\}$ -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 3088–3093 (2008).

- 48 Bobardt MD, Cheng G, de Witte L *et al.* Hepatitis C virus NS5A anchor peptide disrupts human immunodeficiency virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 5525–5530 (2008).
- 49 Botos I, Wlodawer A. Cyanovirin N: a sugar-binding antiviral protein with a new twist. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 277–287 (2003).
- 50 O’Keefe BR, Vojdani F, Buffa V *et al.* Scalable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 6099–6104 (2009).
- 51 de Parseval A, Bobardt MD, Chatterji A *et al.* A highly conserved arginine in gp120 governs HIV-1 binding to both syndecans and CCR5 via sulphated motifs. *J. Biol. Chem.* 280, 39493–39504 (2005).
- 52 Penberthy WT, Chari S, Cole AL, Cole AM. Retrocyclins and their activity against HIV-1. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2231–2242 (2011).
- 53 Gallo SA, Wang W, Rawat SS *et al.*  $\theta$ -defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation. *J. Biol. Chem.* 281, 18787–18792 (2006).
- 54 Sassi AB, Cost MR, Cole AL *et al.* Formulation development of retrocyclin 1 analog RC-101 as an anti-HIV vaginal microbicide product. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2282–2289 (2011).
- 55 Welch BD, Francis JN, Redman JS *et al.* Design of a potent D-peptide HIV-1 entry inhibitor with a strong barrier to resistance. *J. Virol.* 84, 11235–11244 (2010).
- 56 Burkly LC, Olson D, Shapiro R *et al.* Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion. *J. Immunol.* 149, 1779–1787 (1992).
- 57 Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT. Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: potential for HIV-1 therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 1369–1374 (2006).
- 58 Vermeire K, Brouwers J, Van Herreweghe Y *et al.* CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor. *Curr. HIV Res.* 6, 246–256 (2008).
- 59 Bobardt MD, Chatterji U, Schaffer L, de Witte L, Gally PA. Syndecan-Fc hybrid molecule as a potent *in vitro* microbicide anti-HIV-1 agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2753–2766 (2010).
- 60 D’Cruz OJ, Uckun FM. Dawn of non-nucleoside inhibitor-based anti-HIV microbicides. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 411–423 (2006).
- 61 Dobard C, Sharma S, Parikh U *et al.* High protection against vaginal infection in macaques by PEP with gel containing RAL. Presented at: 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA, USA, 27 February–3 March 2011.
- 62 Marchesan S, Da Ros T, Spalluto G, Balzarini J, Prato M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3615–3618 (2005).
- 63 Li Q, Estes JD, Schlievert PM *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 458, 1034–1038 (2009).
- 64 Talwar GP, Raghuvanshi P, Mishra R *et al.* Polyherbal formulations with wide spectrum antimicrobial activity against reproductive tract infections and sexually transmitted pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43, 144–151 (2000).
- 65 Haraguchi Y, Sakurai H, Hussain S, Anner BM, Hoshino H. Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds. *Antiviral Res.* 43, 123–133 (1999).
- 66 Saïdi H, Jenabian MA, Gombert B, Charpentier C, Mannarini A, Bélec L. Pre-clinical development as microbicide of zinc tetra-ascorbo-camphorate, a novel terpenoid derivative: potent *in vitro* inhibitory activity against both R5- and X4-tropic HIV-1 strains without significant *in vivo* mucosal toxicity. *AIDS Res. Ther.* 5, 10 (2008).
- 67 Rohan LC, Sassi AB. Vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *AAPS J.* 11, 78–87 (2009).
- 68 Buckheit RW Jr, Watson KM, Morrow KM, Ham AS. Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res.* 85, 142–158 (2010).
- Very large and up-to-date review about all the stages of development of a microbicide candidate. This paper is an excellent introduction to the scientific problems associated with vaginal microbicides.
- 69 Garg S, Goldman D, Krumme M, Rohan LC, Smoot S, Friend DR. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Res.* 88, S19–S29 (2010).
- 70 Malcolm RK, Edwards KL, Kiser P, Romano J, Smith TJ. Advances in microbicide vaginal rings. *Antiviral Res.* 88, S30–S39 (2010).
- 71 Whaley KJ, Hanes J, Shattock R, Cone RA, Friend DR. Novel approaches to vaginal delivery and safety of microbicides: biopharmaceuticals, nanoparticles, and vaccines. *Antiviral Res.* 88, S55–S66 (2010).
- Opens new horizons on the possible combination of pre-exposure prophylaxis, and notably vaginal microbicides, with prophylactic vaccination.
- 72 Tien D, Schnaare RL, Kang F *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of a potential universal placebo designed for use in vaginal microbicide clinical trials. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 21, 845–853 (2005).
- 73 Kenney J, Aravantinou M, Singer R *et al.* An antiretroviral/zinc combination gel provides 24 hours of complete protection against vaginal SHIV infection in macaques. *PLoS One* 6, e15835 (2011).
- 74 Lard-Whiteford SL, Matecka D, O’Rear JJ *et al.* Recommendations for the nonclinical development of topical microbicides for prevention of HIV transmission: an update. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* 36, 541–552 (2004).
- 75 Cummins JE Jr, Guarner J, Flowers L *et al.* Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1770–1779 (2007).
- 76 Doncel GF, Clark MR. Preclinical evaluation of anti-HIV microbicide products: new models and biomarkers. *Antiviral Res.* 88, S10–S18 (2010).
- 77 Gali Y, Ariën KK, Praet M *et al.* Development of an *in vitro* dual-chamber model of the female genital tract as a screening tool for epithelial toxicity. *J. Virol. Methods* 165, 186–197 (2010).
- 78 Gali Y, Delezay O, Brouwers J *et al.* *In vitro* evaluation of viability, integrity, and inflammation in genital epithelia upon exposure to pharmaceutical excipients and candidate microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5105–5114 (2010).
- 79 Jenabian MA, Saïdi H, Charpentier C *et al.* Differential activity of candidate microbicides against early steps of HIV-1 infection upon complement virus opsonization. *AIDS Res. Ther.* 7, 16 (2010).
- 80 Eckstein P, Jackson MC, Millman N, Sobrero AJ. Comparison of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. *J. Reprod. Fertil.* 85–93 (1969).

- 81 Kreiss J, Ngugi E, Holmes K *et al.* Efficacy of nonoxynol 9 contraceptive sponge use in preventing heterosexual acquisition of HIV in Nairobi prostitutes. *JAMA* 268, 477–482 (1992).
- 82 Roddy RE, Zekeng L, Ryan KA, Tamoufé U, Weir SS, Wong EL. A controlled trial of nonoxynol 9 film to reduce male-to-female transmission of sexually transmitted diseases. *N. Engl. J. Med.* 339, 504–510 (1998).
- 83 Van Damme L, Ramjee G, Alary M *et al.* Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 971–977 (2002).
- Reports the story of a large trial conducted in African women with a surfactant microbicide that resulted in a significant increase of HIV infection in reference to the controls. This study helped to correct some mistakes and now more time is spent researching the side effects of these topical drugs that are microbicides.
- 84 Hillier SL, Moench T, Shattock R, Black R, Reichelderfer P, Veronese F. *In vitro* and *in vivo*: the story of nonoxynol 9. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* 39, 1–8 (2005).
- 85 Beer BE, Doncel GF, Krebs FC *et al.* *In vitro* preclinical testing of nonoxynol-9 as potential anti-human immunodeficiency virus microbicide: a retrospective analysis of results from five laboratories. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 713–723 (2006).
- 86 Rovinsky JJ. Clinical effectiveness of a contraceptive cream. *Obstet. Gynecol.* 23, 125–131 (1964).
- 87 Feldblum PJ, Adeiga A, Bakare R *et al.* SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PLoS One* 3, e1474 (2008).
- 88 Van Damme L, Govinden R, Mireambe FM *et al.* Lack of effectiveness of cellulose sulphate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N. Engl. J. Med.* 359, 463–472 (2008).
- 89 Skoler-Karppoff S, Ramjee G, Ahmed K *et al.* Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372, 1977–1987 (2008).
- 90 Karim SA, Coletti A, Richardson B *et al.* Safety and effectiveness of vaginal microbicides BufferGel and 0.5% PRO 2000/5 gel for the prevention of HIV infection in women: results of the HPTN 035 trial. Presented at: *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Montréal, Canada, 8–11 February 2009.
- 91 Tao W, Richards C, Hamer D. Enhancement of HIV infection by cellulose sulphate. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 925–929 (2008).
- 92 Patel S, Hazrati E, Cheshenko N *et al.* Seminal plasma reduces the effectiveness of topical polyanionic microbicides. *J. Infect. Dis.* 196, 1394–1402 (2007).
- 93 Omar RF, Bergeron MG. The future of microbicides. *Int. J. Infect. Dis.* 15, e656–e660 (2011).
- A lucid reflection on the respective advantages and limits of HIV nonspecific and specific vaginal microbicides.
- 94 Martinez J, Coplan P, Wainberg MA. Is HIV drug resistance a limiting factor in the development of anti-HIV NNRTI and NRTI-based vaginal microbicide strategies? *Antiviral Res.* 71, 343–350 (2006).
- 95 Friend DR, Doncel GF. Combining prevention of HIV-1, other sexually transmitted infections and unintended pregnancies: development of dual-protection technologies. *Antiviral Res.* 88, S47–S54 (2010).
- 96 Veazey RS, Klasse PJ, Schader SM *et al.* Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion. *Nature* 438, 99–102 (2005).
- Elegant experimental demonstration of the effectiveness of a vaginal gel combining three entry inhibitors for inhibiting the transmission of wild-type virus in a macaque model.
- 97 Ballagh SA, Brache V, Mauck C *et al.* A Phase 1 study of the functional performance, safety and acceptability of the BufferGel Duet. *Contraception* 77, 130–137 (2008).
- 98 Schwartz JL, Ballagh SA, Creinin MD *et al.* SILCS diaphragm: postcoital testing of a new single-size contraceptive device. *Contraception* 78, 237–244 (2008).
- 99 Thigpen MC, Kebaabetswe PM, Smith DK. Daily oral antiretroviral use for the prevention of HIV infection in heterosexually active young adults in Botswana: results from the TDF2 study. Presented at: *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. Rome, Italy, 17–20 July 2011.
- 100 Baeten J. Antiretroviral pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention among heterosexual African men and women: the partners PrEP study. Presented at: *6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention*. Rome, Italy, 17–20 July 2011.
- 101 Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV. *Nat. Biotechnol.* 25, 1444–1454 (2007).
- 102 Williams BG, Abdool Karim SS, Karim QA, Gouws E. Epidemiological impact of tenofovir gel on the HIV epidemic in South Africa. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* 58(2), 207–210 (2011).
- 103 Williams DL, Newman DR, Ballagh SA *et al.* Phase 1 safety trial of two vaginal microbicide gels (Acidform or BufferGel) used with a diaphragm compared to KY jelly used with a diaphragm. *Sex. Transm. Dis.* 34, 977–984 (2007).
- 104 Low-Beer N, Gabe R, McCormack S, Kitchen VS, Lacey CJ, Nunn AJ. Dextrin sulphate as a vaginal microbicide: randomized, double-blind, placebo-controlled trial including healthy female volunteers and their male partners. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* 31, 391–398 (2002).
- 105 Herold BC, Scordi-Bello I, Cheshenko N *et al.* Mandelic acid condensation polymer: novel candidate microbicide for prevention of human immunodeficiency virus and herpes simplex virus entry. *J. Virol.* 76, 11236–11244 (2002).
- 106 Anderson RA, Feathergill KA, Waller DP, Zaneveld LJ. SAMMA induces premature human acrosomal loss by Ca<sup>2+</sup> signaling dysregulation. *J. Androl.* 27, 568–577 (2006).
- 107 Chang TL, Teleshova N, Rapista A *et al.* SAMMA, a mandelic acid condensation polymer, inhibits dendritic cell-mediated HIV transmission. *FEBS Lett.* 581, 4596–4602 (2007).
- 108 Passic SR, Ferguson ML, Catalone BJ, Yedery RD. Structure–activity relationships of polybiguanides with activity against human immunodeficiency virus type 1. *Biomed. Pharmacother.* 64, 723–732 (2010).
- 109 Reddy KV, Aranha C, Gupta SM *et al.* Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction* 128, 117–126 (2004).
- 110 McCarthy TD, Karellas P, Henderson SA *et al.* Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol. Pharm.* 2, 312–318 (2005).

- 111 Guo Q, Ho HT, Dicker I *et al.* Biochemical and genetic characterizations of a novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitor that blocks gp120–CD4 interactions. *J. Virol.* 77, 10528–10536 (2003).
- 112 Kilby JM, Eron JJ. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N. Engl. J. Med.* 348, 2228–2238 (2003).
- 113 Van Herrewege Y, Michiels J, Van Roey J *et al.* *In vitro* evaluation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors UC-781 and TMC120-R147681 as human immunodeficiency virus microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 337–339 (2004).
- 114 Malcolm RK, Woolfson AD, Toner CF, Morrow RJ, McCullagh SD. Long-term, controlled release of the HIV microbicide TMC120 from silicone elastomer vaginal rings. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 954–956 (2005).
- 115 Van Herrewege Y, Vanham G, Michiels J *et al.* A series of diaryltriazines and diarylpyrimidines are highly potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors with possible applications as microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3684–3689 (2004).
- 116 Mahalingam A, Simmons AP, Ugaonkar SR *et al.* Vaginal microbicide gel for delivery of IQP-0528, a pyrimidinedione analog with a dual mechanism of action against HIV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1650–1660 (2011).
- 202 Microbicides: ways forward. 2010 report of the Alliance for Microbicide Development. [www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/27266](http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/27266)
- 203 The public health benefits of microbicides in lower-income countries: model projections. A report by the public health working group of the microbicide initiative funded by the Rockefeller Foundation. [www.global-campaign.org/clientfiles/rep7\\_publichealth.pdf](http://www.global-campaign.org/clientfiles/rep7_publichealth.pdf)
- 204 Ongoing clinical trials of topical microbicide candidates (August 2011). [www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/3109](http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/3109)

#### Websites

- 201 UNAIDS report on the global AIDS epidemic (2010). [www.unaids.org/globalreport/documents/20101123\\_GlobalReport\\_full\\_en.pdf](http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf)

**Article 5 : A stable genotyping resistance profile on *pol* gene is archived in the gut of HIV-1 infected men whatever time of initiation of HAART**

**A stable genotyping resistance profile on *pol* gene is archived in the gut of HIV-1 infected men whatever time of initiation of HAART**

Running head: transmitted HIV strain durably archived in gut

Anne Emmanuelle DEPINCE<sup>1,2</sup>, Elodie DUSSERT<sup>1</sup>, Delphine VERGNON-MISZCZYCHAL<sup>1</sup>, Abdelaye KEITA<sup>1,3</sup>, Sylvie PILLET<sup>1,4</sup>, Elisabeth BOTHELO-NEVERS<sup>1,5</sup>, Anne FRESARD<sup>5</sup>, Amandine GAGNEUX-BRUNON<sup>1,5</sup>, Frédéric R LUCHT<sup>1,5</sup>, Xavier ROBLIN<sup>1,6</sup>, Stéphane PAUL<sup>1,2</sup>, Bruno POZZETTO<sup>1,4</sup>, Thomas BOURLET<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes – GIMAP EA 3064, CIC 1408, Université de Saint-Etienne, Université de Lyon, France; <sup>2</sup>Laboratoire d'Immunologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP), Bamako, Mali; <sup>4</sup>Service des Agents Infectieux et d'Hygiène, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France; <sup>5</sup>Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France; <sup>6</sup>Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalo-Universitaire, Saint-Etienne, France.

Name and address for correspondence and requests for reprints:

Prof. Thomas Bourlet

GIMAP EA 3064

Faculté de Médecine J. Lisfranc

Campus Santé Innovations

10, rue de Marandière

42270 Saint-Priest en Jarez, France

Phone: 33 4 77 82 81 06 Fax: 33 4 77 82 84 60 e-mail: Thomas.Bourlet@chu-st-etienne.fr

Sources of support: This work was supported by grants of the University of Saint-Etienne and Lyon, and of Saint-Etienne Metropole.

Total number of words: 1800

## **Abstract (250 words)**

**Objective:** To evaluate the mutational patterns on *pol* gene of the main HIV-1 strain archived in cell DNA of ten chronically-infected men according to their clinical and therapeutic history.

**Design:** Comparison of genotyping resistance profiles between the first blood plasma available at the time of HIV diagnosis and rectal biopsies and PBMC sampled 1 to 5 years after initiation of HAART.

**Methods:** HIV-1 RNA in plasma and cell-associated HIV-1 DNA were quantified respectively by Abbott Real-Time HIV-1 and Generic HIV® DNA cell (Biocentric) assays. The antiretroviral resistance mutations in protease and RT genes were assessed by Trugene® assay (Siemens). The susceptibility to drugs was determined following the ANRS resistance algorithm. The C2V3 region was amplified according to the ANRS Resistance Study Group protocol.

**Results:** In nine patients no or slight differences were observed between the three resistance profiles. The mostly detected mutations in the 3 compartments were related to the resistance to nucleos(t)ide (D67N, L210W, T215A and T69D) and non-nucleoside (K103N, V106I, V179I) inhibitors. In one rilpivirine-treated patient, the M230I mutation was detected in rectum but not in PBMC. The percentages of homology between C2V3 sequences from initial plasma and rectal tissue ranged from 71 to 80. No change of viral tropism was observed between samples.

**Conclusion:** These data suggest that resistance mutations harbored by the main HIV strain detected in plasma at the time of diagnosis are durably archived in DNA cells whatever the delay between infection and initiation of therapy based on drugs achieving adequate tissular concentrations.

**Key-words:** HIV-1; HAART; gut; genotyping resistance assay.



## **Introduction**

The cellular reservoir is one of the major obstacles to functional or sterilizing cure of HIV infection. In particular, the gut-associated lymphoid tissue (GALT) harbors most of HIV-1 target cells and grows during the first weeks of HIV infection [1]. In the absence of highly active antiretroviral therapy (HAART), a greater viral genetic diversity in the rectum than in blood is described mostly because of a mucosal environment favoring a local replication [2]. It has been largely demonstrated that an early initiation of HAART is associated with a smaller and less genetically diverse reservoir [3-5]. Although there is poor evidence of genetic evolution of viral populations under suppressive HAART initiated during primary infection, the persistence of HIV archived sequences is observed, probably driven by memory T cells homeostatic proliferation [3]. In fact, even if early diagnosis and initiation of HAART are highly recommended, most of living HIV infected people were detected positive before the time of “Test and Treat” era and mostly during the chronic phase of their infection [6]. Moreover, for some of them the initiation of HAART was delayed compared to the time of diagnosis.

Different resistance to antiretroviral drugs profiles of HIV-1 *pol* sequences are archived in DNA cells of patients who received numerous treatments [7,8]. In addition, differences in the resistance profiles are observed between anatomical sites including gut, suggesting the participation of intestinal mucosa in HIV genotype selection [7,9]. It has also been observed that successive drug resistant variants selected during non-suppressive therapy remain archived in cell reservoir after long-term suppressive HAART [10]. To our knowledge, no data are available on the major HIV strain archived in the rectal reservoir of patients diagnosed during the chronic phase of infection and who received an effective first-line therapy. Moreover, even if it has been previously suggested that the gut mucosal viral reservoir is not the major source of rebound plasma viremia after stopping HAART [11],

studies dealing with the risk of reactivation of resistant mutated strains from intestinal tissue are also missing.

In this work, our aim was to evaluate the mutational patterns on *pol* gene of the main HIV-1 strain archived in cell DNA of chronically-infected men under suppressive HAART and diagnosed HIV positive at various stages of infection. The genotyping resistance profiles between the first blood plasma available at the time of HIV diagnosis and rectal biopsies and PBMC sampled 1 to 5 years after the initiation of HAART were compared.

## **Methods**

### **Patients**

An ancillary work of a previous study [12] was conducted in ten HIV-1 chronically infected men followed at the Infectious Diseases Department of the University Hospital of Saint-Etienne, France. They had been under HAART for more than one but less than five years, without any viral escape during this period. Their characteristics are depicted in Table 1. At the time of HIV seropositivity diagnosis, stages of clinical infection were A, B, C for 2, 3 and 5 men, respectively. The median period between the initial antiretroviral drug resistance assay done in blood plasma at the time of diagnosis and the one performed in rectal biopsy and PBMC samples was 47 months [range: 12-158].

### **Total cell-associated HIV-1 DNA quantification**

Total DNA was extracted from PBMCs and biopsies using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The cell-associated HIV-1 DNA was quantified by using Generic HIV<sup>®</sup> DNA cell protocol (Biocentric, Bandol, France). The quantification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was undertaken to estimate the amount of cells tested. The results were expressed in logcopies per million of cells.

### **HIV-1 RNA viral load quantification in blood plasma**

The viral load was determined by using the Abbott Real-Time HIV-1 Assay (Abbott Molecular Diagnostics, Rungis, France) combining an automated extraction by the m2000sp apparatus and a real-time amplification by the m2000rt instrument.

### **Antiretroviral drug resistance mutations assay**

The antiretroviral drug resistance mutations in protease and reverse transcriptase (RT) genes were assessed in parallel using Trugene<sup>®</sup> assay (Siemens, Saint-Denis, France). The viral susceptibility to drugs was determined according to the ANRS resistance algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

### **Intra-cellular HIV-1 RNA detection**

Total RNA was extracted from PBMCs and biopsies using RNA Blood Mini and RNeasy kits (Qiagen), respectively. HIV-1 RNA was detected by real-time PCR using the Generic HIV<sup>®</sup> assay (Biocentric).

### **gp120 gene amplification and tropism determination**

The C2V3 region was amplified according to the ANRS AC11 Resistance Study Group protocol (<http://www.hivfrenchresistance.org>). The coreceptor used was predicted using the bioinformatic tool geno2pheno with a 10% false-positive rate and the combined 11/25 and net charge rule for HIV-1 non-B subtypes (<http://coreceptor.geno2pheno.org/>) [13].

## Results

### *Efficacy of HAART in blood and rectal compartments*

The time to obtain HIV RNA undetectability in blood plasma was defined as the period between initiation of HAART and the first viral load value <40 copies/ml. The median time to undetectability was 4 months [2-15] (Table 2). No viral rebound but one blip in patient 4 at month 18 after starting HAART was observed. The median values of total HIV DNA in rectal biopsies and PBMC were 3.75 [3.06-4.59] and 3.25 [2.41-4.21] logcopies/10<sup>6</sup> cells, respectively (Table 1). HIV RNA was found positive in 9 biopsies and 6 PBMC fractions out of the 10 tested.

### *Resistance profiles on protease and RT genes*

The homology between protease and RT sequences from plasma and rectal tissue sampled in the same patient ranged from 96 to 99.5% (Table 2).

The same resistance patterns were obtained in the three tested samples for 3 patients. Mutations conferring possible resistance to the protease inhibitors saquinavir/ritonavir and tipranavir (K20M, M36I, I62V, H69Q) and to the non-nucleoside RT inhibitor etravirine (V106I, V179I) were detected in patient 1. Thymidine analogue mutations (TAMs) D67N, L210W, T215A and T69D mutation conferring resistance to nucleoside RT inhibitors zidovudine, didanoside, stavudine, abacavir and tenofovir were detected in patient 3. No but the L63P minor mutation was found in patient 4. The same profiles were also obtained in blood plasma and rectal biopsy of patient 7 (PBMC fraction not available) exhibiting the K103N mutation conferring a high-level of resistance to efavirenz and nevirapine.

In 6 patients, slight differences were observed between resistance profiles: minor L10I, K20I and/or M36I (patients 6 and 9), I62V (patient 2), Q58E and A71T (patient 8) and A71V (patient 5) mutations in the protease gene. The T215D revertant mutation was detected in the rectal tissue while T215W was present in the blood plasma sample of patient 9. The T210W mutation was observed in the biopsy but not in the initial blood sample of patient 10. What is

worthy also of note is the presence of the M230I mutation related to resistance to rilpivirine in the PBMC fraction of this patient. This man received 2 successive HAART regimens, the current one associating FTC, tenofovir and rilpivirine.

*gp120 and V3 loop analysis.*

The homology between C2V3 sequences from plasma and rectal tissue sampled in the same patient ranged from 71 to 80%. No change of viral tropism was observed between the initial blood sample and the rectal biopsy (being CCR5 tropic).

## Discussion

The rectal mucosa can integrate HIV-1 strains resistant to antiretroviral treatment selected during therapy failing to reach optimal local drugs concentrations [7,9,10]. Josefsson *et al.* showed that HIV-1 DNA integrated in GALT infected T-cells remains stable during suppressive HAART when sequences between plasma sampled at the time of initiation of HAART and GALT biopsies obtained 8-12 years after starting therapy were compared [3]. In our study, the resistance pattern of *pol* gene in rectal tissue and PBMC of men under effective first-line HAART regimen was compared to the one obtained from the first blood plasma sampled at the time of HIV diagnosis. Our data bring complementary information's since we found that the transmitted mutational profile present at the time of HIV diagnosis remains stable and detectable after a 1 to 5 years period -before and after start of HAART- in 9 men out of 10, despite a long period without therapy in some men (patient 1 and 2). In addition, intracellular HIV RNA was detected positive in 6 rectal biopsies. This might reflect a local defective production rather than a complete replication related to cell to cell transmission. Slight differences observed between samples in some patients, were for minor mutations on protease gene not related to the current HAART regimen. Interestingly, the only detected resistance mutation potentially related to therapy was M230I conferring resistance to rilpivirine. One explanation could be the moderate rate of diffusion in rectum of this non-nucleoside RT inhibitor as recently reported for the long-acting form of this drug [14].

It has been previously demonstrated that no significant evolution of HIV-1 *env* occurs in PBMC or GALT of people initiating HAART during early phase of HIV infection by using single genome amplification technology [5]. We observed lower percentages of homology in *env* than *pol* genes when comparing sequences from the initial plasma sample and the PBMC and biopsies ones (data not shown). However, the estimated co-receptor usage remained the same (CCR5 in all tested men). In fact, the Sanger technology only detects the main strains,

and does not allow deciphering if obtained sequences or mutations are belonging to the same virus. These discrepancies between *pol* and *env* genes may also be due to, at least in part, differences in genetic variability between the two genes or in sensitivity and affinity of primers used in the 2 protocols.

We also did not find any evidence of archived mutations either in gut nor in PBMC related to the period of decay of viral load after the initiation of HAART. This finding is in agreement with Bergroth et al, who did not find any M184V mutation in the plasma of chronically infected patients during the decay period after starting a triple therapy regimen including 3TC [15]. In this study, the archived *pol* DNA sequences were not explored. These findings suggest that a triple regimen composed by 2 nucleos(t)ide inhibitors and 1 non-nucleoside or 1 protease inhibitor (such darunavir) that exhibit a high rate of tissular diffusion is able to circumvent the selection of resistance mutations during the first weeks after initiating HAART [16].

As a whole, our study conducted in patients diagnosed during the chronic phase of infection demonstrates that the main strain present at the time of diagnosis remain stably persistent in rectal and PBMC reservoir, as it was shown in PBMC of patients enrolled in the French PRIMO cohort [17]. Even if it has been suggested that the gut reservoir was not the major source of rebound plasma viremia after stopping HAART [11], more data are expected on the potential risk of reactivation of archived-resistant strains, especially at the era of HIV cure strategies development.



**Acknowledgments**

The authors thank all patients who take part in this study and Veronique Ronat for her assistance.

**Conflicts of interest**

The author(s) declare that they have no conflicts of interest

## References

1. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, de Souza M, Rerknimitr R, *et al.* Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PloS One* 2012, **7**:e33948.
2. Avettand-Fenoel V, Hocqueloux L, Müller-Trutwin M, Prazuck T, Melard A, Chaix ML, Agoute E, *et al.* Greater diversity of HIV DNA in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *J Med Virol* 2011; **83**:1499-1507.
3. Josefsson L, Von Stockenstrom S, Faria NR, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, *et al.* The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**:e4997-e4996.
4. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, *et al.* Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J Infect Dis* 2013; **208**:1202-11.
5. Evering TH, Mehandru S, Racz P, Tenner-Racz C, Poles MA, Figueroa A, *et al.* Absence of HIV-1 evolution in the gut associated lymphoid tissue from patients on combination antiviral therapy initiated during primary infection. *PLoS Pathogens* 2012; **8**:e1002506.
6. UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic 2013. Available at [http://www.unaids.org/en/resources/documents/2013/20130923\\_UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013](http://www.unaids.org/en/resources/documents/2013/20130923_UNAIDS_Global_Report_2013)
7. Katzenstein TL, Petersen AB, Storgaard M, Obel N, Jensen-Fangel S, Nielsen C *et al.* Phylogeny and resistance profiles of HIV-1 POL sequences from rectal biopsies and blood. *J Med Virol* 2010; **82**:1103-1109.

8. van Marle G, Church DL, Nunweiler KD, Cannon K, Wainberg MA, Gill MJ. Higher levels of Zidovudine resistant HIV in the colon compared to blood and other gastrointestinal compartments in HIV infection. *Retrovirology* 2010; **13**:74.
9. Monno L, Punzi G, Scarabaggion T, Saracino A, Brindicci G, Fiore JR, Iambrenghi OC, *et al.* Mutational patterns of paired blood and rectal biopsies in HIV-1 infected on HAART. *J Med Virol* 2003; **70**:1-9.
10. Verhofstede C, Noë A, Demecheleer E, De Cabooter N, Van Wanzele F, Van Der Gucht B, *et al.* Drug-resistant variants that evolve during nonsuppressive therapy persist in HIV-1-infected peripheral blood mononuclear cells after long-term highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; **35**:473-483.
11. Lerner P, Guadalupe M, Donovan R, Hung J, Flamm J, Prindiville T, *et al.* The gut mucosal viral reservoir in HIV-infected patients is not the major source of rebound plasma viremia following interruption of highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2011; **85**:4772-82.
12. Depincé-Berger AE, Vergnon-Miszczycha D, Girard A, Frésard A, Botelho-Nevers E, Lambert C, *et al.* Major influence of CD4 count at the initiation of cART on viral and immunological reservoir constitution in HIV-1 infected patients. *Retrovirology* 2016; **13**:44.
13. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Encinas S, *et al.* Genotypic prediction of HIV-1 CRF02-AG tropism. *J Clin Microbiol* 2009; **47**:2292-2294
14. Jackson AG, Else LJ, Mesquita PM, Egan D, Back DJ, Karolia Z, *et al.* A compartmental pharmacokinetic evaluation of long-acting rilpivirine in HIV-negative volunteers for pre-exposure prophylaxis. *Clin Pharmacol Ther* 2014; **96**:314-323.
15. Bergroth T, Ekici H, Gisslén M, Loes SK, Goh LE, Freedman A, *et al.* Selection of drug-resistant HIV-1 during the early phase of viral decay is uncommon in treatment-

naïve patients initiated on a three- or four-drug antiretroviral regimen including lamivudine. *J Med Virol* 2009; **81**:1-8.

16. Thompson CG, Cohen MS, Kashuba A. Antiretroviral pharmacology in mucosal tissues. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013 ; **63**:S240-7.

17. Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, Deveau C, Viard JP, Galimand J, *et al.* HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* 2006; **20**:159-170.

Table 1. Demographic immunological and virological characteristics of the studied population.

Patient	Age, years	Clinical stage, CDC classification	CD4 <sup>+</sup> T cell count <sup>a</sup> , cells/mm <sup>3</sup>	HIV RNA level <sup>a</sup> , logcopies/ml	HIV genotype	HIV RNA load decay <sup>b</sup> , months	HAART regimen		Biopsy		PBMC	
							First line	Current <sup>c</sup>	HIV DNA level, logcopies/10 <sup>6</sup> cells	Qualitative HIV RNA detection	HIV DNA level, logcopies/10 <sup>6</sup> cells	Qualitative HIV RNA detection
1	30	B	248	3.91	B	6	FTC TDF EFV	FTC TDF EFV	4.08	+	3.23	-
2	56	A	843	3.45	B	3	3TC ABC ATV	3TC ABC DTG	3.06	+	2.41	-
3	54	C	152	5.77	B	2	FTC TDF DRV	FTC TDF EVG	4.43	+	4.21	+
4	50	B	435	4.01	B	3	FTC TDF DRV	FTC TDF EFV	3.73	+	3.04	+
5	47	B	257	5.52	B	3	FTC TDF DRV	FTC TDF RPV	4.59	+	3.40	-
6	68	C	74	6.29	CRF02_AG	15	FTC TDF DRV	ABC DRV RAL	3.50	-	3.61	-
7	49	A	1025	6.35	B	4	FTC TDF DRV	DTG 3TC ABC	3.78	+	2.44	+
8	52	C	14	5.43	B	5	FTC TDF DRV	DTG 3TC ABC	3.40	+	2.93	+
9	58	C	36	5.23	B	4	FTC TDF DRV	DTG 3TC ABC	3.42	+	3.26	+
10	64	C	20	5.13	B	4	FTC TDF DRV	FTC TDF RPV	4	+	3.21	+

<sup>a</sup>at the time of HIV diagnosis; <sup>b</sup>delay between antiretroviral therapy initiation and the first undetectable viral load value; <sup>c</sup>at the time of biopsy and PBMC sampling; FTC: emtricitabine; TDF: tenofovir; EFV: efavirenz; 3TC: lamivudine; ABC: abacavir; DTG: dolutegravir; EVG: elvitegravir; RPV: rilpivirine; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; RAL: raltegravir.

Table 2. Resistance mutations and V3 loop sequences analyzed in blood plasma, PBMC and rectal biopsy samples.

Patient	Delay between HIV diag. and therapy, days	Delay between genotyping assays <sup>a</sup> , months	Time with plasma HIV RNA <40 copies/ml, months	RT/protease gene			% of homology <sup>b</sup>	V3 loop gene	
				Resistance mutations				% of homology <sup>b</sup>	Tropism <sup>c</sup> , RNA/biopsy
				Blood RNA <sup>a</sup>	Rectal biopsy	PBMC			
1	1530	96	90	Protease: K20M M36I D60E I62V L63P H69Q RT: V106I V179I	Protease: K20M M36I D60E I62V L63P H69Q RT: V106I V179I	Protease: K20M M36I D60E I62V L63P H69Q RT: V106I V179I	98.5	80	R5/R5
2	3102	158	155	Protease: none RT: D67N T69D L210W T215D	Protease: <i>I62V</i> RT: D67N T69D L210W T215D	Protease: <i>I62V</i> RT: D67N T69D L210W T215D	99	76	R5/R5
3	12	31	29	Protease: I15V RT: D67N T69D L210W T215A K101E	Protease: I15V RT: D67N T69D L210W T215A K101E	Protease: I15V RT: D67N T69D L210W T215A K101E	96	71	R5/R5
4	730	76	69	Protease: L63P RT: none	Protease: L63P RT: none	Protease: L63P RT: none	96.5	80	R5/R5
5	2	57	54	Protease: I62V L63P RT: none	Protease: I62V L63P <i>A71V</i> RT: none	Protease: I62V L63P RT: none	97	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>
6	6	47	32	Protease: <i>L10I K20I</i> H69K L89M RT: none	Protease: <i>M36I</i> H69K L89M RT: none	Protease: <i>M36I</i> H69K L89M RT: none	97	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>
7	0	12	8	Protease: L63P I64V RT: K103N	Protease: L63P I64V RT: K103N	NA	98.5	NA <sup>d</sup>	NA <sup>d</sup>
8	7	44	39	Protease: I62V RT: none	Protease: I62V RT: none	Protease: I62V <i>Q58E</i> <i>A71T</i> RT: none	96.5	78.5	R5/R5
9	6	44	40	Protease: <i>M36I</i> , I64V RT: D67N T69D L210W T215W	Protease: I64V RT: D67N T69D L210W T215D	Protease: I64V RT: D67N T69D L210W	99.5	75.5	R5/R5
10	3	47	43	Protease: L33V, L63P, I64V RT: none	Protease: L33V, L63P, I64V RT: <i>L210W</i>	Protease: L33V, L63P, I64V RT: <i>L210W M230I</i>	96	79	R5/R5

<sup>a</sup> the blood plasma was sampled at the time of HIV seropositivity diagnosis; <sup>b</sup> between RNA and biopsy sequences; <sup>c</sup> determined by Geno2Pheno algorithm; <sup>d</sup> no PCR result; NA: not available; italics: discrepant mutations between samples.

## Autres publications au cours de la période de Thèse

*Communications affichées au cours de la période de Thèse en lien avec la thématique*

**Journées Nationales d'Infectiologie 2011**

**Traitement anti-rétroviral et sperme : absence d'efficacité sur le réservoir cellulaire de VIH-1**

A. Gagneux-Brunon, D. Nasri, MC. Gagnieu, A. Frésard, B. Pozzetto, F. Lucht, T. Bourlet

**International AIDS Society Rome 2011**

**Efficacy of HAART on cell-free but not on cell-associated HIV-1 shedding in semen.**

Amandine Gagneux-Brunon, Dorsaf Nasri, Marie-Claude Gagnieu, Rachel Terrasse, Anne Frésard, Gaëlle Normand, Hénia Saoudin, Delphine Hardy, Bruno Pozzetto, Frédéric Lucht, Thomas Bourlet

**International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases 2016**

**Seminal anti-HIV IgG and IgA antibodies are able to cross a tight epithelial barrier**

A. Gagneux-Brunon, B. Dechaumet, N. Rochereau, S. Paul, B. Pozzetto, F. Lucht, T. Bourlet



*Articles au cours de la période de Thèse en dehors de la thématique*

1. **Gagneux-Brunon A**, Delanaye P, Legrand D, Cavalier E, Mariat C. [NGAL, biomarker of acute kidney injury in 2012]. *Nephrol Ther.* 2012;8:508–15.
2. **Gagneux-Brunon A**, Mariat C, Delanaye P. Cystatin C in HIV-infected patients: promising but not yet ready for prime time. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1305–13.
3. Pestre V, Morel B, Encrenaz N, **Brunon A**, Lucht F, Pozzetto B, et al. Transmission by super-spreading event of pandemic A/H1N1 2009 influenza during road and train travel. *Scand J Infect Dis.* 2012;44:225–7.
4. **Gagneux-Brunon A**, Delanaye P, Maillard N, Fresard A, Basset T, Alamartine E, et al. Performance of creatinine and cystatin C-based glomerular filtration rate estimating equations in a European HIV-positive cohort. *AIDS.* 2013;27:1573–81.
5. Suy F, Botelho-Nevers E, **Gagneux-Brunon A**, Frésard A, Paul S, Lambert C, et al. Immunologic nonresponders and T-regulatory cells in HIV-1 infection. *AIDS.* 2013;27:2968–71.
6. **Gagneux-Brunon A**, Suy F, Pouvaret A, Pillet S, Tarantino E, Bouchet D, et al. Acute acalculous cholecystitis, a rare complication of Epstein-Barr virus primary infection: report of two cases and review. *J Clin Virol.* 2014;61:173–5.
7. **Gagneux-Brunon A**, Timsit J, Lepape A, Berthelot P. Vascular catheter-related infection claims to health insurance company: often preventable. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:O1084–7.
8. **Gagneux-Brunon A**, Grattard F, Morel J, Suy F, Fuzellier J, Verhoeven P, et al. *Mycoplasma hominis*, a Rare but True Cause of Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3068–71.

9. **Gagneux-Brunon A**, Pillet S, Laurent B, Mariat C, Michalet M, Lucht F, et al. A case of BK virus nephropathy in a stem cell transplant recipient: a rare or under-recognized cause for Acute Kidney injury. *Med Mal Infect.* 2015;45:331–4.
10. Moriceau G, **Gagneux-Brunon A**, Gagnaire J, Mariat C, Lucht F, Berthelot P, et al. Preventing healthcare-associated infections: Residents and attending physicians need better training in advanced isolation precautions. *Med Mal Infect.* 2015;
11. Pillet S, Berthelot P, **Gagneux-Brunon A**, Mory O, Gay C, Viallon A, et al. Contamination of healthcare worker’s mobile phones by epidemic viruses. *Clin Microbiol Infect.* 2015;
12. Reynaud Q, Weber E, **Gagneux-Brunon A**, Suy F, Romeyer-Bouchard C, Lucht F, et al. Late *Stenotrophomonas maltophilia* pacemaker infective endocarditis. *Med Mal Infect.* 2015;45:95–7.
13. Weber E, **Gagneux-Brunon A**, Jacomo V, Rousselon T, Lucht F, Botelho-Nevers E. Tenosynovitis: a rare presentation of tuberculosis better known by hand surgeons than infectious diseases specialists. *Infection.* 2015;43:261–6.
14. Weber E, Reynaud Q, Suy F, **Gagneux-Brunon A**, Carricajo A, Guillot A, et al. *Bifidobacterium* species bacteremia: risk factors in adults and infants. *Clin Infect Dis.* 2015;61:482–4.
15. **Gagneux-Brunon A**, Botelho-Nevers E, Frésard A, Lucht F. Preventing long-term tenofovir renal toxicity by pharmacokinetic assessment. *AIDS.* 2016 Feb 20;30(4):665–6.
16. **Gagneux-Brunon A**, Andrillat C, Fouilloux P, Daoud F, Defontaine C, Charles R, et al. Pre-travel advice seeking from GPs by travellers with chronic illness seen at a travel clinic. *J Travel Med.* 2016 Mar;23(3).

17. Botelho-Nevers E, **Gagneux-Brunon A**, Cantais A, Daoud F, Fouilloux P, Fresard A, et al. The potential lethal consequences of rabies vaccine avoidance and dog smuggling in Europe. *J Infect.* 2016 May;72(5):626–8.
18. Botelho-Nevers É, Verhoeven PO, Thibaudin D, Gagnaire J, **Gagneux-Brunon A**, Lucht F, et al. [Survey among French dialysis practitioners about the screening and decolonization of nasal *Staphylococcus aureus* carriage in dialysis patients]. *Nephrol Ther.* 2016 Jul;12(4):206–9.
19. **Gagneux-Brunon A**, Lucht F, Botelho-Nevers E. HIV care: A missed opportunity for immunization. *Vaccine.* 2016 Jul 12;34(32):3632.
20. Frésard A, **Gagneux-Brunon A**, Lucht F, Botelho-Nevers E, Launay O. Immunization of HIV-infected adult patients - French recommendations. *Hum Vaccin Immunother.* 2016 Jul 13;1–13.
21. Killian M, Detoc M, Berthelot P, Charles R, **Gagneux-Brunon A**, Lucht F, et al. Vaccine hesitancy among general practitioners: evaluation and comparison of their immunisation practice for themselves, their patients and their children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016

*Communications orales pendant la période de Thèse*

**JNI 2013**

Infections liées à cathéters : trop souvent évitables... Amandine Gagneux-Brunon, Jean-François Timsit, Alain Lepape, Philippe Berthelot

**RICAI 2015**

Incidence et impact majeurs de l'insuffisance rénale aiguë au cours de la prise en charge des endocardites infectieuses

Anne Pouvaret, Amandine Gagneux-Brunon, Frédéric Lucht, Elisabeth Botelho-Nevers

**ERA-EDTA 2012**

Creatinine and/or Cystatin C-based GFR estimation in HIV-infected patients Gagneux-Brunon A., Delanaye P., Lucht F., Fresard A., Mariat C.

**Journées Nationales d'Infectiologie 2012**

Marqueurs du débit de filtration glomérulaire chez les patients VIH : cystatine C ou créatinine sériques ? Amandine Gagneux-Brunon, Pierre Delanaye, Christophe Mariat, Anne Frésard, Frédéric Lucht

**Kidney Week 2012**

Creatinine and/or Cystatin C-Based GFR Estimation in HIV Patients

Amandine Gagneux-Brunon, Pierre Delanaye, Xavier Delavenne, Thierry Basset, Frederic Lucht, Christopher R. Mariat.

**Kidney Week 2013**

GFR Estimating Equations in HIV-infected patients: One patient, one GFR Estimating Equation. Poster presentation

Gagneux-Brunon, A., Delanaye P., Mariat C., Moranne, O.

**Congrès de la Société Française de Néphrologie Saint-Etienne 2014**

Quel estimateur du débit de filtration glomérulaire pour le choix et l'adaptation des traitements anti-rétroviraux chez les patients infectés par le VIH ?

Gagneux-Brunon. A, Delanaye P., Fafin C., Mariat C., Fresard A., Lucht. F, Moranne O.

## **Journées Nationales d'Infectiologie 2015**

Conseils aux voyageurs : quel rôle pour le médecin généraliste ?

Dr Amandine Gagneux-Brunon, Dr Carole Andrillat Dr Pascale Fouilloux, Dr Fatiha

Daoud, Dr Christiane Defontaine, Pr Frédéric Lucht et Dr Elisabeth Botelho-Nevers

Couverture vaccinale pour les vaccins usuels chez les voyageurs venant consulter en centre de vaccinations internationales (CVI)

Amandine Gagneux-Brunon, Carole Andrillat, Pascale Fouilloux, Fatiha Daoud, Christiane Defontaine, Frédéric Lucht et Elisabeth Botelho-Nevers

## **ISHEID 2016**

**GFR measurement in HIV infected patients: Useful and acceptable.**

Amandine Gagneux-Brunon, Elisabeth Botelho-Nevers, Olivier Moranne, Pierre Delanaye, Christophe Mariat, Anne Fresard, Frédéric Lucht

## **HIV Drug Therapy 2016**

**Different classifications of chronic kidney disease in HIV-infected patients result in large discrepancies in CKD prevalence in this population.**

Amandine Gagneux-Brunon, Anne Frésard, Céline Cazorla, Claire Guglielminotti, Elisabeth Botelh-Nevers, Frédéric Lucht

**In spite of international guidelines, vaccine coverage of HIV-infected patients remains low.**

Amandine Gagneux-Brunon, Anne Frésard, Maëlle Detoc, Elena Charrière, Véronique Ronat Frédéric Lucht, Elisabeth Botelho-Nevers

## Références

1. Global AIDS update— UNAIDS | 2016. Available from: [http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-AIDS-update-2016\\_en.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/arv/global-AIDS-update-2016_en.pdf)
2. GBD 2015 HIV Collaborators, Wang H, Wolock TM, Carter A, Nguyen G, Kyu HH, et al. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980-2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV*. 2016 3(8):e361–87.
3. Patel P, Borkowf CB, Brooks JT, Lasry A, Lansky A, Mermin J. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS* 2014 28(10):1509–19.
4. ONUSIDA. Prevention Gap report. 2016 Juillet.
5. Gowing L, Farrell MF, Bornemann R, Sullivan LE, Ali R. Oral substitution treatment of injecting opioid users for prevention of HIV infection. In: The Cochrane Collaboration, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. C2011. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004145.pub4>
6. Jones A, Cremin I, Abdullah F, Idoko J, Cherutich P, Kilonzo N, et al. Transformation of HIV from pandemic to low-endemic levels: a public health approach to combination prevention. *The Lancet*. 2014 384(9939):272–9.
7. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 [Internet]. Available from: [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS\\_Global\\_Report\\_2013\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf)
8. Wang H, Wolock TM, Carter A, Nguyen G, Kyu HH, Gakidou E, et al. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2015: the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet HIV*. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)30087-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-3018(16)30087-X)
9. ECDC. HIV/AIDS surveillance in Europe 2013. 2014.
10. VIH/sida en France : données de surveillance et études. INPES; 2012.
11. Lawrence P, Zimmer A, Paul S. Infection muqueuse par le virus VIH-1: mécanismes, conséquences, perspectives de vaccination. *Rev Francoph Lab*. 2009 2009(410):45–54.

12. Boeras DI, Hraber PT, Hurlston M, Evans-Strickfaden T, Bhattacharya T, Giorgi EE, et al. Role of donor genital tract HIV-1 diversity in the transmission bottleneck. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 108(46):E1156–63.
13. Grivel J-C, Shattock RJ, Margolis LB. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med.* 2011 9(Suppl 1):S6.
14. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, et al. Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission. *Science.* 2004; 303(5666):2019–22.
15. Lavine CL, Lao S, Montefiori DC, Haynes BF, Sodroski JG, Yang X, et al. High-mannose glycan-dependent epitopes are frequently targeted in broad neutralizing antibody responses during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2012; 86(4):2153–64.
16. Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Uguccioni M, et al. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol CB.* 2000; 10(6):325–8.
17. Joag VR, McKinnon LR, Liu J, Kidane ST, Yudin MH, Nyanga B, et al. Identification of preferential CD4+ T-cell targets for HIV infection in the cervix. *Mucosal Immunol.* 2016; 9(1):1–12.
18. Woodham AW, Skeate JG, Sanna AM, Taylor JR, Da Silva DM, Cannon PM, et al. Human Immunodeficiency Virus Immune Cell Receptors, Coreceptors, and Cofactors: Implications for Prevention and Treatment. *AIDS Patient Care STDs.* 2016; 30(7):291–306.
19. Politch JA, Marathe J, Anderson DJ. Characteristics and quantities of HIV host cells in human genital tract secretions. *J Infect Dis.* 2014; 210 Suppl 3:S609–15.
20. Quayle AJ, Xu C, Mayer KH, Anderson DJ. T Lymphocytes and Macrophages, but Not Motile Spermatozoa, Are a Significant Source of Human Immunodeficiency Virus in Semen. *J Infect Dis.* 1997;176(4):960–8.



21. Le Tortorec A, Dejucq-Rainsford N. HIV infection of the male genital tract--consequences for sexual transmission and reproduction. *Int J Androl.* 2010;33(1):e98–108.
22. Muciaccia B, Corallini S, Vicini E, Padula F, Gandini L, Liuzzi G, et al. HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects. *Hum Reprod* 2007;22(11):2868–78.
23. Gadella BM, Hammache D, Piéroni G, Colenbrander B, van Golde LM, Fantini J. Glycolipids as potential binding sites for HIV: topology in the sperm plasma membrane in relation to the regulation of membrane fusion. *J Reprod Immunol.* 1998;41(1-2):233–53.
24. Muciaccia B, Padula F, Gandini L, Lenzi A, Stefanini M. HIV-1 chemokine co-receptor CCR5 is expressed on the surface of human spermatozoa. *AIDS* 2005;19(13):1424–6.
25. Fanibunda SE, Velhal SM, Raghavan VP, Bandivdekar AH. CD4 independent binding of HIV gp120 to mannose receptor on human spermatozoa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(4):389–97.
26. Ceballos A, Remes Lenicov F, Sabatté J, Rodríguez Rodríguez C, Cabrini M, Jancic C, et al. Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. *J Exp Med.* 2009;206(12):2717–33.
27. Politch JA, Mayer KH, Anderson DJ. Depletion of CD4+ T cells in semen during HIV infection and their restoration following antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;50(3):283–9.
28. Anderson DJ, Politch JA, Nadolski AM, Blaskewicz CD, Pudney J, Mayer KH. Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. *AIDS* 2010;24(2):163–87.
29. Wolff H, Anderson DJ. Male genital tract inflammation associated with increased numbers of potential human immunodeficiency virus host cells in semen. *Andrologia.* 1988;20(5):404–10.
30. Keaveney S, Sadlier C, O’Dea S, Delamere S, Bergin C. High prevalence of

asymptomatic sexually transmitted infections in HIV-infected men who have sex with men: a stimulus to improve screening. *Int J STD AIDS*. 2014;25(10):758–61.

31. Sagar M, Laeyendecker O, Lee S, Gamiel J, Wawer MJ, Gray RH, et al. Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J Infect Dis*. 2009;199(4):580–9.

32. Louissaint NA, Fuchs EJ, Bakshi RP, Nimmagadda S, Du Y, Macura KJ, et al. Distribution of cell-free and cell-associated HIV surrogates in the female genital tract after simulated vaginal intercourse. *J Infect Dis*. 2012;205(5):725–32.

33. Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, et al. Evolutionary Indicators of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reservoirs and Compartments. *J Virol*. 2003;77(9):5540–6.

34. Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, Learn GH, Holodniy M, Katzenstein D, et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol*. 1998;72(1):617–23.

35. Gupta P, Leroux C, Patterson BK, Kingsley L, Rinaldo C, Ding M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. *J Infect Dis*. 2000;182(1):79–87.

36. Paranjpe S, Craigo J, Patterson B, Ding M, Barroso P, Harrison L, et al. Subcompartmentalization of HIV-1 quasispecies between seminal cells and seminal plasma indicates their origin in distinct genital tissues. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18(17):1271–80.

37. Ghosn J, Viard J-P, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourneur F, et al. Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS*;18(3):447–57.

38. Anderson JA, Ping L-H, Dibben O, Jabara CB, Arney L, Kincer L, et al. HIV-1

Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001053.

39. Pillai SK, Good B, Pond SK, Wong JK, Strain MC, Richman DD, et al. Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env. *J Virol.* 2005 79(3):1734–42.

40. Zhang H, Dornadula G, Beumont M, Livornese L, Van Uitert B, Henning K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1998;339(25):1803–9.

41. Nunnari G, Otero M, Dornadula G, Vanella M, Zhang H, Frank I, et al. Residual HIV-1 disease in seminal cells of HIV-1-infected men on suppressive HAART: latency without on-going cellular infections. *AIDS* 2002 16(1):39–45.

42. Bujan L, Daudin M, Alvarez M, Massip P, Puel J, Pasquier C. Intermittent human immunodeficiency type 1 virus (HIV-1) shedding in semen and efficiency of sperm processing despite high seminal HIV-1 RNA levels. *Fertil Steril.* 2002 78(6):1321–3.

43. Marcelin A-G, Tubiana R, Lambert-Niclot S, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M, et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS Lond Engl.* 2008 Aug 20;22(13):1677–9.

44. Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R, et al. Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2009 Sep 24;23(15):2050–4.

45. Halfon P, Giorgetti C, Khiri H, Pénaranda G, Terriou P, Porcu-Buisson G, et al. Semen may harbor HIV despite effective HAART: another piece in the puzzle. *PloS One.* 2010;5(5):e10569.

46. Dulioust E, Leruez-Ville M, Guibert J, Fubini A, Jegou D, Launay O, et al. No detection of HIV 1-RNA in semen of men on efficient HAART in the past 4 years of a 2002-

2009 survey. *AIDS* 2010 ;24(10):1595–8.

47. Politch JA, Mayer KH, Welles SL, O'Brien WX, Xu C, Bowman FP, et al. Highly active antiretroviral therapy does not completely suppress HIV in semen of sexually active HIV-infected men who have sex with men. *AIDS* 2012;26(12):1535–43.

48. Osborne BJW, Sheth PM, Yi TJ, Kovacs C, Benko E, Porte C la, et al. Impact of antiretroviral therapy duration and intensification on isolated shedding of HIV-1 RNA in semen. *J Infect Dis.* 2013;207(8):1226–34.

49. Gianella S, Smith DM, Vargas MV, Little SJ, Richman DD, Daar ES, et al. Shedding of HIV and human herpesviruses in the semen of effectively treated HIV-1-infected men who have sex with men. *Clin Infect Dis* 2013;57(3):441–7.

50. Ferraretto X, Estellat C, Damond F, Longuet P, Epelboin S, Demailly P, et al. Timing of intermittent seminal HIV-1 RNA shedding in patients with undetectable plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *PloS One.* 2014;9(3):e88922.

51. Ghosn J, Leruez-Ville M, Blanche J, Delobelle A, Beaudoux C, Mascard L, et al. HIV-1 DNA levels in peripheral blood mononuclear cells and cannabis use are associated with intermittent HIV shedding in semen of men who have sex with men on successful antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* 2014;58(12):1763–70.

52. Mujugira A, Coombs RW, Heffron R, Celum C, Ronald A, Mugo N, et al. Seminal HIV-1 RNA Detection in Heterosexual African Men Initiating Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2016;214(2):212–5.

53. Torres-Cornejo A, BenMarzouk-Hidalgo OJ, Viciano P, Sánchez B, López-Ruz MA, López-Cortés LF, et al. Protease inhibitor monotherapy is effective in controlling human immunodeficiency virus 1 shedding in the male genital tract. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(1):98.e7–98.e10.

54. Du P, Liu A, Jiao Y, Liu C, Jiang T, Zhu W, et al. HIV RNA and proviral HIV DNA can be detected in semen after 6 months of antiretroviral therapy although HIV RNA is

undetectable in blood. *Microbiol Immunol.* 2016;60(3):187–95.

55. Politch JA, Mayer KH, Anderson DJ. HIV-1 is undetectable in preejaculatory secretions from HIV-1-infected men on suppressive HAART. *AIDS* 2016;30(12):1899–903.

56. Gantner P, Assoumou L, Leruez-Ville M, David L, Suzan-Monti M, Costagliola D, et al. HIV-1-RNA in seminal plasma correlates with detection of HIV-1-DNA in semen cells, but not with CMV shedding, among MSM on successful antiretroviral regimens. *J Antimicrob Chemother.* 2016

57. Lopez-Ruz MA, Navas P, López-Zúñiga MA, Gonzalvo MC, Sampedro A, Pasquau J, et al. Effect of Monotherapy with Darunavir/Ritonavir on Viral Load in Seminal Fluid, and Quality Parameters of Semen in HIV-1-Positive Patients. *PloS One.* 2016;11(7):e0159305.

58. Houzet L, Matusali G, Dejudcq-Rainsford N. Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. *J Infect Dis.* 2014;210 Suppl 3:S622–30.

59. Deleage C, Moreau M, Rioux-Leclercq N, Ruffault A, Jégou B, Dejudcq-Rainsford N. Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2397–408.

60. Else LJ, Taylor S, Back DJ, Khoo SH. Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract. *Antivir Ther.* 2011;16(8):1149–67.

61. Sadiq ST, Taylor S, Copas AJ, Bennett J, Kaye S, Drake SM, et al. The effects of urethritis on seminal plasma HIV-1 RNA loads in homosexual men not receiving antiretroviral therapy. *Sex Transm Infect.* 2005;81(2):120–3.

62. Gianella S, Massanella M, Richman DD, Little SJ, Spina CA, Vargas MV, et al. Cytomegalovirus Replication in Semen is Associated with Higher Levels of Proviral HIV DNA and CD4+ T cell Activation during Antiretroviral Treatment. *J Virol.* 2014; 88(14):7818-27

63. Lisco A, Munawwar A, Introini A, Vanpouille C, Saba E, Feng X, et al. Semen of

HIV-1-infected individuals: local shedding of herpesviruses and reprogrammed cytokine network. *J Infect Dis.* 2012;205(1):97–105.

64. Zuckerman RA, Lucchetti A, Whittington WLH, Sánchez J, Coombs RW, Margaret A, et al. HSV suppression reduces seminal HIV-1 levels in HIV-1/HSV-2 co-infected men who have sex with men. *AIDS.* 2009;23(4):479–83.

65. Shin LY, Sheth PM, Persad D, Kovacs C, Kain T, Diong C, et al. Impact of CMV therapy with valganciclovir on immune activation and the HIV viral load in semen and blood: an observational clinical study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014;65(3):251–8.

66. Sheth PM, Yi TJ, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Osborne B, et al. Mucosal correlates of isolated HIV semen shedding during effective antiretroviral therapy. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):248–57.

67. Liu CM, Osborne BJW, Hungate BA, Shahabi K, Huibner S, Lester R, et al. The Semen Microbiome and Its Relationship with Local Immunology and Viral Load in HIV Infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004262.

68. Shehu-Xhilaga M, de Kretser D, Dejuq-Rainsford N, Hedger M. Standing in the way of eradication: HIV-1 infection and treatment in the male genital tract. *Curr HIV Res.* 2005;3(4):345–59.

69. Coombs RW, Lockhart D, Ross SO, Deutsch L, Dragavon J, Diem K, et al. Lower genitourinary tract sources of seminal HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2006;41(4):430–8.

70. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs That Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity.* 2012;37(3):377–88.

71. Galvin SR, Cohen MS. Genital tract reservoirs. *Curr Opin HIV AIDS.* 2006;1(2):162–6.

72. Rouzioux C, Richman D. How to best measure HIV reservoirs? *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;8(3):170–5.

73. Chun T-W, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. *Nat Immunol.* 2015;16(6):584–9.
74. Chaillon A, Gianella S, Wertheim JO, Richman DD, Mehta SR, Smith DM. HIV Migration Between Blood and Cerebrospinal Fluid or Semen Over Time. *J Infect Dis.* 2014;209(10):1642–52.
75. Archin NM, Sung JM, Garrido C, Soriano-Sarabia N, Margolis DM. Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(11):750–64.
76. North TW, Higgins J, Deere JD, Hayes TL, Villalobos A, Adamson L, et al. Viral Sanctuaries during Highly Active Antiretroviral Therapy in a Nonhuman Primate Model for AIDS. *J Virol.* 2010;84(6):2913–22.
77. Le Tortorec A, Le Grand R, Denis H, Satie A-P, Mannioui K, Roques P, et al. Infection of Semen-Producing Organs by SIV during the Acute and Chronic Stages of the Disease. *PLoS ONE.* 2008;3(3):e1792.
78. Moreau M, Le Tortorec A, Deleage C, Brown C, Denis H, Satie A-P, et al. Impact of short-term HAART initiated during the chronic stage or shortly post-exposure on SIV infection of male genital organs. *PloS One.* 2012;7(5):e37348.
79. Lewin SR, Rouzioux C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 2011;25(7):885–97.
80. Massanella M, Richman DD. Measuring the latent reservoir in vivo. *J Clin Invest.* 2016;126(2):464–72.
81. Santangelo PJ, Rogers KA, Zurla C, Blanchard EL, Gumber S, Strait K, et al. Whole-body immunoPET reveals active SIV dynamics in viremic and antiretroviral therapy-treated macaques. *Nat Methods.* 2015;12(5):427–32.
82. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, et al. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science.* 2014;345(6193):179–83.

83. Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CYK, Larsen BB, Styrchak S, et al. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*. 2014;345(6196):570–3.
84. Passaes CP, Sáez-Ciri3n A. HIV cure research: Advances and prospects. *Virology*. 2014;454–455:340–52.
85. Nunnari G, Leto D, Sullivan J, Xu Y, Mehlman KE, Kulkosky J, et al. Seminal reservoirs during an HIV type 1 eradication trial. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21(9):768–75.
86. Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology*. 2015;12:14.
87. Mestecky J. Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. *J Reprod Immunol*. 2007;73(1):86–97.
88. Haimovici F, Mayer KH, Anderson DJ. Quantitation of HIV-1-specific IgG, IgA, and IgM antibodies in human genital tract secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc*. 1997;15(3):185–91.
89. Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Bl3e C, Meacci F, et al. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med*. 1997;3(11):1250–7.
90. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, et al. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999;13(1):23–9.
91. B3elec L, Ghys PD, Hocini H, Nkengasong JN, Tranchot-Diallo J, Diallo MO, et al. Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-1-seronegative African women. *J Infect Dis*. 2001;184(11):1412–22.



92. Devito C, Broliden K, Kaul R, Svensson L, Johansen K, Kiama P, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;165(9):5170–6.
93. Devito C, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L, et al. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 ;30(4):413–20.
94. Hirbod T, Kaul R, Reichard C, Kimani J, Ngugi E, Bwayo JJ, et al. HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers: *AIDS*. 2008;22(6):727–35.
95. Choi RY, Levinson P, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Bosire R, Liu AY, et al. Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *AIDS* 2012;26(17):2155–63.
96. Lo Caputo S, Trabattoni D, Vichi F, Piconi S, Lopalco L, Villa ML, et al. Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. *AIDS* 2003;17(4):531–9.
97. Hirbod T, Kong X, Kigozi G, Ndyanabo A, Serwadda D, Prodger JL, et al. HIV acquisition is associated with increased antimicrobial peptides and reduced HIV neutralizing IgA in the foreskin prepuce of uncircumcised men. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004416.
98. Mazzoli S, Lopalco L, Salvi A, Trabattoni D, Lo Caputo S, Semplici F, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons. *J Infect Dis*. 1999;180(3):871–5.
99. Prodger JL, Hirbod T, Kigozi G, Nalugoda F, Reynolds SJ, Galiwango R, et al. Immune correlates of HIV exposure without infection in foreskins of men from Rakai, Uganda. *Mucosal Immunol*. 2014;7(3):634–44.
100. Hirbod T, Kong X, Kigozi G, Ndyanabo A, Serwadda D, Prodger JL, et al. HIV Acquisition Is Associated with Increased Antimicrobial Peptides and Reduced HIV

Neutralizing IgA in the Foreskin Prepuce of Uncircumcised Men. *PLoS Pathog* Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183701/>

101. Hocini H, Bélec L, Iscaki S, Garin B, Pillot J, Becquart P, et al. High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997;13(14):1179–85.

102. Gupta S, Gach JS, Becerra JC, Phan TB, Pudney J, Moldoveanu Z, et al. The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. *PLoS Pathog*. 2013;9(11):e1003776.

103. Battle-Miller K, Eby CA, Landay AL, Cohen MH, Sha BE, Baum LL. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Cervical Lavage Fluids of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Women. *J Infect Dis*. 2002;185(4):439–47.

104. 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*. 2012 Jun 14;8(6):e1002739.

105. Kim JH, Excler J-L, Michael NL. Lessons from the RV144 Thai phase III HIV-1 vaccine trial and the search for correlates of protection. *Annu Rev Med*. 2015;66:423–37.

106. Parsons MS, Madhavi V, Ana-Sosa-Batiz F, Center RJ, Wilson KM, Bunupuradah T, et al. Brief Report: Seminal Plasma Anti-HIV Antibodies Trigger Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity: Implications for HIV Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;71(1):17–23.

107. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol*. 2015;108:98–104.

108. Vanpouille C, Introini A, Morris SR, Margolis L, Daar ES, Dube MP, et al. Distinct cytokine/chemokine network in semen and blood characterize different stages of HIV infection. *AIDS* 2016 30(2):193–201.

109. Lisco A, Munawwar A, Introini A, Vanpouille C, Saba E, Feng X, et al. Semen of HIV-1–Infected Individuals: Local Shedding of Herpesviruses and Reprogrammed Cytokine Network. *J Infect Dis.* 2012 205(1):97–105.
110. Olivier AJ, Masson L, Ronacher K, Walzl G, Coetzee D, Lewis DA, et al. Distinct Cytokine Patterns in Semen Influence Local HIV Shedding and HIV Target Cell Activation. *J Infect Dis.* 2014; 209(8):1174-84
111. De Saint Jean A, Lucht F, Bourlet T, Delézay O. Transforming growth factor beta 1 up-regulates CD169 (sialoadhesin) expression on monocyte-derived dendritic cells: role in HIV sexual transmission. *AIDS* 2014;28(16):2375–80.
112. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod* 2007;22(11):2928–35.
113. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res.* 2011;10(3):941–53.
114. Doncel GF, Joseph T, Thurman AR. Role of Semen in HIV-1 Transmission: Inhibitor or facilitator? *Am J Reprod Immunol* 2011;65(3):292-301.
115. Doncel GF, Anderson S, Zalenskaya I. Role of Semen in Modulating the Female Genital Tract Microenvironment – Implications for HIV Transmission. *Am J Reprod Immunol.* 2014 J;71(6):564–74.
116. Sales KJ, Adefuye A, Nicholson L, Katz AA. CCR5 expression is elevated in cervical cancer cells and is up-regulated by seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 2014;20(11):1144–57.
117. Bouhlal H, Chomont N, Réquena M, Nasreddine N, Saidi H, Legoff J, et al. Opsonization of HIV with complement enhances infection of dendritic cells and viral transfer to CD4 T cells in a CR3 and DC-SIGN-dependent manner. *J Immunol* 1950. 2007

J;178(2):1086–95.

118. Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell*. 2007;131(6):1059–71.

119. Allen SA, Carias AM, Anderson MR, Okocha EA, Benning L, McRaven MD, et al. Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues. *J Virol*. 2015;89(10):5569–80.

120. Berlier W, Bourlet T, Lévy R, Lucht F, Pozzetto B, Delézay O. Amount of seminal IL-1beta positively correlates to HIV-1 load in the semen of infected patients. *J Clin Virol*. 2006;36(3):204–7.

121. Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Collet D, Jégou B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans. *Biol Reprod*. 2003;68(1):95–104.

122. Andersson E, Sørensen OE, Frohm B, Borregaard N, Egesten A, Malm J. Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Hum Reprod* 2002;17(10):2529–34.

123. Ohlsson K, Bjartell A, Lilja H. Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl*. 1995;16(1):64–74.

124. Saidi H, Eslahpazir J, Eslaphazir J, Carbonneil C, Carthagena L, Requena M, et al. Differential modulation of human lactoferrin activity against both R5 and X4-HIV-1 adsorption on epithelial cells and dendritic cells by natural antibodies. *J Immunol*. 2006;177(8):5540–9.

125. Kafka JK, Osborne BJW, Sheth PM, Nazli A, Dizzell S, Huibner S, et al. Latent TGF- $\beta$ 1 is compartmentalized between blood and seminal plasma of HIV-positive men and its activation in semen is negatively correlated with viral load and immune activation. *Am J Reprod Immunol* 2015;73(2):151–61.

126. Pinkerton SD, Abramson PR. Effectiveness of condoms in preventing HIV transmission. *Soc Sci Med*. 1997;44(9):1303–12.
127. Stover J. Contribution of condoms to HIV prevention. Geneva; 2014 Nov. (UNAIDS Global Condom Meeting).
128. Laga M, Piot P. Prevention of sexual transmission of HIV: real results, science progressing, societies remaining behind. *AIDS* 2012;26(10):1223–9.
129. Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R, Puren A. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS Med*. 2005;2(11):e298.
130. Anderson D, Politch JA, Pudney J. HIV infection of the penis. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(3):220–9.
131. Gust DA, Wiegand RE, Kretsinger K, Sansom S, Kilmarx PH, Bartholow BN, et al. Circumcision status and HIV infection among MSM: reanalysis of a Phase III HIV vaccine clinical trial. *AIDS Lond Engl*. 2010;24(8):1135–43.
132. Sánchez J, Sal Y Rosas VG, Hughes JP, Baeten JM, Fuchs J, Buchbinder SP, et al. Male circumcision and risk of HIV acquisition among MSM. *AIDS* 2011;25(4):519–23.
133. Weiss HA, Hankins CA, Dickson K. Male circumcision and risk of HIV infection in women: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(11):669–77.
134. Wawer MJ, Makumbi F, Kigozi G, Serwadda D, Watya S, Nalugoda F, et al. Circumcision in HIV-infected men and its effect on HIV transmission to female partners in Rakai, Uganda: a randomised controlled trial. *Lancet* 2009;374(9685):229–37.
135. Baeten JM, Donnell D, Kapiga SH, Ronald A, John-Stewart G, Inambao M, et al. Male circumcision and risk of male-to-female HIV-1 transmission: a multinational prospective study in African HIV-1-serodiscordant couples. *AIDS* 2010;24(5):737–44.
136. Auvert B, Taljaard D, Rech D, Lissouba P, Singh B, Bouscaillou J, et al. Association of the ANRS-12126 male circumcision project with HIV levels among men in a South

African township: evaluation of effectiveness using cross-sectional surveys. *PLoS Med.* 2013;10(9):e1001509.

137. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS Lond Engl.* 1993 Jan;7(1):95–102.

138. Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis.* 1992;19(2):61–77.

139. Barnabas RV, Wasserheit JN, Huang Y, Janes H, Morrow R, Fuchs J, et al. Impact of herpes simplex virus type 2 on HIV-1 acquisition and progression in an HIV vaccine trial (the Step study). *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57(3):238–44.

140. Ng BE, Butler LM, Horvath T, Rutherford GW. Population-based biomedical sexually transmitted infection control interventions for reducing HIV infection. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/14651858.CD001220.pub3/abstract>

141. Delany S, Mlaba N, Clayton T, Akpomemie G, Capovilla A, Legoff J, et al. Impact of aciclovir on genital and plasma HIV-1 RNA in HSV-2/HIV-1 co-infected women: a randomized placebo-controlled trial in South Africa. *AIDS* 2009;23(4):461–9.

142. Celum C, Wald A, Hughes J, Sanchez J, Reid S, Delany-Moretlwe S, et al. Effect of aciclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex with men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2008;371(9630):2109–19.

143. Celum C, Wald A, Lingappa JR, Margaret AS, Wang RS, Mugo N, et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. *N Engl J Med.* 2010;362(5):427–39.

144. Krakower DS, Jain S, Mayer KH. Antiretrovirals for primary HIV prevention: the

current status of pre- and post-exposure prophylaxis. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015;12(1):127–38.

145. Prise en charge Médicale des personnes vivant avec le VIH recommandations du groupe d'experts Rapport 2013 (Sous la direction du Pr Philippe Morlat) [Internet]. Available from: [http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_Morlat\\_2013\\_Mise\\_en\\_ligne.pdf](http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Morlat_2013_Mise_en_ligne.pdf)

146. European AIDS Clinical Society. EACS Guidelines 8.0. 2016 Jun; Available from: <http://www.eacsociety.org/guidelines/eacs-guidelines/eacs-guidelines.html>

147. British HIV Association. UK Guideline for the use of HIV Post-Exposure Prophylax [Internet]. 2015. Available from: <http://www.bhiva.org/PEPSE-guidelines.aspx>

148. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection drug use, or other nonoccupational exposure to HIV—United States, 2016 2016. Available from: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/38856>

149. Herida M, Larsen C, Lot F, Laporte A, Desenclos J-C, Hamers FF. Cost-effectiveness of HIV post-exposure prophylaxis in France. *AIDS Lond Engl.* 2006;20(13):1753–61.

150. Guinot D, Ho MT, Poynten IM, McAllister J, Pierce A, Pell C, et al. Cost-effectiveness of HIV nonoccupational post-exposure prophylaxis in Australia. *HIV Med.* 2009;10(4):199–208.

151. Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS Lond Engl.* 2009;23(11):1397–404.

152. Cohen MS, Smith MK, Muessig KE, Hallett TB, Powers KA, Kashuba AD. Antiretroviral treatment of HIV-1 prevents transmission of HIV-1: where do we go from here? *The Lancet.* 2013;382(9903):1515–24.

153. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.*

2011;365(6):493–505.

154. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N Engl J Med.* 2016;375(9):830–9.

155. Castel AD, Befus M, Willis S, Griffin A, West T, Hader S, et al. Use of the community viral load as a population-based biomarker of HIV burden. *AIDS* 2012 28;26(3):345–53.

156. Iwuji CC, Orne-Gliemann J, Tanser F, Boyer S, Lessells RJ, Lert F, et al. Evaluation of the impact of immediate versus WHO recommendations-guided antiretroviral therapy initiation on HIV incidence: the ANRS 12249 TasP (Treatment as Prevention) trial in Hlabisa sub-district, KwaZulu-Natal, South Africa: study protocol for a cluster randomised controlled trial. *Trials.* 2013;14:230.

157. Hayes R, Ayles H, Beyers N, Sabapathy K, Floyd S, Shanaube K, et al. HPTN 071 (PopART): Rationale and design of a cluster-randomised trial of the population impact of an HIV combination prevention intervention including universal testing and treatment – a study protocol for a cluster randomised trial. *Trials.* 2014;15:57.

158. Maman D, Zeh C, Mukui I, Kirubi B, Masson S, Opolo V, et al. Cascade of HIV care and population viral suppression in a high-burden region of Kenya. *AIDS* 2015 ;29(12):1557–65.

159. Hill AM, Anton Pozniak, Dauncey, Thomas, Levi, Jacob, Heath, Katherine, Essajee, Shaffiq, et al. Countries With Lower HIV Prevalence Have Lower ARV Coverage: UNAIDS 2015 Database. In Boston; 2016.

160. Supervie V, Ndawinz JDA, Lodi S, Costagliola D. The undiagnosed HIV epidemic in France and its implications for HIV screening strategies. *AIDS* 2014;28(12):1797–804.

161. Granich RM, Gilks CF, Dye C, De Cock KM, Williams BG. Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV



transmission: a mathematical model. *Lancet Lond Engl.* 2009;373(9657):48–57.

162. Supervie V, Marty L, Lacombe J-M, Dray-Spira R, Costagliola D, FHDH-ANRS CO4 study group. Looking beyond the cascade of HIV care to end the AIDS epidemic: estimation of the time interval from HIV infection to viral suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016; publié en ligne

163. Lasry A, Sansom SL, Wolitski RJ, Green TA, Borkowf CB, Patel P, et al. HIV sexual transmission risk among serodiscordant couples: assessing the effects of combining prevention strategies. *AIDS.* 2014;28(10):1521–9.

164. Alison Rodger, The Partner Study Group. HIV transmission risk through condomless sex if the HIV positive partner is on suppressive ART: PARTNER study. Conference on retroviruses and opportunistic infections, Boston, 2014;

165. García-Lerma JG, Otten RA, Qari SH, Jackson E, Cong M-E, Masciotra S, et al. Prevention of rectal SHIV transmission in macaques by daily or intermittent prophylaxis with emtricitabine and tenofovir. *PLoS Med.* 2008;5(2):e28.

166. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, et al. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science.* 2010; 329(5996):1168–74.

167. Abdool Karim SS, Kashuba AD, Werner L, Karim QA. Drug concentrations after topical and oral antiretroviral pre-exposure prophylaxis: implications for HIV prevention in women. *Lancet.* 2011; 378(9787):279–81.

168. Patterson KB, Prince HA, Kraft E, Jenkins AJ, Shaheen NJ, Rooney JF, et al. Penetration of Tenofovir and Emtricitabine in Mucosal Tissues: Implications for Prevention of HIV-1 Transmission. *Sci Transl Med.* 2011 Dec 7;3(112):112re4–112re4.

169. Sheth AN, Rolle CP, Gandhi M. HIV pre-exposure prophylaxis for women. *J Virus Erad.* 2016;2(3):149.

170. Zirafi O, Kim K-A, Roan NR, Kluge SF, Müller JA, Jiang S, et al. HIV enhancing

activity of semen impairs the antiviral efficacy of microbicides. *Sci Transl Med.* 2014;6(262):262ra157.

171. Mujugira A, Celum C, Coombs RW, Campbell JD, Ndase P, Ronald A, et al. HIV Transmission Risk Persists During the First 6 Months of Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016;72(5):579–84.

172. Jared Baeten, Renee Heffron, Lara Kidoguchi, Nelly Mugo, Elly Katabira, Elizabeth Bukusi, et al. Near Elimination of HIV Transmission in a Demonstration Project of PrEP and ART. *Conf Retroviruses Opportunistic Infect 2015 Seattle.*

173. Pozzetto B, Delézay O, Brunon-Gagneux A, Hamzeh-Cognasse H, Lucht F, Bourlet T. Current and future microbicide approaches aimed at preventing HIV infection in women. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(2):167–83.

174. Schneider K, Gray RT, Wilson DP. A cost-effectiveness analysis of HIV preexposure prophylaxis for men who have sex with men in Australia. *Clin Infect Dis* 2014;58(7):1027–34.

175. Mugwanya KK, Wyatt C, Celum C, Donnell D, Mugo NR, Tappero J, et al. Changes in glomerular kidney function among HIV-1-uninfected men and women receiving emtricitabine-tenofovir disoproxil fumarate preexposure prophylaxis: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med.* 2015;175(2):246–54.

176. Lehman DA, Baeten JM, McCoy CO, Weis JF, Peterson D, Mbari G, et al. Risk of drug resistance among persons acquiring HIV within a randomized clinical trial of single- or dual-agent preexposure prophylaxis. *J Infect Dis.* 2015;211(8):1211–8.

177. King HL, Keller SB, Giancola MA, Rodriguez DA, Chau JJ, Young JA, et al. Pre-exposure prophylaxis accessibility research and evaluation (PrEPARE Study). *AIDS Behav.* 2014;18(9):1722–5.

178. Whaley KJ, Mayer KH. Strategies for preventing mucosal cell-associated HIV transmission. *J Infect Dis.* 2014;210 Suppl 3:S674–80.

179. Grant RM, Lama JR, Anderson PL, McMahan V, Liu AY, Vargas L, et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med.* 2010;363(27):2587–99.
180. Van Damme L, Corneli A, Ahmed K, Agot K, Lombaard J, Kapiga S, et al. Preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med.* 2012;367(5):411–22.
181. Baeten JM, Donnell D, Mugo NR, Ndase P, Thomas KK, Campbell JD, et al. Single-agent tenofovir versus combination emtricitabine plus tenofovir for pre-exposure prophylaxis for HIV-1 acquisition: an update of data from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(11):1055–64.
182. Marrazzo JM, Ramjee G, Richardson BA, Gomez K, Mgodhi N, Nair G, et al. Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women. *N Engl J Med.* 2015;372(6):509–18.
183. McCormack S, Dunn DT, Desai M, Dolling DI, Gafos M, Gilson R, et al. Pre-exposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet.* 2016;387(10013):53-60.
184. Molina J-M, Capitant C, Spire B, Pialoux G, Cotte L, Charreau I, et al. On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2015;373(23):2237–46.
185. Baeten JM, Palanee-Phillips T, Brown ER, Schwartz K, Soto-Torres LE, Govender V, et al. Use of a Vaginal Ring Containing Dapivirine for HIV-1 Prevention in Women. *N Engl J Med.* 2016; publié en Ligne
186. Hocqueloux L, Prazuck T, Avettand-Fenoel V, Lafeuillade A, Cardon B, Viard J-P, et al. Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 2010;24(10):1598–

601.

187. Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 2013;9(3):e1003211.

188. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet.* 1996;348(9038):1347–51.

189. Shen R, Smith PD. Mucosal Correlates of Protection in HIV-1-Exposed Sero-negative Persons. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(2):219–27.

190. Simek MD, Rida W, Priddy FH, Pung P, Carrow E, Laufer DS, 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.* 2009; 83(14):7337–48.

191. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2209–20.

192. Montefiori DC, Karnasuta C, Huang Y, Ahmed H, Gilbert P, de Souza MS, et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis.* 2012;206(3):431–41.

193. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med.* 2012;366(14):1275–86.

194. Poropatich K, Sullivan DJ. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 2):247–68.

195. Blankson JN. Effector mechanisms in HIV-1 infected Elite Controllers: Highly Active Immune Responses? *Antiviral Res.* 2010 Jan;85(1):295.
196. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:875821.
197. Morris GC, Wiggins RC, Woodhall SC, Bland JM, Taylor CR, Jespers V, et al. MABGEL 1: first phase 1 trial of the anti-HIV-1 monoclonal antibodies 2F5, 4E10 and 2G12 as a vaginal microbicide. *PloS One.* 2014;9(12):e116153.
198. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, et al. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med.* 2000;6(2):207–10.
199. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud J-L, Biedma ME, Holl V, Van Ham G, et al. Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques. *Mucosal Immunol.* 2014;7(1):46–56.
200. Gardner MR, Kattenhorn LM, Kondur HR, von Schaeuwen M, Dorfman T, Chiang JJ, et al. AAV-expressed eCD4-Ig provides durable protection from multiple SHIV challenges. *Nature.* 2015;519(7541):87–91.
201. Byrareddy SN, Kallam B, Arthos J, Cicala C, Nawaz F, Hiatt J, et al. Targeting  $\alpha 4\beta 7$  integrin reduces mucosal transmission of simian immunodeficiency virus and protects gut-associated lymphoid tissue from infection. *Nat Med.* 2014;20(12):1397–400.
202. Hefferon KL. Broadly neutralizing antibodies and the promise of universal vaccines: where are we now? *Immunotherapy.* 2014;6(1):51–7.
203. Zhang J, Crumpacker CS. Human immunodeficiency virus type 1 RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients receiving prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2001;184(10):1341–4.
204. Viard J-P, Burgard M, Hubert J-B, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, et al. Impact of 5

years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *AIDS* 2004;18(1):45–9.

205. Brussel A, Sonigo P. Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol.* 2004;78(20):11263–71.

206. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinghuys P, Brown GD, et al. Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol.* 2013 ;11(9):e1001658.

207. Greener BN, Patterson KB, Prince HMA, Sykes CS, Adams JL, Dumond JB, et al. Dolutegravir pharmacokinetics in the genital tract and colorectum of HIV-negative men after single and multiple dosing. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2013;64(1):39–44.

208. Imaz A, Niubó J, Kashuba AD, Ferrer E, Sykes C, Rozas N, et al. Elvitegravir concentrations in seminal plasma in HIV-1-infected men. *HIV Med.* 2016; publié en ligne

209. Mora-Peris B, Watson V, Vera JH, Weston R, Waldman AD, Kaye S, et al. Rilpivirine exposure in plasma and sanctuary site compartments after switching from nevirapine-containing combined antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2014; ;69(6):1642-7

## Résumé

HIV est principalement transmis par voie sexuelle. Bien que les stratégies de prévention basées sur les antirétroviraux (TasP et PrEP) soient efficaces, d'autres approches complémentaires, en particulier vaccinales restent d'actualité.

Dans la première partie de ce travail, nous avons cherché à mieux caractériser le réservoir séminal de HIV chez des patients chroniquement infectés et sous trithérapie antirétrovirale (TARV). Dans le sperme, HIV est présent sous forme libre et/ou associée aux NSMC. Ces deux formes peuvent être transmises. Le TARV réduit le risque d'avoir une charge virale détectable dans le sperme, mais ne semble pas influencer la quantité d'ADN HIV total présent au niveau cellulaire. A l'heure du TasP, comme meilleur outil de prévention de la transmission sexuelle, mieux caractériser l'état de ce virus résiduel (latent, répliatif, défectif ?) semble nécessaire. Dans notre travail, le virus associé aux NSMC n'a pas été réactivé, laissant supposer que le virus résiduel dans les NSMC de patients sous TARV au long cours, est peut-être défectif. Ces données restent à confirmer dans de plus grandes cohortes.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons caractérisé sur le plan isotypique et fonctionnel, les anticorps dirigés contre HIV et présents dans le sperme. L'objectif est de mettre en évidence des anticorps « large spectre » neutralisant HIV, et/ou inhibant la transcytose, et/ou capables d'ADCC et ciblant les souches virales potentiellement transmissibles par voie sexuelle. Nous avons identifié dans des pools de plasmas séminaux des anticorps neutralisant, mais aucun pool n'a neutralisé les souches à tropisme R5, majoritairement transmises par voie sexuelle. Nous avons mis en évidence la capacité d'anticorps dirigés contre HIV du plasma séminal à traverser un épithélium monocouche. Le rôle exact de ces anticorps dans la transmission (protecteur ou facilitateur) reste à préciser. Ces anticorps, s'ils s'avéraient protecteurs pourraient être utilisés dans des formulations de type microbicides ou en immunothérapie et contribuer également à un développement de vaccin après identification des épitopes cibles.

Mots clés : HIV, réservoir génital, anticorps, neutralisation, transcytose