

Université de Montréal

**L'immunité naturelle contre le VIH-1 est associée à un profil tolérogénique dans la muqueuse génitale des travailleuses du sexe béninoises hautement exposées et séronégatives (HESN)**

par

Lyvia Fourcade

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en Virologie et Immunologie

Janvier 2020

© Lyvia Fourcade, 2020

Université de Montréal  
Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

*Cette thèse intitulée :*

**L'immunité naturelle contre le VIH-1 est associée à un profil tolérogénique dans la muqueuse génitale des travailleuses du sexe béninoises hautement exposées et séronégatives (HESN)**

*Présentée par*

**Lyvia Fourcade**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :*

**Dr. Nicolas Chomont**  
Président - rapporteur

**Dr. Michel Roger**  
Directeur de recherche

**Dre. Johanne Poudrier**  
Co-directrice de recherche

**Dr. Hugo Soudeyns**  
Membre du jury

**Dre. Nicole Bernard**  
Examineur externe

**Dr. Jacques Thibodeau**  
Représentant de la doyenne

## RÉSUMÉ

La plupart des infections par le VIH-1 sont acquises lors de rapports hétérosexuels. En Afrique subsaharienne on observe 71 % des infections mondiales et 60 % des nouvelles infections par le VIH-1 touchent les femmes. Le tractus génital féminin (TGF) constitue la principale porte d'entrée pour le VIH-1 et joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les microorganismes pathogènes tout en maintenant une tolérance de la flore commensale. On y trouve les cellules épithéliales qui participent à l'élaboration des réponses immunes en collaboration avec les cellules dendritiques (DCs), mais également d'autres types de cellules immunitaires qui confèrent une protection à la muqueuse vaginale, notamment à travers la production de cytokines et de chimiokines. Nous avons établi une cohorte de travailleuses du sexe (CSWs) au Bénin et nous avons identifié des femmes hautement exposées et séronégatives au VIH-1 (HESN), qui demeurent séronégatives après plus de sept années actives dans le travail du sexe. Les personnes HESN étant un excellent modèle d'immunité naturelle contre le VIH-1, le but de notre projet consiste donc à étudier les cellules immunitaires impliquées dans la protection de l'hôte face au VIH-1, au niveau du tractus génital féminin. Nous émettons l'hypothèse que le maintien de faibles conditions inflammatoires dans le TGF des femmes HESN préviendrait une activation immunitaire excessive en préservant l'intégrité de la barrière de la muqueuse vaginale et contribuerait ainsi à maintenir une protection contre l'infection par le VIH-1.

Des études antérieures sur les HESN béninoises et kenyanes ont démontré que ces femmes présentent de faibles niveaux d'inflammation dans leur TGF inférieur. En accord avec cela, nous avons observé de faibles niveaux de B<sub>LyS</sub>/BAFF dans la muqueuse vaginale des HESN comparativement aux travailleuses du sexe séropositives (CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>). B<sub>LyS</sub>/BAFF est une molécule importante pour la différenciation des cellules B et pour la sélection de cellules B de première ligne de la zone marginale (MZ). De ce fait, nous rapportons pour la première fois la présence de cellules B CD1c<sup>+</sup> de type MZ qui sont capables de se lier naturellement à la gp120 glycosylée, au niveau de la muqueuse vaginale. Or, des cellules B CD1c<sup>+</sup> exprimant IgG sont augmentées chez les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> comparativement aux HESN, ce qui pourrait contribuer à l'hyperglobulinémie observée

dans le TGF inférieur des CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Les faibles niveaux de BLyS/BAFF retrouvés dans la muqueuse vaginale des HESN semblent donc préserver une homéostasie au sein du compartiment B et des cellules B CD1c<sup>+</sup> du TGF. De plus, nous y détectons une réactivité des IgG<sub>1</sub> avec la gp-41 de l'enveloppe virale, qui pourrait contribuer à leur immunité naturelle.

Avec les cellules épithéliales, les DCs sont l'une des premières à être en contact avec le virus dans le TGF. Elles jouent un rôle essentiel dans l'orchestration des réponses immunitaires. Nous pensons que les DCs contribuent au maintien de faibles conditions inflammatoires dans le TGF des HESN, prévenant ainsi l'activation immunitaire excessive et préservant l'intégrité de la barrière muqueuse de façon à maintenir une protection/contrôle contre le virus. Nous avons caractérisé une population myéloïde endocervicale « tolérogénique » HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> exprimant HLA-G, ILT4, CD103 et de forts taux d'IFN- $\alpha$  et d'IL-10 dont la fréquence relative était augmentée au niveau du col de l'utérus des HESN comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. De plus, des populations T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub> étaient aussi augmentées chez les HESN. Ces données reflètent à la fois une réponse antivirale et une contribution au contrôle des conditions inflammatoires dans le TGF des HESN. Afin de mieux comprendre la nature des cellules myéloïdes tolérogéniques, nous avons voulu dériver des monocytes en cellules dendritiques (MoDCs). Toutefois, nous avons remarqué que la différenciation des MoDCs des HESN était altérée. Suite à cela, nous avons caractérisé le profil transcriptomique des monocytes. Les résultats préliminaires mettent en lumière l'éventuel rôle des récepteurs nucléaires NR4A dans la modulation des MoDCs et, possiblement, sur le plan des cellules myéloïdes tolérogéniques chez les HESN.

Dans l'ensemble, ces résultats nous ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes mis en place chez les HESN dans l'immunité naturelle contre le VIH-1.

**Mots-clés :** VIH-1, HESN, tractus génital féminin, immunité naturelle, BLyS/BAFF, cellules B innées de la zone marginale CD1c<sup>+</sup>, isotype, DCs tolérogéniques, T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub>, IFN- $\alpha$ , MoDCs.

## ABSTRACT

Most HIV-1 infections are acquired through heterosexual intercourse. In sub-Saharan Africa, 71% of global infections are observed and 60% of new HIV-1 infections affect women. The female genital tract (FGT) constitutes a main portal of entry for HIV-1 and plays an important role in protecting the host against pathogens while maintaining a tolerance to a commensal flora. FGT immunity involves genital epithelial cells as well as dendritic cells (DCs) and many other types of immune cells which confer protection, through the production of chemokines and cytokines. We established a cohort of commercial sex workers (CSWs) in Benin and identified HIV-1 highly exposed seronegative (HESN) individuals, who remain uninfected after more than seven years of active prostitution. These HESN individuals being an exceptional model of natural immunity against HIV-1, the aim of our project is to characterize immune cells involved in protection from HIV-1 infection, in the female genital tract. We hypothesize that maintenance of low inflammatory conditions in the FGT of HESN women helps to prevent excessive immune activation likely preserving the mucosal barrier integrity and would help to maintain a protection against HIV infection.

Previous studies of Beninese and Kenyan HESN have shown that these women have a low inflammatory profile in their lower FGT. Accordingly, we found that vaginal mucosa of HESN had lower soluble BLYS/BAFF levels when compared to HIV-infected CSWs (CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>). BLYS/BAFF is highly recognized for its role in B-cell ontogenesis, as well as cell fate decision towards the innate marginal zone (MZ) B-cell pool. For the first time, we report the presence of genital MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells that naturally bind to fully glycosylated gp120 in the vaginal mucosa. However, CD1c<sup>+</sup> B-cells expressing IgG are increased in the lower FGT of CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> when compared to HESN, suggesting that these cells could contribute to the hyperglobulinemia observed in the lower FGT of CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. The low levels of BLYS/BAFF found in the vaginal mucosa of HESN thus appear to preserve homeostasis of the FGT B cell compartment and CD1c<sup>+</sup> B-cells. In addition, we detect a reactivity of IgG1 to HIV-gp41 in cervico-vaginal lavages (CVL) supernatants of HESN, which could contribute to their natural immunity.

Epithelial cells and DCs are one of the earliest cell types to sense the virus in the FGT. They play a key role in the orchestration of immune responses. We characterized a "tolerogenic" endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> population expressing HLA-G, ILT4, CD103 and high levels of IFN- $\alpha$  and IL-10, that was increased in the cervix of HESN when compared to CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. In addition, frequencies of T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub> cells were also increased in HESN. We believe that DCs contribute to maintaining low inflammatory conditions in the FGT of HESN, preventing excessive immune activation and preserving the integrity of the mucosal barrier to maintain a protection/control against the virus. These data reflect both an antiviral response and a contribution to the control of inflammatory conditions in the FGT of HESN. To better understand the nature of tolerogenic myeloid cells, we wanted to derive monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). However, derivation of blood MoDCs was impaired in HESN. As a result, we decided to characterize the transcriptomic profile of total blood monocytes. Preliminary results appear to demonstrate the possible role of NR4A nuclear receptors in MoDCs modulation, and possibly in tolerogenic myeloid cells in HESN.

Overall, our results contribute to a better understanding of the mechanisms established by HESN in natural immunity to HIV-1.

**Keywords:** HIV-1, HESN, female genital tract, natural immunity, BLyS/BAFF, CD1c<sup>+</sup> B-cells MZ, isotype, "tolerogenic" DCs, T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub>, IFN- $\alpha$ , MoDCs.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XVI</b>

### CHAPITRE I

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE TYPE 1 .....	3
1.1.1 La structure morphologique.....	4
1.1.2 La structure génomique .....	5
1.1.3 Le cycle de la réplication virale.....	7
1.1.3.1 Les étapes précoces du cycle.....	7
1.1.3.2 Les étapes tardives du cycle .....	9
1.1.4 L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1.....	11
1.2 LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ .....	13
1.2.1 La structure et l'anatomie du TGF .....	14
1.2.2 Le cycle menstruel et hormonal.....	16
1.2.3 La flore commensale .....	18
1.2.4 Le mucus cervico-vaginal.....	19
1.3 L'IMMUNOLOGIE DE L'HÔTE ET DES MUQUEUSES .....	20
1.3.1 Les cytokines et chimiokines.....	20
1.3.2 Les cellules épithéliales du TGF .....	21
1.3.3 Les récepteurs de patrons moléculaires dans le TGF .....	22
1.3.4 Les cellules dendritiques .....	23
1.3.4.1 Les cellules dendritiques des muqueuses .....	23
1.3.4.2 Les cellules dendritiques tolérogéniques.....	26
1.3.5 Les monocytes .....	27
1.3.6 Les lymphocytes T.....	28
1.3.6.1 Les cellules T des muqueuses.....	29
1.3.6.2 Les cellules T régulatrices.....	30
1.3.7 Les lymphocytes B .....	32
1.3.7.1 Le stimulateur des Lymphocytes B.....	32
1.3.7.2 Les lymphocytes B de la zone marginale.....	34
1.3.7.3 Les fonctions des immunoglobulines .....	36
1.3.7.4 Les cellules B des muqueuses .....	38
1.3.7.5 Les cellules B régulatrices.....	38

1.4	LES MOLÉCULES D'INTÉRÊTS POUR CETTE ÉTUDE.....	40
1.4.1	La cytokine IL-10 .....	40
1.4.2	HLA-G et ses récepteurs.....	41
1.4.3	Les interférons .....	42
1.4.4	Les molécules « <i>check point</i> » d'intérêt pour cette étude.....	43
1.5	LES MODÈLES DE TRANSMISSION ET D'INFECTION DU VIH-1 DANS LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ .....	44
1.6	LES TRAITEMENTS ET LES PRÉVENTIONS MIS EN PLACE POUR LUTTER CONTRE L'INFECTION .....	47
1.7	LES STRATÉGIES VACCINALES CONTRE LE VIH-1 .....	48
1.8	LES DIFFÉRENTS TYPES DE PATIENTS .....	49
1.9	LES CAS CLINIQUES DE GUÉRISON.....	50
1.10	LES INDIVIDUS SÉRONÉGATIFS EXPOSÉS AU VIH-1 .....	51
1.11	LES HYPOTHÈSES ET LES OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	53
1.12	DESCRIPTION DE NOTRE COHORTE : LES TRAVAILLEUSES DU SEXE BÉNINOISES.....	54

## CHAPITRE II

	<b>LES NIVEAUX FAIBLES DE BLYS/BAFF ET DES FRÉQUENCES DES CELLULES B INNÉES DE TYPES CD1c<sup>+</sup> DE LA ZONE MARGINALE DU TRACTUS GÉNITAL SONT ASSOCIÉS À L'IMMUNITÉ NATURELLE AU VIH-1 CHEZ LES FEMMES HESN .....</b>	<b>56</b>
2.1	MISE EN CONTEXTE .....	56
2.2	CONTRIBUTION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE 1 .....	57
2.3	RÉSUMÉ.....	58
2.4	ARTICLE 1 : NATURAL IMMUNITY TO HIV IS ASSOCIATED WITH LOW BLYS/BAFF LEVELS AND LOW FREQUENCIES OF INNATE MARGINAL ZONE LIKE CD1c <sup>+</sup> B-CELLS IN THE GENITAL TRACT.....	59
2.4.1	Abstract.....	60
2.4.2	Author Summary .....	61
2.4.3	Introduction .....	61
2.4.4	Materials and Methods .....	63
2.4.5	Results .....	66
2.4.6	Discussion.....	70
2.4.7	Conclusion.....	74
2.4.8	Acknowledgements .....	74
2.4.9	References .....	75
2.4.10	Figure Legends .....	78
2.4.11	Supplementary Figures.....	89



### **CHAPITRE III**

<b>AUGMENTATION DE LA FRÉQUENCE DES CELLULES T RÉGULATRICES ET DES CELLULES MYÉLOÏDES TOLÉROGÉNIQUES DANS LA MUQUEUSE GÉNITALE DES HESN .....</b>	<b>94</b>
3.1 MISE EN CONTEXTE .....	94
3.2 CONTRIBUTION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE 2 .....	95
3.3 RÉSUMÉ.....	96
3.4 ARTICLE 2 : HIGHLY-EXPOSED HIV-1 SERONEGATIVE FEMALE COMMERCIAL SEX WORKERS SUSTAIN IN THEIR GENITAL MUCOSA INCREASED FREQUENCIES OF TOLEROGENIC MYELOID AND REGULATORY T-CELLS .....	97
3.1.1 Abstract.....	98
3.1.2 Introduction .....	99
3.1.3 Methods .....	100
3.1.4 Results .....	104
3.1.5 Discussion.....	107
3.1.6 Acknowledgments .....	111
3.1.7 References .....	112
3.1.8 Figures legends .....	115
3.1.9 Supplementary Figures .....	126

### **CHAPITRE IV**

<b>RÔLE DES MONOCYTES DANS LA FORMATION DU PROFIL TOLÉROGÉNIQUE DES CELLULES DENDRITIQUES CHEZ LES HESN... 128</b>	<b>128</b>
4.1 MISE EN CONTEXTE .....	128
4.2 CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	129
4.3 INTRODUCTION.....	130
4.4 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	131
4.4.1 Le groupe d'étude.....	131
4.4.2 Prélèvement et préparation des échantillons .....	132
4.4.3 Évaluation préliminaire des populations de monocytes par cytométrie en flux .....	132
4.4.4 Culture et stimulation des MoDCs .....	133
4.4.5 Tri cellulaire des monocytes, extraction d'ARN et séquençage.....	133
4.5 RÉSULTATS.....	134
4.5.1 Analyses transcriptomiques des monocytes sanguins totaux .....	134
4.5.2 Différenciation des monocytes en DCs (MoDCs).....	139
4.6 DISCUSSION.....	141
4.7 RÉFÉRENCES.....	144

## **CHAPITRE V**

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>146</b>
5.1 LES CELLULES B INNÉES DANS L'IMMUNITÉ NATURELLE DES HESN.....	146
5.1.1 Les niveaux d'expression de BLyS/BAFF soluble et membranaire.....	147
5.1.2 Les cellules B de la zone marginale du TGF des femmes béninoises.....	149
5.1.3 Les immunoglobulines et isotypes dans le CVL des femmes béninoises .....	151
5.2 LES POPULATIONS ENDOCERVICALES IMMUNORÉGULATRICES DANS L'IMMUNITÉ NATURELLE DES HESN .....	153
5.2.1 Les molécules solubles dans le CVL des femmes béninoises.....	153
5.2.2 Les populations endocervicales tolérogéniques/régulatrices chez les HESN.....	155
5.3 LES DCs TOLÉROGÉNIQUES DES HESN SONT-ELLES INDUITES À LA SUITE D'UN PHÉNOTYPE DIFFÉRENTIEL DE MONOCYTES ?.....	157
5.4 IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES .....	162
5.4.1 Ciblage de BLyS/BAFF soluble.....	162
5.4.2 Les immunoglobulines réactives à l'enveloppe virale .....	163
5.4.3 Cellules myéloïdes tolérogéniques .....	164
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>165</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>166</b>
<b>LIMITES DE L'ÉTUDE .....</b>	<b>168</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>169</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>209</b>
ANNEXE 1 : ARTICLE BLOOD B LYMPHOCYTE STIMULATOR (BLyS/BAFF) LEVELS MAY REFLECT NATURAL IMMUNITY TO HIV IN HIGHLY EXPOSED UNINFECTED BENINESE COMMERCIAL SEX WORKERS.....	209
ANNEXE 2 : REVUE NATURAL IMMUNITY TO HIV: A TEMPLATE FOR VACCINE STRATEGIES .....	243

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1.</b> Récapitulatif des différentes sous-populations de DCs humaines présentes au niveau du col de l'utérus.....	25
--	----

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Organisation morphologique du VIH-1.....	5
<b>Figure 1.2.</b> Organisation du génome du VIH-1. ....	6
<b>Figure 1.3.</b> Cycle de réplication virale du VIH-1. ....	8
<b>Figure 1.4.</b> Phases cliniques de l'infection au VIH-1. ....	12
<b>Figure 1. 5.</b> Anatomie et histologie de la muqueuse génitale féminine. ....	15
<b>Figure 1.6.</b> Régulation du cycle menstruel par les hormones sexuelles. ....	17
<b>Figure 1.7.</b> Mécanismes d'action des DCs tolérogéniques. ....	27
<b>Figure 1.8.</b> Induction des cellules T régulatrices par les DCs tolérogéniques. ....	31
<b>Figure 1.9.</b> BLyS et ses récepteurs.....	33
<b>Figure 1.10</b> Réponses indépendantes des LT par les cellules B humaines MZ. ....	35
<b>Figure 1.11.</b> Rôles des cellules B régulatrices dans la réponse immunitaire. ....	39
<b>Figure 1.12.</b> Transmission du SIV dans le modèle animal macaque rhésus. ....	46
<b>Figure 4.1.</b> Modulation des gènes exprimés dans les monocytes sanguins chez les CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>+</sup> et les HESN.....	135
<b>Figure 4.2.</b> Représentation graphique (PCA) montrant la variabilité 2D des gènes exprimés dans les monocytes sanguins totaux à J0 entre les Non-CSWs HIV <sup>-</sup> , les CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>-</sup> , les HESN et les CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>+</sup> . ....	137
<b>Figure 4.3.</b> Analyses RNA-Seq de l'expression de CCL3, CCL4, CCL5, NR4A1, CX3CR1 et CCR2 sur les monocytes circulant des Non-CSWs HIV <sup>-</sup> , CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>-</sup> , HESN et CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>+</sup> . ....	138
<b>Figure 4.4.</b> Différenciation des MoDCs chez les Non-CSWs HIV <sup>-</sup> , les CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>-</sup> , les HESN et les CSWs <sup>+</sup> HIV <sup>+</sup> . ....	140
<b>Figure 5.1.</b> Microenvironnement tolérogénique retrouvé dans la muqueuse génitale des HESN.....	161

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Ad5</b>	Vecteurs recombinants à adénovirus
<b>ADCC</b>	Réponse cytotoxique dépendante des anticorps ( <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> )
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>APC</b>	Cellules présentatrices d'antigènes
<b>APOBEC3G</b>	Polypeptide 3G d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm ( <i>Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i> )
<b>APRIL</b>	Ligand induisant la prolifération ( <i>a proliferation-inducing ligand</i> )
<b>AR</b>	Acide rétinoïque
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ARNt-Lys</b>	ARN de transfert lysine
<b>ART</b>	Traitements antirétroviraux
<b>cART</b>	Thérapie antirétrovirale combinée
<b>ASC</b>	Cellules sécrétrices d'anticorps
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BAFF</b>	Facteur d'activation des cellules B ( <i>B-cell activating factor</i> )
<b>BCMA</b>	Antigène de maturation des cellules B ( <i>B-cell maturation antigen</i> )
<b>BCR</b>	Récepteur des cellules B ( <i>B-cell receptor</i> )
<b>BLyS</b>	Stimulateur des lymphocytes B ( <i>B Lymphocyte Stimulator</i> )
<b>bNAbs</b>	Anticorps neutralisants à large spectre ( <i>Broadly Neutralizing Antibodies</i> )
<b>BR3</b>	Récepteur de BLyS/BAFF 3
<b>Bregs</b>	Cellules B régulatrices
<b>CA</b>	Capside interne
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CG</b>	Centre germinatif
<b>CLEC9A</b>	Lectine de type C contenant un domaine 9A
<b>CCL</b>	Ligand (motif CC) GEC de chimiokine
<b>CCR</b>	Récepteur (motif CC) de chimiokine
<b>CMH-I</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
<b>CMH-II</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
<b>CRF</b>	<i>Circulating recombinant forms</i>
<b>CRM1</b>	<i>Chromosome maintenance gene 1</i>
<b>CSF</b>	Facteurs stimulateurs de colonies
<b>CSWs</b>	Travailleuses du sexe ( <i>Commercial sex workers</i> )
<b>CTLA-4</b>	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>

<b>CXCL</b>	Ligand (motif CXC) de chimiokine
<b>CXCR</b>	Récepteur (motif CXC) de chimiokine
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>dNTPs</b>	Désoxynucléotides
<b>EC</b>	<i>Elite controllers</i>
<b>Env</b>	Enveloppe virale
<b>ESCRT</b>	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
<b>FcR</b>	Récepteur Fc
<b>FcRn</b>	Récepteur Fc néonatal
<b>FcγRIII</b>	Récepteur gamma de type III
<b>TGF</b>	<i>Feminin genital tract</i>
<b>FSH</b>	Hormone folliculo-stimulante
<b>GalCer</b>	Galactosylcéramide
<b>GALT</b>	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
<b>G-CSF</b>	Facteur de stimulation des granulocytes
<b>GEC</b>	<i>Genital epithelial cells</i>
<b>gp120, gp41</b>	Glycoprotéine 120, glycoprotéine 41
<b>GM-CSF</b>	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages
<b>GM-CSFR</b>	Récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages
<b>HARSAH</b>	Hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes
<b>HESN</b>	Hautement exposés et séronégatifs
<b>HSV</b>	Virus de l'herpès simplex ( <i>virus simplex herpes</i> )
<b>ICAM</b>	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
<b>ICOS</b>	<i>Inducible T-cell costimulator</i>
<b>IDO</b>	2,3-dioxygénase d'indoleamine
<b>IFNs</b>	Interférons
<b>Igs</b>	Immunoglobulines
<b>IL</b>	Interleukines
<b>IRF7</b>	<i>Interferons regulatory factor 7</i>
<b>IN</b>	Intégrase
<b>ISG</b>	Gènes stimulés par l'interféron
<b>IST</b>	Infections sexuellement transmissibles
<b>ITGAE</b>	Intégrine alpha de type E
<b>KIR</b>	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
<b>LAG-3</b>	Gène 3 d'activation des lymphocytes
<b>LB</b>	Lymphocytes B
<b>LEDGF</b>	<i>Lens epithelium-derived growth factor</i>
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante

<b>LT</b>	Lymphocytes T
<b>LTc</b>	Lymphocytes T cytotoxiques
<b>LTR</b>	<i>Long terminal repeat sequence</i>
<b>LTNP</b>	<i>Long term progressors</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LyC6</b>	Antigène lymphocytaire 6 C
<b>MA</b>	Matrice virale
<b>MALT</b>	Tissu lymphoïde associés aux muqueuses
<b>M-CSF</b>	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
<b>MIF</b>	Migration des macrophages
<b>MIP</b>	<i>Macrophage inflammatory proteins</i>
<b>MZ</b>	Zone marginale
<b>NC</b>	Nucléocapside
<b>Nef</b>	<i>Negative factor</i>
<b>NF-κB</b>	Facteur nucléaire-kappa B
<b>NK</b>	Cellules tueuses naturelles ( <i>Natural killer</i> )
<b>iNKT</b>	Cellules T tueuses naturelles invariante
<b>NR4A</b>	Récepteurs nucléaires orphelins
<b>NLRs</b>	Récepteurs de type NOD
<b>nT<sub>regs</sub></b>	Cellules T régulatrices naturelles
<b>OE<sub>2</sub></b>	Œstrogène
<b>PAMPs</b>	Patrons moléculaires associés aux pathogènes
<b>PBMCs</b>	Cellules mononuclées périphériques sanguines ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>PD-1</b>	<i>Programmed cell death-1</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<b>PIC</b>	<i>Pre-integration complex</i>
<b>poly (I: C)</b>	Acide polyinosinique-polycytidylique
<b>PPE</b>	Prophylaxies post-exposition
<b>PPT</b>	<i>Polypurine tracts</i>
<b>PR</b>	Protéase virale
<b>PrEP</b>	Prophylaxies préexposition
<b>PRRs</b>	Récepteurs de reconnaissance de patrons moléculaires
<b>pTEFb</b>	<i>Positive transcription elongation factor</i>
<b>Ran-GTP</b>	<i>RAs related nuclear protein – guanosine triphosphate</i>
<b>Rev</b>	<i>Regulator of expression of virion proteins</i>
<b>RLRs</b>	Récepteurs de type RIG-I
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>RRE</b>	Élément de réponse à rev ( <i>Rev-responsive element</i> )

<b>RT</b>	<i>Reverse transcriptase</i>
<b>SAMHD1</b>	<i>Sterile alpha motif domain and HD domain-containing protein 1</i>
<b>SERINC3</b>	<i>Serine incorporator 3</i>
<b>SERINC5</b>	<i>Serine incorporator 5</i>
<b>SIDA</b>	Syndrome de l'immunodéficience acquise
<b>SHIV</b>	Virus de l'immunodéficience simienne humaine
<b>SIV</b>	Virus de l'immunodéficience simienne
<b>SLP</b>	Inhibiteurs de protéases sécrétés par les leucocytes
<b>SU</b>	<i>Surface envelope glycoprotein</i>
<b>TAC1</b>	Activateur transmembranaire-1 et modulateur du calcium et ligand de la cyclophiline
<b>TAR</b>	<i>Trans-activating response element</i>
<b>Tat</b>	Protéine transactivatrice
<b>TCR</b>	Récepteurs des cellules T ( <i>T cell receptor</i> )
<b>TGF</b>	Tractus génital féminin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance de transformation de type bêta
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>TM</b>	<i>Transmembrane envelope protein</i>
<b>T<sub>regs</sub></b>	Cellules T régulatrices
<b>iT<sub>regs</sub></b>	Cellules T régulatrices induites
<b>T<sub>RM</sub></b>	Cellules T mémoires résidentes
<b>TLRs</b>	Récepteurs de types Toll
<b>TS</b>	Travailleuses du sexe
<b>TSLP</b>	Lymphopoïétine stromale thymique pro-inflammatoire
<b>URF</b>	<i>Unique recombinant forms</i>
<b>Vif</b>	<i>Viral infectivity factor</i>
<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
<b>VSP4</b>	<i>Vacuolar protein sorting associated protein 4</i>
<b>Vpr</b>	<i>Viral protein R</i>
<b>Vpu</b>	<i>Viral protein U</i>



*L'excellence ne consiste pas à être meilleure que  
quelqu'un d'autre...*

*L'excellence signifie fonctionner avec la plus grande  
aisance et au meilleur de ses capacités.*

**J. V.**

## REMERCIEMENTS

L'accomplissement de mon parcours jusqu'à la réalisation de ma thèse a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Michel Roger, de m'avoir fait confiance et conseillée tout au long de mon cursus. Son soutien, sa diplomatie et sa marque de confiance envers moi, en m'ayant autorisé à prendre de nombreuses responsabilités, ont davantage développé mon implication ainsi que mes capacités de gestion et d'organisation au sein d'une équipe de recherche.

Merci également à ma codirectrice, Dre Johanne Poudrier, pour sa patience, son écoute et sa très grande disponibilité. Elle a cru en moi, elle a cru en mes capacités et m'a toujours encouragée, et ce, en toute circonstance. Sa passion et sa détermination pour la recherche m'ont aidée à surmonter mes débuts, qui ont été quelque peu difficiles. Ses judicieux conseils ont contribué à alimenter ma réflexion durant toutes ces années.

À leurs exemples, j'ai développé plus de dextérité, plus de finesse et un plus grand leadership relationnel.

Je remercie aussi la Dre Nathalie Grandvaux pour la mise au point de certaines techniques de laboratoire et ses conseils d'orientation. Merci également aux Drs Andrès Finzi et Nicolas Chomont et leur équipe, pour les différents tests effectués sur nos échantillons. Merci à la Dre Dominique Gauchat pour ses judicieux conseils en cytométrie en flux, tant sur le plan technique que théorique; merci à la Dre Olfa Debbèche pour ses conseils d'orientation, ainsi que la formation NC3, et au Dre Aurélie Cleret-Buhot pour son aide précieuse en microscopie. Merci à la plateforme de génomique et de bio-informatique de l'IRIC pour l'analyse rapide des échantillons.

Merci à toutes les participantes de l'étude et les personnes associées de près ou de loin à ce projet, qui ont permis la réalisation de cette étude.

Je voudrais également remercier le laboratoire du Dr Coutlée et son équipe, notamment Émilie Comète et Julie Guenon. Merci pour l'ambiance, votre bonne humeur et les bons restos. Merci à mes anciennes collègues Dre Valérie Thibodeau, Josiane Chagnon-Choquet et Catherine Sabourin-Poirier qui m'ont aidée à initier mon Ph. D d'un point de vue technique. Je n'oublie Marie-Claude Faucher, Michelle Byrns, Kim Doyon-Laliberté, Laurence Blondin-Ladrie, Matheus Aranguren et Alessandro Modica avec qui j'ai collaboré durant ces dernières années: merci pour votre motivation au sein du laboratoire et votre bonne humeur.

Merci à mes anciennes collègues de l'UQAM et amies maintenant, Clara, Audrey et Ouafa qui m'ont été d'une très grande aide, particulièrement sur le plan moral et davantage lors de mes deux dernières années; un grand merci pour votre écoute qui m'a permis de tenir le coup durant les moments difficiles, et vos nombreux conseils également. Un grand merci à mes amis David, Larissa, Tamara, Saraï, Marie-Odile, Steeven, Lindsay et mon *frère* Gary, qui m'ont toujours fait l'honneur d'une amitié durable, vraie et sincère.

Pour terminer, un très grand merci à ma maman, mon papoune J-P, mon adorable sœur, ma grand-mère et mon tonton J-C qui, malgré la distance, m'ont toujours encouragée et toujours soutenue dans tous mes choix, et ce, depuis le début. Merci pour votre soutien sans relâche et sans faille, je vous aime.

# CHAPITRE I

## Introduction

Le nombre de nouvelles infections par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) reste un problème de santé majeur et, aujourd'hui, 37,9 millions de personnes sont touchées par le VIH-1 dans le monde. L'amélioration des campagnes de prévention en matière de relations sexuelles, de drogues et de grossesses, ainsi qu'une plus grande accessibilité aux traitements antirétroviraux, ART, ont entraîné la diminution du taux de mortalité et de morbidité des personnes infectées à travers le monde. Toutefois, 70 % des personnes séropositives vivent en Afrique subsaharienne, soit près de deux tiers de la population mondiale (1). Le mode de transmission est principalement par voie hétérosexuelle et touche majoritairement les femmes, surtout en Afrique subsaharienne. Dans certains pays de cette région, en plus d'une discrimination sociale, le statut de la femme fait l'objet d'une certaine subordination en matière de rapports sexuels, comme l'interdiction du port de préservatifs, entraînant ainsi des risques accrus de contamination au VIH-1. De plus, l'accès restreint aux traitements antirétroviraux n'aide pas à l'éradication de l'infection.

Le fonctionnement de l'immunité dans le compartiment systémique est différent du compartiment génital (site initial de l'infection) indiquant ainsi un certain contraste d'un compartiment à l'autre (2-5). Ceci pourrait expliquer, en partie, les nombreuses difficultés à l'élaboration de stratégies préventives et thérapeutiques pour lutter contre l'infection virale. Étant la principale porte d'entrée pour le VIH-1 chez la femme, le tractus génital féminin (TGF) joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre les pathogènes tout en maintenant une tolérance de la flore commensale (6, 7). Cependant, malgré les efforts considérables déployés pour comprendre l'infection par le VIH-1, certains mécanismes se déroulant après l'entrée du virus dans la muqueuse vaginale doivent être encore élucidés.

Au laboratoire, nous travaillons avec des échantillons provenant d'une cohorte de travailleuses du sexe, CSW (*Commercial Sex Workers*), à Cotonou au Bénin, en Afrique

subsaharienne. Dans cette cohorte, nous avons identifié un groupe de femme HESN (*Highly Exposed SeroNegative*) qui demeure séronégatif malgré une forte exposition au VIH-1, et ce, après plus de sept années de travail sexuel actif. Documentées dans différentes cohortes (8, 9), ces femmes dites « résistantes » constituent un très bon modèle de l'immunité naturelle contre le VIH-1 et offrent une occasion exceptionnelle de caractériser certains paramètres nécessaires au développement de stratégies préventives. Pour ce faire, nous utilisons des échantillons provenant de HESN que nous comparons aux CSW infectées par le VIH-1 et aux femmes contrôle Non-CSW de la population générale. Ces comparaisons nous permettent d'identifier certains facteurs associés à la sensibilité ou à la résistance à l'infection, entre les organes génitaux mucosaux et le compartiment systémique chez ces HESN. Ainsi, pour une meilleure compréhension de l'immunité présente au niveau de la muqueuse vaginale, l'analyse d'échantillons endocervicaux de femmes HESN nous a permis de caractériser les cellules T régulatrices et les cellules B de la zone marginale du tractus génital, mais également une population de cellules dendritiques exprimant des niveaux élevés de molécules régulatrices, contribuant à un environnement « tolérogénique/régulateur » dans le contexte de la protection contre le VIH-1.

Dans ce travail, nous présenterons dans un premier temps les différents aspects du VIH-1, sa structure et son cycle de réplication jusqu'aux diagnostics et aux préventions mises en place. Par la suite, nous aborderons l'anatomie et la physiologie du tractus génital féminin, avant de nous concentrer sur l'immunité de l'hôte et des muqueuses ainsi que les facteurs influençant cette immunité. Ensuite, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du VIH-1, nous présenterons le rôle des cellules et des molécules régulatrices dans le TGF lors de l'infection. Tout ceci nous mènera aux hypothèses et aux objectifs de ce projet de recherche. Les résultats qui seront présentés mettent en évidence le profil inné et anti-inflammatoire des HESN qui, selon nous, contribue au maintien d'un équilibre et d'un contrôle face à l'intrusion du VIH-1. Nous finirons avec la discussion des résultats et la conclusion, suivies des perspectives et des limites de cette étude.

## 1.1 Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1

Au début des années 1980, des médecins américains constatent que plusieurs patients se présentent avec différentes maladies dues à un dérèglement du système immunitaire telles que la pneumocystose atypique et la rétinite au cytomégalovirus. D'autres maladies opportunistes associées à une diminution des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> mais également à certains cancers comme le syndrome de Kaposi sont également décrites (10). L'observation croissante de cas supplémentaires répartis dans plusieurs villes des États-Unis incite les médecins à alerter au sujet de ces profils, marquant ainsi le point de départ de la grande histoire du syndrome d'immunodéficience acquise, SIDA.

La communauté scientifique suspecte que ce syndrome d'immunodéficience pourrait être d'origine virale, compte tenu du mode de transmission se faisant majoritairement via le sang et le sperme, mais également par les utilisateurs de drogues injectables et les patients recevant des transfusions sanguines. C'est ainsi que des chercheurs français de l'Institut Pasteur isolèrent un virus provenant de ganglions lymphatiques d'un patient ayant une adénopathie, ce qu'ils nommèrent par la suite le VIH-1. Cette découverte vaudra aux Drs Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi le prix Nobel de médecine en 2008 (11). Quelques années après l'identification du VIH-1, il a été découvert une autre forme du VIH, ce dernier étant moins virulent que le premier et majoritairement restreint à certaines régions d'Afrique de l'Ouest. Ainsi, sur la base des caractéristiques génétiques et des différences antigéniques virales, le VIH se répartit en deux types, à savoir le VIH-1 et le VIH de type 2, VIH-2 (12).

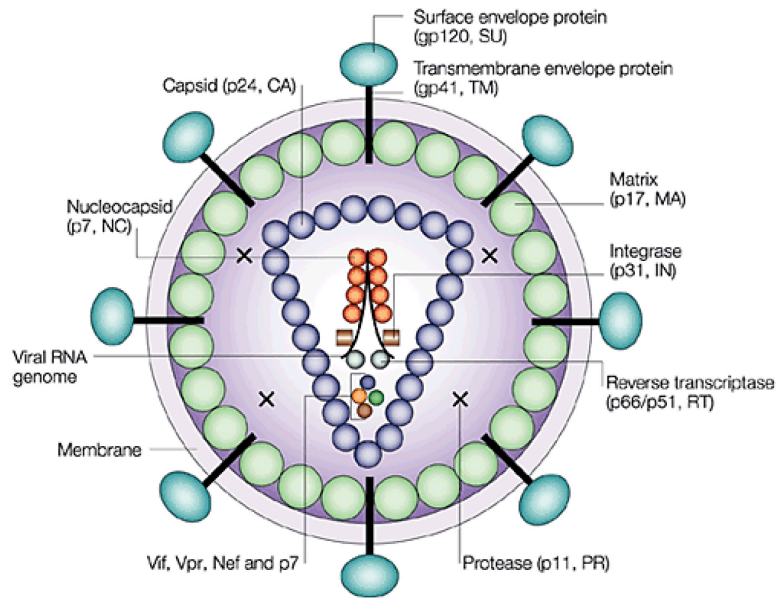
Les analyses épidémiologiques et phylogénétiques actuellement disponibles suggèrent que le VIH a été introduit dans la population humaine bien avant sa découverte initiale (13, 14). Il a été démontré que le VIH-1 provient de chimpanzés d'Afrique centrale, réservoirs naturels du virus d'immunodéficience des primates non humains, SIVcpz (13, 15) alors que le VIH-2 tient son origine des mangabeys noirs d'Afrique du Sud, SIVsm (14). Ces analyses ont apporté la preuve que le SIDA a émergé chez les humains à la suite d'infections interspèces, mais également après le transfert zoonotique des singes vers l'humain (14). Ces transmissions ont généré des souches virales distinctes pour les deux types de VIH. Ainsi, on distingue quatre différents groupes pour le VIH-1, à savoir le groupe M (*Major*), N (*Non-M, Non-O*), O (*Outlier*)

et P (*Pending the identification of further human cases*). Le groupe M est responsable de la majorité de la pandémie actuelle et comprend différents sous-types ou clades (A, B, C, D, F, G, H, J et K) ainsi que des formes recombinantes circulantes, CRF (*Circulating Recombinant Forms*) et uniques, URF (*Unique Recombinant Forms*) (14, 16). Concernant le VIH-2, on distingue huit groupes différents allant de A à H, où les groupes A et B sont endémiques (17, 18).

### 1.1.1 La structure morphologique

D'une taille d'environ de 100 nm de diamètre, le VIH-1 est un virus enveloppé, appartenant à la famille des *Retroviridae*, du genre lentivirus. Il est entouré d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Lorsque mature, il possède à sa surface une glycoprotéine (SU, gp120) sous forme trimérique, qui est liée de façon non covalente à une glycoprotéine transmembranaire (TM, gp41) (19). L'enveloppe virale (Env) entoure la matrice virale (MA, p17) qui, elle-même, recouvre la membrane de la capsid de type conique, assemblée à partir de protéines de la capsid interne (CA, p24) (20).

À l'intérieur de la capsid (ou core), les molécules d'acide ribonucléique, ARNs, sont stabilisées par des nucléocapsides (NC, p7) qui sont des composants structuraux majeurs de particules infectantes du VIH-1 (21). En plus des NC, on retrouve une protéase virale (PR, p11) ainsi que d'autres protéines cellulaires telles que la transcriptase inverse (RT, p66/p51) et l'intégrase (IN, p31), qui sont nécessaires à la réplication du virus. Plusieurs protéines accessoires comme le facteur d'infectivité virale, Vif (*Viral infectivity factor*), la protéine virale R, Vpr (*Viral protein R*) et le facteur négatif, Nef (*Negative factor*) sont également présentes (22) (Fig. 1.1).



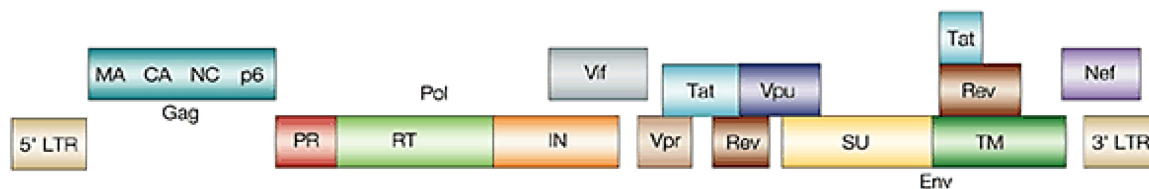
**Figure 1.1. Organisation morphologique du VIH-1.** Représentation schématique d'une particule virale mature du VIH-1 avec ses glycoprotéines de surface, ses protéines accessoires et son matériel génétique. *Reproduit avec la permission de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (23), copyright (2002). Numéro de licence 4745621502283.*

### 1.1.2 La structure génomique

Le génome du VIH-1 est constitué de deux copies d'ARNs simples brins à polarité positive et comprend 9 200 nucléotides. L'ARN viral possède une coiffe et une queue polyadénylée dans le sens 5'-3'; chacune de ses extrémités contient une région non codante dans laquelle on retrouve une séquence répétée R-U5 du côté 5' et R-U3 du côté 3'. L'acide désoxyribonucléique (ADN) proviral est obtenu après l'étape de rétrotranscription est encadré par de longues séquences terminales répétées identiques, LTR (*Long Terminal Repeats*), afin qu'il puisse s'intégrer dans le génome cellulaire (24).

Le génome viral possède neuf cadres de lecture ouverts, ORF (*Open Reading Frame*) localisés entre le LTR 5' et le LTR 3' et qui codent pour 15 protéines virales différentes (Fig. 1.2).





**Figure 1.2. Organisation du génome du VIH-1.** Représentation des gènes Gag, Env, Pol, Tat, Rev, Vpu, Vif, Vpr et Nef dans le génome du VIH-1. Vif, Vpr, Vpu et Nef sont des protéines accessoires virales alors que Tat et Rev sont des protéines régulatrices virales. *Reproduit avec la permission de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (23), copyright (2002). Numéro de licence 4745621502283.*

Ces protéines sont réparties en quatre catégories : les protéines structurales, les enzymes virales, les protéines régulatrices et les protéines accessoires.

**Les protéines structurales** proviennent des gènes *Gag* et *Env*. *Gag* code pour les protéines externes du noyau : MA, CA, NC et pour la protéine de stabilisation de l'acide nucléique, P6 (25); et *Env* code les glycoprotéines de l'enveloppe, SU et TM, toutes deux provenant d'un précurseur glycoprotéique, la gp160 (26). **Les enzymes virales** PR, RT et IN sont synthétisés à partir du gène *Pol* (27).

**Les protéines régulatrices** Tat et Rev sont synthétisées par les gènes *Tat* et *Rev*, respectivement. La protéine transactivatrice, Tat, sert d'activateur de la transcription du gène viral (28); et Rev, protéine régulatrice d'épissage de l'ARN, intervient dans la régulation de l'exportation de l'ARN messenger (ARNm) viral vers le cytoplasme pour la production de protéines régulatrices virales (29, 30).

**Les protéines accessoires** Vpu (*Viral protein U*), Vif, Nef et Vpr ont un impact sur la réplication virale, le bourgeonnement et la pathogenèse virale. La protéine virale unique Vpu contrôle la dégradation de la molécule de CD4, et se lie à la protéine transmembranaire, la tétherine, permettant ainsi le bourgeonnement puis la libération des particules virales (31). La protéine Vif joue un rôle dans l'ubiquitination du facteur de restriction APOBEC3G (*APOprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like 3 G*), ce qui permet la synthèse de l'ADN viral (31, 32). La protéine Nef a la capacité de réguler à la baisse plusieurs molécules telles que le CD4, le complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH-I), la molécule de

costimulation CD28 et le CXCR4, ce qui améliore l'infectivité du virus (33). La protéine virale Vpr intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire et facilite l'infectivité du virus (34, 35).

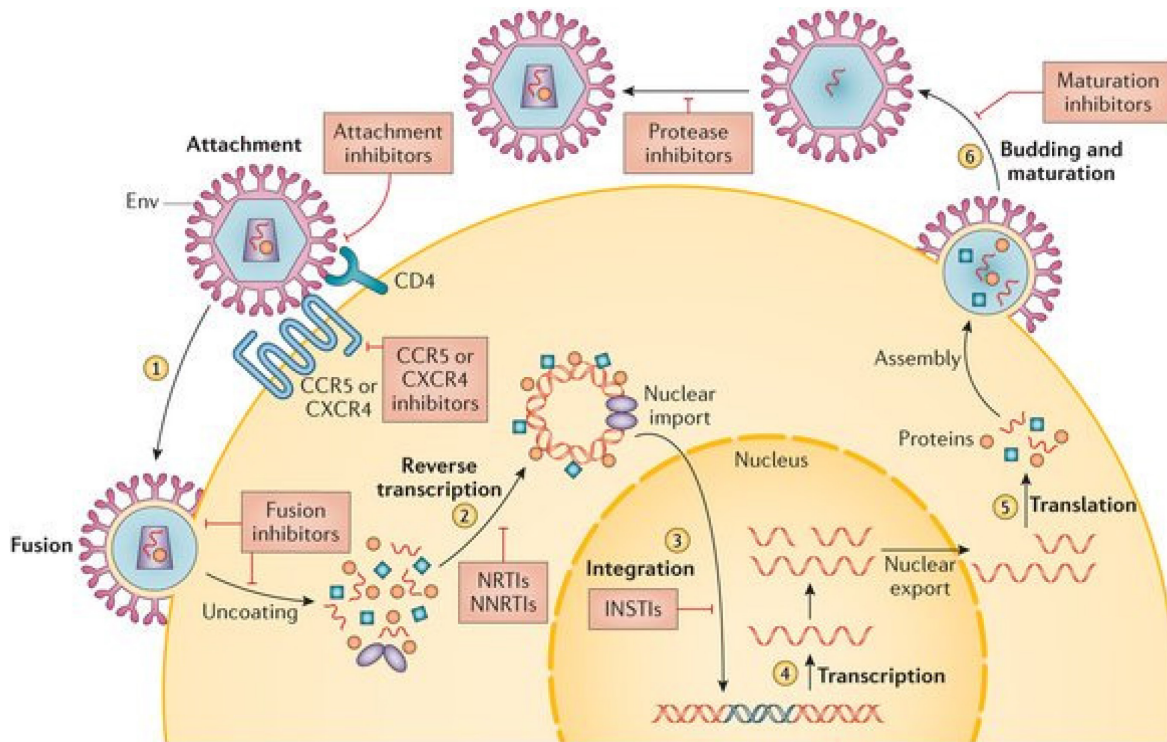
### **1.1.3 Le cycle de la réplication virale**

Le cycle répliatif du VIH-1 se divise en deux phases majeures. La première consiste en la phase précoce, qui comprend les premières étapes de la réplication allant de l'entrée du virus dans la cellule de l'hôte jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. La phase tardive de la réplication correspond aux dernières étapes du cycle viral allant de la transcription du provirus VIH-1 et le conduisant à la production des virus en grandes quantités (Fig. 1.3).

#### **1.1.3.1 Les étapes précoces du cycle**

Le mécanisme d'entrée du VIH-1 dans la cellule est initié par le processus de l'attachement, c'est-à-dire la liaison de la glycoprotéine de l'enveloppe virale, la gp120, au récepteur CD4 à la surface de la cellule cible (36). Cependant, la présence seule de la molécule de CD4 n'étant pas suffisante pour l'entrée du virus dans la cellule, la gp120 effectue un changement de conformation. Ceci permet le recrutement d'un de ses corécepteurs à la surface de la cellule, soit le récepteur de chimiokine CCR5 (37) ou CXCR4 (38, 39). Cette interaction, avec le corécepteur, détermine ainsi le tropisme du virus. Subséquemment, d'autres changements de conformation sont transmis par la gp120 vers la gp41, provoquant l'exposition de l'ectodomaine de la gp41 au corécepteur. L'insertion de la gp41 dans la membrane cellulaire de l'hôte entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, permettant ainsi à la capsid virale et son contenu de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule hôte (40, 41).

Certaines cellules comme les LT-CD4<sup>+</sup>, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) sont de potentielles cibles pour le VIH-1, par la présence du récepteur CD4 sur la majorité de leur surface (42-44).



**Figure 1.3. Cycle de réplication virale du VIH-1.** (1) Le VIH pénètre dans la cellule cible par le biais du récepteur CD4 et corécepteur CCR5 ou CXCR4 par interaction avec la glycoprotéine de l'enveloppe virale; (2) après fusion, l'ARN viral est soumis à une transcription inverse; (3) l'ADN nouvellement transcrit pénètre dans le noyau puis est intégré dans l'ADN de la cellule hôte; (4) l'ADN viral est transcrit en ARNm viral; (5) les ARNm viraux sont exportés dans le cytoplasme pour être ensuite (6) traduits en protéines virales permettant la fabrication de virions matures. Reproduit avec la permission de Springer Nature : *Nature Reviews Disease Primers* (45), copyright (2015). Numéro de licence 4745640310489.

Des études ont démontré que les DCs résidants dans les muqueuses génitales expriment à leur surface des taux élevés de lectines de type C, telles que DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), récepteur d'endocytose capable de reconnaître les résidus riches en mannose de la gp120 de l'enveloppe (46, 47). S'en suivent l'internalisation du virus puis son transfert aux cellules cibles (48-50), amplifiant ainsi l'infection virale (51).

La rétrotranscription est une étape requise dans le cycle répliatif. Après la décapsidation, le virus se désassemble progressivement dans le cytoplasme et, avec les protéines

de l'hôte, un complexe de transcription inverse se forme (52). Une fois ce complexe formé, l'amorce ARN de transfert lysine (ARNt-Lys) provenant de la cellule hôte, permet à la RT de convertir l'ARN viral simple brin en ADN double brin, générant la présence de LTR à chaque extrémité du génome viral (53) (Fig. 1.2). Certains gènes stimulés par l'interféron (ISG) comme l'APOBEC3G et le SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) interfèrent avec la transcription inverse et participent ainsi au blocage de la réplication virale (54). En effet, le facteur de restriction SAMHD1 diminue le taux de désoxynucléotides (dNTPs) essentiels à la synthèse de l'ADN viral par la RT (55). Concernant l'APOBEC3G, il est capable d'intégrer le virion nouvellement formé et de bloquer la réplication du VIH-1 dans la nouvelle cellule infectée, à la suite de mutations de la cytosine en uracile dans l'ADN viral, au cours de la synthèse de la RT.

Une fois l'ADN proviral formé, le complexe de transcription inverse se désassemble et s'associe avec les protéines cellulaires et virales pour construire un complexe de préintégration, PIC (*Pre-Integration Complex*). Il sera transporté dans le noyau à l'aide des microtubules de la cellule hôte (56).

L'étape d'intégration est catalysée par l'IN virale qui reconnaît les régions LTR situées aux extrémités de l'ADN proviral puis les clivent spécifiquement sous forme oligomérique. Après avoir séparé les brins de l'ADN cellulaire de l'hôte de manière non spécifique, l'IN incorpore l'ADN proviral dans le génome cellulaire (57). En raison de la limitation du génome viral, l'IN requiert la présence d'un co-activateur transcriptionnel de l'hôte, LEDGF (*Lens Epithelium-Derived Growth Factor*), pour la fixation et l'intégration correcte du génome viral localisé dans une région transcriptionnellement active de la chromatine de l'hôte (57, 58). Il s'en suit d'un mécanisme de réparation de l'ADN au sein des sites d'intégration (59).

### **1.1.3.2 Les étapes tardives du cycle**

Une fois l'ADN viral intégré dans le génome de la cellule cible, la transcription du provirus s'effectue grâce aux différentes composantes de la machinerie cellulaire et est régulée par l'activité du promoteur du VIH-1, localisé dans la région 5' LTR. Lors de cette étape, l'ARN

polymérase II de la cellule hôte effectue la synthèse de l'ARNm fortement épissé codant pour les protéines Tat, Rev et Nef. En effet, Tat et Rev font partie des premières protéines à être exprimées afin de réguler et de permettre l'expression des autres protéines virales par la suite (60, 61). La protéine Tat joue un rôle majeur dans la transcription virale; elle s'associe à une région en épingle à cheveux de l'ARN viral, TAR (*Trans-Activating Response element*) et au cofacteur de transcription cellulaire, pTEFb (*positive Transcription Elongation Factor*) et ensemble, forme un complexe qui stimule le processus d'élongation de l'ARNm par l'ARN polymérase II cellulaire (62, 63). Il en résulte une succession de modifications post-transcriptionnelles qui donneront des transcrits viraux de différentes tailles. La protéine Rev régule le taux d'exportation des différents ARNm dans le cytoplasme de la cellule en se liant à une région spécifique de l'ARNm, le RRE (*Rev-Responsive Element*) (64). Suite à cette liaison se forme un complexe qui recrute les protéines cellulaires CRM1 (*Chromosome Maintenance gene 1*) et Ran-GTP (*Ras related nuclear protein – Guanosine TriPhosphate*) qui interagissent avec la machinerie d'exportation permettant le transport de l'ARNm dans le cytoplasme (65, 66). La protéine Nef, est abondamment exprimée tout au long du cycle viral et permet l'acheminement des protéines virales vers le réseau trans-Golgien, les endosomes ou les lysosomes (67); elle régule à la baisse les facteurs de restriction SERINC3 et SERINC5 des cellules infectées, empêchant ainsi leur incorporation dans des virions naissants (68).

L'assemblage du génome et des particules virales matures au niveau de la membrane plasmique est orchestré par Vpu, qui intervient dans l'adressage des protéines de l'enveloppe, et par Vif qui influence les étapes finales d'assemblage des virions (63). La région CA de la polyprotéine Gag interagit avec la membrane plasmique cellulaire formant une particule sphérique, et la région NC de Gag interagit avec les ARNs viraux permettant ainsi son encapsidation dans la particule virale (60). Par la suite, le virion à assembler incorpore Env, puis recrute le complexe de tri endosomal requis pour le transport, ESCRT-1 (*Endosomal Sorting Complex 1 Required for Transport*) via p6 et la sous-unité du gène de susceptibilité à la tumeur 101, TSG101 (*Tumor susceptibility gene 101*) d'ESCRT-I (62, 69). Au fur et à mesure que le processus de bourgeonnement progresse, d'autres protéines comme ESCRT-III et VPS4 (*Vacuolar Protein Sorting associated protein 4*) sont recrutées pour diriger la réaction de scission membranaire, ce qui conduit à la libération des particules virales (69). La nouvelle

particule virale est relâchée à l'extérieur de la cellule et subit la fin de sa maturation par certaines protéases virales, afin de créer une particule virale infectieuse, puis entame un nouveau cycle de réplication.

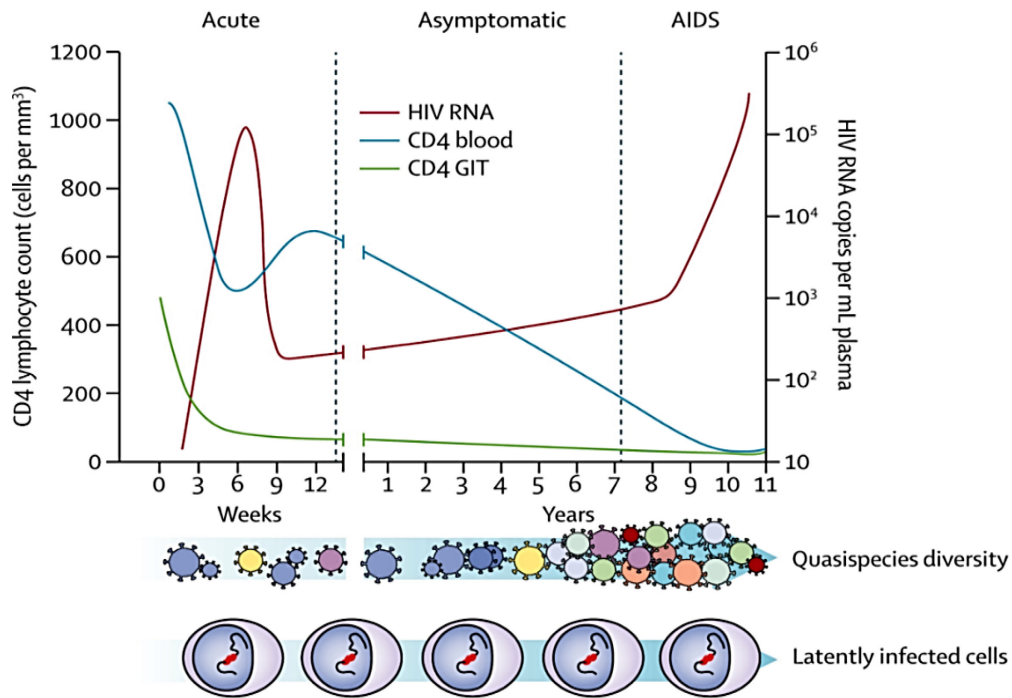
Lors de cette étape d'assemblage, le facteur de restriction tétherine (CD137 ou BST-2) intervient et inhibe la libération des particules virales en les liant à la surface de la cellule (70). Généralement, la tétherine est peu exprimée dans les LT-CD4<sup>+</sup> primaires, mais son expression est fortement induite par les interférons de type I (IFN-I) (71). Cependant, ce facteur de restriction est contrecarré par Vpu, réduisant ainsi ses niveaux d'expression à la surface des cellules et favorisant sa dégradation dans le protéasome (72).

#### **1.1.4 L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1**

La progression de l'infection se décrit en trois phases cliniques à durées variables : la phase aigüe ou primo-infection, la phase chronique ou asymptomatique et la phase SIDA (Fig. 1.4).

La phase primo-infection correspond à l'invasion du VIH-1 dans l'organisme au bout de quelques jours/semaines après l'exposition de l'individu au virus. Cette phase est symptomatique puisqu'elle se manifeste par un syndrome apparenté à la mononucléose manifesté par des adénopathies, des myalgies, des céphalées, de la fièvre et autres symptômes grippaux (73, 74). Au niveau cellulaire, cette phase se caractérise par une charge virale très élevée, soit  $10^6$  à  $10^7$  copies d'ARN viral/ml de sang (75). On observe également une déplétion active des cellules T-CD4<sup>+</sup> en périphérie et dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT), au bout de deux à trois semaines suivant l'infection (76). Cette déplétion favorise une perte de l'homéostasie des barrières muqueuses entraînant la translocation microbienne, ce qui contribue à l'inflammation chronique.

Les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal, GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), comptent énormément de cellules T-CD4<sup>+</sup> (78) et, parmi elles, 50 % expriment le récepteur CCR5, comparativement à 15 % en périphérie (79, 80).



**Figure 1.4. Phases cliniques de l'infection au VIH-1.** Lors d'une infection au VIH-1 non traitée, les LT-CD4<sup>+</sup> du sang (*ligne bleue*) diminuent progressivement durant les trois phases, alors que les LT-CD4<sup>+</sup> du tractus gastro-intestinal (*ligne verte*) sont rapidement épuisés, et ce, dès la primo-infection. En lien avec la réponse de l'hôte, la réplication virale diminue dans la deuxième phase de la primo-infection puis augmente par la suite. La phase SIDA est caractérisée par un épuisement total des LT-CD4<sup>+</sup>. L'individu est immunodéprimé et a un système immunitaire qui se trouve dans l'incapacité de contrôler les maladies/infections opportunistes. *Figure adaptée et reproduite avec la permission de Elsevier : The Lancet (77), copyright (2014). Numéro de licence 4745640871888.*

Ainsi, les cellules T CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> activées (81, 82) sont très permissives au VIH-1 et interagissent principalement avec les souches virales de tropisme R5 (83). C'est aussi durant cette phase qu'apparaissent les immunoglobulines (Ig) de type G spécifiques du VIH-1, ainsi que les anticorps non neutralisants, ayant un fort potentiel à ADCC (*Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity*) (2, 84). Parallèlement, on observe une augmentation accrue des cellules T-CD8<sup>+</sup> cytotoxiques permettant un contrôle immunologique du virus. Ceci se traduit par une

diminution de la charge virale dans le sang et un rétablissement partiel des LT-CD4<sup>+</sup> circulants, mais pas dans les muqueuses (85, 86), marquant ainsi l'entrée dans la phase chronique.

La phase chronique est asymptomatique. Selon l'individu et en l'absence de traitement, elle dure généralement entre 8 et 10 ans (voire 15 ans dans certains cas) (87). Après le pic viral, la virémie se stabilise et persiste durant toute la phase chronique. Au fur et à mesure de l'évolution de l'infection, la charge virale augmente, entraînant à la longue une suractivation du système immunitaire. Le nombre de cellules T-CD4<sup>+</sup> dans les muqueuses et en périphérie diminue progressivement (79) ce qui aboutit à l'exhaustion cellulaire et donc à l'épuisement du système immunitaire chez l'individu infecté. À ce stade, les cellules du système immunitaire deviennent activées par différents agonistes tels que les protéines virales, les produits de la translocation microbienne ou les réponses cytokiniques pro-inflammatoires (88).

Sans traitement, l'évolution du VIH-1 aboutit à la phase SIDA. Ce stade est rapidement mortel puisque les défenses immunitaires s'effondrent pour laisser place aux maladies opportunistes. On observe alors une perte massive des LT-CD4<sup>+</sup> allant en dessous des 200 cellules/mm<sup>3</sup> de plasma et de graves lésions des tissus lymphoïdes provoquées par une inflammation chronique à long terme, ce qui permet le retour d'une charge virale très élevée au sein de l'organisme (79, 89). L'apparition de tumeurs rares (90) et de nombreuses infections opportunistes (91) conduisent l'individu au décès.

## **1.2 Le tractus génital féminin**

Le tractus génital féminin constitue la principale porte d'entrée de nombreux organismes et joue donc un rôle important dans la protection de l'hôte contre les agents pathogènes viraux, bactériens, parasitaires et fongiques, tout en maintenant une tolérance à une flore commensale (92). Il présente des variations morphologiques, cycliques, hormono-dépendantes, de la puberté à la ménopause.



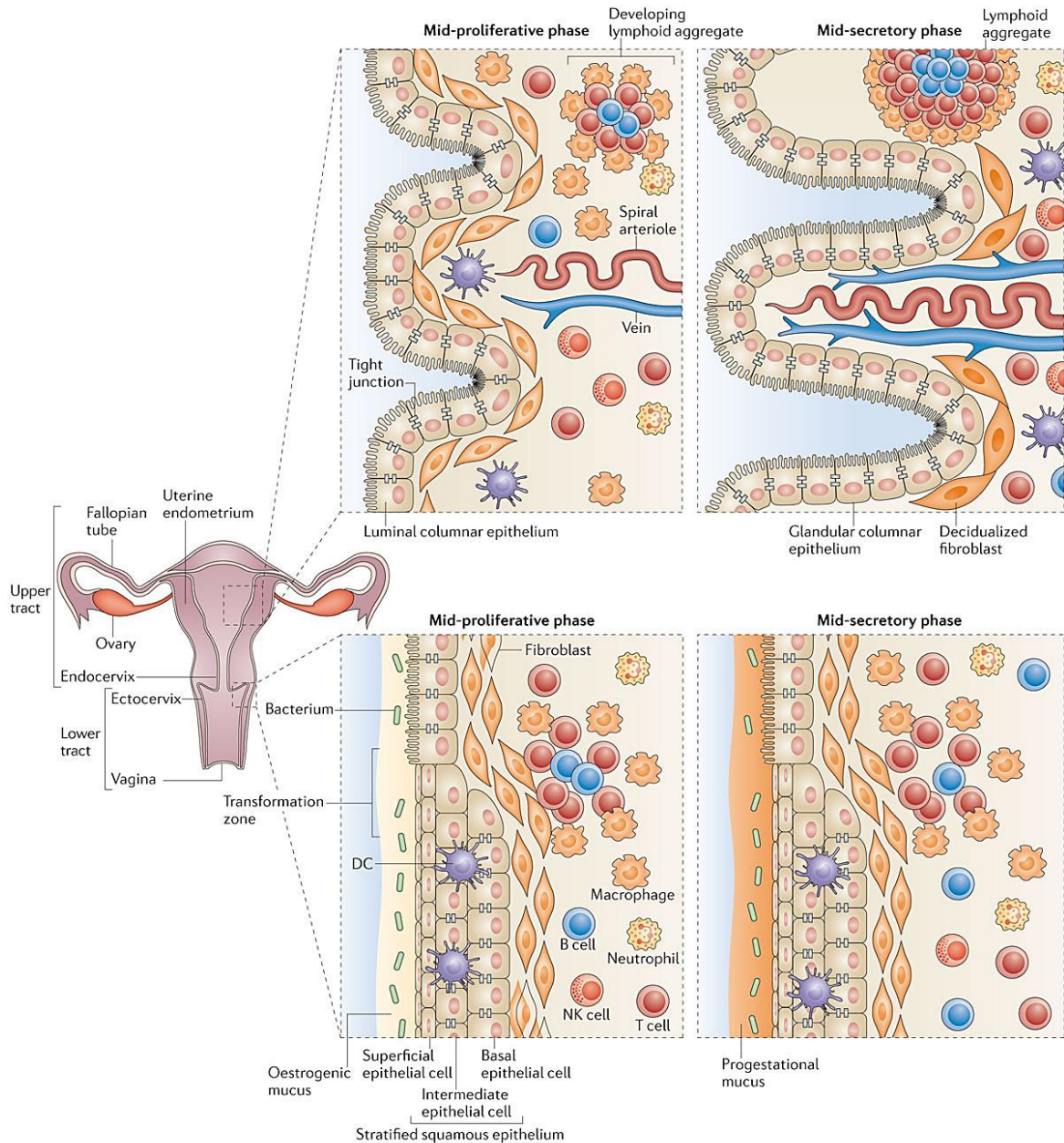
### 1.2.1 La structure et l'anatomie du TGF

Le TGF est subdivisé en deux régions présentant des profils phénotypiques bien distincts. La partie supérieure, qui est stérile, est constituée de l'endomètre (muqueuse utérine), des trompes de Fallope et de l'endocol; et la partie inférieure non stérile composée du vagin et de l'exocol (93, 94) (Fig. 1.5).

Au niveau de la partie supérieure du TGF, les cellules épithéliales sont cylindriques et forment une monocouche cellulaire. Elles prolifèrent pendant le cycle menstruel et forment des glandes pendant la phase de sécrétion (94). De plus, les cellules immunitaires qui la composent forment des agrégats lymphoïdes principalement composés de lymphocytes B et de T-CD8<sup>+</sup> entourés de macrophages, qui atteignent leur taille maximale autour de l'ovulation et pendant la phase de sécrétion du cycle (94-96).

La partie inférieure du TGF, protégée par un épithélium squameux stratifié dans le vagin, est composée de cellules épithéliales superficielles, intermédiaires et basales. Une couche dense de fibroblastes entremêlés de cellules immunitaires comme les cellules T, les macrophages, les cellules B, les neutrophiles, les cellules tueuses naturelles, NK et les DCs y sont sous-jacentes (93-95).

Il existe également une zone appelée « zone de transformation » qui réunit l'épithélium du TGF supérieur et inférieur. Cette zone contient un nombre particulièrement élevé de cellules immunitaires par rapport au reste du TGF (93-95). De plus, la muqueuse vaginale est colonisée par une microflore commensale et le mucus qui s'y trouve voit sa consistance changer au cours du cycle menstruel, devenant épais et visqueux durant la phase de sécrétion.



**Figure 1. 5. Anatomie et histologie de la muqueuse génitale féminine.** La muqueuse vaginale regroupe le TGF supérieur (trompes de Fallope, utérus et de l'endocol) et le TGF inférieur (vagin et exocol). Le vagin et l'exocol comprennent des fibroblastes et de nombreuses cellules immunitaires, en plus du mucus et d'une flore microbienne. L'endocol et l'utérus comprennent également des cellules immunitaires formant de petits agrégats lymphoïdes. La zone de transformation indique la région où les cellules épithéliales monocouches de l'exocol rencontrent les cellules épithéliales squameuses stratifiées du vagin; on y retrouve aussi des agrégats lymphoïdes. *Reproduit avec la permission de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (94), copyright (2015). Numéro de licence 4745650051459.*

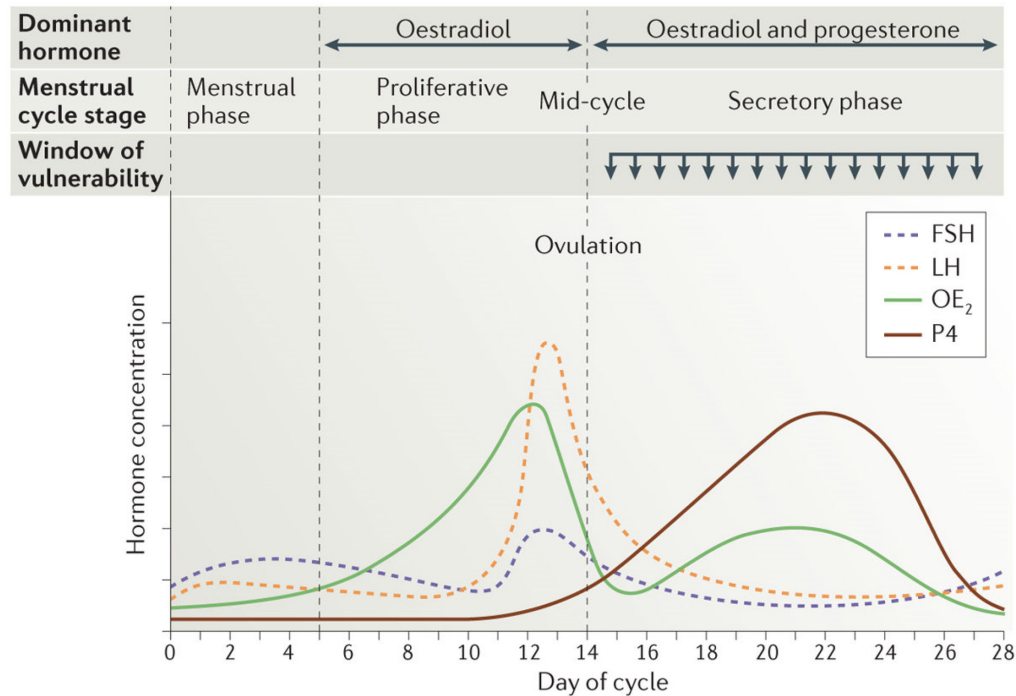
### 1.2.2 Le cycle menstruel et hormonal

La durée moyenne du cycle menstruel est de 28 jours. Le cycle est divisé en quatre étapes : la phase menstruelle, la phase proliférative (ou phase folliculaire), le milieu du cycle au cours duquel se produit l'ovulation et la phase sécrétoire (ou phase lutéale) (Fig. 1.6).

Lors du cycle menstruel, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) stimule les cellules ovariennes thécales et de la granulosa, dans le follicule en développement, afin de produire l'œstradiol (OE<sub>2</sub>). Durant la phase proliférative, les taux d'OE<sub>2</sub> augmentent, par l'intermédiaire de la FSH et de l'hormone lutéinisante (LH), pour atteindre leur maximum au milieu du cycle (juste avant l'ovulation). Il s'en suit une augmentation de la LH, qui est essentielle pour l'ovulation. Après l'ovulation, le corps jaune se développe pour devenir la principale source d'œstradiol et de progestérone au cours de la phase de sécrétion. Ces hormones préparent ainsi l'utérus pour l'implantation de l'œuf, en fournissant un apport vasculaire et des nutriments adéquats. En absence de fécondation, le corps jaune se dégrade, ce qui entraîne une diminution des taux d'œstradiol et de progestérone, l'excrétion de l'endomètre et l'apparition des règles (94).

En plus des fonctions de reproduction, les hormones sexuelles régulent le système immunitaire du TGF tout au long du cycle, afin de le protéger contre les agents pathogènes sans rejeter le sperme, le zygote et le blastocyste (97).

Durant la phase proliférative, on observe la migration et la différenciation phénotypique des cellules immunitaires vaginales, ce qui diffère pour les cellules immunitaires des autres muqueuses et de la périphérie. Ceci se caractérise par une angiogenèse ainsi que par la croissance des cellules épithéliales glandulaires et des fibroblastes stromaux de l'endomètre, (98). Lors de l'ovulation, le pic d'angiogenèse facilite le recrutement et donc l'augmentation du nombre de cellules immunitaires telles que les leucocytes, les neutrophiles et les macrophages, au sein de l'utérus. Ces cellules sont nécessaires en cas de grossesse puisqu'elles éliminent les potentiels agents pathogènes pouvant être présents dans le TGF supérieur afin de préparer l'implantation de l'ovule fécondé (98-101).



**Figure 1.6. Régulation du cycle menstruel par les hormones sexuelles.** Le cycle menstruel est subdivisé en différentes phases et est sous le contrôle de différentes hormones sexuelles telles que l'œstrogène ( $OE_2$ ), la progestérone ( $P_4$ ), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). *Reproduit avec la permission de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (94), copyright (2015). Numéro de licence 4745650051459.*

Ce recrutement, régulé par les hormones sexuelles, repose sur les cytokines/chimiokines comme les CCL4 (ou MIP-1 $\beta$ ), CCL14, CCL16 et CCL21. Ces molécules s'accumulent au pourtour des vaisseaux sanguins utérins et sont principalement produites par les fibroblastes épithéliaux et stromaux (98). Le nombre de cellules immunitaires du TGF inférieur est, quant à lui, constant tout au long du cycle (95). Durant la phase sécrétoire du cycle, la protection immunitaire est atténuée afin d'optimiser les conditions de fécondation et de grossesse, ce qui crée une « fenêtre de vulnérabilité » au cours de laquelle de potentiels pathogènes peuvent pénétrer et infecter le TGF.

De ce fait, la présence d'infections préexistantes dans le TGF peut augmenter le risque à une infection par le VIH-1 (102) et potentiellement élargir la « fenêtre de vulnérabilité ». Ceci se traduit par une inflammation accrue, une régulation positive de

l'expression des cytokines/chimiokines et le recrutement de cellules cibles (4). Des études *ex vivo* effectuées chez les macaques co-infectés par *Chlamydia trachomatis* et *Trichomonas vaginalis* ont démontré une infection par le virus de l'immunodéficience simienne au cours de la phase de prolifération du cycle menstruel (103). Aussi, il a été démontré que les femmes atteintes d'infection à chlamydia présentent un nombre accru de LT-CD4<sup>+</sup> exprimant CCR5 sensibles au VIH-1 dans l'endocol par rapport aux femmes non infectées (104). Ainsi, les infections sexuellement transmissibles (IST) acquises lors de cette « fenêtre de vulnérabilité » peuvent affecter les cellules immunes de même que la microflore, normalement présentes au cours de la phase proliférative du cycle menstruel.

### 1.2.3 La flore commensale

La flore microbienne présente au niveau vaginal contribue à la fois à la défense et au bon fonctionnement du TGF. Sa fonction et sa composition sont complexes, et une simple modification de la flore vaginale peut entraîner l'acquisition d'IST.

Plusieurs études ont démontré que la flore vaginale normale dominante comprend le genre *Lactobacillus* (105, 106). Parmi les *Lactobacillus*, les principales espèces retrouvées dans la flore vaginale sont *L. acidophilus* (106), *L. crispatus* (107, 108), *L. gasseri* (109) et *L. jensenii* (110). Lorsque le taux d'œstrogène augmente, ces bactéries lactiques métabolisent de grandes quantités de glycogène présent dans l'épithélium vaginal (111), ce qui permet la production des acides organiques. Il en résulte un pH vaginal acide, créant ainsi un environnement restrictif afin de limiter la croissance de nombreux organismes pathogènes (112).

Cependant, la composition du microbiote vaginal peut varier au cours du temps. Le cycle menstruel (113), l'utilisation de contraceptifs (114), la fréquence des rapports sexuels et le nombre de partenaires sexuels (115), les douches vaginales et l'utilisation d'antibiotiques ou d'autres médicaments ayant des activités immunitaires ou endocriniennes (116) sont des variables qui peuvent entraîner la fluctuation des bactéries initialement présentes. Ainsi, une diminution du nombre de ces bactéries lactiques est généralement associée à une

augmentation du pH vaginal et à la diminution des protéines microbiennes. Ceci entraîne le développement de bactéries opportunistes, engendrant ainsi un dérèglement de la flore vaginale (117, 118).

Par ailleurs, en plus d'influencer la composition du mucus, les microorganismes de la flore commensale ont la capacité de moduler la différenciation des cellules épithéliales et la migration des cellules présentatrices d'antigènes (APCs), au travers de l'épithélium (119) ainsi que le recrutement des cellules lymphocytaires vers la muqueuse vaginale (120, 121).

#### **1.2.4 Le mucus cervico-vaginal**

Les cellules épithéliales endocervicales sécrètent des glycoprotéines, appelées mucines. Elles constituent une composante majeure du mucus et piègent les agents pathogènes en leur empêchant l'accès à l'épithélium (94, 122-124). L'expression des gènes codant pour la mucine varie selon le statut menstruel, ce qui entraîne la modification des propriétés globales du mucus (124, 125). Ainsi, le mucus œstrogénique est fin et aqueux avec une faible viscosité, ce qui facilite le mouvement des spermatozoïdes dans le TGF supérieur (124, 126). Il est présent durant la phase proliférative et augmente lors de l'ovulation. En revanche, le mucus progestatif est épais, visqueux et n'est présent qu'après l'ovulation et pendant la phase de sécrétion (124, 127).

En plus de supporter et de réguler la flore commensale (128), le mucus protège les cellules épithéliales du contact direct avec des agents pathogènes tels que le VIH-1 (129). En effet, certaines études ont démontré que la glaire cervico-vaginale interagit avec les anticorps pour entraver la mobilité du VIH-1 et améliorer ainsi la fonction de la barrière muqueuse (122, 123, 129, 130). Tomaras et ses collègues ont démontré que les isotypes d'immunoglobulines peuvent différer par leur profil fonctionnel, notamment par leur fraction Fc, entraînant l'internalisation du virus. Ils ont également montré que les IgG et IgA spécifiques du VIH-1 ont la capacité d'induire la phagocytose des virions infectieux et que l'activité antivirale médiée par la fraction Fc de l'IgG est active au sein de la muqueuse vaginale (131).

L'analyse de la composition du mucus vaginal a démontré la présence de plusieurs protéines antimicrobiennes telles que la calprotectine (132), le lysozyme (133), la lactoferrine

(128, 134), les défensines (135), les inhibiteurs de protéases sécrétés par les leucocytes, SLP (136, 137) et l'élafine/trappine-2 (9) et de leurs actions antivirales contre le VIH-1. Dans le mucus, on retrouve également différentes cytokines et chimiokines qui, produites par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires du TGF, aident à la protection de la muqueuse vaginale.

### **1.3 L'immunologie de l'hôte et des muqueuses**

Le TGF constitue une partie majeure du MALT (92, 96). En effet, il contient un nombre élevé de cellules immunitaires par rapport au reste de l'organisme tels que les DCs, les cellules de Langerhans et les macrophages, mais aussi les cellules NK, les neutrophiles, les lymphocytes T et B (96). Ces cellules sont étroitement régulées par les hormones sexuelles tout au long du cycle menstruel et confèrent une protection à travers la flore vaginale et la production de protéines antimicrobiennes, mais également par la production d'anticorps et de cytokines/chimiokines (92, 94, 138).

#### **1.3.1 Les cytokines et chimiokines**

Les cytokines et les chimiokines sont connues pour agir en tant que molécules régulatrices dans la maturation, le trafic et le recrutement des leucocytes vers différents sites d'inflammation (139). Ce sont de petites glycoprotéines spécialisées dans la signalisation cellulaire dans le système immunitaire (140, 141).

Elles exercent plusieurs fonctions et sont regroupées en différentes catégories. Parmi elles, on retrouve (i) les cytokines antivirales telles que les IFNs, qui jouent un rôle central dans l'immunité innée contre les virus et d'autres agents pathogènes microbiens (142); (ii) les interleukines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires qui interviennent dans la croissance, la différenciation et l'activation des leucocytes (143); (iii) les chimiokines, sont classées en quatre groupes (CC, C, CXC et CX3C), qui sont des cytokines chimioattractantes et qui interviennent dans le déplacement des cellules immunitaires (144); (iv) d'autres cytokines telles que les

facteurs stimulateurs de colonies, CSF (145), le facteur de nécrose tumorale, TNF (146, 147), le facteur de croissance de transformation de type bêta, TGF- $\beta$  (148-150).

Dans le système génital féminin, on retrouve les cytokines tant dans le TGF supérieur qu'inférieur, mais aussi dans les sécrétions vaginales et dans le mucus (151). Leur expression sera détaillée dans les sections suivantes.

### **1.3.2 Les cellules épithéliales du TGF**

L'épithélium du TGF constitue une barrière physique et immunologique afin de protéger l'organisme des agents pathogènes, mais aussi pour favoriser la migration des spermatozoïdes, des ovules et du fœtus.

De façon générale, les cellules épithéliales sont reliées entre elles par des protéines d'adhérences intercellulaires. Il en existe trois types principaux : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes (152, 153). Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires ce qui crée une barrière et limite la diffusion de molécules en réduisant leur mobilité au travers des cellules épithéliales (152, 154). Les jonctions adhérentes relient des faisceaux de filaments d'actine cellulaire afin de former une ceinture d'adhérence en continu, généralement juste en dessous des jonctions serrées (153, 155). Les desmosomes relient les filaments intermédiaires de la kératine entre les cellules, pour former un cadre structural de grande résistance à la traction (153, 156).

Dans l'épithélium du TGF inférieur, il existe plusieurs couches de cellules épithéliales (Fig. 1.5). Les jonctions serrées ne sont principalement présentes qu'au sein des cellules basales, régulant ainsi le mouvement des molécules à travers l'épithélium. Leur absence aboutit généralement à une faible liaison entre les cellules, permettant à des agents pathogènes tels que le VIH-1 de pénétrer dans l'épithélium (157). En revanche, la monocouche de cellules épithéliales du TGF supérieur n'est maintenue qu'avec des jonctions serrées. Ainsi, l'œstrogène module l'expression des protéines de claudine et l'occludine, ce qui entraîne une relaxation des jonctions serrées et un flux beaucoup plus important des molécules à travers l'épithélium (158, 159).



Les agents pathogènes et l'état inflammatoire dégradent l'intégrité des jonctions serrées. Ceci entraîne un flux beaucoup plus important à travers l'épithélium et une augmentation à la vulnérabilité de l'infection (160). Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, le virus peut passer au travers des cellules épithéliales par transcytose (161), notamment via le récepteur galactosylcéramide (GalCer) (162), accédant ainsi aux cellules T-CD4<sup>+</sup> cibles et aux cellules immunitaires (163).

### 1.3.3 Les récepteurs de patrons moléculaires dans le TGF

En plus de sécréter des cytokines et des chimiokines, les cellules épithéliales expriment à leur surface des molécules du CMH-I et -II. Elles sont capables de reconnaître des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) via les récepteurs de reconnaissance de patrons moléculaires (PRRs), y compris les récepteurs de types Toll (TLRs) (164), les récepteurs de type RIG-I (RLRs) (165), les récepteurs de type NOD (NLRs) (166) et les lectines (167), ce qui déclenchera l'initiation de la réponse immunitaire.

Plusieurs études ont démontré l'expression des TLRs au travers du TGF. Les TLRs 1 à 10 sont exprimés dans les cellules épithéliales des trompes de Fallope et de l'endomètre, ainsi qu'au niveau de l'épithélium vaginal et du col de l'utérus (168-173). D'autres études ont montré l'expression des TLRs 1, 2, 3, 6, 7 et 10 à la surface des cellules NK mucosaux (174, 175). L'expression des TLRs 2-4, 7-10 a été démontré au sein de l'endomètre (176). Fazeli *et al.* ont également démontré l'existence des TLRs 5 dans le muscle lisse et les cellules endothéliales vasculaires dans le stroma du vagin et de l'endocol (177).

Toutefois, l'expression des TLRs peut changer au cours du cycle menstruel. Certaines études ont montré que l'œstrogène diminue l'expression du transcrit mature (ARNm) de TLR 4 dans les fibroblastes utérins et l'expression des TLRs 2 et 6 dans les cellules épithéliales vaginales VK2 *in vitro* (178). En revanche, la progestérone augmente l'expression de TLR 4 par les fibroblastes, suggérant ainsi que ces cellules seraient plus sensibles aux agents pathogènes bactériens lors de la phase de sécrétion (176).

### 1.3.4 Les cellules dendritiques

Ayant un rôle de « sentinelle », les cellules dendritiques constituent une population hétérogène de cellules présentatrices d'antigènes. Elles ont la capacité à répondre à une gamme variée de pathogènes, générant ainsi des réponses innées et adaptatives lors de réactions inflammatoires (179).

Les DCs peuvent être classées en fonction de leurs localisations tissulaires, leur phénotype et leurs fonctions. Les DCs plasmacytoïdes (*p*DCs) sont présentes dans la moelle osseuse, en périphérie, et migrent vers les tissus lymphoïdes, où elles interagissent avec les cellules T et les cellules B (180). Elles expriment un fort taux de TLR7 et de TLR9, leur permettant ainsi de pouvoir détecter les ARNs simple brin et les ADNs double brin des pathogènes viraux (181, 182), ce qui entraîne la production massive d'IFN-I (183). Les DCs myéloïdes (*m*DCs) représentent une autre sous-population des DCs. Elles expriment l'intégrine CD11c, le CMH-II et certaines molécules de costimulations comme le CD40, le CD80 et le CD86. Lorsqu'elles arrivent à maturité, elles possèdent le CD83, provoquant la régulation positive du MHC-II et du CD86 nécessaires à l'activation des lymphocytes T; de plus, l'expression de CCR7 et CXCR3 à leur surface leur permettent de migrer vers les zones des lymphocytes T (184, 185). De plus, les *m*DCs présentes au sein des muqueuses expriment l'intégrine CD103, qui est importante pour leur migration (186). Les DCs dérivées des monocytes, MoDCs, dépendent du facteur de stimulation des colonies de macrophages, M-CSF, et du récepteur du CCR2 pour le recrutement dans les sites inflammatoires (187). *In vitro*, leur induction dépend du facteur de stimulation des colonies des granulocytes-macrophages, GM-CSF (188).

#### 1.3.4.1 Les cellules dendritiques des muqueuses

Les cellules dendritiques présentes dans les muqueuses assurent une surveillance immunitaire constante contre les agents pathogènes des poumons, des intestins et des voies génitales (189). En effet, en association avec les cellules épithéliales, les DCs des muqueuses

sont l'une des premières cellules à reconnaître les antigènes via leur PRRs (6, 93, 179). Tout comme la muqueuse intestinale, l'équilibre physiologique de la muqueuse vaginale est régulé par une interaction bidirectionnelle, « *cross-talk* », entre les DCs et les cellules épithéliales (190).

Dans le TGF, les DCs peuvent avoir un phénotype cellulaire unique en fonction de leur localisation et leurs états de maturation. Wira et ses collègues ont démontré que les DCs résidents dans le TGF de type CD11c<sup>+</sup> peuvent être divisées en quatre sous-populations, à savoir (i) les CD11b<sup>+</sup>CD1a<sup>low</sup>CD14<sup>low</sup>, (ii) les CD11b<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>hi</sup>, (iii) les CD11b<sup>low</sup>CD1a<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> et (iv) les CD11b<sup>low</sup>CD1a<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup> (150) (Tableau 1.1). Ils ont également montré que la principale population des DCs du TGF exprime CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>. En effet, même si les DCs traditionnelles sont décrites comme étant CD14<sup>-</sup>, certaines études rapportent que les DCs de la muqueuse vaginale de type CD14<sup>+</sup> ont la capacité d'induire la polarisation des LT-CD4<sup>+</sup> vers les cellules T effectrices Th1 *in vitro* (191). La co-expression de CD1c, marqueur des *mDCs*, et de CD1a avec le CD14, le CD11c et le CD11b permettent de classifier les différents stades de maturation des DCs dans le TGF.





Il est à noter que les molécules CD1 sont des glycoprotéines structurellement apparentées aux protéines du CMH-I, jouant un rôle dans la présentation antigénique lipidique et glycolipidique aux LT. On distingue les molécules CD1a, CD1b et CD1c qui sont reconnues par des LT-CD4<sup>+</sup> et les LT-CD8<sup>+</sup> et par les NK, alors que le CD1d est plutôt exprimé chez le rat et la souris (192, 193).

Une autre différence phénotypique des DCs présentes au sein des muqueuses est l'expression de DC-SIGN et de l'intégrine CD103. Les DCs exprimant DC-SIGN sont présents dans tous les sites du TGF (7, 150, 194); cependant, elles sont particulièrement élevées dans les DCs de l'endocol. En revanche, les DCs qui expriment le CD103 n'expriment pas DC-SIGN.

Les fonctions des DCs de types CD103<sup>+</sup> du TGF sont à ce jour mal connues. Toutefois, des études effectuées chez l'humain et la souris ont démontré que les CD103<sup>+</sup> sont impliquées dans la migration des DCs, localisées dans les muqueuses intestinales, vers les tissus lymphoïdes (183, 195). Les modèles murins démontrent que les DCs CD103<sup>+</sup> hépatiques et pulmonaires sont nécessaires à l'induction des réponses des cellules LT-CD8<sup>+</sup> aux infections

virales (196, 197); en revanche, les DCs de type CD103 localisées dans l'intestin humain représentent un sous-ensemble de DCs essentiels pour l'induction des cellules T régulatrices ( $T_{regs}$ ) (198, 199) et expriment des niveaux élevés de CCR6, TLR5 et TLR9 (200, 201).

**Tableau 1.1. Récapitulatif des différentes sous-populations de DCs humaines présentes au niveau du col de l'utérus.**

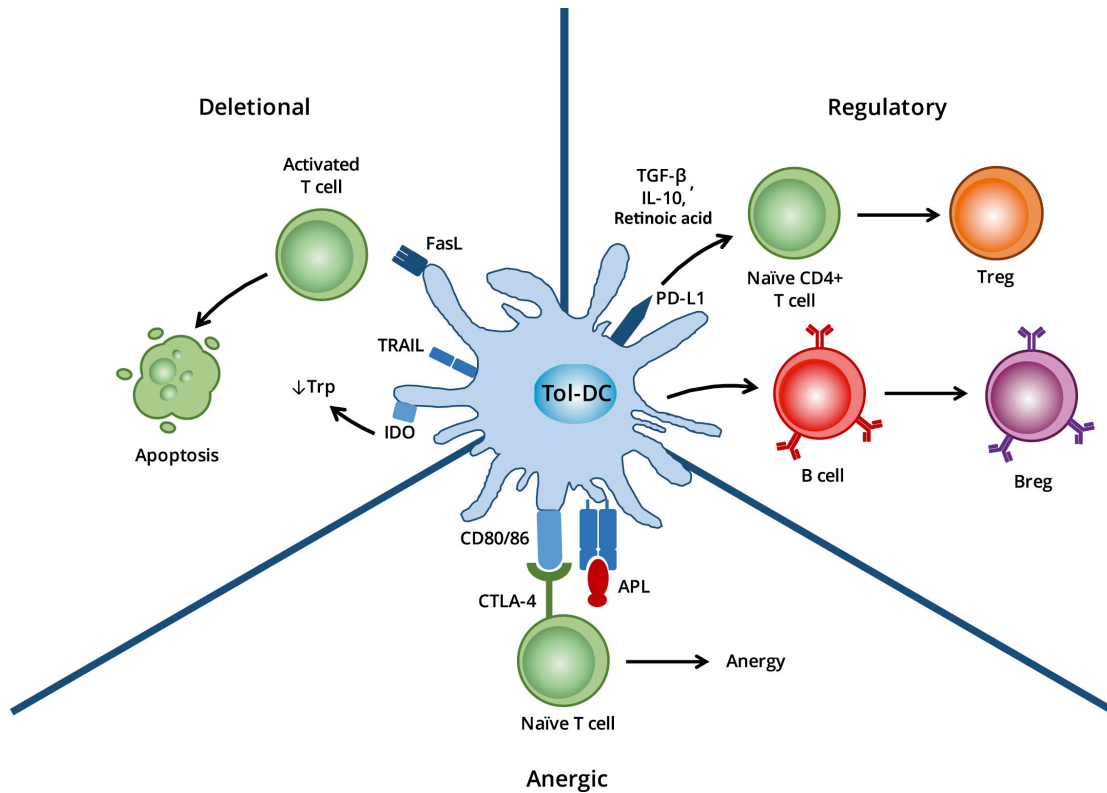
				
	CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD1a <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD1a <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD1a <sup>-</sup> CD14 <sup>hi</sup>	CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD1a <sup>low</sup> CD14 <sup>low</sup>
<b>Principaux marqueurs cellulaires</b>	HLA-DR CD1c DC-SIGN CD86 CD40 CD103 CCR7 CD83	HLA-DR CD1c DC-SIGN CD86 CD40 CD103	HLA-DR CD1c DC-SIGN CD86 CD40 CD83 CCR5	HLA-DR CD1c DC-SIGN CD86 CD40 CCR5 CCR7
	Induction de l'expression de CXCR <sub>3</sub> et de l'intégrine β <sub>7</sub> sur les cellules T (202)			
<b>Principales fonctions connues</b>	Sécrétion de CCL2, IL-8 (150)		Polarisation des cellules T en Th <sub>1</sub> (191)	
	Sécrétion d'inhibiteurs protéases (SLPI, Elfine) qui sont associés à une protection contre le VIH-1 (203, 204)		Sensible à la capture du VIH-1 (191)	
	Polarisation des cellules T en Th <sub>2</sub> (191)		Restent dans le tissu afin de prévenir une infection locale (150)	
	Induit l'expression de CCR4 sur les Th <sub>2</sub> (191)			
	Migration vers les zones T (191)			

#### 1.3.4.2 Les cellules dendritiques tolérogéniques

Plusieurs études suggèrent que la fonction régulatrice des DCs est déterminée par leur statut d'activation (205, 206). Ces DCs, qualifiées de DCs tolérogéniques, expriment à leur surface des molécules comme HLA-DR, CD103, CD14, CD16, CD11b, CD11c, CD83, ILT-2, -3, -4 et HLA-G (207, 208). Elles entraînent un état de tolérance immunitaire, par la sécrétion de cytokines comme l'IL-27 (209) et l'IL-10 (210), mais également suite à la synthèse de la 2,3-dioxygénase d'indoleamine (IDO) (211) et de l'acide rétinoïque (AR) (212), qui limite les réponses des lymphocytes T effecteurs et de favorise la différenciation des cellules régulatrices (Fig.1.7).

L'induction de la différenciation en  $T_{\text{regs}}$  est médiée par le ligand de la molécule inhibitrice de la mort programmée, PD-L1, exprimée sur les DCs. Par conséquent, l'inhibition de PD-L1 empêcherait l'induction des  $T_{\text{regs}}$  par les DCs tolérogéniques, même en présence des cytokines nécessaires (213) (Fig. 1.7).

Il a également été rapporté un autre sous-ensemble de DCs tolérogéniques, les DC-10, qui sont caractérisées par leur capacité à sécréter des niveaux élevés d'IL-10. Ces cellules matures expriment un ensemble spécifique de marqueurs, tels que le CD14, le CD16, le CD11c, le CD11b, le CD80, le CD86 et le CMH-II. Elles expriment aussi des molécules tolérogéniques comme l'ILT-2, -3, -4 et HLA-G, et sont également connues pour favoriser l'induction de cellules régulatrices (214) (voir la section 1.3.6.2).



**Figure 1.7. Mécanismes d'action des DCs tolérogéniques.** L'activation des cellules régulatrices par les DCs tolérogéniques est médiée par divers mécanismes tels que la mort cellulaire des cellules T répondantes, leur paralysie fonctionnelle par l'induction d'une anergie ou la polarisation de cellules T ou B naïves vers un phénotype régulateur par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. *D'après Christopher Horton, Kumaran Shanmugarajah, and Paul J. Fairchild, Elsevier Biomedical Journal, copyright (2017) (215). Licence <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.*

### 1.3.5 Les monocytes

Dans le système mononuclé de phagocytes, les monocytes représentent 10 % des leucocytes et sont capables de fonctionner, à la fois comme des cellules précurseurs et des cellules effectrices. Ils sont issus des cellules souches hématopoïétiques, elles-mêmes dérivées de la moelle osseuse, puis sont libérés dans la circulation sanguine lors de leur maturation. En

cas d'inflammation, ils sont recrutés dans les tissus, où ils pourront se différencier en MoDCs ou en macrophages, grâce à leurs récepteurs de chimiokines et leurs PRRs. (216).

Parmi les monocytes humains, on distingue trois stades de différenciation, en fonction de l'expression des marqueurs CD14 et CD16, codant pour le corécepteur du LPS et le récepteur Fc gamma de type III, FcγRIII, respectivement. Ces sous-populations peuvent varier lors d'infections virales/bactériennes, lors d'inflammation chronique ou encore lors de maladies auto-immunes (217).

Les monocytes classiques (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) représentent près de 90 % des monocytes du sang humain et ont pour fonction première de phagocyter les pathogènes (218). Ils expriment différents marqueurs à leur surface comme les récepteurs de chimiokines CXCR1, CXCR2 et CCR2, le récepteur de type alpha 1 de l'IL-13, IL-13Rα1, mais aussi la L-sélectine (ou CD62L).

Les monocytes intermédiaires, de type CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, représentent environ 2 à 5 % des monocytes sanguins. Ils induisent la stimulation et la prolifération des lymphocytes T, mais aussi la production d'espèces réactives de l'oxygène, ROS (218). Ils expriment certaines chimiokines comme le CXCR3 et le CCR5 (219-222), des molécules de costimulations telles que le CD80, le CD83 et le CD86, certaines molécules d'adhésion cellulaire de type intégrine comme ICAM-1 et CD11c, ainsi que la chaîne γ du CMH-II (ou CD74) (218, 219, 223, 224).

Les monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) représentent les 2 à 10 % des monocytes restants. Ils sont responsables de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1β, l'IL-6 et l'IL-8, et préviennent d'éventuels dommages tissulaires ou de signes inflammatoires, en parcourant l'organisme (146, 218, 225, 226).

### **1.3.6 Les lymphocytes T**

Les cellules T sont des composants cellulaires de l'immunité adaptative qui contribuent au bon fonctionnement du système immunitaire. Après différentes sélections positives et négatives dans le thymus, nommé la tolérance centrale, les thymocytes terminent leur maturation et deviennent des lymphocytes T matures, dits « naïfs ». Ils peuvent alors reconnaître

des antigènes étrangers présentés par des APCs, via les molécules du CMH-I/II, dépendamment du corécepteur de surface, CD8 ou CD4, qu'ils expriment (227).

L'interaction antigénique avec les lymphocytes T naïfs dicte le type de cellules T effectrices qui seront générées et la nature des populations mémoires produites.

### 1.3.6.1 Les cellules T des muqueuses

Quelques études récentes ont quantifié des sous-ensembles de lymphocytes dans le col utérin et il en résulte que les lymphocytes T sont majoritairement plus abondants que les lymphocytes B, et la plupart d'entre eux sont des cellules T mémoires effectrices (95, 99, 228).

Parmi elles, on distingue des lymphocytes T mémoires non circulants ( $T_{RM}$ ), qui résident dans les tissus non lymphoïdes comme les poumons, la peau, le foie, les muqueuses intestinales et génitales (229, 230). Ces cellules expriment divers marqueurs à leur surface, dont la lectine CD69 et le CD103. Le CD69 permet de distinguer les cellules T mémoires circulantes des cellules T mémoires résidentes; et l'expression de CD103 est limitée à une sous-population de lymphocytes  $T_{RM} CD8^+$  (231).

Dans le cadre de l'infection par le VIH-1, les  $T_{RM} CD8^+$  de profil  $CD69^+CD103^+CCR7^-CD62L^-$  ont été retrouvés dans le TGF des femmes séropositives et séronégatives. Toutefois, les femmes infectées présentent une diminution de l'expression de CD103 (232). De plus, certaines études ont démontré que les cellules  $T_{RM} CD4^+CD69^+$  utérines expriment certains marqueurs de sensibilité au VIH-1 comme le CCR5, ce qui pourrait entraîner la dissémination virale dans les tissus lymphoïdes, après leur infection (233). Ceci confirme l'étude faite sur le modèle animal où les cellules  $T_{RM} CD4^+CD69^+$  de type Th17 qui prédominent dans la muqueuse génitale, sont la principale cible du virus (234-236). En conséquence, elles pourraient contribuer à l'établissement de réservoirs viraux et donc à la persistance du VIH-1, notamment chez les patients sous ART (237-239).



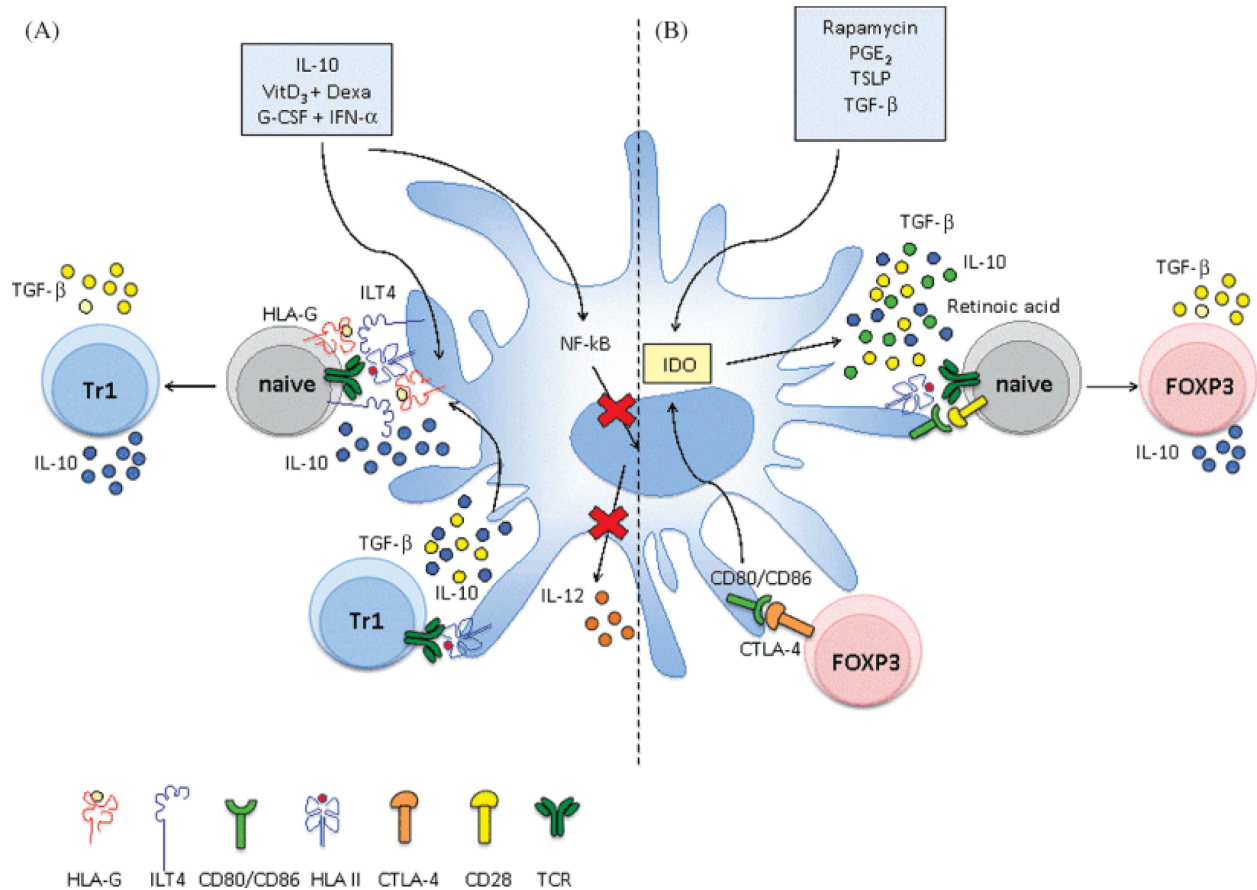
### 1.3.6.2 Les cellules T régulatrices

Les lymphocytes T régulateurs ( $CD4^+CD25^+$ ) générés dans le thymus sont essentiels au maintien de l'homéostasie immunitaire et à la suppression des cellules T autoréactives existant naturellement (240, 241). Il existe plusieurs sous-ensembles de  $T_{regs}$  et une variété de mécanismes suppressifs qu'ils utilisent. Les deux principaux sous-types de  $T_{regs}$  comprennent les  $T_{regs}$  naturels ( $nT_{regs}$ ) et les  $T_{regs}$  induits ( $iT_{regs}$ ), chacun exprimant le facteur de transcription FOXP3, avec toutefois différents niveaux de méthylation au sein du gène (242) (Fig. 1.8).

Plusieurs études ont montré que la différenciation des  $nT_{regs}$  provenant du thymus dépend de la force de l'interaction et de la durée du signal du TCR (243). Cependant, d'autres molécules comme NFAT/AP1, ICOS/ICOSL et PD-1/PD-L1 sont également impliquées dans le contrôle transcriptionnel de la différenciation des  $nT_{regs}$  chez l'humain (244, 245). L'expression du facteur de transcription FOXP3 nécessite la présence de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-7, mais également l'expression des membres de la famille des récepteurs nucléaires NR4A (246).

Les cellules  $iT_{regs}$  proviennent de la différenciation des LT- $CD4^+$  naïfs en périphérie. Leur différenciation nécessite de faibles concentrations de molécules costimulatrices et la sécrétion de molécules anti-inflammatoires par les DC-10 (247). Parmi elles, on distingue des cellules T régulatrices de type 1 ( $T_{r1}$ ) qui expriment généralement FOXP3 de façon transitoire (248) et sont caractérisées par leur capacité à produire de l'IL-10 (249). Ces cellules possèdent une capacité de suppression puissante (250), en inhibant les réponses des LT- $CD4^+$  par le biais de mécanismes dépendants et indépendants de l'IL-10 (251).

Fait intéressant, les  $T_{regs}$  sont impliquées dans l'infection par le VIH-1 et favorisent la formation de réservoirs. Des études effectuées chez les macaques infectés au SIV sans traitement ont démontré que les  $T_{regs}$  de la muqueuse intestinale contenaient des fréquences plus élevées de provirus par rapport aux LT- $CD4^+$  (252, 253). Ainsi, étant donné la longue durée de vie et leur résistance à l'apoptose, les  $T_{regs}$  pourraient constituer un obstacle à l'éradication du VIH-1.



**Figure 1.8. Induction des cellules T régulatrices par les DCs tolérrogéniques.** (A) Les molécules telles que l'IL-10, le G-CSF, l'IFN- $\alpha$ , la vitamine D<sub>3</sub> et la dexaméthasone favorisent l'induction de DCs tolérrogéniques et l'augmentation des molécules de surface comme ILT-4 et HLA-G. L'interaction ILT4/HLA-G favorise l'induction des cellules T<sub>r1</sub> grâce aux niveaux élevés d'IL-10 produits par les DCs tolérrogéniques. (B) La présence de rapamycine, de PGE<sub>2</sub>, de TSLP ou de TGF- $\beta$ , favorisent la production d'IL-10 et l'expression de l'IDO qui à son tour, induit TGF- $\beta$  et l'AR. Tout ceci entraîne le développement de cellules T<sub>regs</sub> (FOXP3<sup>+</sup>). De même, l'activation des cellules T<sub>r1</sub> ou de T<sub>regs</sub> favorisent l'induction de DCs tolérrogéniques. PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub>. *Reproduit avec la permission de John Wiley and Sons : HLA: Immune response genetics (254), copyright (2011). Numéro de licence 4825721064324.*

### 1.3.7 Les lymphocytes B

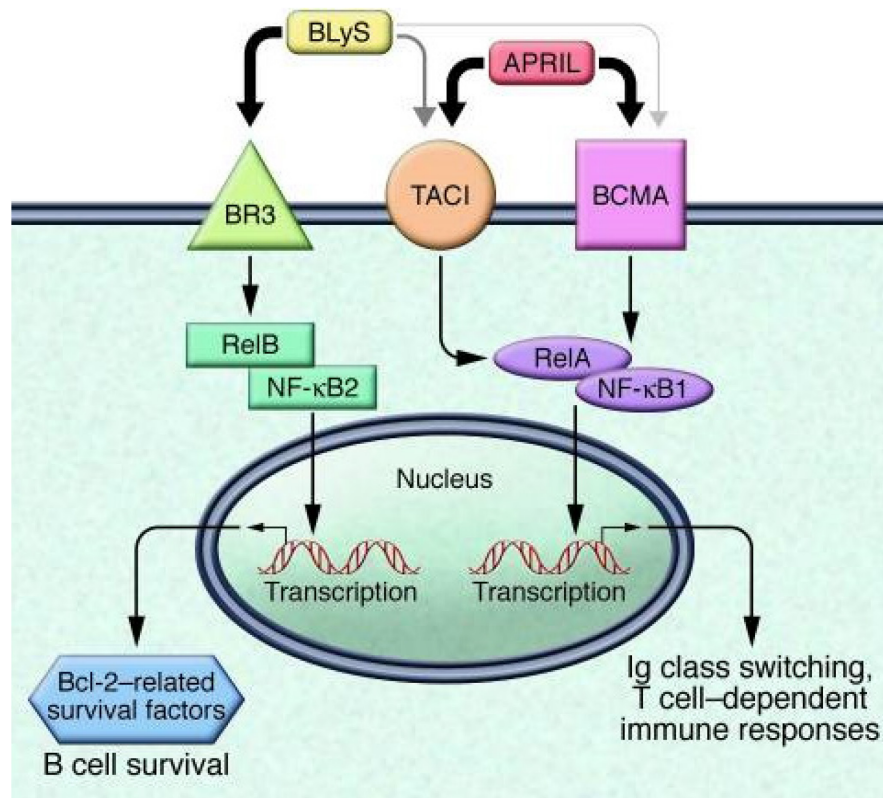
Les cellules B font, elles aussi, partie de l'immunité adaptative et jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte par la sécrétion d'anticorps. La tolérance centrale fait référence aux mécanismes de régulation et de sélection qui se produisent dès les premiers stades du développement des cellules B dans la moelle osseuse. À ce stade, ces cellules B de type CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> sont dites immatures et expriment à leur surface le complexe membranaire BCR (*B-cell receptor*). En fonction de la force de la signalisation de leur BCR, ces cellules terminent leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires au sein des follicules et peuvent se différencier en deux sous-populations.

Ainsi, de faibles signaux du BCR de ces cellules B immatures favoriseront leur migration vers la zone marginale (MZ) de la rate où elles deviendront des cellules B matures de la MZ; leur différenciation est influencée et stimulée majoritairement par le stimulateur des lymphocytes B (BLyS/BAFF), mais également par les voies de signalisation Notch2 et NF-κB (255). En revanche, de forts signaux du BCR des cellules B immatures les dirigeront vers le centre germinatif (CG) où elles interagiront avec les lymphocytes T pour devenir des cellules B matures folliculaires (252, 256, 257). Les mécanismes de tolérance qui surviennent à ces stades sont appelés tolérance périphérique et, lors d'inflammations chroniques, comme l'infection par le VIH-1 ou lors de maladies auto-immunes, ces mécanismes sont altérés avec un dysfonctionnement du compartiment des lymphocytes B (258).

#### 1.3.7.1 Le stimulateur des Lymphocytes B

Le stimulateur des lymphocytes B, BLyS, également appelé BAFF, est un élément essentiel de la réponse immunitaire innée. C'est une cytokine costimulatrice qui appartient à la superfamille du TNF ligand. Elle est exprimée sous forme trimérique à la surface de nombreuses cellules, telles que les neutrophiles activés (259), les monocytes et les macrophages (260), les DCs (261) et les lymphocytes T activés (262). Elle sera ensuite clivée par une furine puis relâchée sous forme soluble.

BLyS/BAFF peut se lier à trois récepteurs : le récepteur BLyS 3, (ou BR3 ou BAFF-R), le récepteur de l'antigène de maturation des cellules B, BCMA, et l'activateur transmembranaire-1 et modulateur du calcium et ligand de la cyclophiline, TACI (Fig. 1.9).



**Figure 1.9. BLyS et ses récepteurs.** BLyS/BAFF se lie plus fortement à son récepteur BR3 qu'à TACI ou BCMA, alors qu'APRIL présente une plus grande affinité pour les récepteurs TACI et BCMA par rapport à BLyS/BAFF. Les signaux de BLyS via le BR3 agissent principalement par l'activation de la voie non classique, NF-κB2, ce qui facilite la régulation à la hausse de plusieurs membres de la famille des anti-apoptotiques Bcl-2. La liaison de BLyS ou APRIL aux récepteurs TACI ou BCMA entraîne l'activation de NF-κB1, influençant ainsi la différenciation des lymphocytes B et la commutation de classe des immunoglobulines. *D'après Khamashta M.A et al., 2009 (264), J Clin Invest. Licence <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.*

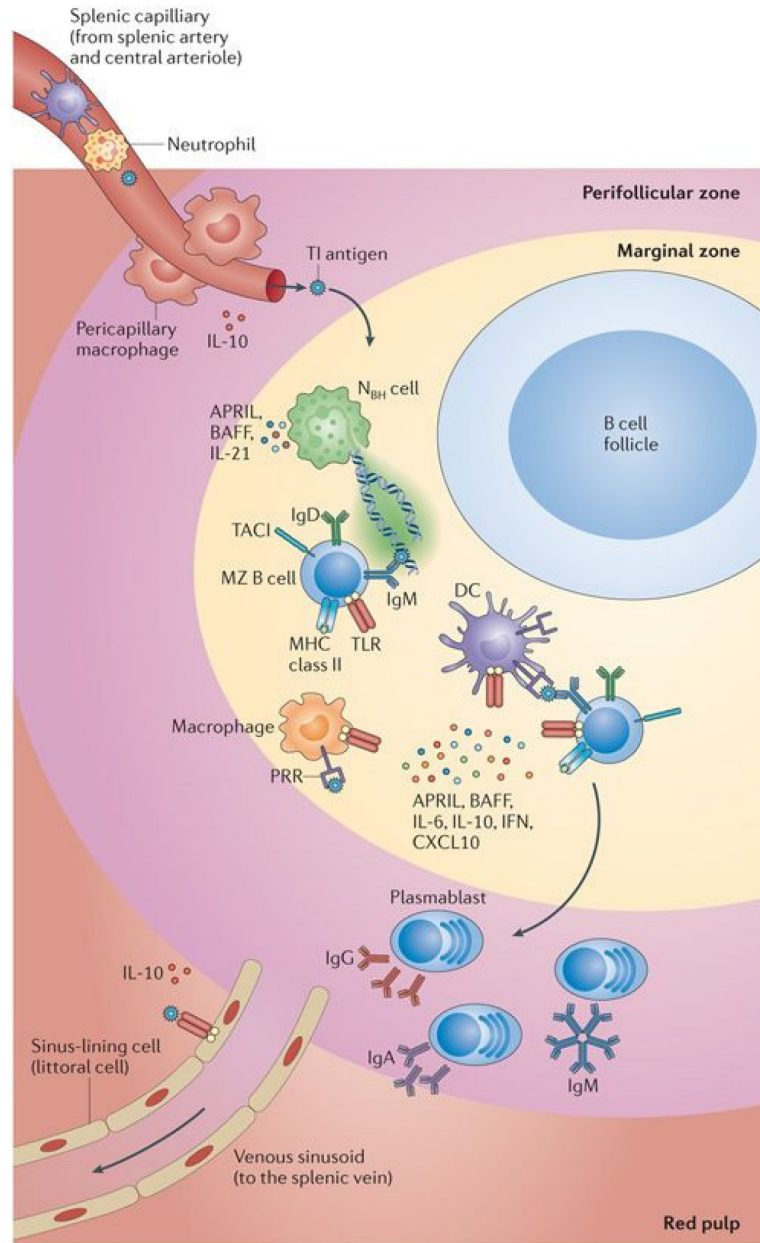
Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que BLyS/BAFF favorise la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire des lymphocytes B, mais augmente également les niveaux d'immunoglobulines sériques. Chez la souris, il a été démontré que la suppression de BLyS/BAFF ou de son récepteur BCR3 entraîne la perte de cellules B périphériques matures (263).

En plus de la costimulation des lymphocytes T, BLyS/BAFF améliore les réponses immunitaires humorales indépendantes et dépendantes des cellules T (265-267). Son expression et sa sécrétion sont influencées par les PRRS, comme les TLRs, mais également par certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-2, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (259, 260, 268). Néanmoins, les données scientifiques ont établi qu'un blocage thérapeutique de BLyS/BAFF reste nécessaire pour traiter et améliorer certains cancer (269) et maladies auto-immunes (270, 271), suggérant ainsi un lien entre la surexpression de BLyS/BAFF et le développement de maladies inflammatoires.

### **1.3.7.2 Les lymphocytes B de la zone marginale**

La zone marginale est un compartiment anatomique localisé au pourtour des CG et qui, en plus d'avoir les cellules B, contient d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles, les macrophages et les *mDCs* (187). Chez l'humain, les cellules B de la MZ sont localisées dans la rate. Elles ont la capacité de recirculer en périphérie puis sont retrouvées généralement dans les ganglions, les amygdales et dans certains tissus lymphoïdes au sein des muqueuses (256, 272). Ainsi, ces cellules de la MZ sont parmi les premières à entrer en contact avec l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires (Fig. 1.10).

Possédant un BCR polyréactif, les cellules B de la MZ sont dites innées ou de première ligne et ont la capacité à réagir rapidement à l'antigène. Elles sont capables de reconnaître plusieurs PAMPs, à l'aide des lectines et de nombreux TLRs présents à leur surface (252). Leur seuil d'activation est donc beaucoup plus faible que celui des cellules B folliculaires (273).



**Figure 1.10 Réponses indépendantes des LT par les cellules B humaines MZ.** Les antigènes T pénètrent dans la MZ et peuvent être capturés par des neutrophiles auxiliaires des cellules B ( $N_{BH}$ ) qui se différencient en neutrophiles circulants suite à la production d'IL-10. La capture antigénique peut également impliquer des macrophages, des cellules tapissant le sinus et des DCs. Ces cellules libèrent BAFF et d'autres cytokines qui iront se fixer sur leur récepteur respectif, engendrant ainsi l'activation des cellules B de la MZ et leur différenciation en plasmocytes à court terme pour la sécrétion d'Igs. *PALS, gaine lymphoïde périartériolaire. Reproduction avec la permission de Springer Nature : Nature Reviews Immunology (256), copyright (2013). Numéro de licence 4745661039371.*

Le haut niveau d'expression d'IgM, du récepteur du complément CD21, du récepteur de costimulation CD27 et de la glycoprotéine CD38 (tous deux impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules B), de CD1 ainsi que des molécules costimulatrices CD80 et CD86 à la surface des LB de la MZ, facilite la capture antigénique (273, 274). En effet, ces cellules nécessitent un double engagement des récepteurs antigéniques microbiens avec des signaux de stimulations provenant des DCs, des macrophages et des neutrophiles via diverses cytokines comme BLYS/BAFF, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-21, l'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  et CXCL10. Leur BCR étant stimulé, les cellules B se différencient en plasmocytes, sans l'aide des cellules T. Ces plasmocytes produiront des IgM, mais également des IgG et des IgA à la suite de commutations isotypiques, en réponse à des antigènes de la flore commensale qui migreront de la muqueuse intestinale vers la périphérie en l'absence d'infection. Cette réponse humorale innée génère alors une série d'immunoglobulines prêtes à agir, offrant une ligne de défense systématiquement rapide contre les agents pathogènes et les bactéries commensales qui franchissent la barrière muqueuse (256).

### **1.3.7.3 Les fonctions des immunoglobulines**

Appartenant à la superfamille des immunoglobulines, les anticorps sont présents sous formes membranaire et soluble (275). Il existe cinq isotypes : les IgM, les IgD, les IgG, les IgA et les IgE, qui diffèrent tous au niveau de la région constante de la chaîne lourde, mais peuvent être identiques au niveau du site de liaison à l'antigène (276).

Les IgM sont présentes à la surface des cellules B lors de l'expression du BCR. Une fois sécrétées, elles reconnaissent divers déterminants microbiens et auto-antigènes, puis les éliminent efficacement. Sous forme pentamérique, elles participent aux réponses de première ligne en jouant un rôle dans l'agglutination des antigènes et de facilitant à l'activation du complément (277).

Les IgD, co-exprimées avec les IgM à la surface des cellules B, ont tendance à diminuer leur niveau d'expression au fur et à mesure de la différenciation des cellules B. Elles sont connues pour être polyréactives et jouent un rôle dans l'anergie des cellules B via des voies tolérogéniques (278). Les IgD sécrétées semblent renforcer l'homéostasie et la surveillance

immunitaire des muqueuses en réagissant contre les antigènes mucosaux, notamment les microbes commensaux et les pathogènes (279).

Les IgG sont des immunoglobulines circulantes les plus abondantes et jouent un rôle important dans l'infection. Elles ont la capacité d'activer le complément, de se rendre aux muqueuses génitales et de traverser le lumen via notamment le récepteur FcRn (280). On distingue quatre sous-types chez l'humain. Les IgG<sub>1</sub> constituent la principale sous-classe représentant 60 % des IgG sériques et sont les plus abondantes dans le sérum. Ce sont de puissants effecteurs de neutralisation et elles peuvent déclencher l'ADCC, l'opsonisation ainsi que la cytotoxicité dépendante du complément. Elles peuvent donc présenter une réponse antibactérienne et antivirale (281). Les IgG<sub>2</sub> représentent 32 % des IgG sériques et sont capables de se lier aux antigènes bactériens polysaccharidiques capsulaires (282). Elles présentent une résistance accrue aux protéases microbiennes (283), activent principalement la cascade de complément par la voie alternative (284) ainsi que l'ADCC via les macrophages et des leucocytes polynucléaires (285). Les IgG<sub>3</sub>, représentant 4 % des IgG en périphérie, participent également aux réponses virales et bactériennes, et peuvent déclencher l'ADCC. Ce sont de puissants pro-inflammatoires et, tout comme les IgG<sub>1</sub>, elles peuvent traverser la barrière placentaire, protégeant ainsi le fœtus des pathogènes (286); elles sont également très efficaces dans l'induction de fonctions effectrices. Les IgG<sub>4</sub> ont un rôle protecteur dans l'allergie en bloquant et en inhibant la dégranulation des mastocytes; toutefois, elles entravent l'immunité antitumorale induite par IgG<sub>1</sub> dans les mélanomes (287).

Les IgA jouent un rôle particulièrement au sein des muqueuses intestinales, pulmonaires et génitales. On distingue les IgA<sub>1</sub> qui sont sécrétées sous forme monomériques et qui sont particulièrement abondantes en périphérie; et les IgA<sub>2</sub> qui interviennent dans les muqueuses sous formes dimériques (288). Ces dernières sont produites dans la lamina propria par les plasmocytes locaux, principalement sous forme dimérique (dIgA) et sont rapidement exportées vers le lumen. Par la suite, elles seront sécrétées sous forme sécrétoire (SIgA) via le récepteur polymérique des Ig (pIgR). Elles peuvent assurer la protection de l'hôte en piégeant, en neutralisant et en empêchant la transcytose (258).

Les IgE, quant à eux sont des isotypes impliqués dans les mécanismes allergiques via des récepteurs de très haute affinité sur les mastocytes et les polynucléaires basophiles (289).



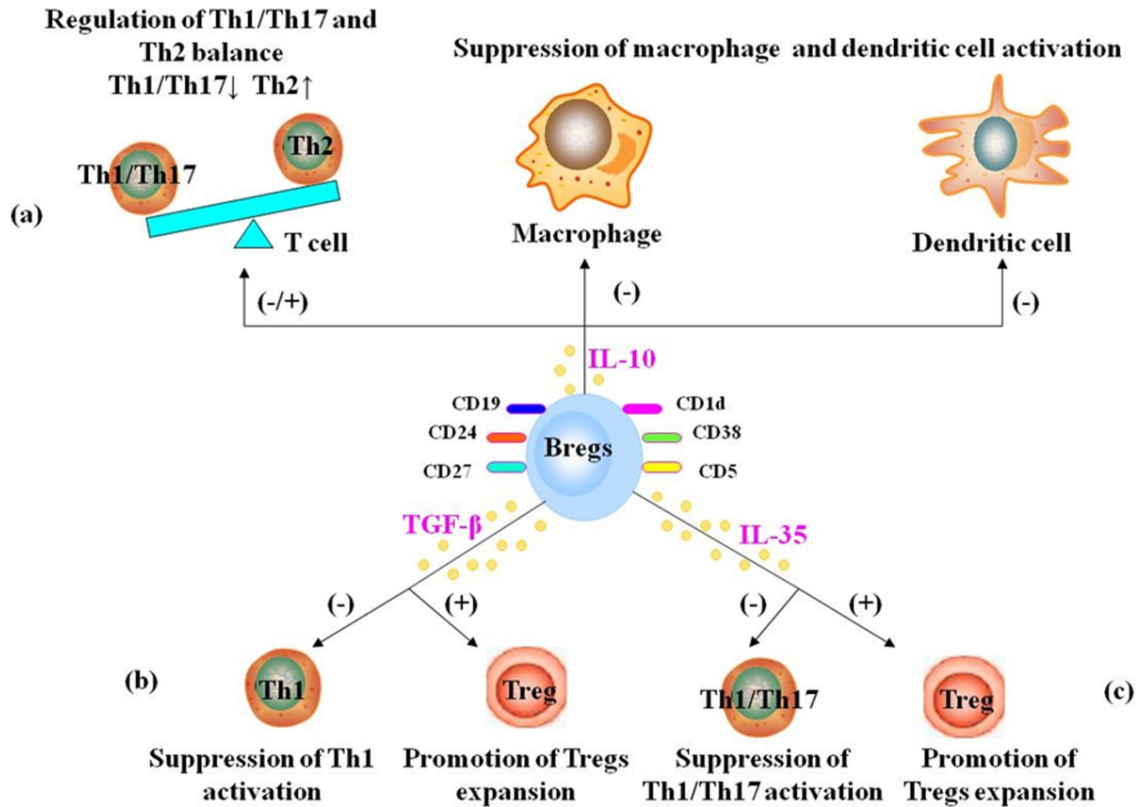
#### 1.3.7.4 Les cellules B des muqueuses

La fonction des lymphocytes B aux muqueuses a pour principal objectif de collaborer avec les cellules épithéliales des muqueuses afin de fournir une défense de première ligne à l'hôte, par la sécrétion majoritaire d'IgA. Pour se faire, ces lymphocytes B subissent une commutation de classe prédominante en IgA, aboutissant à une différenciation finale en plasmocytes (290). Des études faites dans la muqueuse intestinale montrent qu'une stimulation par BLYS/BAFF et APRIL favorisent la survie des cellules sécrétrices d'anticorps, ASC, de type IgA (291). De plus, la liaison de CD40 et son ligand CD40L, entre les cellules B et les cellules T folliculaires (Tfh) du CG respectivement (261), et celle du TGF- $\beta$  et de son récepteur, induirait également des réponses IgA par les cellules B humaines (292). En effet, TGF- $\beta$  est le facteur de commutation essentiel et son absence sur les cellules B entraînerait une réduction significative du nombre de plasmocytes qui sécrètent des IgA (148, 149).

Récemment, l'équipe d'Iwasaki a démontré que les cellules B retrouvées dans le TGF des souris sont majoritairement des cellules B mémoires (293). Étant donné la très faible quantité d'anticorps circulants qui pénètre dans le TGF, les T<sub>RM</sub> CD4<sup>+</sup> du TGF jouent un rôle essentiel dans le recrutement de cellules B mémoires circulantes au sein de la muqueuse vaginale (294). En effet, ces T<sub>RM</sub> CD4<sup>+</sup> qui expriment CXCR3, sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et induisent des niveaux élevés de CXCL9 et de CXCL10. Ces dernières participent au recrutement des cellules B mémoires et aux sécrétions ultérieures d'anticorps dans le TGF (293).

#### 1.3.7.5 Les cellules B régulatrices

Les cellules B régulatrices, B<sub>regs</sub>, sont des cellules dites immunosuppressives. Elles sont caractérisées par leur capacité à produire de l'IL-10, du TGF- $\beta$  et de l'IL-35 (295) (Fig. 1.11). Ces cellules ont été identifiées comme ayant un profil CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et jouant un rôle crucial dans la régulation des réponses inflammatoires (296). Dans des conditions de maladies auto-immunes, en plus d'être minoritaires, elles sont fonctionnellement défectueuses. Elles ne sont donc ni en mesure de sécréter de l'IL-10, ni de supprimer les cellules T effectrices Th1 (296).



**Figure 1.11. Rôles des cellules B régulatrices dans la réponse immunitaire. (a)** Les B<sub>regs</sub> producteurs d'IL-10 suppriment la différenciation des cellules T effectrices Th1/Th17 et améliorent la polarisation Th2. Ils suppriment également l'activation des macrophages et des DCs. **(b)** Les B<sub>regs</sub>, également producteurs de TGF-β, suppriment l'activation des Th1 et favorisent l'expansion des T<sub>regs</sub>. **(c)** En sécrétant l'IL35, les B<sub>regs</sub> suppriment l'activation des Th1/Th17 et favorisent l'expansion des T<sub>regs</sub>. D'après Han J. et al., *J Neurosci Res.* (2016) (299). 10.1002/jnr.23749.

Dans le cadre du VIH-1, les patients séropositifs présentent un nombre beaucoup plus élevé des cellules B<sub>regs</sub> CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> par rapport aux individus sains. Ce nombre élevé de B<sub>regs</sub> entraîne la sécrétion de l'IL-10, du TGF-β et de l'IL-35, mais également la sécrétion de la protéase granzyme, après la stimulation du BCR et du CD40 (297), conduisant ainsi à la suppression des lymphocytes T effecteurs (298).

Toutefois, il est difficile de caractériser la population B<sub>regs</sub> de façon précise. Contrairement aux cellules T régulatrices qui ont été associées au facteur de transcription

FOXP3, il n'existe actuellement aucun facteur de transcription connu qui identifie de façon spécifique la population des cellules B régulatrices.

Notre équipe a récemment démontré que ces cellules co-expriment de hauts niveaux de molécules immunorégulatrices de surface CD39, CD73 et de CD83, à l'état basal (300). En effet, les protéines CD39 et CD73 sont connues pour intervenir dans les voies de signalisation de l'adénosine et sont associées aux cellules régulatrices T et B (301). De plus, l'expression de gènes des récepteurs nucléaires NR4A1, -2 et -3 a été observée dans les cellules B innées de la MZ *ex vivo* (300). Les récepteurs nucléaires NR4A sont connus pour être associés à la fonction régulatrice des  $T_{\text{regs}}$  en favorisant directement l'expression du facteur de transcription FOXP3 (246). Ce sont donc d'importants régulateurs de la réponse inflammatoire qui peuvent être transitoirement régulés à la hausse après une stimulation via le TCR ou le BCR (302). Ces nouvelles observations éclairent un peu plus le potentiel des  $B_{\text{regs}}$  au sein des populations B innées de la MZ, et les récepteurs NR4A1-3, nouvellement identifiés comme marqueurs potentiels des  $B_{\text{regs}}$  et des  $T_{\text{regs}}$  pourraient être impliqués dans le statut de cellules B régulatrices.

#### **1.4 Les molécules d'intérêts pour cette étude**

Il existe plusieurs molécules qui sont impliquées dans la tolérance aux muqueuses. Elles favorisent en partie la polarisation des cellules effectrices en cellules régulatrices et la sécrétion des IgA par les cellules B. Ces molécules et bien d'autres contribuent à l'homéostasie immunitaire des muqueuses en jouant un rôle clé dans la régulation de la réponse immunitaire face aux infections.

##### **1.4.1 La cytokine IL-10**

L'IL-10 est une cytokine immunomodulatrice qui joue un rôle central dans le contrôle de l'inflammation, dans l'inhibition des réponses immunitaires et dans l'induction de la tolérance (303). Elle diminue le niveau d'expression du CMH-II et des molécules de

costimulations telles que le CD80 et le CD86, sur des DCs (304). La présence d'IL-10 dans les DCs matures (305), ou encore l'exposition des DCs immatures à l'IL-10 (306), inhibent la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TNF $\alpha$  et d'IL-12 (303, 307). En revanche, l'IL-10 régule à la hausse l'expression de HLA-G (voir paragraphe suivant) (308), de l'ILT2 et l'ILT4 (309) sur les précurseurs des DCs, ce qui permet aux DCs d'induire les T<sub>regs</sub> et les B<sub>regs</sub> par la suite. De plus, l'IL-10 joue un rôle important dans la génération des cellules T et B régulatrices, en périphérie et dans les muqueuses (310).

#### 1.4.2 HLA-G et ses récepteurs

HLA-G est une molécule non classique d'histocompatibilité majeure de classe I. Elle se caractérise par un polymorphisme allélique relativement faible et une distribution tissulaire fortement restreinte par rapport aux molécules HLA classiques de classe I. Au niveau structural, HLA-G peut générer sept isoformes différents, soit membranaires (HLA-G1, -G2, -G3 et -G4) et solubles (HLA-G1, -G5, -G6 et -G7) (311).

HLA-G est un des ligands des récepteurs de transcrit analogue à l'immunoglobuline, l'ILT2 et l'ILT4 (312). Ces récepteurs sont exprimés par des sous-populations de lymphocytes T et B, de cellules NK et par des monocytes, des macrophages et des DCs (313). En raison de la fonctionnalité de ces récepteurs et de leur profil d'expression, HLA-G a la capacité de moduler la réponse du système immunitaire adaptatif et inné. Elle confère au fœtus une protection semi-allogénique vis-à-vis du système immunitaire maternel, en empêchant le rejet du fœtus et permettre l'implantation de l'ovule fécondé (314). Elle semble également agir comme inducteur de tolérance lors de greffes d'organes, mais également lors de certains cancers et de certaines maladies infectieuses (315). L'interaction de HLA-G avec l'IL-4 induit la production des cellules T<sub>H1</sub> par l'intermédiaire des DC-10.

Par ailleurs, des études de notre laboratoire ont démontré que des niveaux élevés de HLA-G soluble dans la muqueuse vaginale sont associés à une infection par le VIH-1 (4, 5). En effet, les molécules solubles de HLA-G étant générées à la suite du clivage de l'isoforme HLA-G1 membranaire sous la forme soluble HLA-G5, le VIH-1 peut réguler à la baisse l'expression

de surface de HLA-G1 grâce à un mécanisme dépendant de Vpu (316). Ainsi, il se pourrait que le virus réduise le niveau d'expression membranaire de HLA-G1, augmentant ainsi son clivage et le taux de HLA-G soluble chez les personnes infectées par le VIH-1.

### 1.4.3 Les interférons

Détectés par de nombreux PRRs, les infections virales déclenchent de multiples cascades de signalisation aboutissant à la libération, entre autres, de molécules d'interférons (IFN). Ce sont des cytokines pro-inflammatoires et immunomodulatrices qui induisent un état antiviral chez l'hôte, aboutissant ainsi au blocage de la réplication du virus. Elles sont essentiellement produites par les *p*DCs et reconnaissent un même récepteur, IFNR, entraînant la régulation à la hausse d'ISG (317).

Un certain nombre de PRRs sont impliqués dans la détection du VIH-1, y compris les TLR7 qui reconnaissent l'ARN viral dans les endosomes. L'activation de TLR7 provoque le recrutement du gène MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), ce qui conduit à l'induction de l'IFN et de d'autres cytokines par l'activation des facteurs de transcription IRF7 et NF- $\kappa$ B (318). Des études *in vitro* ont montré que les *p*DCs peuvent détecter efficacement les particules libres du VIH-1 ainsi que les cellules infectées par le virus, conduisant à la production de niveaux élevés d'IFN- $\alpha$  (319). De plus, chez les macaques infectés par le SIV, l'arrêt de la production d'IFN est fortement associé à l'épuisement des *p*DCs (320) et au blocage de TLR7. Il s'en suit d'une diminution de la production d'IFN (321) soulignant davantage l'importance de la détection des TLRs *in vivo*.

Toutefois, une production accrue d'IFN peut être délétère pour l'organisme. En effet, des niveaux constamment élevés d'ISG et d'IFN- $\alpha$  seraient associés à une augmentation significative de l'expression de l'ARNm corécepteur CCR5 du VIH-1 et à la déplétion des LT-CD4<sup>+</sup> (322). Ainsi, ces IFN peuvent supprimer la réplication du virus, mais, en excès, ils sont capables de mener à la suppression des LT-CD4<sup>+</sup>, ce qui aboutirait à l'évolution de l'infection par le VIH-1.

#### 1.4.4 Les molécules « *check point* » d'intérêt pour cette étude

Le maintien de l'homéostasie immunitaire est essentiel à la survie de l'hôte. Les réponses immunitaires incontrôlées face aux agents pathogènes peuvent provoquer des lésions inflammatoires des tissus. Ainsi, l'emploi de molécules « *check point* » par le système immunitaire reste nécessaire afin de protéger l'hôte contre les dommages cellulaires.

La molécule PD-1 (*Programmed cell death 1*) ou CD279 est une protéine exprimée à la surface des lymphocytes T activés, qui a deux ligands PD-L1 (CD274) et PD-L2 (CD273). PD-L1 est régulée par IFN-I et IFN- $\gamma$  (323, 324) et exprimée de manière constitutive sur les DCs immatures, ainsi que sur d'autres cellules immunitaires et non immunes comme les cellules épithéliales, stromales et cancéreuses. PD-L2 est exprimée uniquement sur les APCs, à savoir les DCs, les lymphocytes B du CG et les macrophages (325). Un des mécanismes des DCs tolérogéniques pour induire les iT<sub>regs</sub> est obtenu par la signalisation de PD-1. En effet, l'interaction PD-1/PD-L1 limiterait la survie et la prolifération des cellules T effectrices (326) mais favoriserait la différenciation des cellules T régulatrices (327).

La molécule CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) ou CD152 est un récepteur membranaire exprimé à la surface des lymphocytes T activés. Il agit principalement en entrant en compétition avec le récepteur CD28, pour se lier aux ligands B7 sur les APCs. En effet, les récepteurs CD28, également localisés sur les cellules T activés, se lient aux ligands B7 (avec une affinité inférieure par rapport à CTLA-4) et fournissent le deuxième signal d'activation essentiel pour l'activation des lymphocytes T (328). Toutefois, les cellules T<sub>regs</sub> expriment également CTLA-4, en raison du niveau d'expression de FOXP3, ce qui pourrait médier à la suppression des cellules cibles (325). Les études faites chez l'humain ont démontré que l'expression de CTLA-4 est régulée à la hausse lors d'infections par le VIH-1 mais également dans d'autres infections, et un blocage *in vitro* de CTLA-4 sur les LT-CD4<sup>+</sup> pourrait augmenter leur spécificité face au virus (329).

Une autre molécule de régulation importante est ICOS (*Inducible T cell Costimulator*) ou CD278. C'est une molécule exprimée sur les cellules LT-CD4<sup>+</sup> après l'activation du TCR (330), qui interagit spécifiquement avec son ligand, ICOSL, sur les APCs (331). De manière générale, ICOS régule la croissance, la prolifération et la survie des lymphocytes T

dépendamment du milieu environnant, à savoir s'il y a présence d'inflammation ou non (332). Les DCs immatures expriment de grandes quantités d'ICOSL à leur surface, ce qui est important puisque, lors d'une faible stimulation par le CD28 des lymphocytes T, un fort signal d'ICOS sera émis par les cellules T. Ce signal stabilisera le récepteur de l'IL-10 à la surface des lymphocytes T stimulés, entraînant alors la prolifération des cellules iT<sub>regs</sub> (333). Ainsi, l'interaction ICOS/ICOSL est nécessaire pour l'induction des T<sub>regs</sub> ou pour le maintien de la tolérance périphérique (334, 335).

Étant un homologue de CD4, LAG-3 (*Lymphocyte-activation gene 3*) ou CD223 est principalement exprimé sur les LT-CD4<sup>+</sup>, LT-CD8<sup>+</sup> et les cellules NK activées qui résident dans les organes lymphoïdes secondaires infectés ou tumoraux (336). En plus d'être importante à l'expansion et à l'homéostasie des cellules T effectrices (337), LAG-3 possède une activité régulatrice nécessaire à la fonction des cellules T<sub>RI</sub> (338) et constitue donc un marqueur phénotypique des iT<sub>regs</sub> indépendants de FOXP3, mais producteurs d'IL-10 (339).

## **1.5 Les modèles de transmission et d'infection du VIH-1 dans le tractus génital féminin**

Après un contact avec le VIH-1 lors de rapport hétérosexuel, la dissémination du virus vers les organes lymphoïdes secondaires peut se produire très rapidement en quelques heures (340). La mise en place de réponses adaptatives efficaces contre le virus pouvant aller jusqu'à quelques semaines, c'est la réponse innée qui, par des mécanismes de défense non spécifiques, intervient afin de limiter la dispersion du virus dans l'organisme.

Jusqu'à présent, les mécanismes conduisant à l'infection par le VIH-1 dans le TGF ne sont pas encore clairs. Les modèles actuels de transmission sexuelle du VIH-1 sont largement basés sur les études faites dans le GALT (160), mais également sur les études de transmission du SIV chez le macaque rhésus (340).

Les cellules épithéliales qui tapissent la muqueuse vaginale et de l'exocol sont généralement serrées/stratifiées et en monocouche, respectivement. Toutefois, des lésions préexistantes, à la suite d'IST ou de relations sexuelles violentes, altèrent l'étanchéité des cellules épithéliales. Ces lésions favorisent l'inflammation et augmentent ainsi les probabilités

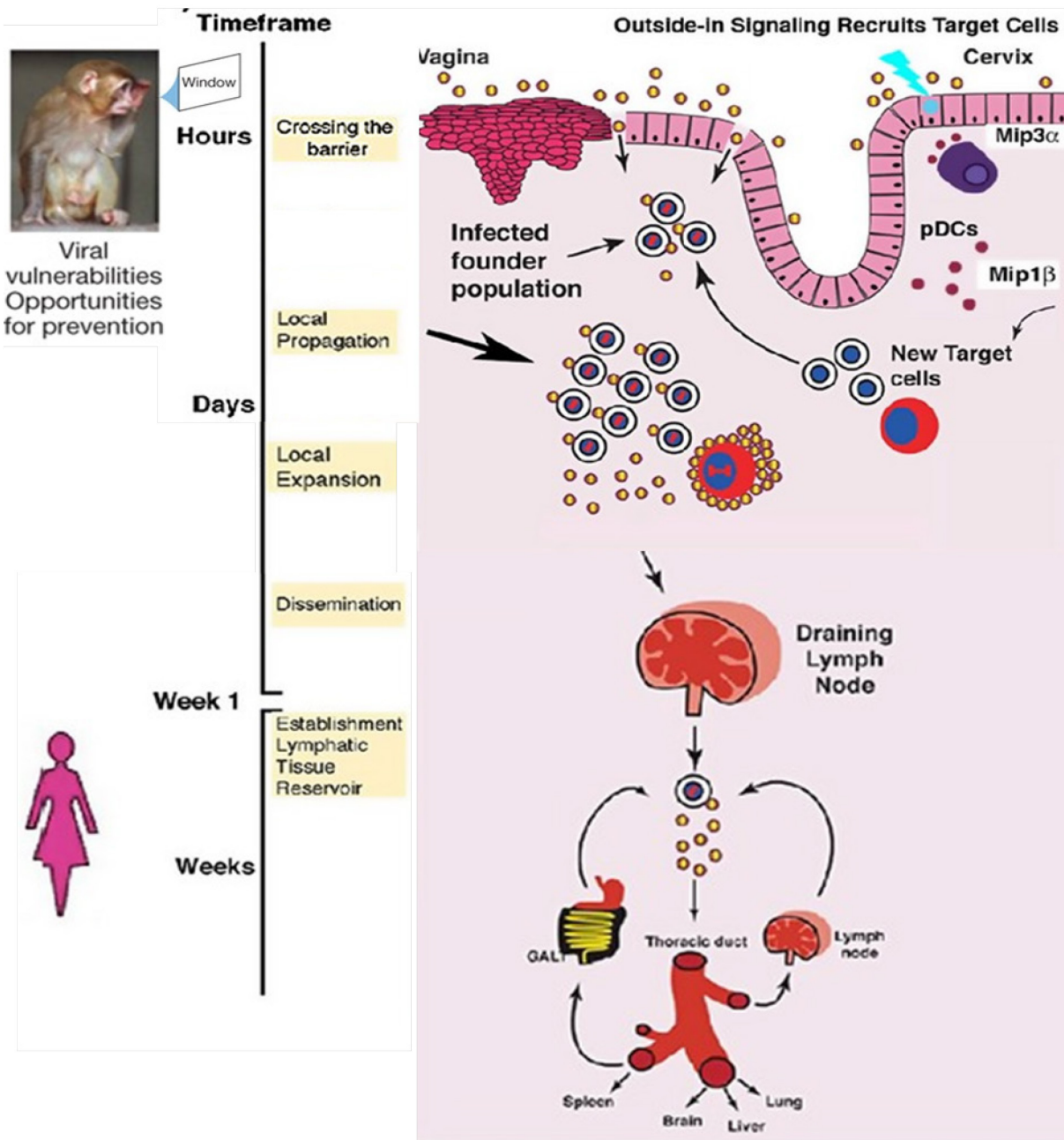
d'une infection, à la suite du recrutement de cellules cibles. De plus, dans le contexte d'une infection précoce par le VIH-1, l'intégrité de cette barrière épithéliale est influencée par des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF (147), mais également par une activité soutenue des cellules Th17 (341). Tout ceci augmente les risques de translocation microbienne et d'infection chronique (160).

Les cellules épithéliales ne possédant pas de CD4, utilisent le récepteur de glycosphingolipide, GalCer, localisé à leur surface (162). Ce dernier se lie aux glycoprotéines gp120 et gp41 du VIH-1 (342), favorisant ainsi la transcytose du virus à travers la barrière épithéliale (147, 161, 343) puis son transfert aux DCs et aux cellules cibles (6, 46, 344). Bien que les DCs immatures puissent être infectées par le VIH-1, elles expriment de puissants facteurs de restriction tels que SAMHD1 (345), les empêchant donc d'être une cible principale pour le virus. Autre fait intéressant, le VIH-1 peut être intériorisé par les cellules épithéliales du TGF grâce au récepteur protéique appartenant à la famille des SRCR (*scavenger receptor cysteine-rich*), la gp340, qu'elles expriment à leur surface. Cette internalisation entraîne la production de lymphopoïétine stromale thymique pro-inflammatoire, TSLP, via la signalisation de TLR7, ce qui active les DCs et la dissémination virale aux LT-CD4<sup>+</sup> cibles (346).

Les modèles d'infection vaginale par le SIV ont identifié de nombreux foyers infectieux au sein du TGF tôt après l'infection (Fig. 1.12). Une des sous populations des LT-CD4<sup>+</sup> identifiées comme étant les cibles privilégiées du SIV après une transmission sont les cellules Th17 (235, 340). Ces cellules expriment CCR6<sup>+</sup> et requièrent certaines cytokines comme l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23, l'IL-1 $\beta$  et le TGF- $\beta$  pour leur différenciation (347, 348), mais également le facteur de transcription ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma*) (235, 340). Les Th17 sont connues pour exprimer également l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, un autre corécepteur du VIH-1, facilitant ainsi leur infection (234).

De fortes doses de SIV dans la muqueuse vaginale des macaque rhésus entraînent une augmentation de la chimiokine MIP-3 $\alpha$ /CCL20 (344), ligands de CCR6<sup>+</sup> sécrétés principalement par les cellules épithéliales des muqueuses. La sécrétion de cette chimiokine permet alors le recrutement des DCs et des macrophages au sein de l'épithélium cervical (349, 350).





**Figure 1.12. Transmission du SIV dans le modèle animal macaque rhesus.** Le virus traverse la barrière muqueuse et établit une petite population fondatrice de cellules cibles T CD4<sup>+</sup> infectées dans les heures qui suivent le début de l'infection. La production de MIP-3 $\alpha$  entraîne le recrutement de pDCs, qui sécrètent à leur tour du MIP-1 $\beta$  afin de recruter des cellules cibles T-CD4<sup>+</sup> entraînant leur expansion clonale puis la propagation de l'infection dans l'organisme au bout de quelques jours. *Reproduction avec la permission de Springer Nature : Nature (161), copyright (2010). Numéro de licence 4825160065831.*

Fait intéressant, un blocage précoce de MIP-3 $\alpha$  et de cytokines pro-inflammatoires empêcherait le recrutement cellulaire, l'établissement d'un milieu inflammatoire et une infection malgré une exposition intravaginale répétée à de fortes doses de SIV (349, 351). En plus de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 et MIP-1 $\beta$ /CCL4 qui jouent un rôle dans le recrutement des LT-CD4<sup>+</sup>, IFN- $\alpha$  est un important promoteur de l'expansion clonale des cellules LT-CD4<sup>+</sup> au niveau de la muqueuse vaginale jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (344).

L'établissement d'une infection systémique conduit finalement à un épuisement massif de cellules LT-CD4<sup>+</sup>, principalement les cellules Th17 ayant un profil CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>, dans les muqueuses. Il en résulte un déséquilibre cellulaire favorisant la population des T<sub>regs</sub> de type FOXP3 chez les sujets infectés par le VIH/SIV (2, 352-354) par rapport aux cellules effectrices.

## **1.6 Les traitements et les préventions mis en place pour lutter contre l'infection**

Le traitement antirétroviral actuel est efficace pour atténuer de façon drastique la réplication virale, réduire le taux de morbidité/mortalité associé au VIH-1, et il permet aux personnes infectées de sortir de la phase SIDA.

Aujourd'hui, il existe plusieurs traitements contre le VIH-1, à savoir la ART ou la thérapie antirétrovirale combinée (273). Ces traitements emploient plusieurs molécules qui, associées entre elles, peuvent intervenir à différentes étapes du cycle viral du VIH-1, et empêcher la réplication du virus. On observe ainsi une forte diminution de la charge virale plasmatique, atteignant souvent la barre des 50 copies d'ARN/ml de plasma ou moins, ne permettant donc pas sa détection par des tests commerciaux (355); on observe également un rétablissement du nombre de cellules T-CD4<sup>+</sup>, soit 350 à 500 cellules T-CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> de plasma (356), traduisant la reconstitution progressive, mais incomplète, du système immunitaire. Toutefois, la thérapie antirétrovirale actuelle ne permet pas une éradication complète du virus et un arrêt du traitement entraîne une augmentation de la charge virale, généralement au bout de quelques semaines.

Concernant les préventions mises en place, en plus de l'utilisation du préservatif lors des rapports sexuels, il y a les prophylaxies préexposition (PrEP) et post-exposition (PPE). Les PrEP

sont connues pour réduire de manière efficace l'acquisition du VIH-1 chez les personnes non infectées, mais ayant un risque élevé de contracter le virus (357), alors que la PPE est recommandée pour toutes les personnes séronégatives qui ont été, ou qui pensent avoir été, en contact avec une ou des personnes infectées par le VIH-1, dans les 72 heures qui suivent l'exposition (358).

Les microbicides vaginaux et rectaux sont d'autres modes de prévention qui ciblent les différentes étapes du cycle du VIH-1, notamment la liaison de la gp120 au CD4 et la fusion entre les membranes virale et cellulaire (359). Ces microbicides sont administrés par voie topique sous forme de gel, de comprimé, de film ou d'anneau intravaginal dans la muqueuse génitale ou colorectale aux personnes à haut risque d'infection. La circoncision médicale masculine constitue une intervention efficace de prévention du VIH qui a considérablement diminué l'acquisition du VIH-1 chez les hommes (360).

## 1.7 Les stratégies vaccinales contre le VIH-1

De nouvelles stratégies sont à l'étude afin d'élaborer des vaccins permettant la prévention et le traitement de la maladie. En 2009, le RV144, a été la première approche vaccinale qui a réussi à démontrer son efficacité à réduire l'acquisition du VIH-1 à 44% après 18 mois, puis de 31% au bout de 42 mois après la première vaccination (361, 362). Ces données suggèrent ainsi un effet vaccinal précoce, mais non durable. Toutefois, les réponses immunitaires spécifiques du VIH-1 dans les sécrétions ano/génitales n'ont pas été caractérisées, du fait de l'absence de prélèvements dans les muqueuses lors de cet essai vaccinal.

Il est maintenant connu que l'infection naturelle par le VIH-1 est capable d'induire des anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs), qui peuvent cibler l'enveloppe virale afin d'inhiber efficacement sa réplication *in vitro* (363). Cependant, ces bNAbs sont peu nombreux et sont produits par un faible pourcentage d'individus. L'immunisation passive d'anticorps monoclonaux reste, en termes de stratégie vaccinale, l'une des approches actuelles utilisées afin de neutraliser un large éventail des diverses souches du VIH-1, *in vitro* (364, 365). D'ailleurs, la combinaison de deux puissants bNAbs, ciblant des épitopes indépendants de l'enveloppe du

VIH-1, maintient une suppression de la charge virale durant près de 4 mois chez les individus séropositifs, sans développer de souches virales résistantes aux deux anticorps (366). Toutefois, la diversité génétique du VIH-1 ainsi que la variabilité des séquences conformationnelles de l'enveloppe virale affectent le développement des bNAbs spécifiques, ce qui rend difficile l'élaboration de stratégies vaccinales (367).

## 1.8 Les différents types de patients

De manière générale, les progresseurs rapides correspondent à 10 à 15 % des personnes infectées par le VIH-1. La période asymptomatique étant très courte, voire absente dans certains cas, ces personnes développent beaucoup plus rapidement la maladie et arrivent au bout de 2 à 3 ans dans la phase SIDA (87, 368). Les progresseurs rapides possèdent beaucoup de souches virales à tropisme X4, ce qui favorise une meilleure dissémination du virus chez l'individu, caractérisée par une réplication virale très active et la chute rapide du nombre des LT-CD4<sup>+</sup> (369). On observe également un délai dans la réponse des LT-CD8<sup>+</sup> (370) et la présence de nombreux facteurs d'inflammation (371).

Les progresseurs lents ou LTNPs (*Long Term Non Progressors*), ont une virémie faible, mais détectable et représentent moins de 5 % des personnes séropositives. Ils possèdent une phase asymptomatique très longue de dix années (372). En l'absence de traitement antirétroviral, ces personnes restent cliniquement ou immunologiquement stables pendant des années. On observe des niveaux de cellules T-CD4<sup>+</sup> périphériques normaux et stables supérieurs à 500 cellules/mm<sup>3</sup> de plasma, une faible charge virale, soit moins 10<sup>4</sup> copies d'ARN viral/ml de sang (373), et la préservation des fonctions immunitaires (372, 374, 375). Le contrôle de l'infection par ces individus pourrait s'expliquer par la présence des allèles HLA-B\*27 et HLA-B\*57 de façon dominante chez certains LTNPs, entraînant ainsi une réponse très spécifique contre le VIH-1 afin de favoriser une stimulation des LT-CD8<sup>+</sup> cytotoxiques par les cellules T-CD4<sup>+</sup> (376, 377). Toutefois, ces données restent encore controversées. En effet, certaines données scientifiques ont démontré que la plupart des LTNPs, avec ou sans allèles HLA-B\*27

et HLA-B\*57, possédaient des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 (378-380) suggérant la possibilité d'autres mécanismes responsables du contrôle de la virémie chez ces individus.

Les « *Elites Controllers* » (EC) représente moins de 1 % des LTNPs. Ces individus ont une charge virale indétectable et sont capables de contrôler naturellement la réplication du virus. Ils possèdent moins de 50 copies d'ARN viral/ml de plasma et maintiennent un nombre de lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> normal (372, 375, 381). La capacité des cellules T-CD8<sup>+</sup> spécifiques du VIH-1 à augmenter leur contenu en protéines, telles que le granzyme B et la perforine connues pour médier la cytotoxicité, semble être un moyen essentiel de réguler la capacité cytotoxique spécifique du VIH-1.

## 1.9 Les cas cliniques de guérison

À ce jour, seuls trois cas de guérison du VIH-1 ont été rapportés. Il s'agit de Timothy Ray Brown surnommé le « patient de Berlin », Adam Castillejo pour le « patient de Londres » et le « patient de Düsseldorf » (382-384).

Suite à des greffes de cellules souches de cellules immunitaires, ces hommes séropositifs ont été guéris d'une tumeur maligne, la leucémie myéloïde aigüe pour Timothy Ray Brown et pour le « patient de Düsseldorf », et le lymphome de Hodgkin pour Adam Castillejo. Ces cellules souches proviennent de donneurs homozygotes porteurs d'une mutation génétique rare, se caractérisant par la délétion de 32 paires de bases sur l'allèle *ccr5*. Cette mutation entraîne ainsi l'absence du corécepteur CCR5 (*CCR5Δ32*) sur les LT-CD4<sup>+</sup> et rend ces derniers résistants à l'infection par le VIH-1 (382-384). Ces patients ont suivi une chimiothérapie hautement toxique et, dans le cas de M. Brown, une radiothérapie de tout le corps a été faite, afin de traiter le cancer (382). Quelque temps après cette greffe, les patients ont arrêté leur traitement sous ART et ont été en mesure de contrôler spontanément la réplication du virus, en maintenant une charge virale indétectable en périphérie et dans les différents tissus (385).

## 1.10 Les individus séronégatifs exposés au VIH-1

Il existe certaines personnes qui sont exposées de façon répétée au VIH-1, mais qui ne développent pas d'infection, c'est-à-dire qu'elles demeurent négatives pour la présence d'IgG dirigées contre la gp120 de l'enveloppe du virus, ainsi que pour la présence d'ARN viral dans le sang. Ces personnes sont dites « séronégatives exposées au VIH » (HESN). Parmi elles, on retrouve (i) les couples discordants dans lesquels un seul des deux partenaires se retrouve à être infecté par le VIH-1; (ii) les personnes exposées non sexuellement, les nourrissons nés de mères infectées par le VIH-1; (iii) les personnes ayant des relations sexuelles à haut risque, y compris les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes et les travailleuses du sexe « *commercial sex workers* » (CSWs) (386, 387). Les deux groupes d'études les plus courants, à savoir les couples discordants et les CSWs, sont utiles à étudier, car les détails précis de l'exposition sont connus. L'études de ces groupes de personnes peuvent fournir des données très utiles pour l'identification des différents facteurs de l'hôte qui contribueraient à leur protection contre le VIH-1.

Différentes études effectuées chez les HESN ont démontré l'existence des LT-CD4<sup>+</sup> et des LT-CD8<sup>+</sup> spécifiques au VIH-1, tant au niveau muqueux que systémique (388, 389). En effet, les LT-CD8<sup>+</sup> spécifiques au VIH-1 des HESN reconnaissent des épitopes viraux différents de ceux reconnus par les LT-CD8<sup>+</sup> des personnes séropositives (390). Les LT-CD4<sup>+</sup> des HESN stimulés avec certains peptides de l'enveloppe virale sont capables de proliférer et de sécréter de l'IL-2 et d'autres cytokines (388, 391). Aussi, des fréquences élevées de cellules T régulatrices ont également été identifiées dans le sang de HESN par rapport au groupe de personnes séropositives (392), ce qui pourrait contribuer à un faible niveau d'activation et une régulation immunitaire plus efficace.

Quelques études ont permis d'établir l'existence d'anticorps chez les HESN qui auraient probablement une activité neutralisante ou empêcheraient la transcytose du virus au travers de l'épithélium de la muqueuse vaginale. En effet, la présence d'IgA ayant la capacité de neutraliser le VIH-1 a été démontrée chez des HESN au Kenya et en Italie, dans les deux compartiments, sang et muqueuses (393, 394). Toutefois, leur rôle dans la protection contre le VIH-1 reste encore controversé (395-398).

La résistance au VIH-1 pourrait également être reliée à un équilibre entre la réponse immunitaire efficace et le contrôle de l'inflammation au site initial de l'infection, ce qui limiterait le nombre de cellules cibles et la dissémination du virus en périphérie. La sécrétion de certains facteurs mucosaux sont associées à la résistance. En effet, des études effectuées dans une cohorte au Kenya ont permis d'identifier la présence de protéines innées antimicrobiennes comme la lactoferrine, la serpine, la cystatine, l'élafine/trappine 2 dans les sécrétions vaginales des HESN comparativement aux personnes infectées par le VIH-1, ce qui pourraient contribuer à la protection du VIH-1 (9, 134).

En plus de la présence de protéines antimicrobiennes, nos études précédentes exécutées au laboratoire ont montré que les taux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , les monokines induites par l'IFN- $\gamma$ , MIG, et les chimiokines induites par l'IFN- $\gamma$ , IP-10, étaient plus faibles dans le liquide cervico-vaginal (CVL) des HESN par rapport aux personnes infectées par le VIH-1 (4, 399). La sécrétion des  $\beta$ -chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES chez les HESN a été associée à la prévention de l'infection, car à forte concentration, elles sont capables d'entrer en compétition avec le virus afin de se lier au corécepteur CCR5 (4, 134, 399, 400).

Dans nos précédentes études chez les souris transgéniques, nous avons constaté une augmentation des cellules B de la MZ en accord avec l'augmentation des niveaux de BLyS/BAFF (401). Il est connu que les molécules CD1 jouent un rôle important dans les réponses immunitaires innées. Elles sont spécialisées dans la capture et dans la présentation des lipides/glycolipides à la surface cellulaire (402). Tout comme le groupe de Cerutti et Weill, nous avons utilisé le marqueur CD1c afin de distinguer les cellules B innées de la MZ chez l'humain (256, 272). Nous avons pu démontrer que la surexpression de BLyS/BAFF plasmatique concordait à la fois avec la fréquence élevée des cellules B de la MZ de type CD1c<sup>+</sup> « précurseurs » et l'hyperglobulinémie chez les progressseurs rapides et classiques infectés par le VIH-1, de la cohorte HARSAH (403). Ces mêmes résultats ont été confirmés dans le sang des travailleuses du sexe infectées par le VIH-1, CSW<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup>, comparativement aux deux autres groupes, les travailleuses du sexe non infectées par le VIH-1, HESN, et les femmes du groupe contrôle de la population générale, Non-CSW HIV<sup>-</sup> (404, 405) (Annexe 1).

Suite à ces travaux, nous pensons que l'immunité naturelle chez les HESN est multifactorielle et fait appel à un ensemble de facteurs génétiques et environnementaux, ce qui leur permettent de maintenir une réponse inflammatoire faible au sein de leur muqueuse vaginale.

### 1.11 Les hypothèses et les objectifs de recherche

À la suite de toutes ces données connues chez les HESN, nous pensons que les mécanismes de tolérance chez ces femmes, sur le plan génital, pourraient aider au contrôle de l'infection par le VIH-1. Toutefois, la compréhension de la réaction de l'hôte au niveau du TGF, lors de l'infection, reste encore floue.

Le présent travail a pour but de continuer les travaux d'élucidation des mécanismes de l'immunité naturelle face au VIH-1 chez les HESN, sur le plan du tractus génital. Notre **hypothèse générale** est donc que le maintien de faibles conditions inflammatoires dans le TGF des femmes HESN prévient une activation immunitaire excessive en préservant l'intégrité de la barrière muqueuse et contribue ainsi à maintenir une protection contre le virus.

Étant donné que BLyS/BAFF est reconnu pour son rôle dans l'ontogenèse des cellules B et dans leur sélection vers le pool de cellules B innées de la MZ, **notre hypothèse spécifique** est que :

- 1) La différence du niveau d'expression de BLyS/BAFF et la réponse en anticorps des cellules B innées de la MZ pourraient contribuer à une immunité naturelle dans le TGF des HESN.

De plus, sachant que les DCs sont l'une des premières cellules à rencontrer le virus dans le TGF et qu'elles jouent un rôle essentiel dans l'orchestration des réponses immunitaires pour réguler les cellules T et B, **nos hypothèses spécifiques** sont que :

- 2) Les cellules dendritiques pourraient induire une réponse immune régulatrice et antivirale, à travers la production de cytokines et de cellules régulatrices au site initial de l'infection dans le TGF des HESN.



- 3) La présence de monocytes sanguins phénotypiquement différents pourrait être impliquée dans la génération de MoDCs tolérogéniques observés dans le TGF des HESN.

Afin de tester ces hypothèses, notre **objectif principal** a été de caractériser l'environnement de la muqueuse génitale ainsi que les cellules immunitaires qui sont associées à l'immunité naturelle contribuant à la modulation de faibles conditions inflammatoires observées dans le TGF de ces HESN.

Ainsi, en comparant les HESN par rapport aux groupes contrôles, à savoir les CSW<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> et les Non-CSW HIV<sup>-</sup>, les **objectifs spécifiques** de cette étude sont :

- 1) de mesurer les niveaux de BLyS/BAFF soluble dans le CVL, d'identifier et de caractériser les cellules B innées de la MZ ainsi que la nature et la spécificité des anticorps et isotypes envers les protéines gp120 et pg41 dans le CVL des HESN.
- 2) d'identifier et de caractériser les populations génitales immunorégulatrices, notamment les T<sub>regs</sub> et les T<sub>r1</sub> ainsi que les *m*DCs présents au niveau de la muqueuse génitale des HESN.
- 3) de déterminer le profil transcriptomique et phénotypique des monocytes sanguins totaux des HESN et de caractériser leur différenciation *in vitro* en MoDCs.

Cette étude contribuera à une meilleure compréhension des facteurs intervenant dans l'immunité naturelle et contrôlant l'infection par le VIH-1, dans la muqueuse génitale des HESN béninoises.

### 1.12 Description de notre cohorte : les travailleuses du sexe béninoises

Le Bénin est un pays francophone d'Afrique de l'Ouest, sa capitale officielle étant la ville de Porto-Novo, et sa capitale économique Cotonou. Selon l'ONUSIDA 2019, la prévalence du VIH-1 chez les travailleuses du sexe au Bénin est d'environ 8,5 % (1).

De ce fait, notre laboratoire a établi une cohorte de travailleuses du sexe commerciales (CSWs) fortement exposées au VIH-1. Dans ce groupe de CSWs (n = 281), nous avons identifié

des femmes séropositives, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> (n = 129) et des femmes non infectées, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> (n = 152). Parmi les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>, certaines ont été identifiées comme étant des femmes HESN, c'est-à-dire qu'elles demeurent séronégatives malgré de nombreuses années de prostitution et d'exposition au VIH. Ces femmes CSWs sont inscrites dans une clinique spécialisée à Cotonou, au Bénin. Nous avons également recruté des femmes témoins de la population générale, Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (n = 70), inscrites dans une clinique de santé générale de Cotonou, qui sont non infectées et présentent un faible risque d'exposition au VIH-1. Toutes ces femmes ont donné au préalable leur consentement par écrit et ont été suivies à intervalles de trois mois sur une période de trois ans, soit quatre visites par année.

Lors de leur inscription, les participantes ont été invitées à répondre à un questionnaire démographique et comportemental détaillé, afin de connaître leur âge, leur nombre d'années de prostitution, l'utilisation ou non de préservatifs lors de leurs rapports sexuels, l'emploi de douche vaginale, et de savoir si elles avaient déjà été enceintes. À chaque visite de suivi, ces femmes ont subi un examen gynécologique permettant (i) le diagnostic d'éventuelles vaginoses bactériennes, ulcère génital, cervicite, etc.; (ii) le dépistage de possible IST comme la gonorrhée, la chlamydia, l'herpès simplex de type 2, HSV-2, et le VIH-1, et (iii) de procéder à des prélèvements d'échantillons cervico-vaginaux (CVL et cytobrosse) et sérologiques. Les participantes refusant le prélèvement sanguin par ponction veineuse se voyaient prélever une goutte de sang au bout de leur doigt. Les femmes séropositives ont été informées de leur statut clinique et ont reçu un traitement pour les infections connexes ainsi que des conseils sur divers aspects de la transmission du VIH-1. De plus, elles ont été dirigées vers le programme national de traitement antirétroviral.

Ainsi, pour les femmes CSW et les Non-CSW HIV<sup>-</sup>, nous avons exclu de l'étude toutes celles qui étaient mineures (moins de 18 ans), enceintes, menstruées, sous contraceptifs oraux, positives pour le HSV-2, celles qui avaient des co-infections, des vaginoses bactériennes et autres symptômes cliniques. Nous nous sommes assurés également qu'elles étaient toutes dans la phase folliculaire de leur cycle. Le choix des HESN s'est fait en suivant les mêmes critères mentionnés précédemment, mais également en sélectionnant uniquement celles qui avaient plus de sept années de prostitution à leur actif.

## CHAPITRE II

### **Les niveaux faibles de BLyS/BAFF et des fréquences des cellules B innées de types CD1c<sup>+</sup> de la zone marginale du tractus génital sont associés à l'immunité naturelle au VIH-1 chez les femmes HESN**

#### **2.1 Mise en contexte**

En accord avec nos résultats trouvés chez les « *Elite Controllers* » de la cohorte HARSAH, nos précédentes analyses effectuées dans le compartiment systémique des HESN de la cohorte béninoise ont présenté des taux plasmatiques et cellulaires de BLyS/BAFF significativement plus faibles par rapport à ceux mesurés chez les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Annexe 1). Cependant, comme pour les contrôleurs EC, nous avons constaté que les fréquences des cellules B MZ de type « matures » ont diminué dans le sang des HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux non-CSWs HIV<sup>-</sup>. Ceci impliquerait le recrutement de ces cellules vers les muqueuses et les sites lymphoïdes périphériques, afin de générer des réponses de première ligne impliquées dans le contrôle de la progression du VIH-1.

Suite à toutes ces données effectuées dans le compartiment systémique, et connaissant le rôle de BLyS/BAFF dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules B, nous avons voulu mesurer les niveaux de BLyS/BAFF soluble et identifier les sous-populations de cellules B innées de la MZ dans la muqueuse vaginale des femmes béninoises afin de déterminer leur rôle dans l'immunité naturelle au VIH-1.

## 2.2 Contribution des auteurs dans l'article 1

Auteurs : **Lyvia Fourcade**, Catherine Sabourin-Poirier, Victoire Perraud, Marie-Claude Faucher, Josiane Chagnon-Choquet, Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier, Michel Roger.

### ✚ Statut de l'article :

Publié dans *PLos Pathogens* le 7 juin 2019.

15 (6): e1007840. DOI: 10.1371 / journal.ppat.1007840

### ✚ Conception et mise au point des expériences :

Lyvia Fourcade, Catherine Sabourin-Poirier, Johanne Poudrier et Michel Roger.

### ✚ Expériences effectuées, analyses des données statistiques et présentation des figures:

- J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans cet article, leurs analyses statistiques et le montage des figures (Figures 2 à 6, Figures supplémentaires S1, S2B, S3) – Contribution 80 %.
- Catherine Sabourin-Poirier a mesuré les niveaux de BLYS/BAFF dans les CVL des femmes et effectué l'analyse statistique (Figure 1) – Contribution 10 %.
- Victoire Perraud et Marie-Claude Faucher ont effectué les expériences de PCR et de polymorphisme du promoteur BLYS/BAFF/BAFF (Figure supplémentaire S4) – Contribution 5 %.
- Josiane Chagnon-Choquet a participé au tri cellulaire et à l'extraction de l'ARN des cellules B MZ de la cohorte HARSAH, en vue de leur analyse transcriptomique (RNAseq) (Figure supplémentaire S2A) – Contribution 5 %.

Johanne Poudrier et Michel Roger ont supervisé toutes les expériences et les analyses statistiques.

### ✚ Contribution en approvisionnement des réactifs, matériels et outils d'analyses :

Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier et Michel Roger.

### ✚ Rédaction de l'article : Lyvia Fourcade, Johanne Poudrier et Michel Roger.

### 2.3 Résumé

BLyS/BAFF est reconnu pour son rôle dans l'ontogenèse des cellules B ainsi que pour la survie et la différenciation des cellules B, et la sélection des cellules B de la Zone Marginale. Un excès de BLyS/BAFF est associé à une hyperglobulinémie et une fréquence élevée des cellules B de la MZ de type précurseur chez les HARSAH. Nous montrons ici que les travailleuses du sexe (TS) Hautement Exposées au VIH-1 Séronégatives (HESNs) ont un faible niveau de BLyS/BAFF soluble et de faibles fréquences relatives de cellules exprimant BLyS/BAFF dans la muqueuse vaginale lorsque comparées aux TS infectées et aux non-TS non infectées de la population générale. De plus, nous avons identifié des cellules B innées CD1c<sup>+</sup> de type MZ, appartenant à la muqueuse vaginale qui peuvent se lier naturellement à la gp120 glycosylée, dont la fréquence est plus faible chez les HESNs comparativement aux deux autres groupes. Bien que les niveaux totaux de l'immunoglobuline (Ig)-A soient similaires entre les trois groupes, les HESNs ont un faible niveau d'IgG1 et d'IgG3 totaux. Fait intéressant, des IgG1 reconnaissant la gp41 du VIH-1 ont été trouvés chez les HESNs. Les faibles niveaux de BLyS/BAFF observés dans la muqueuse génitale des HESNs peuvent permettre des réponses de première ligne contrôlées, contribuant à l'immunité naturelle contre le VIH.

Mots-clés : Immunité naturelle, VIH, BLyS/BAFF, Cellules innées de la zone marginale, Cellules B CD1c<sup>+</sup>

## **2.4 Article 1 : Natural Immunity to HIV is associated with Low BLYS/BAFF levels and low frequencies of innate marginal zone like CD1c<sup>+</sup> B-cells in the genital tract**

Lyvia Fourcade <sup>1,2</sup>, Catherine Sabourin-Poirier <sup>1,2</sup>, Victoire Perraud <sup>1,2</sup>, Marie-Claude Faucher <sup>1</sup>, Josiane Chagnon-Choquet <sup>1</sup>, Annie-Claude Labbé <sup>2,3</sup>, Michel Alary <sup>4,5,6</sup>, Fernand Guédou <sup>7</sup>, Johanne Poudrier <sup>1,2\*</sup>, Michel Roger <sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada,

<sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada,

<sup>3</sup>Département de Microbiologie Médicale et Infectiologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada,

<sup>4</sup> Centre de recherche du CHU de Québec – Université Laval, Québec, Canada,

<sup>5</sup>Département de Médecine Sociale et Préventive, Université Laval, Québec, Canada,

<sup>6</sup> Institut National de Santé Publique du Québec, Québec, Canada,

<sup>7</sup>Dispensaire IST, Cotonou, Bénin.

Correspondance: johanne.poudrier@crchum.qc.ca; michel.roger.chum@ssss.gouv.qc.ca

\*J.P. and M. R. are senior co-authors

Short Title: HIV HESNs have low genital BAFF levels

Word count in the text: 4112

Number of figures and tables: Figures: 6, Table: 1, Supplemental Figures: 4

Reference count: 47

Address correspondence to:

Johanne Poudrier PhD (johanne.poudrier@crchum.qc.ca) and Michel Roger MD PhD (michel.roger@ssss.gouv.qc.ca), CRCHUM, Tour Viger 900 rue St-Denis, Montréal, Canada H2X 0A9. Phone: (514) 890-8000 (25798, 20934), Fax: (514) 412-7412.

### 2.4.1 Abstract

BLyS/BAFF is recognized for its role in B-cell ontogenesis, as well as cell fate decision towards the first-line/innate marginal zone B-cell pool. Excess BLyS/BAFF is associated with hyperglobulinemia and increased frequencies of activated precursor-like MZ B-cells. Herein, we show that HIV highly-exposed seronegative (HESN) commercial sex workers (CSWs) had lower soluble BLyS/BAFF levels and relative frequencies of BLyS/BAFF expressing cells in their genital mucosa when compared to those from HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. Furthermore, we identified genital innate and/or marginal zone-like CD1c<sup>+</sup> B-cells that naturally bind to fully glycosylated gp120, which frequencies were lower in HESNs when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. Although genital levels of total IgA were similar between groups, HESNs had lower levels of total IgG1 and IgG3. Interestingly, HIV-gp41 reactive IgG1 were found in some HESNs. Low genital levels of BLyS/BAFF observed in HESNs may allow for controlled first-line responses, contributing to natural immunity to HIV.

**Key words** natural immunity, HIV, BLyS/BAFF, innate, marginal zone, CD1c<sup>+</sup> B-cells

## 2.4.2 Author Summary

Worldwide, most human immunodeficiency virus infections affect women through heterosexual intercourse. We and others have identified African female commercial sex workers (CSWs), who remain seronegative despite high exposition to HIV (HESNs). Innate marginal zone B-cells recirculate in humans and have been found in front-line areas such as the sub-epithelial lamina propria of mucosal associated lymphoid tissues. MZ B-cells can bind to fully glycosylated gp120 and produce specific IgG and IgA, and have a propensity for B regulatory potential, which could help both the fight against HIV and maintenance of low inflammatory conditions reported for HESNs. Here we identify genital MZ-like B-cells, which frequencies are lower in the genital tract of HESNs when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSW women. Furthermore, this coincides with significantly lower genital levels of B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF), known to shape the MZ pool and which overexpression leads to MZ deregulation in HIV-infected progressors. HESN individuals provide an exceptional opportunity to determine important clues for the development of protective devices. Here we show that contained BLyS/BAFF levels are concomitant with natural immunity against HIV and may prevent dysregulated first-line responses. MZ-like B-cells could be harnessed in preventive strategies viewed at soliciting quick first-line to be adjunct to matured long term protection.

## 2.4.3 Introduction

Worldwide, most HIV infections are acquired through heterosexual intercourse, and in sub-Saharan Africa, 60% of new HIV infections affect women [1]. Observations made in the context of natural immunity to HIV may help identify important clues for the development of protective devices. As such, we established a cohort of female commercial sex workers (CSWs), in Cotonou (Benin), in which we have identified HIV highly-exposed seronegative (HESN) individuals, who remain uninfected after more than 4 years of active prostitution. Beninese HESN CSWs have significantly lower genital levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines when compared to both HIV-infected CSWs and



HIV-uninfected non-CSWs [2, 3]. Previous studies from Kenyan female CSWs demonstrated that HESNs have a low activation T-cell profile in both the blood and vaginal mucosa, which corresponds with a greater ability to proliferate in response to HIV-p24 peptides when compared to HIV-infected CSWs [4-7]. Furthermore, we and others have demonstrated elevated frequencies of T-regulatory lymphocytes in the blood [8] and genital tract [9] of HESN CSWs, the latter which were concomitant with increased frequencies of dendritic cells [10] bearing a tolerogenic profile. Altogether, these findings suggest that the capacity to regulate the activation/inflammatory profile is associated with protection against HIV infection.

Consistent with their low-inflammatory profile, we recently reported that Beninese HESNs have lower levels of B Lymphocyte Stimulator (BLyS/BAFF) in their blood when compared to HIV-uninfected non-CSWs [11]. BLyS/BAFF is highly recognized for its role in B-cell ontogenesis, as well as cell fate decision towards the first-line/innate marginal zone [12] B-cell pool [13, 14]. As such, HESNs have reduced frequencies of mature MZ B-cells in their blood when compared to HIV-uninfected non-CSWs [11]. In contrast, HIV-infected CSWs have higher levels of BLyS/BAFF, hyperglobulinemia and increased frequencies of activated precursor-like MZ B-cells in their blood when compared to those in HESNs [11]. These findings suggest that control of BLyS/BAFF and innate B-cell status could play a role in natural immunity against HIV infection.

Based on these observations, we have now assessed BLyS/BAFF expression levels and innate B-cell status in the genital tract of these women, which is a main portal of entry for HIV. We have been using the “lipid presenting” MHC class I-like molecule CD1c [15], which is a marker shared by “innate-like” populations, to help track MZ-like B-cells [13, 14]. In the present study, we show that as for blood, HESNs have lower levels of BLyS/BAFF and MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells in their genital tract when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs.

#### 2.4.4 Materials and Methods

**Study groups.** Female CSWs were recruited through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin. HIV-uninfected non-CSW control women at low risk for exposure were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women were excluded from the study if, they were less than 18 years old, menstruating or pregnant. At enrolment, participants were asked to answer a questionnaire about demographic information, sexual behavior, duration of sex work, number of sex partners, condom use, vaginal douching practices, and reproductive history. Each participant underwent a genital examination by a physician. Vaginal specimens were obtained for diagnosis of candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis by microscopic examination and herpes simplex virus (HSV) infection by PCR. Endocervical swabs were obtained to test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection using BD ProbeTec ET system (Strand Displacement Assay, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Peripheral blood was taken for HIV, syphilis, HSV and progesterone testing by immunoassays. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV specific IgG tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV seronegative, whereas reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II non-reactive) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). HSV infection and shedding was determined by testing for the presence of HSV in the CVLs of the women by PCR assay. For the present study, we selected samples from 10 HIV-uninfected and 11 treatment-naïve HIV-infected CSWs, and 10 HIV-uninfected non-CSW control subjects from the general population. None of these women were injecting drug users. The three study groups were all in the follicular phase of their menstrual cycle, as determined by blood progesterone levels, not taking oral contraception or injectable contraception such as DMPA or implanted ring, had no HSV, *N gonorrhoeae*, *C trachomatis* infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis or candidiasis.

**Ethics statement.** Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The methods reported in this paper were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou and the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Ethics Committees.

**CVL sample collection and preparation.** Mucus was removed initially prior to performing the Cervico-vaginal lavage (CVL). CVL samples were obtained from all study participants by a physician, using a 10-ml syringe filled with sterile 1x phosphate-buffered solution (PBS) and aimed directly into the cervical os. CVL fluids were then collected, transferred immediately into 20 ml of RPMI-1640, kept on ice, and processed within 1 hour. CVL samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and supernatants were concentrated on a 3 KDa Amicon membrane and stored at -80°C. The CVL cellular fractions were cryopreserved in liquid nitrogen.

**Determination of soluble BLYS/BAFF concentrations in CVL supernatants.** BLYS/BAFF levels were determined by using a commercial ELISA kit, R&D systems (Minneapolis, USA).

**Flow-cytometry characterization of BLYS/BAFF surface expression on CVL epithelial cells, T-cells, myeloid DCs, CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> “monocytic” or monocyte-derived cells and granulocytes.** CVL cells were thawed and washed with RPMI 1640 followed by 1X PBS. Briefly, a maximum of  $2 \times 10^5$  cells per well were used for staining. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1x PBS, 2% heat inactivated (hi)-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10 ug mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). CVL cells were stained using the following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: BUV395 anti-CD45 and BV786 anti-CD14 (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), PeCy5.5 anti-CD11c, PeCy7 anti-CD66b, AlexaFluor 700 anti-CD3 and PE anti-BLYS (ebiosciences, San Jose, CA, USA), APC

CDK PAN cytokeratin for epithelial cells (Cedarlane, Burlington, ON, CA). CVL cells were fixed with 1.25% paraformaldehyde and kept at 4°C for a minimum of 12 hours before flow-cytometry analysis. Briefly, live epithelial cells and leucocytes were analyzed after FSC/SSC gating to remove debris, and removal of doublets, for HIV-infected CSWs: epithelial cells constituted 18% and leucocytes 48% of recovered live cells, which summed to a mean of  $17\,336 \pm 6743$  total events. For HESNs: epithelial cells constituted 9,3% and leucocytes 37% of recovered live cells, which summed to a mean of  $14\,867 \pm 8938$  total events. For HIV-uninfected non-CSWs: epithelial cells constituted 8% and leucocytes 26% of recovered live cells, which summed to a mean of  $5650 \pm 992$  total events. Acquisition was with an LSRFortessa (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). Flow-cytometry data analysis quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls.

**Flow-cytometry characterization of total B-cells, plasmablasts and plasma cells in the CVL cellular fraction.** Cell processing, staining and analysis were performed as mentioned above. The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used: BUV395 anti-CD45, BUV737 anti-CD138, BV605 anti-CD19, APC/H7 anti-IgG and APC anti-CD1a (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), PerCP efluor710 anti-CD1c and AlexaFluor 700 anti-CD3 (ebiosciences, San Jose, CA, USA). Cells were pre-incubated or not with mannose (5 ug/ml) for 40 minutes on ice, followed by incubation with or without fully glycosylated biotinylated gp120 IIIB (ImmunoDX Inc) at 5 ug/ml for 40 minutes on ice prior to adding the staining cocktail and streptavidin-PE (BD-Biosciences, San Jose, USA).

**Determination of immunoglobulin isotype concentrations in CVL supernatants.** Levels of total immunoglobulin (Ig) isotypes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA were measured in CVL supernatants using the multiplex bead assay Milliplex Map Kit with human immunoglobulin isotyping Magnetic Bead panel by EMD Millipore (Billerica, USA) according to manufacturer's protocol. Analysis was performed on a Luminex 200 System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). HIV-gp120 and -gp41 Ig reactivity was

detected based on the method previously described [16, 17]. Briefly, non-concentrated CVL supernatants were incubated for 18 hours at 4°C rotating with protein G-agarose (ThermoFisher), and eluted with elution buffer (ThermoFisher) to recover IgG. Subsequently, remaining supernatants were incubated for 18 hours at 4°C rotating with peptide M-agarose (Invivogen) and eluted to recover IgA. IgG and IgA recovery in eluates and presence within remaining supernatants were verified by performing human total IgG and IgA ELISAs (ThermoFisher). The remaining supernatants following IgA recovery were used to detect IgM reactivity. Eluates were neutralized with TRIS 1M pH 7.5 (ThermoFisher) and incubated with gp120 M.CONSD11 and MN gp41 (NIH AIDS-Reagent program) coated magnetic microspheres (Radix) for 18 hours at 4°C rotating, followed by incubation with either of PE conjugated mouse anti-human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Southern Biotech), IgA1, IgA2 and IgM (ebioscience), and detection by Luminex 200 system. The cut-off for positivity was set at a mean fluorescence intensity value obtained for 10 HIV-uninfected non-CSWs<sup>+</sup> 3 SD.

**Statistical analyses.** Data from HESNs were compared separately to those of HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. The statistical significance of difference between groups was determined by Fisher's exact test for categorical variables and Unpaired T-test or Mann-Whitney U test analysis for continuous variables. The D'Agostino-Pearson normality test was used to determine whether the values were sampled from a Gaussian distribution. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

#### 2.4.5 Results

##### **Socio-demographic characteristics of the study groups.**

The socio-demographic characteristics of female CSWs and non-CSWs are shown in Table 1. There were no statistical differences for age between HESNs and the two other groups. All women were practicing vaginal douching. Duration of sex work, average number of clients and condom use were not significantly different between the HESN and HIV-1-

infected CSW groups. Thus CSWs and non-CSWs were comparable in terms of socio-demographic characteristics.

**Levels of expression of BLYS/BAFF in CVL supernatants and by genital cell populations of HIV-uninfected non-CSWs, HESNs and HIV-infected CSWs.** We have previously shown that BLYS/BAFF levels were lower in the blood of HESNs when compared to the two other groups. As with the blood compartment, we found that BLYS/BAFF levels measured in CVL supernatants of HESNs were significantly lower than those observed in both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig. 1). Because determining and comparing frequencies of cells expressing BLYS/BAFF might be influenced by the fluctuations in cell populations between the study groups [11, 18], we have assessed the percentages (Fig. 2, left panels) of total: (A) epithelial cells, (B) T-cells, (C) CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> myeloid DCs, (D) CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> “monocytic” or monocyte-derived cells, (E) granulocytes and (F) B-cells in the CVL cellular fractions of HIV-uninfected non-CSWs, HESNs and HIV-infected CSWs. Gating strategies are found in Supp. Fig. 1. We found that the relative percentages of epithelial cells in HESNs were comparable to that of HIV-uninfected non-CSWs and lower than that of HIV-infected CSWs (Fig. 2A left panel). Percentages of T-cells were significantly lower in HESNs when compared to HIV-uninfected non-CSWs and to HIV-infected CSWs (Fig. 2B left panel). When compared to those in HIV-uninfected non-CSWs, percentages of granulocytes were elevated in HESNs, and similar to those of HIV-infected CSWs (Fig. 2 E left panel). Percentages of myeloid DCs were higher in HESNs when compared to those in both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig. 2 C left panel). Percentages of CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> “monocytic” cells were decreased in HESNs when compared to both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig. 2D left panel). The relative percentages of cells expressing BLYS/BAFF within these populations were significantly or tended to be lower in HESNs when compared to HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig. 2 A, C-E middle panels), except for T-cells, which relative percentages of BLYS/BAFF expressing cells were comparable to that of HIV-uninfected non-CSWs and lower than that of HIV-infected CSWs (Fig. 2B middle panel). Strikingly, we found higher cell surface expression levels of BLYS/BAFF in HESNs when compared to HIV-uninfected non-CSWs and HIV-

infected CSWs (Fig. 2B-E right panels), except for epithelial cells and B-cells, which levels of expression were lower when compared to HIV-uninfected non-CSWs, but higher than HIV-infected CSWs (Fig. 2 A, F right panels). Thus, although the genital cells of HESNs expressed relatively higher levels of BLyS/BAFF than the cells of the other groups of women, HESNs had lower levels of soluble BLyS/BAFF and lower relative frequencies of BLyS/BAFF expressing cells in their genital mucosa.

**Frequencies of plasmablasts and plasma cells in the genital mucosa of HIV-uninfected non-CSWs, HESNs and HIV-infected CSWs.** Variability in BLyS/BAFF expression levels may impact on B-cell populations. As such, we expected that B-cells such as MZ populations, whose development and activation depend on signals from BLyS/BAFF [11], would be influenced by the differences of BLyS/BAFF expression we observed between HESNs and the two other groups. There were no significant differences when comparing the relative frequencies of total B-cells (CD19<sup>+</sup>), plasmablasts (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) and plasma cells (CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>) in CVL cellular fractions between HESNs and the two other groups (Fig. 3A, B, C left panels). Gene expression analyses of blood MZ B-cells showed that CD1a expression allowed to further differentiate “mature” CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> from “precursor-like” CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> MZ B-cell populations (Supp. Fig. 2A). The relative frequencies of total innate MZ-like CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> and CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> B-cells were lower in HESNs when compared to both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig. 3A middle and right panels). The relative percentages of CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> plasmablasts in HESNs were comparable to that of HIV-uninfected non-CSWs and greater than that of HIV-infected CSWs (Fig. 3B middle panel), whereas frequencies of CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> plasma cells in HESNs were lower when compared to HIV-infected CSWs (Fig. 3C middle panel). Both CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> plasmablasts and plasma cells were significantly lower in HESNs when compared to the two other groups (Fig. 3B, C right panels). There were no significant differences in IgG-expression by total CD138<sup>+</sup> or CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> plasmablasts and plasma cells between the three study groups (Fig. 3D left and middle panels). However there were less IgG expressing CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> B-cells in HESNs when compared to those of HIV-infected CSWs (Fig.3D right panel). Gating strategies are found in Supp. Fig. 3. Thus, consistent with lower levels of soluble BLyS/BAFF, HESNs had reduced frequencies of

innate MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells in their genital tract when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. Furthermore, there were less IgG expressing CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> B-cells in HESNs when compared to those of HIV-infected CSWs.

It has been shown that human MZ CD1c<sup>+</sup> B-cells from blood, spleen and tonsils naturally bind to fully glycosylated gp120 through a process involving C-type lectins and/or polyreactive BCR [19], and in the presence of BLyS/BAFF they generate Ig, of which a fraction can recognize gp120. We thus analyzed whether genital CD1c<sup>+</sup> B-cells could also bind to gp120. We found that the relative frequencies of MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells binding gp120 were higher than those that did not bind to gp120 (Fig. 4B, C), whereas the majority of CD1c<sup>-</sup> B-cells did not bind gp120 (Fig. 4D), in all three groups of women. We found no significant differences in the frequencies of CD1c and/or CD1a B-cell subpopulations binding gp120 between the different groups, albeit HESNs had higher frequencies of total B-cells binding gp120 than those found in the other groups (Fig 4A).

Overall, HESNs had lower relative percentages of innate MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells, whether they were CD1a<sup>+</sup> or not, within their CVL cellular fraction when compared to both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs. Most of the MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells bind to fully glycosylated gp120.

**Concentrations of total, as well as gp120 and gp41 reactive immunoglobulin isotypes in the CVL supernatants of HIV-uninfected non-CSWs, HESNs and HIV-infected CSWs.** We have previously shown that HIV-infected CSWs present increased frequencies of IgG<sup>+</sup> plasmablasts in their blood and hypergammaglobulinemia in their serum when compared to HESNs [10]. The evaluation of total immunoglobulin isotypes in CVL supernatants demonstrated that HESNs had significantly lower concentrations of total IgG1 and IgG3 when compared to both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs (Fig.5 A, B). There were no significant differences in total IgM and IgA levels between the groups. IgG1 and IgA1 reactivity to both gp120 and gp41 (Fig. 6 A, C left panels and Fig. 6B, D left panels), as well as IgG2, IgG3, IgA2 and IgM reactivity to gp41 (Fig 6 B, D middle and right panels) were observed in CVL supernatants of the majority of HIV-infected CSWs. No Ig reactivity to gp120 and gp41 were detected in the CVL supernatants of HESNs (Fig. 6), except for low IgG1 (Fig.6B left panel) and IgM (Fig. 6D right panel)



reactivity to gp41 in some individuals. Overall, we found that gp120 reactivity in CVLs of HIV-infected CSWs mostly involved IgG1 and IgA1 isotypes, whereas gp41 reactivity involved all isotypes. We found gp41 reactivity in a proportion of HESNs, which was mainly of the IgG1 isotype.

#### **2.4.6 Discussion**

We [2, 3, 9] and others [8, 20, 21] have shown that HESN female CSWs have lower genital inflammation when compared to both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. We hypothesized that maintenance of low-inflammatory conditions in the female genital tract of HESN individuals may help to prevent excessive immune activation and lower HIV target availability, likely maintaining the integrity of the mucosal barrier to protect from HIV infection [4, 22]. In agreement with this, HESNs had lower blood [11] and genital levels of soluble BLyS/BAFF and lower frequencies of BLyS/BAFF expressing cells in their genital mucosa. In contrast, the genital cells of HESNs expressed relatively higher levels of BLyS/BAFF than the cells of the other groups of women. These observations suggest that upregulation of BLyS/BAFF expression is required but regulated so as to prevent deleterious effects. Recent studies have shown that plasmacytoid DCs exposed to HIV in vitro upregulate BLyS/BAFF cell surface expression without releasing the molecule [23]. This raises the possibility that the low levels of BLyS/BAFF measured in blood [11] and CVL supernatants of HESNs may be linked to the signals leading to BLyS/BAFF release. As to whether these are related to advantageous genetic polymorphisms remains to be established. We have recently analyzed BAFF promoter -871, -2841 and -2701 mutations associated with elevated BLyS/BAFF plasma levels and susceptibility to auto-immune diseases such as Systemic Lupus Erythematosus and hepatitis C associated cryoglobulinemia [24-26] in our Benin cohort and found no association between BAFF promoter mutations and either blood or CVLs BLyS/BAFF levels for all study groups (Supp. Fig. 4).

The relatively high levels of BLyS/BAFF observed in the blood [11] and CVL supernatants of HIV-infected CSWs are consistent with our previous reports for HIV-

infected rapid and classic progressors [18], and likely due to direct and indirect factors associated with HIV infection [22]. Plasma [11] and CVL levels, but not cell surface expression, of BLyS/BAFF measured in HIV-uninfected non-CSWs were similar to those observed in HIV-infected CSWs. This may be due to inflammatory/infectious conditions other than HIV in HIV-uninfected non-CSWs that can stimulate soluble release of BLyS/BAFF [11].

Consistent with lower levels of soluble BLyS/BAFF, HESNs had reduced frequencies of innate MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells in their genital tract when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. Growing importance is given to innate MZ B-cells in health and disease [13], as they constitute early first-line defense against invading pathogens and participate in the development of adaptive antibody (Ab) responses by trafficking to follicular B-cell areas of lymphoid structures and promoting germinal center reactions [27]. MZ B-cells are capable of isotype switching and can present a somatically mutated pre-diversified low affinity polyreactive BCR repertoire [13], which comprises usage of the IGHV1-2 gene [28], shown to take part in HIV-ENV reactive broadly neutralizing Abs (bNAbs) such as VRC01 [29]. Interestingly, repeated treatment of mice with BLyS/BAFF increased their MZ compartment, and generated an increased response to ENV immunization and bNAbs [30]. In agreement with the observations made by Cerutti and colleagues [19], the innate/MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cell populations we identified in the genital tract of Beninese women also bind to fully glycosylated gp120, and to a greater frequency than CD1c<sup>-</sup> B-cells. Although this suggests that these cells have the capacity to transfer HIV to target cells, it is unlikely that they get infected by the virus since it has not yet been convincingly shown to infect or replicate in B-cells in vivo [31]. Interestingly, although they have lower frequencies of CD1c<sup>+</sup> MZ-like B-cells, HESNs have higher relative frequencies of total B-cells binding gp120 when compared to the other groups. The fact that there were no significant differences in frequencies of CD1c<sup>+</sup> B-cell sub-populations binding gp120 between the different groups suggests that in HESNs, genital B-cells other than CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> and CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> subsets have a greater capacity to bind gp120 than those in HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. It is possible that the relative binding capacity was lower in the HIV-infected CSWs because gp120 receptors were saturated in these individuals. In contrast to that observed by He et

al [19], pre-incubation of total B-cells with mannose did not significantly diminish gp120 binding (Supp Fig. 2B), suggesting receptors of various types might be involved. Identifying these receptors and B-cell sub-population(s) binding gp120 that are increased in HESNs will require further experimentation. Also, the exact nature of the innate MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells we identify in the genital tract has yet to be confirmed, and as to whether they have a direct link with those we previously observed in blood [11] remains to be established.

In humans, MZ B-cells recirculate and have been found in front-line areas such as the sub epithelial lamina propria of mucosal associated lymphoid tissues (MALT) [13]. To our knowledge, we show for the first time that MZ-like B-cells can be found in the female genital tract, which is part of the MALT and is populated by a commensal microflora [4, 32]. It is thus conceivable that the innate MZ-like CD1c<sup>+</sup> B-cells observed in the genital tract of Beninese women participate in local immune responses to control microflora and pathogens. Moreover, it has been shown that the gut lamina propria can be a T-independent inductive site in humans [33] and likely similar mechanisms operate at the genital lamina propria. The recent characterization of elevated BLyS/BAFF levels and transient Gp41-specific IgA in mucosal genital fluids from patients within the first weeks after HIV transmission, suggest that these Abs might have originated from first-line B-cell populations [34]. The fact that HESNs who undergo a sex-break eventually seroconvert [35], suggests that natural immunity involves populations of which pool maintenance in the genital mucosal niche requires frequent antigen exposure, and this is consistent with first-line responses. As to whether first-line responses are actually polyreactive with shared HIV-specificity and/or involve shared antigenicity with the local microbiota remains to be determined.

Depending on the level of inflammation, CD1c<sup>+</sup> B-cells may contribute to natural immunity against HIV or conversely promote disease progression. Indeed, as shown previously [11, 18], elevated BLyS/BAFF levels increase expansion, activation and dysregulation of innate B-cell populations such as precursor-like MZ B-cells, likely contributing to the over-representation of low affinity, polyreactive and auto-reactive Abs [36] at the expense of high affinity polyfunctional eradicating anti-HIV Ab responses. As

such, we found hyperglobulinemia in the blood [11] and CVL supernatants of HIV-infected CSWs. Although we found no significant difference in the frequencies of total or IgG<sup>+</sup> plasmablasts/plasma cells in the genital tract of Beninese women, relative percentages of total CD138<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> cells bearing IgG were significantly higher in HIV-infected CSWs when compared to HESNs. It has yet to be determined whether these cells are substantially involved in the relatively high IgG1 and IgG3 levels measured in the CVLs of HIV-infected CSWs.

Most genital immunoglobulins (Ig) are found in the mucus [37], unfortunately the latter was removed prior to CVL sample collection in our study. Nevertheless, IgG1 and IgA1 reactivity to both gp120 and gp41, as well as IgG2, IgG3, IgA2 and IgM reactivity to gp41 were observed in CVL supernatants of the majority of HIV-infected CSWs. However, despite the elevated frequencies of B-cells binding to gp120, we found no Ig reactivity to gp120 in the CVL supernatants of HESNs. It is possible that lower levels of Ig are present in the samples of HESN but mucus removal has precluded their detection. Accordingly, we have previously detected anti-HIV-1-Env-specific IgG, neutralizing or ADCC activities in blood and CVL samples from HIV-infected CSWs but not in those from HESNs [38]. Interestingly, we could detect IgG1 reactivity to gp41 in some HESNs, which could be derived from a microbiota reactive, possibly first-line B-cell pool [39], as most gp41 reactive Abs cross-react with microbiota [40]. Whether the gp41 binding IgG1 Abs detected in the CVL of HESNS can confer some level of protection remains to be established. There is increasing evidence for non-neutralizing functions of antibodies in decreasing the viral load, and in conferring some level of protection [41]. In this view, anti-gp41 IgG antibodies are found in the plasma of HIV-infected individuals shortly after transmission, and form antibody-virion complexes, which although ineffective at controlling disease progression [42], have been associated with infectivity decay [43]. We could not detect substantial IgA1 and IgA2 reactivity to gp120 or gp41 in the CVL supernatants of HESNs. To date, studies have reported contradictory results regarding the presence of anti-HIV specific IgA responses in the genital tract of HESNs [44-49]. The discrepancies between studies may be due to relatively small sample size of these studies and/or the different techniques used to detect ENV-reactive Abs.

Because of the cross-sectional design, the present study cannot address whether the lower levels of BLYS/BAFF and CD1c<sup>+</sup> B-cells, as well as gp41 reactive IgG1 found in the genital tract of HESNs have a protective role against HIV infection. Comparison between HESN and women involved in sex work but not yet HESN should also be done to control for the effects of sex work itself on genital immunology. Longitudinal studies and further phenotypic and functional characterizations are required to confirm a protective role, and the exact nature of genital CD1c<sup>+</sup> B-cells and their responses.

#### **2.4.7 Conclusion**

Understanding the dynamics of BLYS/BAFF and its role in homeostasis of immune responsiveness appears pivotal to the design of vaccine strategies soliciting first-line B-cell responses to help protect from HIV infection. Based on our observations, the capacity to contain BLYS/BAFF expression levels seems concomitant with natural immunity against HIV, whereas excessive BLYS/BAFF may promote immune dysregulation, risk of infection and disease progression. The fact that human genital innate MZ-like B-cells naturally bind to fully glycosylated gp120 renders these cells of particular interest because MZ B-cells can acquire Ig somatic mutations and could be harnessed to increase HIV-ENV affinity.

#### **2.4.8 Acknowledgements**

We are grateful to the Beninese study participants. We are indebted to N. Geraldo, A. Gabin, C. Assogba and C. Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M. Massinga-Loembe, G. Ahotin, L.Djossou, and E. Goma for their technical assistance and to G. Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We also thank K. Beauchemin and V. Thibodeau for their help in managing the cohort. We are grateful to D. Gauchat and the CRCHUM flow-cytometry facility. We are grateful to Raphaële Lambert, Jennifer Huber and Patrick Gendron (IRIC Genomic and Bioinformatics core facilities) for RNASeq transcriptomic and data analyses, respectively.

## 2.4.9 References

- [1]. AIDS by the number-UNAIDS 2016 [Available from: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/AIDS-by-the-numbers-2016\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf).
- [2]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol.* 2010; 30: 90-98. 10.1007/s10875-009-9343-3
- [3]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol.* 2008; 1: 309-316. 10.1038/mi.2008.18
- [4]. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 875821. 10.1155/2012/875821
- [5]. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, Izulla P, Kimani M, Huibner S, et al. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol.* 2011; 187: 6032-6042. 10.4049/jimmunol.1101836
- [6]. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol.* 2000; 164: 1602-1611.
- [7]. Alimonti JB, Koesters SA, Kimani J, Matu L, Wachihi C, Plummer FA, et al. CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J Infect Dis.* 2005; 191: 20-24. 10.1086/425998
- [8]. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1318-1322. 10.1086/597801
- [9]. Thibodeau V, Fourcade L, Labbe AC, Alary M, Guedou F, Poudrier J, et al. Highly-Exposed HIV-1 seronegative Female Commercial Sex Workers sustain in their genital mucosa increased frequencies of tolerogenic myeloid and regulatory T-cells. *Sci Rep.* 2017; 7: 43857. 10.1038/srep43857
- [10]. (CDC) CfDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981; 30: 250-252.
- [11]. Sabourin-Poirier C, Fourcade L, Chagnon-Choquet J, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci Rep.* 2016; 6: 32318. 10.1038/srep32318
- [12]. Cremel M, Berlier W, Hamzeh H, Cognasse F, Lawrence P, Genin C, et al. Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 158-166. 10.1189/jlb.0305147
- [13]. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13: 118-132. 10.1038/nri3383
- [14]. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 267-285. 10.1146/annurev.immunol.021908.132607
- [15]. Chancellor A, Gadola SD, Mansour S. The versatility of the CD1 lipid antigen presentation pathway. *Immunology.* 2018; 154: 196-203. 10.1111/imm.12912
- [16]. Mkhize NN, Durgiah R, Ashley V, Archary D, Garrett NJ, Karim QA, et al. Broadly neutralizing antibody specificities detected in the genital tract of HIV-1 infected women. *Aids.* 2016; 30: 1005-1014. 10.1097/qad.0000000000001038

- [17]. Tomaras GD, Binley JM, Gray ES, Crooks ET, Osawa K, Moore PL, et al. Polyclonal B cell responses to conserved neutralization epitopes in a subset of HIV-1-infected individuals. *J Virol.* 2011; 85: 11502-11519. 10.1128/jvi.05363-11
- [18]. Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood.* 2011; 117: 145-155. 10.1182/blood-2010-08-301887
- [19]. He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, et al. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol.* 2006; 176: 3931-3941.
- [20]. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol.* 2012; 5: 277-287. 10.1038/mi.2012.7
- [21]. Yao XD, Omenge RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal Immunol.* 2014; 7: 268-279. 10.1038/mi.2013.44
- [22]. Fourcade L, Poudrier J, Roger M. Natural Immunity to HIV: A Template for Vaccine Strategies. *Viruses.* 2018; 10: 10.3390/v10040215
- [23]. Borhis G, Burelout C, Chaoul N, Smith N, Goujard C, Meyer L, et al. Plasmacytoid dendritic cells and myeloid cells differently contribute to B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor superfamily overexpression during primary HIV infection. *Aids.* 2016; 30: 365-376. 10.1097/qad.0000000000000965
- [24]. Ayad MW, Elbanna AA, Elneily DA, Sakr AS. Association of BAFF -871C/T Promoter Polymorphism with Hepatitis C-Related Mixed Cryoglobulinemia in a Cohort of Egyptian Patients. *Mol Diagn Ther.* 2015; 19: 99-106. 10.1007/s40291-015-0134-7
- [25]. Steri M, Orru V, Idda ML, Pitzalis M, Pala M, Zara I, et al. Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk. *N Engl J Med.* 2017; 376: 1615-1626. 10.1056/NEJMoa1610528
- [26]. Zayed RA, Sheba HF, Abo Elazaem MA, Elsaadany ZA, Elmessery LO, Mahmoud JA, et al. B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci.* 2013; 43: 289-294.
- [27]. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30: 429-457. 10.1146/annurev-immunol-020711-075032
- [28]. Bikos V, Karypidou M, Stalika E, Baliakas P, Xochelli A, Sutton LA, et al. An Immunogenetic Signature of Ongoing Antigen Interactions in Splenic Marginal Zone Lymphoma Expressing IGHV1-2\*04 Receptors. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 2032-2040. 10.1158/1078-0432.ccr-15-1170
- [29]. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science.* 2010; 329: 811-817. 10.1126/science.1192819
- [30]. Dosenovic P, Soldemo M, Scholz JL, O'Dell S, Grasset EK, Pelletier N, et al. BLyS-mediated modulation of naive B cell subsets impacts HIV Env-induced antibody responses. *J Immunol.* 2012; 188: 6018-6026. 10.4049/jimmunol.1200466
- [31]. Moir S, Fauci AS. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev.* 2013; 254: 207-224. 10.1111/imr.12067
- [32]. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev.* 2005; 206: 306-335. 10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x
- [33]. Cerutti A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol.* 2008; 1: 8-10. 10.1038/mi.2007.8

- [34]. Yates NL, Stacey AR, Nolen TL, Vandergrift NA, Moody MA, Montefiori DC, et al. HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol.* 2013; 6: 692-703. 10.1038/mi.2012.107
- [35]. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, et al. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest.* 2001; 107: 341-349. 10.1172/jci10714
- [36]. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjogren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev.* 2010; 9: 604-608. 10.1016/j.autrev.2010.05.006
- [37]. Gunn B, Schneider J, Shansab M, Bastian AR, Fahrback K, Smith At, et al. Enhanced binding of antibodies generated during chronic HIV infection to mucus component MUC16. *Mucosal Immunol.* 2016; 9: 1549-1558. 10.1038/mi.2016.8
- [38]. Batrville LA, Richard J, Veillette M, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Short communication: Anti-HIV-1 envelope immunoglobulin Gs in blood and cervicovaginal samples of Beninese commercial sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014; 30: 1145-1149. 10.1089/aid.2014.0163
- [39]. Wills S, Hwang KK, Liu P, Dennison SM, Tay MZ, Shen X, et al. HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. *J Virol.* 2018; 92. 10.1128/jvi.01552-17
- [40]. Williams WB, Liao HX, Moody MA, Kepler TB, Alam SM, Gao F, et al. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science.* 2015; 349: aab1253. 10.1126/science.aab1253
- [41]. Mayr LM, Su B, Moog C. Non-Neutralizing Antibodies Directed against HIV and Their Functions. *Front Immunol.* 2017; 8: 1590. 10.3389/fimmu.2017.01590
- [42]. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol.* 2008; 82: 12449-12463. 10.1128/jvi.01708-08
- [43]. Vaidya NK, Ribeiro RM, Liu P, Haynes BF, Tomaras GD, Perelson AS. Correlation Between Anti-gp41 Antibodies and Virus Infectivity Decay During Primary HIV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1326. 10.3389/fmicb.2018.01326
- [44]. Alexander R, Mestecky J. Neutralizing antibodies in mucosal secretions: IgG or IgA? *Curr HIV Res.* 2007; 5: 588-593.
- [45]. 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.
- [46]. Dorrell L, Hessell AJ, Wang M, Whittle H, Sabally S, Rowland-Jones S, et al. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *Aids.* 2000; 14: 1117-1122.
- [47]. 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.
- [48]. 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. 10.1089/aid.2010.0169
- [49]. Yu X, Duval M, Lewis C, Gawron MA, Wang R, Posner MR, et al. Impact of IgA constant domain on HIV-1 neutralizing function of monoclonal antibody F425A1g8. *J Immunol.* 2013; 190: 205-210. 10.4049/jimmunol.1201469

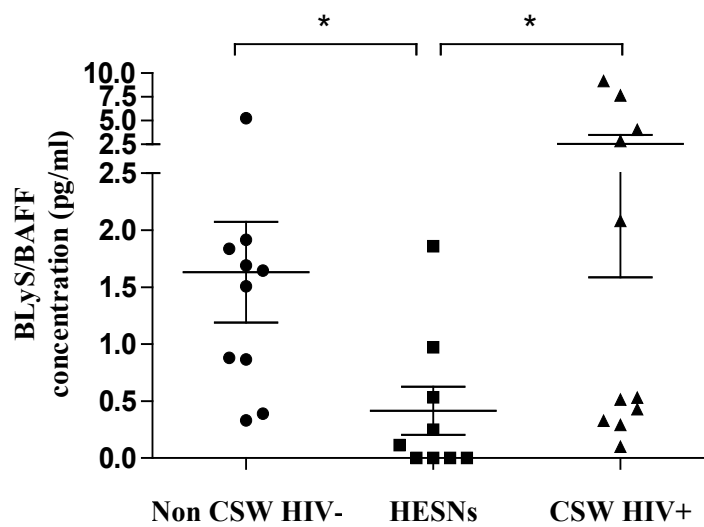


## 2.4.10 Figure Legends

Table 1. **Distribution of demographic and sexual behavior characteristics in HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** \*p-value for comparisons between HESNs and the two other groups were calculated with Mann Whitney U test for age and duration of sex work; Unpaired T-test for the number of clients; Fisher's exact test for condom use and vaginal douching. CSWs, commercial sex workers; HIV, human immunodeficiency virus; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative; N, number of participants; NA, non-applicable; NS, non-significant; SD, standard deviation.

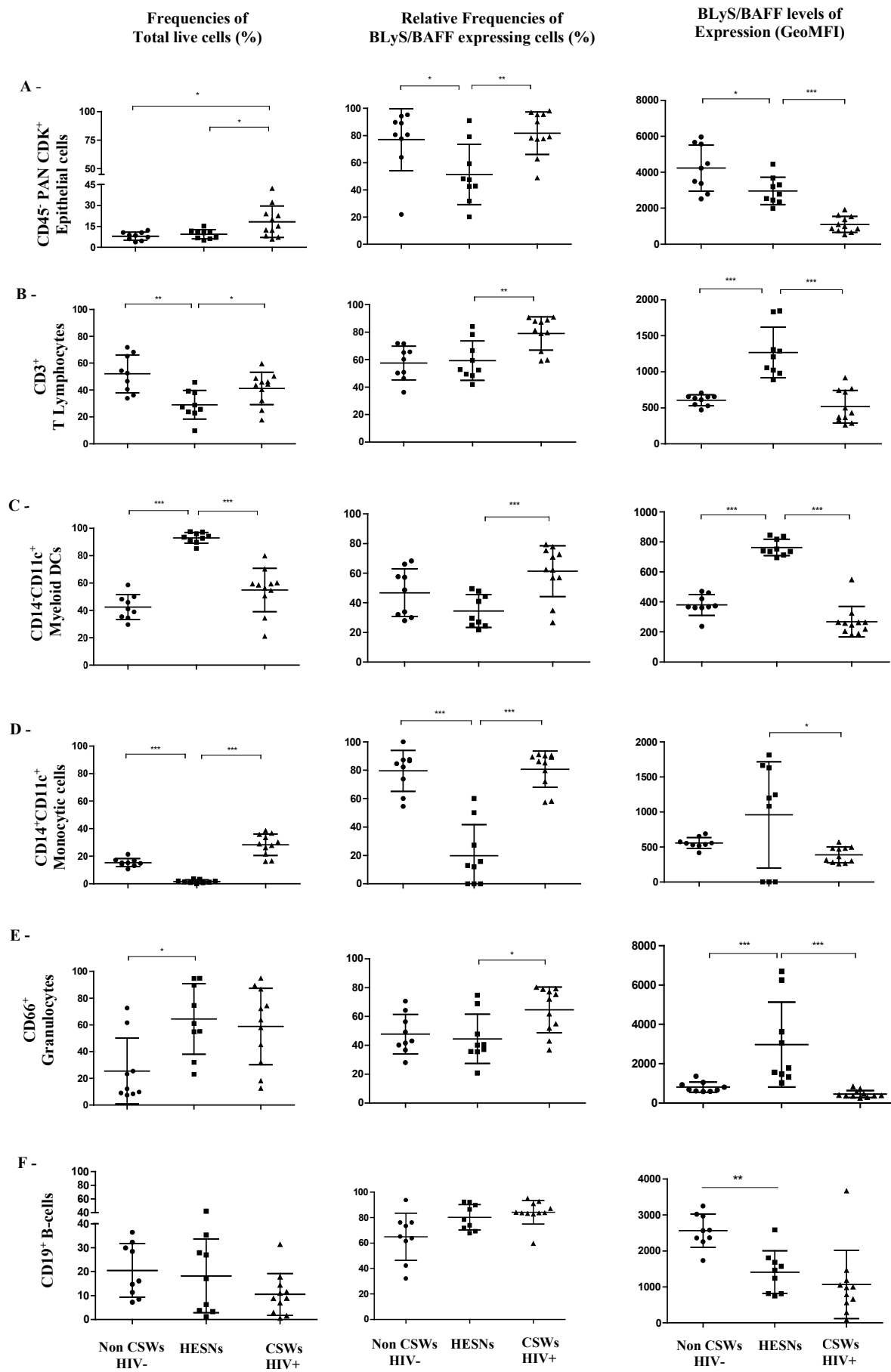
	HIV-1 uninfected non CSWs	HESNs	HIV-1 infected CSWs	*p-value
	N = 10	N = 10	N = 11	
Age, mean (SD), years	38 (11)	36 (9)	41 (9)	NS
Duration of sex work, mean (SD), years	NA	3,6 (1.3)	5,5 (5)	NS
Number of client past week, mean (SD)	NA	18 (15)	13 (10)	NS
Condom always used with client past week	NA	8	5	NS
Vaginal douching	10	10	11	NS

**Figure 1. Concentration of BLyS/BAFF in cervicovaginal lavage (CVL) supernatants of HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** Concentrations of BLyS/BAFF (pg/ml) in CVL supernatants were compared with Mann Whitney U test for pairwise comparisons between HESN and the two other groups. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Significance levels are shown as \*( $p < 0.05$ ). HIV, human immunodeficiency virus; CSW, commercial sex worker; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative; SD, standard deviation.



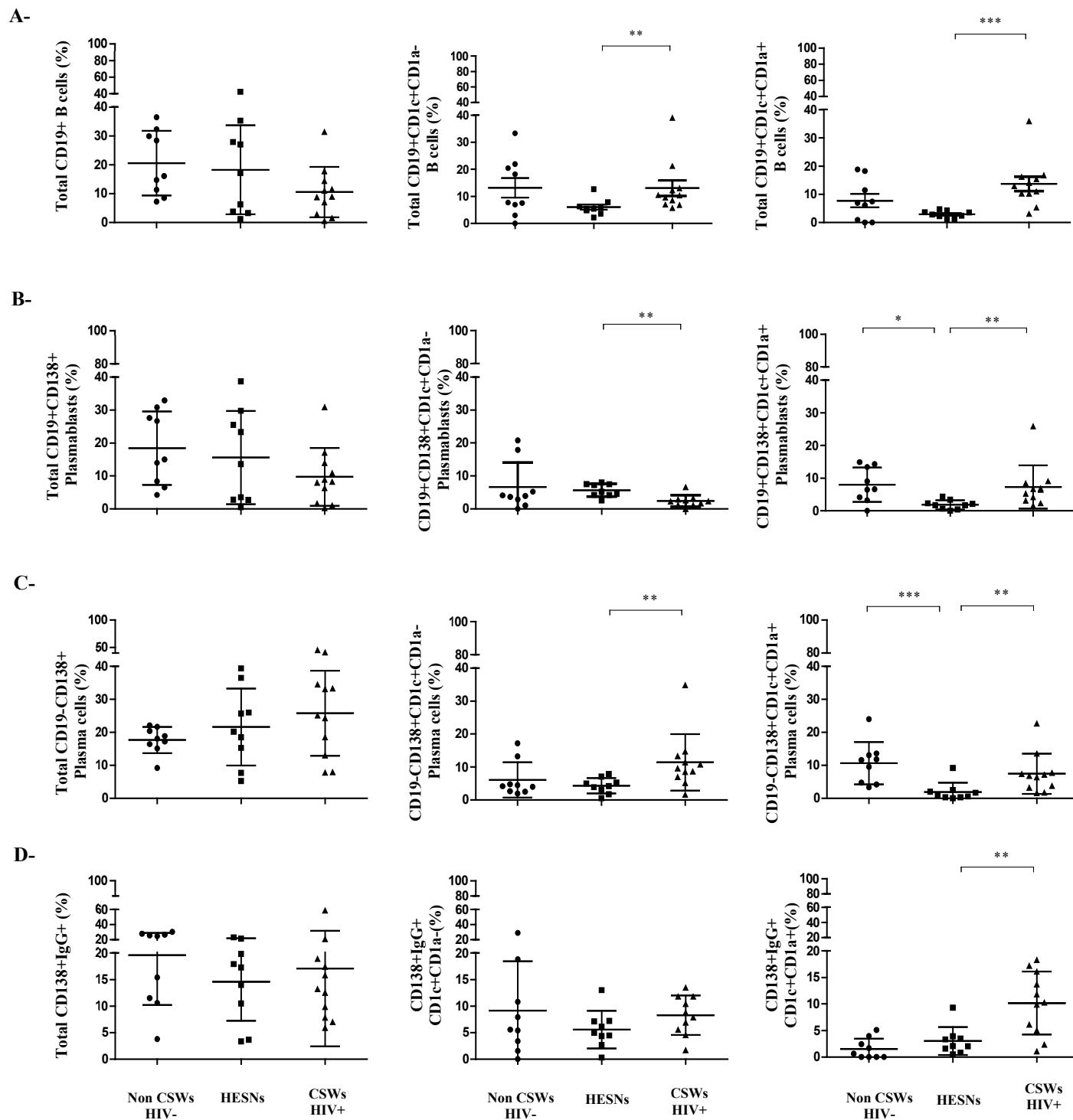
**Figure 2. Relative frequencies of BLyS/BAFF expressing cells and surface expression levels in cervicovaginal lavage (CVL) cellular populations of HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** Percentages (%) of total live cells (left panels), relative frequencies of BLyS/BAFF expressing cells (middle panels) and levels of expression (geometric mean fluorescence intensity; GeoMFI) (right panels) were assessed by flow-cytometry. Total cells were gated on live (A) CD45-CDKPAN+ Epithelial cells, and live CD45+CDKPAN- (B) CD3+ T Lymphocytes, (C) CD11c+CD14- myeloid Dendritic cells (DCs), which were negative for CD3, CD19,CD56 and CD66, (D) CD11c+CD14+ “Monocytic” monocyte derived cells, which were negative for CD3, CD19,CD56 and CD66, and (E) CD66+ Granulocytes and (F) B-cells. BLyS/BAFF expressing cells were gated from total respective populations. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical significance of differences in the relative frequencies (%) and levels of expression (GeoMFI) were evaluated with Mann Whitney U test for pair-wise comparisons between HESNs and the two other groups. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ . Frequencies (%) of total live cell populations (left panels) are calculated vs total live CVL cells (A) or total live CD45+ CDKPAN- cells (B-F). Relative frequencies (%) of BLyS/BAFF expressing cells (middle panels) are calculated vs frequencies (%) of total respective populations (left panels). HIV, human immunodeficiency virus; CSWs, commercial sex workers; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative. SD, standard deviation.

**Figure 2**



**Figure 3. Frequencies of total B-cells, plasmablasts and plasma cells in the cervicovaginal lavage (CVL) cellular fraction of HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** Flow-cytometry analysis of (A) total CD19<sup>+</sup> (left panel), CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> (middle panel), and CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> (right panel) B-cells, (B) total CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> (left panel), CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> (middle panel) and CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> (right panel) plasmablasts, (C) total CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> (left panel), CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> (middle panel) and CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> (right panel) plasma cells, (D) total CD138<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> (left panel), CD138<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> (middle panel) and CD138<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> (right panel) plasmablasts and plasma cells. Cells were gated on live CD45<sup>+</sup> CDK PAN<sup>-</sup> cells and were negative for CD3, CD56 and CD66. Relative frequencies were calculated vs total live CD45<sup>+</sup>CDK PAN<sup>-</sup> cells (A,B,C and D) left panels, vs total CD19<sup>+</sup> B-cells (A) middle and right panels, vs total CD138<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>plasmablasts (B) middle and right panels, vs total CD19<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> plasma cells (C) middle and right panels, and vs CD138<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> plasmablasts and plasma cells (D) middle and right panels. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical significance of differences in the relative frequencies (%) were evaluated with Mann Whitney U test for pairwise comparisons between HESNs and the two other groups. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001. HIV, human immunodeficiency virus; CSWs, commercial sex workers; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative. SD, standard deviation.

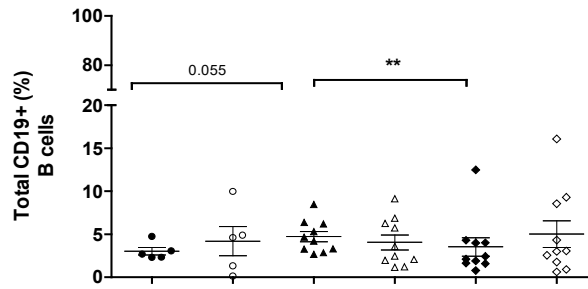
**Figure 3**



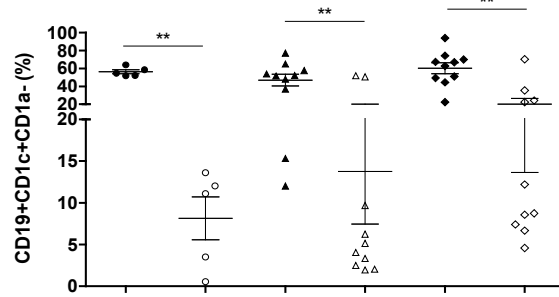
**Figure 4. Analysis of gp120 binding by B-cell populations in the cervicovaginal lavage (CVL) cellular fraction of HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** Cells were pre-incubated with fully glycosylated gp120 IIIB and processed for flow-cytometry. Data are represented as gp120 binding (filled) vs non-binding (clear) (A) total CD19<sup>+</sup> B-cells, (B) CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> B-cells, (C) CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> B-cells and (D) CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup> B-cells. Total CD19<sup>+</sup> B-cells were gated on live CD45<sup>+</sup> CDKPAN<sup>-</sup> cells (A). Relative frequencies of CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>, CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> and CD1c<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup> populations were calculated vs total CD19<sup>+</sup> B-cells (B, C and D). Data are presented as mean ± SD. Statistical significance of differences in the relative frequencies (%) were evaluated with Mann Whitney U tests when statistical non-parametric and with Unpaired T tests when statistical parametric between HESNs and the two other groups. \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01. HIV, human immunodeficiency virus; CSWs, commercial sex workers; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative. SD, standard deviation.

Figure 4

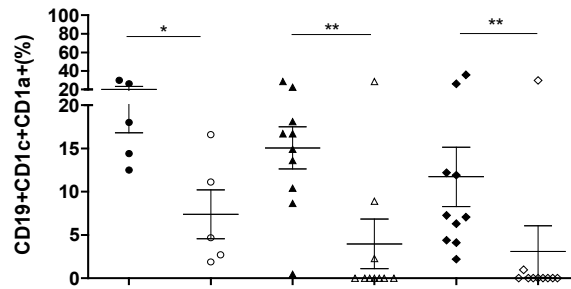
A-



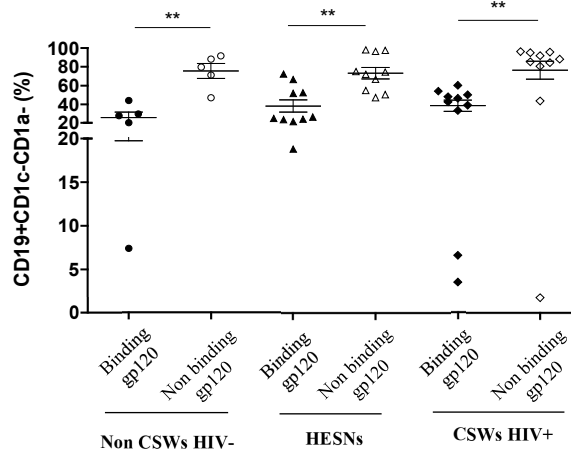
B-



C-

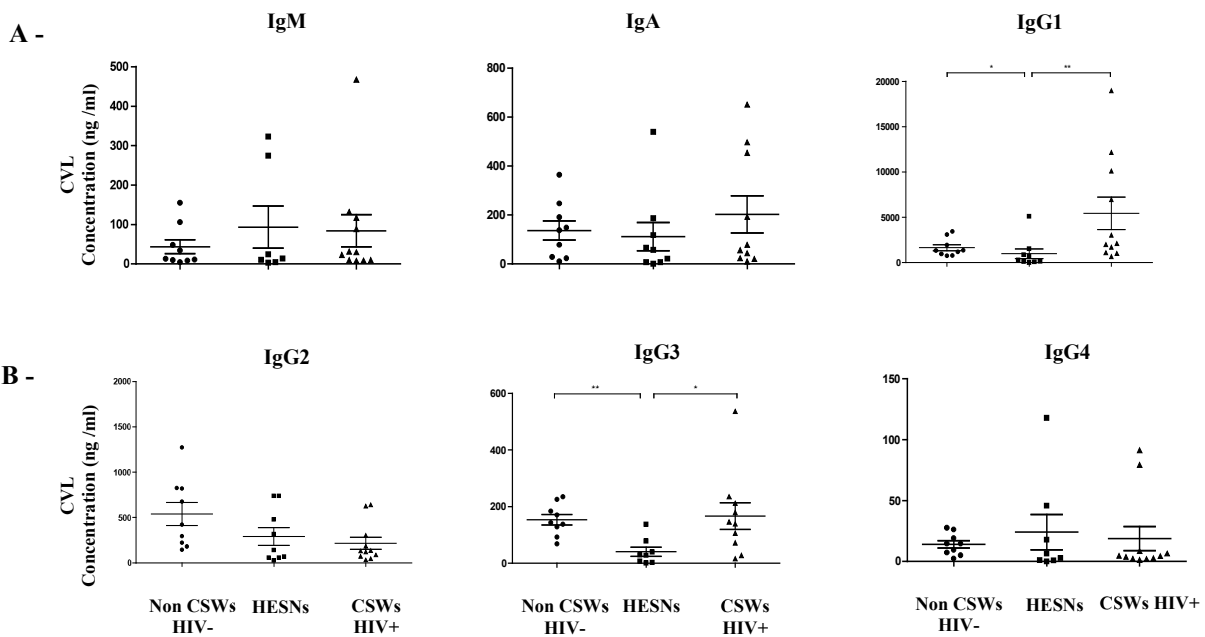


D-



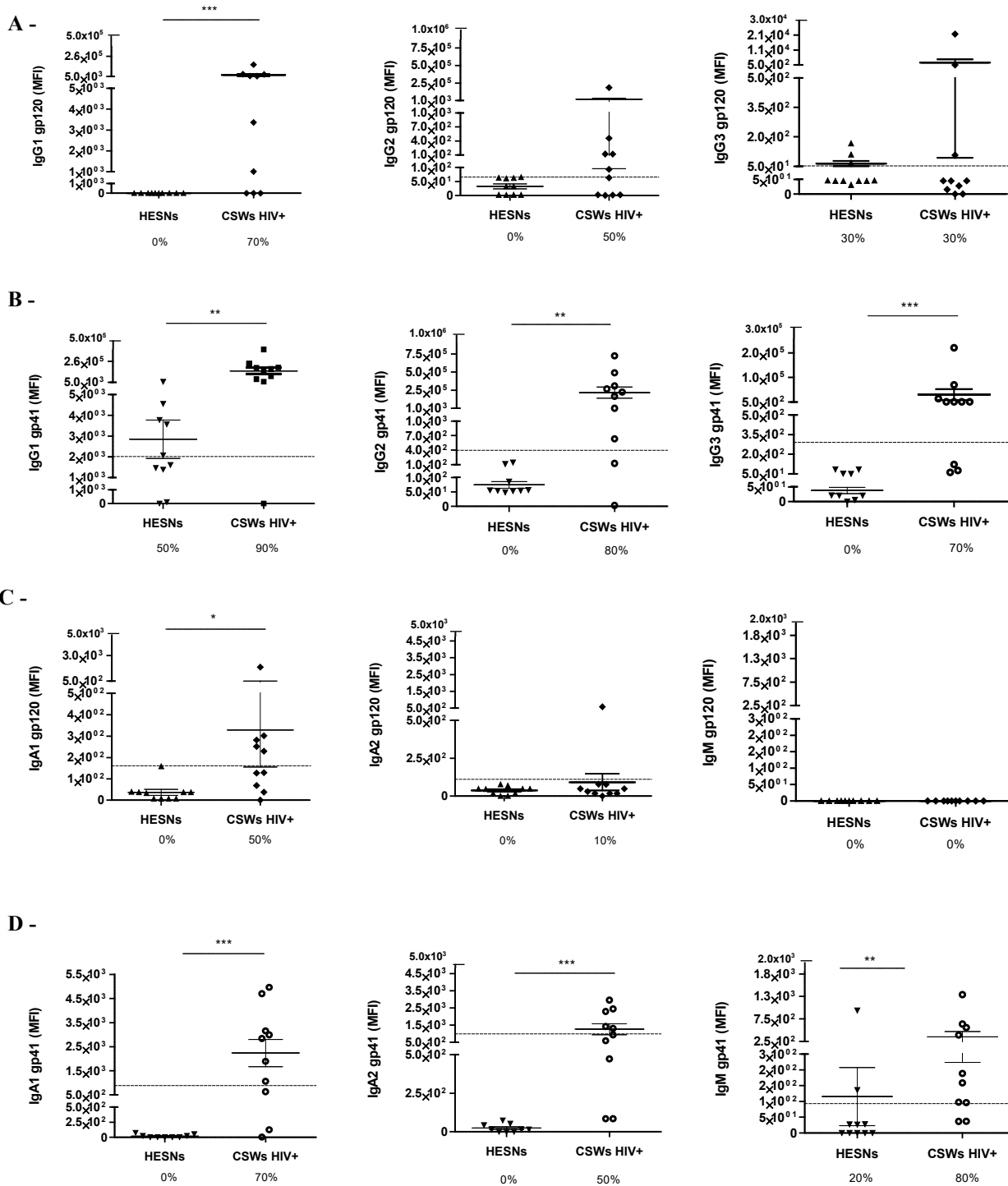


**Figure 5. Total immunoglobulin (Ig) isotype concentrations in cervicovaginal lavage (CVL) supernatants of HIV-1 uninfected non-CSW, HESN and HIV-1 infected CSW women.** Immunoglobulin isotype concentrations (ng/ml) in CVLs were compared with Mann Whitney U test for pair-wise comparisons between HESNs and the two other groups. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Significance levels are shown as \*(p < 0.05), \*\*\*(p < 0.001). HIV, human immunodeficiency virus; CSWs, commercial sex workers; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative. SD, standard deviation.



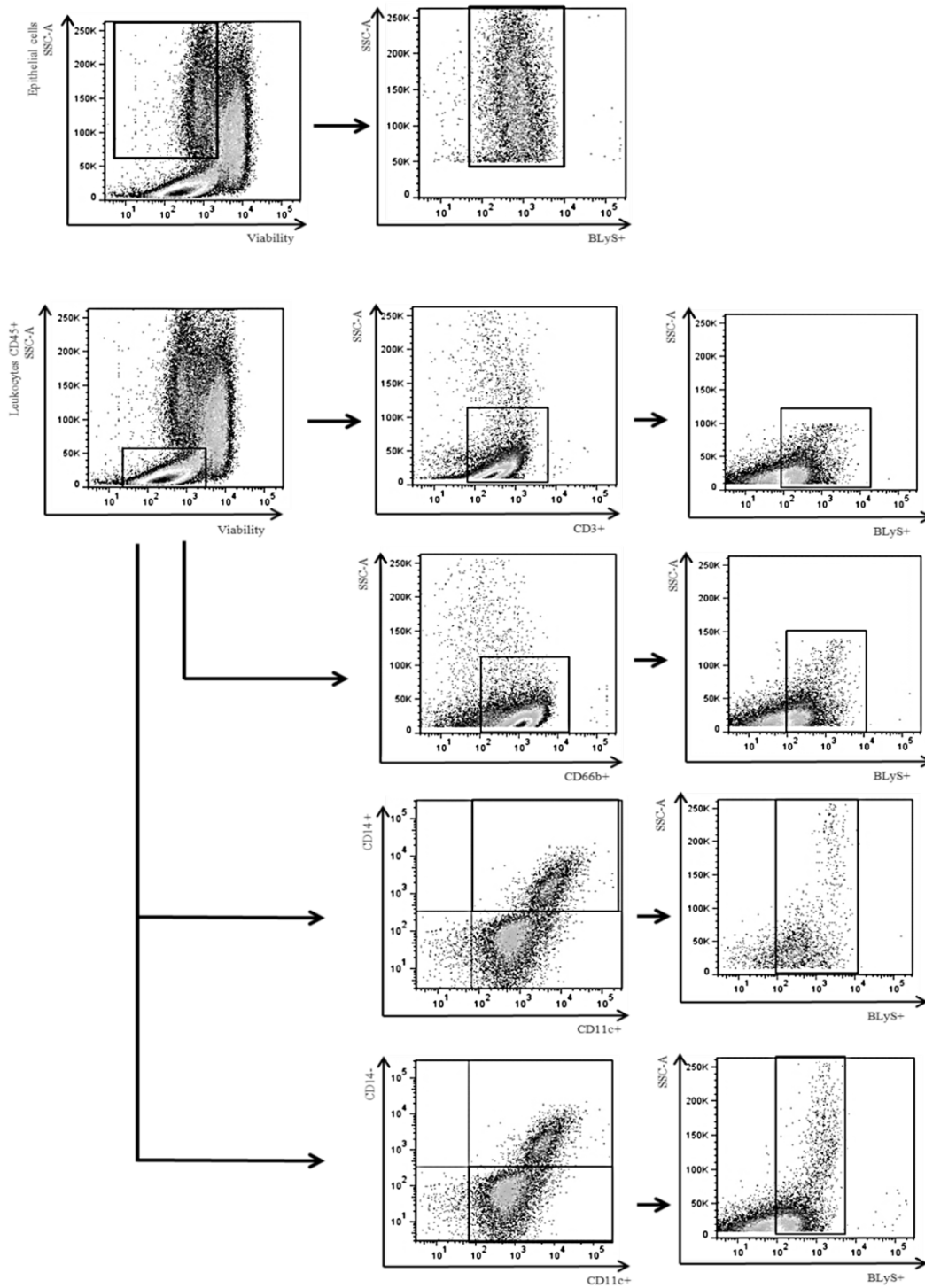
**Figure 6. Levels of immunoglobulin (Ig) isotypes recognizing HIV-1 envelope proteins gp120 and gp41 in the cervicovaginal lavages (CVLs) of HESN and HIV-1 infected CSW women.** Levels of immunoglobulin isotypes recognizing gp120 of HIV-1 (A) IgG1, IgG2 and IgG3, (C) IgA1, IgA2 and IgM, and immunoglobulin isotypes recognizing gp41 of HIV-1 (B) IgG1, IgG2 and IgG3, and (D) IgA1, IgA2 and IgM. Immunoglobulin isotypes levels were determined by Multiplex assay, data are presented as mean fluorescence intensity as mean  $\pm$  SD. Data were compared with Mann Whitney U tests between HESNs and HIV-infected CSWs. Significance levels are shown as \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ). The dotted line represents the cut-off value for positivity, which was set as the MFI for 10 HIV-uninfected non-CSWs<sup>+</sup> 3 SD. Values below the dotted line were considered as negative. Detection rates are expressed as %. HIV, human immunodeficiency virus; CSW, commercial sex worker; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative; gp, glycoproteins. SD, standard deviation.

Figure 6



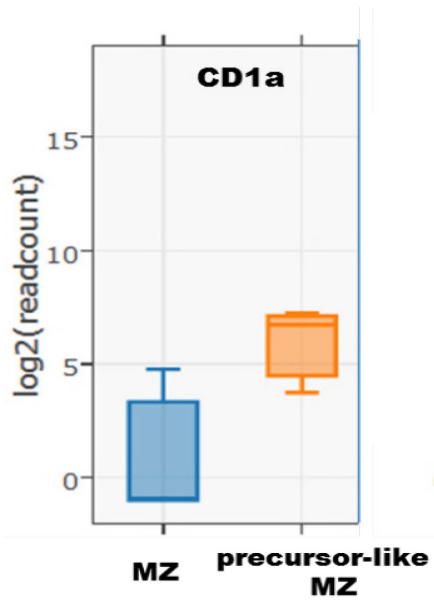
## 2.4.11 Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. Flow-Cytometry gating strategy for analysis of cells from cervico-vaginal lavages (CVLs).

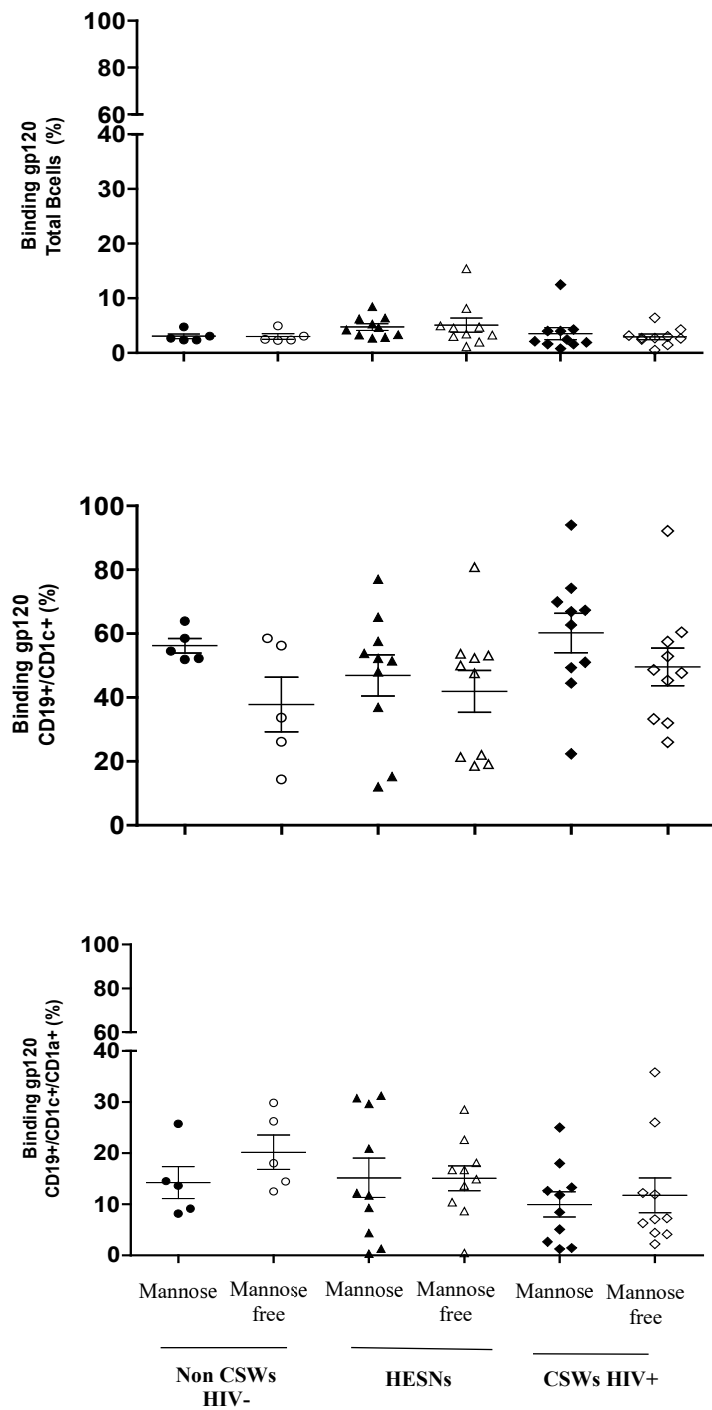


**Supplementary Figure 2. (A) RNA-Seq analyses of CD1a expression by *ex vivo* human blood marginal zone and precursor-like MZ B-cells.** Data are presented as the mean value of samples from 3 healthy donors  $\pm$  SD. (B) Cells were pre-incubated (dark circles) or not (clear circles) with mannose (5 ug/ml) for 40 minutes on ice, followed by incubation with fully glycosylated biotinylated gp120 IIIB at 5 ug/ml for 40 minutes on ice prior to adding the staining cocktail and streptavidin-PE. Data are presented in percentages (%) of gp120 binding for total B-cells (top panel), CD1c+CD1a- B-cells (middle panel) and CD1c+CD1a+ B-cells (lower panel). Statistical significance of differences was evaluated with Mann Whitney U test when statistical non-parametric and with Unpaired T test when statistical parametric between HESNs and the two other groups. HIV, human immunodeficiency virus; CSWs, commercial sex workers; HESN, HIV Highly-Exposed Seronegative.

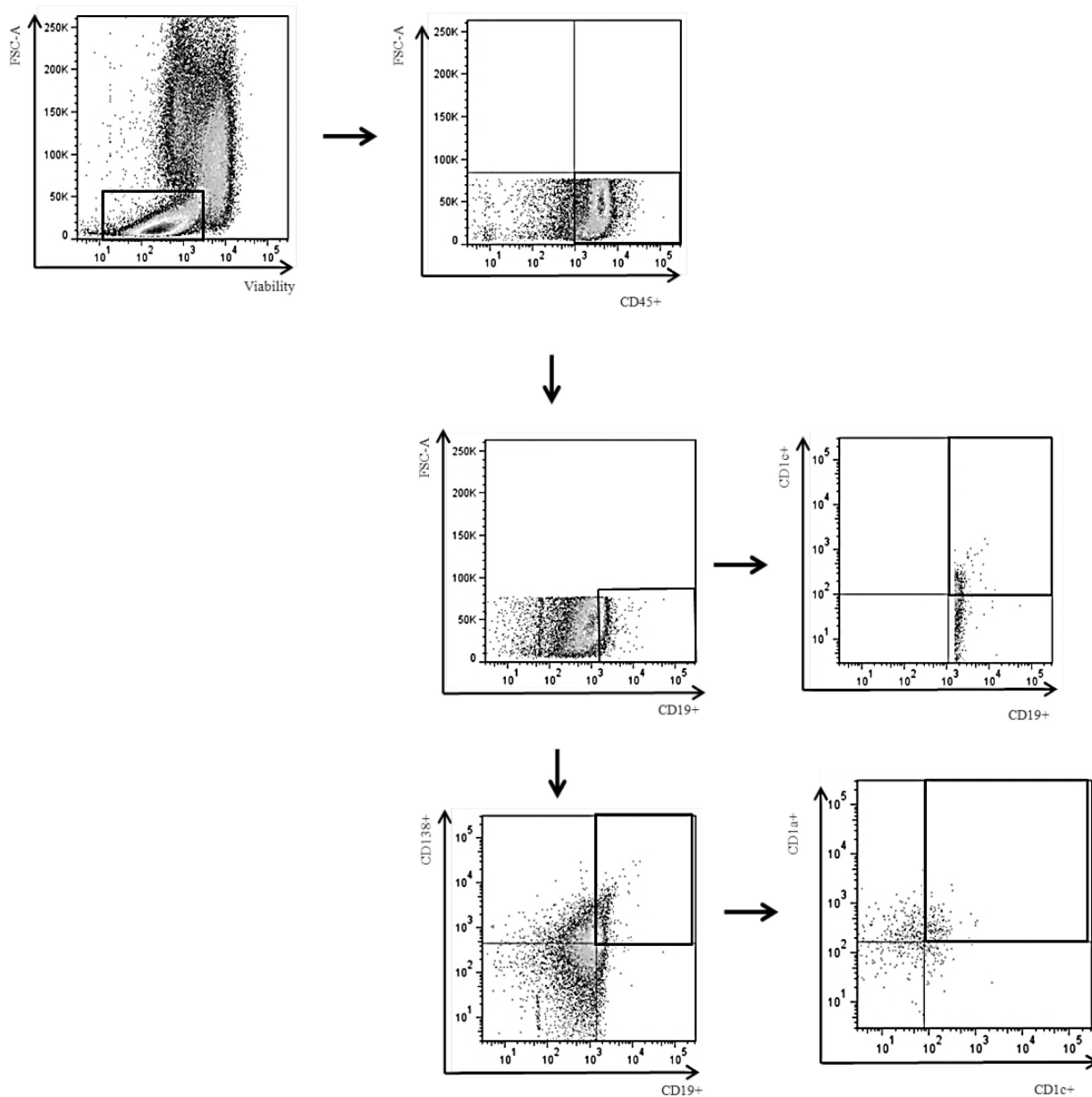
A-



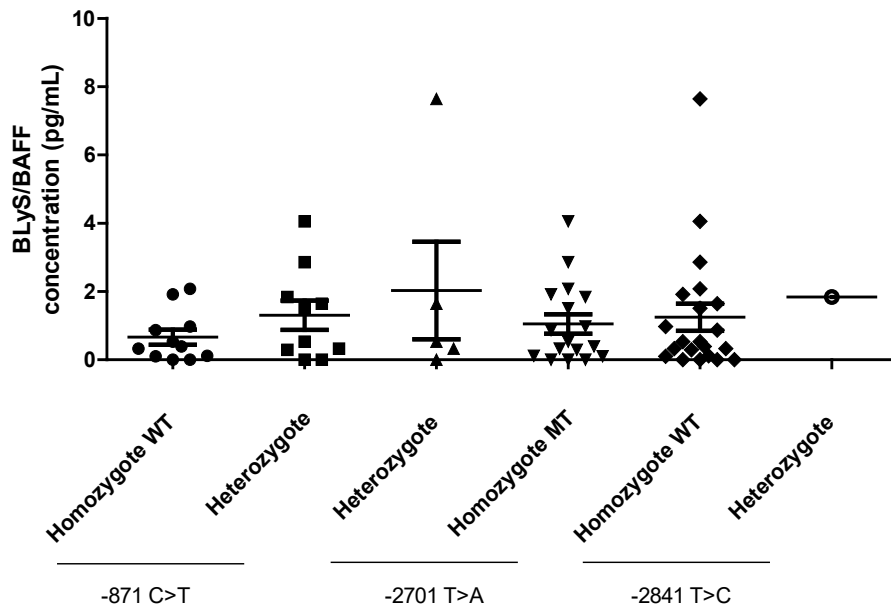
B-



**Supplementary Figure 3. Flow-Cytometry gating strategy for analysis of B-cells from cervico-vaginal lavages (CVLs).**



**Supplementary Figure 4. BLyS/BAFF expression levels in cervico-vaginal lavages (CVLs) do not correlate with BLyS/BAFF promotor polymorphisms in regions -871, -2701, -2841, amongst the three study groups. (WT : Wild Type ; MT : Mutant)**





## CHAPITRE III

### Augmentation de la fréquence des cellules T régulatrices et des cellules myéloïdes tolérogéniques dans la muqueuse génitale des HESN

#### 3.1 Mise en contexte

Nos études antérieures sur les femmes béninoises de notre cohorte ont démontré que les niveaux de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires de la muqueuse vaginale sont plus faibles chez les HESN comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Chez les CSW<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> le gradient de chimiokines attirant les cellules inflammatoires, comme MCP-3 et MIG, s'est avéré être plus élevé dans leur TGF par rapport à leur compartiment systémique. En revanche, nous avons démontré que les niveaux de la protéine inflammatoire MIP-1 $\alpha$  (CCL3), connue pour réduire l'infectiosité du VIH-1, sont plus élevés chez les HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Nous avons également observé un gradient de chimiokines protecteurs, comme MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ , plus élevé dans la muqueuse vaginale des HESN par rapport à leur compartiment systémique.

Suite à ces données et en accord avec les faibles niveaux de BLyS/BAFF soluble observées dans le TGF des HESN (chapitre 2), nous pensons que certaines cellules et cytokines tolérogéniques pourraient contribuer à l'immunité naturelle dans le TGF des HESN face à l'infection au VIH-1.

### 3.2 Contribution des auteurs dans l'article 2

Auteurs: Valérie Thibodeau\*, Lyvia Fourcade\*, Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier, Michel Roger \*copremiers auteurs

#### ✚ Statut de l'article :

Publié dans *Scientific Reports* en février 2017, 7, 43857, DOI: 10.1038/srep43857.

#### ✚ Conception et mise au point des expériences :

Valérie Thibodeau, Lyvia Fourcade, Johanne Poudrier et Michel Roger.

#### ✚ Expériences effectuées, analyses des données statistiques et présentation des figures :

- Valérie Thibodeau a effectué toutes les expériences et les analyses statistiques sur les CSW HIV<sup>+</sup> et les CSW HIV<sup>-</sup> – Contribution 50 %.
- J'ai réalisé toutes les expériences sur les femmes contrôles de la population générale Non CSWs HIV<sup>-</sup> et les analyses statistiques qui y sont associées, ainsi que la présentation de toutes les figures présentes sur cet article – Contribution 50 %.

Johanne Poudrier et Michel Roger ont supervisé toutes les expériences et les analyses statistiques.

#### ✚ Contribution en approvisionnement en réactifs, matériels et outils d'analyses :

Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier et Michel Roger.

#### ✚ Rédaction de l'article :

Valérie Thibodeau, Fourcade Lyvia, Johanne Poudrier et Michel Roger.

### 3.3 Résumé

Nous et d'autres avons montré que les travailleuses du sexe (TS) hautement exposées au VIH-1 séronégatives (HESNs) maintiennent des conditions inflammatoires génitales faibles pour prévenir l'infection par le VIH. Le virus du VIH de type 1 interagit avec des récepteurs de types Toll (TLRs)-7/8, qui induisent l'IFN- $\alpha$ , une importante cytokine antivirale et immunomodulatrice, qui agit en association avec l'IL-10, HLA-G et l'ILT-4 afin d'initier une boucle anti-inflammatoire tolérogénique/régulatrice. Pour répondre au questionnement des éléments associés à une immunité naturelle au VIH-1, nous avons caractérisé le profil d'expression des molécules TLR7, IFN- $\alpha$ , IL-10, HLA-G et ILT-4 dans le tractus génital féminin des TS infectées, les HESNs et les femmes non-TS non infectées de la population générale du Bénin. Les cellules endocervicales myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup> des HESNs expriment des niveaux plus élevés d'IFN- $\alpha$ , TLR-7, IL-10 et HLA-G que les TS infectées et les non-TS non infectées. Une caractérisation plus poussée des cellules endocervicales myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup> des HESNs a révélé une population de cellules myéloïdes tolérogéniques CD103<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> exprimant HLA-G, ILT-4, mais également des niveaux élevés d'IFN- $\alpha$  et d'IL-10. Parallèlement, les HESNs présentent des fréquences plus élevées de cellules endocervicales régulatrices T-CD4<sup>+</sup> comparées aux TS infectées et aux non-TS non infectées de la population générale. Ainsi, l'implication des cellules myéloïdes tolérogéniques exprimant des niveaux élevés de molécules antivirales joue un rôle important dans la réponse immunitaire de la muqueuse génitale afin de prévenir l'infection au VIH.

Mots-clés : VIH-1, HESN, TS, tractus génital féminin, IFN $\alpha$ , microenvironnement tolérogénique/régulateur.

### **3.4 Article 2 : Highly-Exposed HIV-1 seronegative Female Commercial Sex Workers sustain in their genital mucosa increased frequencies of tolerogenic myeloid and regulatory T-cells**

V. Thibodeau<sup>1,2</sup>, L. Fourcade<sup>1,2</sup>, A.-C. Labbé<sup>2</sup>, M. Alary<sup>3,4</sup>, F. Guédou<sup>5</sup>, J. Poudrier<sup>1,2</sup>, M. Roger<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, <sup>3</sup>Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, Canada, <sup>4</sup>Département de médecine sociale et préventive, Université Laval, Québec, <sup>5</sup>Dispensaire des IST, Cotonou, Benin.

Word count in text: 4296

Word count in abstract: 200

Number of figures; 5, table; 1, supplementary figures; 3.

Reference count: 50

Part of this work was presented at the International Congress of Immunology, August 2013, Milan, and Italia. Abstract # P4.03.55.

¶contributed equally to this work

\*correspondence: Michel Roger, Laboratoire Immunogénétique, Centre de Recherche du CHUM, Tour Viger R05.436A, 900 rue Saint-Denis, Montréal, Canada H2X 0A9. Phone: (514) 890-8000 (31263) Fax: (514) 412-7512. E-mail: michel.roger@ssss.gouv.qc.ca

### 3.1.1 Abstract

We and others have shown that HIV-1 highly-exposed seronegative (HESN) female commercial sex workers (CSWs) maintain low genital inflammatory conditions to prevent HIV infection. HIV-1 interacts with toll-like receptors (TLR)-7/8 to induce interferon (IFN)- $\alpha$ , an important antiviral and immunomodulatory cytokine, which acts together with interleukin (IL)-10, human leukocyte antigen (HLA)-G and immunoglobulin-like transcript ILT-4 to initiate a “tolerogenic/regulatory” anti-inflammatory loop. In view of further unravelling elements associated with natural immunity to HIV-1, we have characterised TLR-7, IFN- $\alpha$ , IL-10, HLA-G and ILT-4 expression profiles in the genital tract of female CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs from Benin. Endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup> cells from HESN CSWs expressed higher levels of IFN- $\alpha$ , TLR-7, IL-10 and HLA-G than those from both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs. Further characterization of the endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup> cells in HESN CSWs revealed a population of “tolerogenic” CD103<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> myeloid cells expressing high levels of IFN- $\alpha$  and IL-10. Concomitantly, HESN CSWs had higher frequencies of endocervical regulatory CD4<sup>+</sup> T-cells when compared to those from the two other groups of women. These novel findings provide strong evidence to support the implication of tolerogenic myeloid cells expressing high levels of antiviral molecules in shaping the genital mucosal immune response to prevent HIV infection.

Key Words: HIV-1, HESN, CSWs, female genital tract, IFN $\alpha$ , tolerogenic/regulatory microenvironment

### 3.1.2 Introduction

In 2015, an estimated 36.7 million people were living with HIV/AIDS worldwide. Most HIV-1 infections are acquired through heterosexual intercourse, and in Africa, 60% of new HIV-1 infections affect women [1]. Vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV-1, but the success of designing such agents needs a better understanding of the mechanisms of transmission and HIV-specific immune responses at the initial site of infection.

The female genital tract (FGT) constitutes a main portal of entry for HIV-1, and plays a critical role in protecting the host against pathogens while maintaining a tolerance to a commensal flora [2, 3]. To this end, the FGT is provided with an array of protective mechanisms from the innate and adaptive arms of the immune system to maintain a delicate balance between protection and tolerance [4]. FGT immunity is also tightly regulated by a hormonal/inflammatory process throughout the menstrual cycle, having to deal with the pressure of procreation and microbial control [5, 6]. The innate immune compartment of the FGT involves genital epithelial cells (GEC), dendritic cells [7], Langerhans cells (LC), macrophages, natural killer (NK) cells and neutrophils, which confer protection through the production of antimicrobial agents, chemokines and cytokines [8, 9]. GECs, which form an uninterrupted barrier between the lumen and underlying cells, have been shown to express toll-like receptors (TLRs) 1 to 9, indicating the potential to respond to a wide range of microbes/pathogens [8, 10]. It has been shown that mucosal epithelial cells (genital and intestinal) respond directly to envelope glycoproteins of HIV-1 by upregulating inflammatory cytokines [11]. Given the pivotal role GECs play in modulation of FGT mucosal integrity, it is likely that sensing through TLRs is involved in regulating the balance between tolerance vs defence, and modulating subsequent immunity [9, 10, 12]. The FGT associated lymphoid organs are part of the mucosal associated lymphoid tissue (MALT), which also includes the gastrointestinal lymphoid tissue (GALT). Unlike the GALT, the FGT does not include M cells or organised lymphoid crypts or follicles in the sub-mucosa [12] but contains uterine lymphoid aggregates [13]. Local immunisations at the FGT level have been shown to induce local CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> CTL, IgG and IgA responses. However, mechanisms of immune induction in the FGT remain poorly understood [2, 3, 5]. The link with adaptive immunity mainly involves DC, the

latter which through pattern recognition receptor (PRR) such as TLR sensing are also involved in maintaining a homeostatic balance between tolerance and inflammation. Cross-talk between epithelial cells and sub-mucosal DC involves immunoregulatory cytokines and lead to activation of effector cells in the lamina propria. DC are also pivotal in orchestrating innate and adaptive immune responses directly or by migrating to FGT mucosal associated draining lymphoid organs to regulate B and T lymphocyte responses [8, 9, 14].

Mucosal exposure to HIV-1 in the absence of infection was documented in different cohorts across the world, including the Beninese commercial sex workers (CSWs) and evidence supports a major role for the FGT microenvironment and innate immune system in sustaining resistance against HIV-1 infection [2, 15, 16]. The demonstration of the presence of low-inflammatory conditions in the FGT of HIV-1 highly-exposed seronegative (HESN) Beninese and Kenyan CSWs has recently been described [17-20]. However, the biological impact of HIV-1 on FGT immunity and how infection could be avoided/controlled are still largely unresolved partially because studies on HIV FGT immunity remain challenging, principally due to the difficulty of recruiting participants, obtaining fresh samples, adequate numbers of viable cells, and controlling for major confounders such as sexually transmitted infections, menstrual cycle and risk behaviours.

Based on our previous studies [18, 19, 21] and others [17, 20, 22, 23], we hypothesized that maintenance of low-inflammatory conditions in the FGT of HESN individuals helps to prevent excessive immune activation and lower HIV-1 target availability, likely maintaining the integrity of the mucosal barrier to protect from HIV-1 infection [2]. In the present study, we aimed to further characterize immune cells that might be involved in the production of the low-inflammatory conditions observed in the FGT of HIV-1 HESN CSWs.

### **3.1.3 Methods**

#### **Study population**

Female CSWs were recruited through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin. Non-CSW control women at low risk for exposure were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women were excluded from the study if, they were less than 18 years old, menstruating or pregnant. At

enrolment, participants were asked to answer a questionnaire about demographic information, sexual behaviour, duration of sex work (i.e number of years of practice), number of sex partners, condom use, vaginal douching practices, and reproductive history. Each participant underwent a genital examination by a physician. Vaginal specimens were obtained for diagnosis of candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis by microscopic examination and HSV infection by PCR. Endocervical swabs were obtained to test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection using BD ProbeTec ET system (Strand Displacement Assay, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Peripheral blood was taken for HIV, syphilis, HSV and progesterone testing by immunoassays. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV-1 specific IgG tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV seronegative, whereas reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II non-reactive) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). For the present study we selected genital samples from 22 HIV-1-uninfected CSWs or HESN, 24 treatment-naïve HIV-1-infected CSWs and 13 HIV-1-uninfected non-CSW control women. For the phenotype characterisation of GEC, myeloid and CD4<sup>+</sup> T cells, endocervical samples from 9 or 7 HIV-1-uninfected CSWs, 10 or 7 treatment-naïve HIV-1-infected CSWs and 5 HIV-1-uninfected non-CSW women were available, respectively. The three study groups were all in the follicular phase of their menstrual cycle as determined by progesterone levels, not taking oral contraception, and had no co-infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis or candidiasis. The average blood CD4<sup>+</sup> T-cells count for HIV-1-infected CSWs was 500 cells/mm<sup>3</sup>.

### **Ethics statement**

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The methods reported in this paper were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou and the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Ethics Committees.



### **Cervico-vaginal lavage (CVL) sample collection and preparation**

CVL samples were obtained from all study participants by a physician, using a 10-ml syringe filled with sterile 1x phosphate-buffered solution (PBS) and aimed directly into the cervical os. CVL fluids were then collected, transferred immediately into 20 ml of RPMI-1640, kept on ice, and processed within 1 hour. CVL samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and supernatants were concentrated on a 3 KDa Amicon membrane and were stored at -80°C until shipped on dry ice to Montreal, Canada. CVL cells were cryopreserved in liquid nitrogen until shipped in transport tanks to Montreal, Canada

### **Endocervical cell sample collection and preparation**

Endocervical cells were collected using a cytobrush under speculum examination by inserting the cytobrush into the cervix, rotating 360° and immediately placing in 5 mL of RPMI. Cytobrush samples with visible blood contamination were excluded from further analysis. Samples were kept on ice and processed within 1 hour. The cytobrush was vortexed, cells were flushed out of the brush, suspended in freezing medium (90% heat inactivated fetal bovine serum (hi-FBS), 10% DMSO) and cryopreserved in liquid nitrogen until shipped in transport tanks to Montreal, Canada.

### **Cytokines measurement**

Cytokines were measured in CVLs using the ProcartaPlex immunoassay (Affimetrix/eBioscience, San Diego, CA, USA), which allows simultaneous detection of IFN- $\beta$ , IL-10, IL-17A, IL-22, and TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  was quantified by Bio-Plex cytokine/chemokine assay (Bio-Rad, Hercules CA, USA ) and TGF- $\beta$  was quantified by Milliplex (Millipore, Billerica, MA, USA). Analysis was performed on a Luminex® 200 System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The final concentration for a given cytokine in the CVL sample was determined as follows: concentration obtained with the Luminex analyser ( $\text{pg ml}^{-1}$ ) / (CVL concentration factor). The concentration factor was calculated as follows: initial volume/final volume (after concentration). Samples below Lower Detection Limit (LDL) were assigned a value of 0 pg/ml. sHLA-G levels were measured using the Human sHLA-G Immunoassay kit (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), which allows simultaneous detection of HLA-G1 and -G5 soluble proteins without discrimination. The final concentration of sHLA-G in the CVL

sample was determined as follows: concentration obtained with the sHLA-G Elisa assay (units per ml)/(CVL concentration factor).

### **Flow-Cytometry analyses**

Endocervical cells from cytobrush samples were thawed, washed and processed for flow-cytometry analysis. Briefly, a maximum of  $2 \times 10^5$  endocervical cells per well were used for staining. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1x PBS, 2% heat inactivated (hi)-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10 ug/ml mouse and/or rat IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). The following conjugated mouse or rat anti-human monoclonal antibodies were used: anti-CD3-e fluor 605 NC, anti-CD138-Pe, anti-CD158a-Pe Cy7, anti-CD3/anti-CD19/ anti-CD56-Per CP e fluor 710, anti-CD14-e fluor 605 NC, anti-CD11c-Pe, anti-HLA-DR-APC 780, anti-BDCA2-Pe Cy7, and anti-CD11c Pe Cy7, anti-CD103-FITC, anti-CD8-APC 780, anti-LAP-Pe, and anti-FOXP3-488 (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD66b-FITC, anti-CD1a-a fluor 700, and anti-CD207-Pe, anti-ILT4-APC, anti-CD56-Brilliant Violet 510, and rat anti-IL-10-Pe Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA); anti CD19-FITC, anti-CD45-V450, anti-CD209-Pe CF594, anti-HLA-G-biotin/Streptavidin-Pe CF594, anti-IFN- $\alpha$ 2b-Pe, anti-TLR7-FITC, anti-CD11c-Pe CF594, HLA-G-Per CP Cy5.5, anti-CD138-BV510, anti-CD4-a fluor 700, and anti-CCR5 (CD 195)-Pe CF504 (BD-Biosciences); anti-Pan Cytokeratin-APC (EXBIO Praha Czech Republic); anti-CD19-Pacific Green (Life Technologies); anti-CD45RA- BV711 (BioLegend, San Diego, CA, USA); anti-LAG-3- Pe, (R&D Systems, Minneapolis, USA); anti-CD3- eVolve 605, anti-ICOS- APC (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD45- BUV395, anti-CD49- BV786, anti-CTLA-4- BV421, anti-PD-1- PerCP Cy 5.5, anti-CD8-APC/H7, anti-CD4- a fluor 700, and anti-LAP- PeCF 594 (BD-Biosciences). Intracellular labelling was performed using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit and perm/wash buffer (BD-Biosciences). Intracellular non-specific binding sites were blocked using perm/wash buffer containing 20% hi-FBS, 50% rat serum and 20 ug/ml mouse IgG. Cells were kept at 4°C in 1.25% paraformaldehyde for 18 hours prior to analysis. Data acquisition of  $5 \times 10^4$  events per sample was performed with an LSRFortessa (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar,

Ashland, OR, USA). All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values (Supplementary Figure 1) and isotype controls. Anti-mouse Ig( $\kappa$ ) and anti-rat Ig( $\kappa$ ) Compbeads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings. CS&T beads (BD) were routinely used to calibrate the LSRFortessa to exclude the possibility of instrument-related fluorescence intensity changes over time, and we verified consistency prior to each data acquisition session using application settings based on Rainbow beads (BD).

### **Statistical analyses**

Data from HESN CSWs were compared separately with those of HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs. The statistical significance of difference between groups was determined by Fisher's exact test for categorical variables and unpaired Student's T-test or one-way ANOVA analysis for variance when continuous variables were normally distributed or by Mann-Whitney U test otherwise. The D'Agostino-Pearson normality test was used to determine whether the values were sampled from a Gaussian distribution. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

### **3.1.4 Results**

#### **Socio-demographic characteristics of the study population**

The socio-demographic characteristics of female CSWs and non-CSWs are shown in Table 1. HIV-1-infected CSWs were older than the HIV-1-uninfected (HESN) CSWs and non-CSWs. All women were practicing vaginal douching. Duration of sex work, average number of clients and condom use were similar between the HESN CSWs and HIV-1-infected CSW groups.

#### **Cytokines and soluble HLA-G expression levels in cervico-vaginal lavages (CVLs) from HESN CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women**

Levels of TNF- $\alpha$ , Rantes, IL-17A, IL-10, IL-22 and IFN- $\beta$  were lower in the CVLs from HESN CSWs when compared to those measured in the CVLs from HIV-1-infected CSWs (Fig. 1). Interestingly, HESN CSWs had higher CVL levels of IFN- $\alpha$  than HIV-1-infected CSWs (Fig. 1h). HESN CSWs had similar CVL levels of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Rantes, and IL-22 (Fig. 1a-c, e), lower levels of IL-17A, IFN- $\alpha$  and - $\beta$  (Fig. 1d, h-i), and higher levels of IL-10 and soluble HLA-

G (sHLA-G) (Fig. 1f-g) than HIV-1-uninfected non-CSW women. In agreement with previous studies [17-23], these observations show that the FGT of HESN CSWs exhibit relatively low levels of pro-inflammatory cytokines in comparison to HIV-1-infected CSWs and high levels of regulatory molecules such as IL-10 and sHLA-G in comparison to HIV-1-uninfected non-CSW women.

### **Distribution of cell populations in endocervical samples from HESN CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women**

Due to the low leukocyte yield in samples from CVLs, cells of the epithelial, myeloid and lymphoid lineages were characterized in endocervical samples following multi-colour flow cytometric analysis. The GECs (CD45<sup>+</sup>CK<sup>+</sup>) were the most abundant cell population (42%) found in the endocervical samples, followed by CD45<sup>+</sup>CK<sup>-</sup> leukocytes negative for the lineage markers CD3, CD19, and CD56 (41%). The latter group of cells were divided into two groups based on HLA-DR expression; myeloid (HLA-DR<sup>+</sup>) cells (6%) and granulocytes (HLA-DR<sup>-</sup>, CD66b<sup>+</sup>) (35%). Cells carrying markers of the lymphoid lineage CD45<sup>+</sup>CK<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> (T-cells) or CD19<sup>+</sup> and/or CD138<sup>+</sup> (B-cells, and plasmablasts and/or plasma cells) or CD56<sup>+</sup> (NK-cells) represented 17% of the total endocervical cell population. The relative frequencies of these cell populations were similar between the three study groups (data not shown).

### **Phenotypic characterisation of epithelial cells in endocervical samples from HESN CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women**

We evaluated the GECs' expression of TLR-7, IFN- $\alpha$ , IL-10 and HLA-G found to be of major importance for their antiviral and immune-regulatory properties [21, 24-28]. The GEC levels of expression of TLR-7, IFN- $\alpha$ , IL-10 and HLA-G were lower in HESN CSWs when compared to those found in HIV-1-infected CSWs, reaching significant levels for IFN- $\alpha$  and HLA-G (Fig. 2). Levels of TLR7 and IFN- $\alpha$  expression by GECs were lower in HESN when compared to those in HIV-1-uninfected non-CSWs (Fig. 2b-c), whereas similar levels of expression were found for IL-10 and HLA-G between the two groups (Fig. 2d-e).

### **Characterisation of HLA-DR<sup>+</sup> myeloid cells in endocervical samples from HESN CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women**

The levels of expression of TLR-7, IFN- $\alpha$ , IL-10 and HLA-G by endocervical lineage<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> myeloid cells were significantly higher in HESN CSWs when compared to those observed in both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 3b-e). Levels of immunoglobulin like transcript ILT-4 expression by myeloid cells were similar for the two CSW groups (Fig. 3f), but expression was significantly higher in myeloid cells from the HESN CSWs when compared to those from HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 3f).

Further characterization of the endocervical myeloid lineage<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells revealed a population expressing CD11c and CD14 as well as both IFN- $\alpha$  and IL-10. The relative frequencies of these CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IFN $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells in HESN CSWs were higher than those in HIV-1-infected CSWs but lower than in those from HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 4b left panel). The majority of this cell subset expressed CD103 (80%) and HLA-G (87%), and a relatively large proportion also expressed CD1a (66%) and ILT-4 (55%). Intensity of expression of IFN- $\alpha$  and IL-10 by these cells were similar between the three groups (Fig. 4b middle and right panels), except for lower levels of IFN- $\alpha$  expression in the HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 4b middle panel). We also found a population of myeloid lineage<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> which were negative for CD11c and CD14 but positive for both IFN- $\alpha$  and IL-10. In contrast to the CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IFN $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> subset, a smaller proportion of the CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>IFN $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells were positive for CD103 (30%), HLA-G (40%) and ILT-4 (36%), whereas the proportion of cells expressing CD1a (72%) was similar. The relative frequencies of the CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>IFN $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cell subset were lower in the HESN CSWs when compared to the HIV-1-infected CSWs (Fig. 4c left panel). Intensity of expression for IFN- $\alpha$  and IL-10 by these cells were similar between the three groups (Fig. 4c middle and right panels), except for lower levels of IFN- $\alpha$  expression in the HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 4c middle panel).

### **Characterisation of CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell populations in endocervical samples from HESN CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women**

We found no significant difference in the percentages of total endocervical CD4<sup>+</sup> T-cells or CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup> likely “effector” T-cells between the three study groups (Fig. 5b left and right panels). Given our finding that genital myeloid cells from HESN CSWs presented a more

“tolerogenic/regulatory” profile, we characterised the CD4<sup>+</sup> T-cell regulatory profile. We identified two distinctive CD4<sup>+</sup> T-cell regulatory phenotypes in endocervical samples of the three study groups, namely CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells (T<sub>regs</sub>) and CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> type 1 regulatory T cells (T<sub>r1</sub>) [29]. We also found expression of the molecules programmed cell death protein (PD)-1, TGF-β latency associated peptide (LAP), inducible costimulatory (ICOS), lymphocyte-activation gene (LAG)-3 and cytotoxic T-lymphocyte associated protein (CTLA)-4 on a great percentage of cells within these two cellular types. The relative frequencies of T<sub>regs</sub> expressing PD-1 were significantly increased in the HESN CSWs when compared to both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 5c left panel). The frequencies of T<sub>r1</sub> were similar between the three groups (Figure 5C right panel). Interestingly, the intensity of expression of PD-1 was greater in both T<sub>regs</sub> and T<sub>r1</sub> from HESN CSWs when compared to the two other groups (Fig. 5d-e left panels). Moreover, T<sub>regs</sub> of HESN CSWs had higher IL-10 and FoxP3 expression levels than those from both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs, reaching significant differences with the latter group (Fig. 5d middle and right panels). Levels of CTLA-4 and LAG3 expression in T<sub>r1</sub> from HESN CSWs were similar to those in HIV-1-infected CSWs but different than those in HIV-1-uninfected non-CSW women (Fig. 5e middle and left panels).

### 3.1.5 Discussion

We and others have shown that natural immunity to HIV-1 in HESN CSWs is associated with low genital inflammatory conditions [17-23]. To further our understanding of the mechanisms that orchestrate this low inflammatory profile and confer protection against HIV-1, we have characterized and compared inflammatory vs “tolerogenic/regulatory” cytokines as well as the phenotype of genital immune cells and their “tolerogenic/regulatory” profile in the FGT of CSWs from Benin.

As expected, HESN CSWs had lower levels of pro-inflammatory cytokines in their genital fluids than did the HIV-1-infected CSWs. Interestingly, relatively higher levels of IFN-α were found in HESN CSWs, which could be critical to sustain immune homeostasis, antiviral activity and restriction factors in cells at the portal of entry for the virus. Indeed, following viral encounter/infection, the induced IFNs can upregulate a myriad of IFN-stimulated genes (ISGs),

which have been shown to interfere with multiple viruses at various life cycle stages [28, 30]. Moreover, a recent study demonstrated that blockade of the IFN-I receptor caused reduced antiviral gene expression, increased SIV reservoir size and accelerated CD4<sup>+</sup> T cell depletion with progression to AIDS [31]. The elevated IFN levels observed in the FGT of HIV-1-uninfected non-CSWs also suggest that these African women might be exposed to microbial factors or have inflammatory/infectious conditions other than HIV favouring IFN production.

The relatively high levels of IL-22 and IL-17A in CVLs of HIV-1-infected CSWs may possibly reflect Th17 activity and an attempt from the infected host to preserve mucosal integrity [32, 33]. IL-22 in conjunction with IL-17A or IL-17F synergistically induced the expression of  $\beta$ -defensin 2 and other antimicrobial peptides (S100A9, S100A7 and S100A8) [33]. However, sustained Th17 activity may lead to barrier impairment, increasing epithelium permeability and allowing for microbial translocation and chronic inflammation/activation [34]. On the other hand, the relatively high levels of IL-22 and IL-17A found in the CVLs from HIV-1-infected CSWs may be produced by cell types other than Th17 such as innate lymphoid cells, natural killer cells, macrophages and neutrophils, therefore additional experiments are warranted to directly assess Th17 activity and mucosal integrity in the genital mucosa of CSWs. GECs from HESN CSWs expressed low levels of TLR7, IFN- $\alpha$ , IL-10 and HLA-G when compared to those observed in HIV-1-infected CSWs. As to whether the discrepancy between IFN- $\alpha$  levels measured in the CVLs and those expressed by GECs of HESN and HIV-1-infected CSWs is linked to differential mechanistic and/or kinetics of a production/release/consumption loop remain to be established.

However, in contrast to that observed for GECs, endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup> cells from HESN CSWs expressed higher levels of IFN- $\alpha$  as well as TLR-7, IL-10 and HLA-G when compared to both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non CSWs. This is consistent with the elevated IFN- $\alpha$  and IL-10 levels we measured in the CVLs of HESN CSWs possibly to promote a potent antiviral and yet at the same time immunoregulatory profile. IL-10 levels are often elevated in the context of HIV, as reported here in the CVLs from HIV-1-infected CSWs, but the overall outcome of excessive IL-10 may well be to sustain chronic activation and dysregulation, and may lead to imbalanced Treg/Teffector ratios [35, 36] associated with HIV disease progression [2, 3]. Furthermore, high level of regulatory activity may impede viral eradication [37]. In contrast, a more modest elevation of IL-10, such as observed for HESN

CSWs, may be beneficial and promote an immunoregulatory microenvironment [38]. Although, additional experiments are needed to directly assess the impact of IL-10 on the production and functionality of  $T_{\text{regs}}$  observed in the mucosal samples of HESNs, several studies support the role of IL-10 in promoting immunoregulatory responses. Both IFN- $\alpha$  and IL-10 are involved in differentiation of long-lasting antigen-specific T-cell anergy and  $T_{\text{r1}}$  [39, 40]. *In vitro* studies have demonstrated that monocyte derived DCs treated with IL-10 and/or IFN- $\alpha$  were rendered “tolerogenic” and upregulated the inhibitory receptors ILT-3 and ILT-4, which promoted their capacity to induce  $T_{\text{r1}}$  [25, 41]. IL-10 is one of the key cytokines inducing HLA-G expression on myeloid cells [42]. The engagement of the inhibitory molecules ILT-2, ILT-3 and ILT-4 on myeloid cells by HLA-G prevents the up-regulation of costimulatory molecules, inhibits maturation and allows them to promote the differentiation of  $CD4^+$   $T_{\text{regs}}$  [27, 43]. It has been reported that, in addition to its membrane-bound form, sHLA-G also plays a role in promoting the induction of  $T_{\text{regs}}$  [44]. Amodio and colleagues identified a subset of “tolerogenic” DCs, named DC-10 that secrete high amounts of IL-10, express high levels of HLA-G and ILT-4 and bind  $CD4^+$ HLA-G $^+$  T-cells at the fetal maternal interface, where they may contribute to tolerance [24]. Furthermore, Gregori and colleagues have demonstrated that these DC-10 can induce  $T_{\text{r1}}$  via an IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway [26]. Interestingly, we found a subset of myeloid HLA-DR $^+$ CD11c $^+$ CD14 $^+$  “DC” bearing IFN- $\alpha$  and IL-10, which relative percentage is increased in endocervical samples of HESN CSWs. The fact that we found a significant increase in IFN- $\alpha$  expressing cells to be associated with phenotypically distinct myeloid HLA-DR $^+$  cells in endocervical samples of HESN CSWs supports the notion that production of IFN- $\alpha$  may be tightly regulated and restricted in these individuals. These myeloid HLA-DR $^+$ CD11c $^+$ CD14 $^+$ IFN- $\alpha^+$ IL-10 $^+$  cells also expressed high levels of CD103, which could correspond to their function as mucosal sentinels poised to respond to and translate microbial antigens to cells of the innate and adaptive immune response, as has been reported for similar populations in other mucosal sites [45]. Also, murine CD103 $^+$  DCs [46], and human CD103 $^+$  DCs found throughout the gut lamina propria are thought to be more effective at promoting Treg responses and therefore play a central role in maintaining tolerance and tissue homeostasis [14]. Interestingly, the majority of the myeloid CD11c $^+$ CD14 $^+$ IFN- $\alpha^+$ IL-10 $^+$  cells also expressed HLA-G and ILT-4, as do DC-10 [24, 26]. It is thus possible that the CD11c $^+$ CD14 $^+$ IFN- $\alpha^+$ IL-10 $^+$  myeloid population mostly bearing CD103 and HLA-G and found to be relatively increased



in endocervical samples of HESN CSWs play a similar role in the FGT, which would be consistent with the increased frequencies of endocervical  $T_{\text{regs}}$  we found for these individuals. This is also in agreement with previous findings showing elevated frequencies of  $T_{\text{regs}}$  in the blood of HESN CSWs from Kenya [47]. The higher expression levels of PD-1 we report for endocervical  $T_{\text{regs}}$  and  $T_{\text{r1}}$  of HESNs could reflect T-cell exhaustion, however we prefer the view by which these cells are in an homeostatic activated status, possibly regulating cytotoxic T lymphocyte (CTL) or DC activities via PD-1L [48, 49], which likely confers an advantage to these individuals. Furthermore, endocervical  $T_{\text{regs}}$  and  $T_{\text{r1}}$  cells from HESN also expressed higher levels of IL-10 and CTLA-4, respectively, which again reflect their regulatory activity [48].

Inversely, the myeloid  $\text{HLA-DR}^+\text{CD11c}^-\text{CD14}^-\text{IFN-}\alpha^+\text{IL-10}^+$  subset, which frequencies are significantly increased in the FGT of HIV-1-infected CSWs, expressed lower levels of CD103 and HLA-G. Interestingly, in contrast to  $\text{CD103}^+$  DCs,  $\text{CD103}^-$  DCs have a more immunogenic phenotype in both the steady state [50] and in an inflammatory context [51]. Moreover,  $\text{CD103}^-$  intestinal mouse DCs have been shown to induce differentiation of IFN- $\gamma$  and IL-17-producing effector T cells [35]. Therefore, the  $\text{CD103}^-$  myeloid cell subset found to be elevated in the FGT of HIV-1-infected CSWs could have a more “activated” phenotype than the  $\text{CD103}^+$  myeloid subset found in HESN CSWs. It is thus possible that the  $\text{CD103}^-$  myeloid cell subset found in HIV-1-infected CSWs may contribute to the inflammatory conditions observed in the genital mucosa of these women resulting in increase susceptibility to HIV-1 infection and disease progression/perpetuation at the initial site of exposure.

Because of the cross-sectional design, the present study cannot address whether the myeloid subsets and  $T_{\text{regs}}$  found to be increased in the FGT of HESN CSWs, have a protective role against HIV infection. Moreover, the control group HIV-uninfected non-CSWs differ from the HESN study group by both HESN status and exposure to sex work. Therefore, it is not possible to determine if the differences observed between these groups are due to regular exposure to sex antigens and semen of clients or if it is due to the HESN phenotype. A longitudinal study to compare samples before and after seroconversion and further phenotypic and functional characterisations are required to confirm the protective role, the exact nature of the myeloid and regulatory T-cells, and whether they represent different populations or stages of differentiation remain to be established. Nevertheless the findings reported herein support the

hypothesis that natural immunity/resistance to HIV-1 infection may be orchestrated by specific mucosal tolerogenic/regulatory myeloid cell populations, which promote T<sub>regs</sub> and induce a potent antiviral but regulated immune response to prevent excessive immune activation, lower HIV-1 target availability, and maintain the integrity of the mucosal barrier.

### **3.1.6 Acknowledgments**

We are indebted to N. Geraldo, A. Gabin, C. Assogba and C. Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M. Massinga-Loembe, G. Ahotin, L.Djossou, and E. Goma for their technical assistance and to G. Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We thank Dr S. Gregori (San Raffaele Institute for Gene Therapy, Milan, Italia) for the T<sub>H1</sub> cell staining protocol and Dr D. Gauchat from the flow cytometry core facility of the CRCHUM (Montreal, Canada). This work was supported by Grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119406) and the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses, Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

### **Authors' Contributions**

VT and LF performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. ACL, MA and FG were responsible for the participants' recruitment and provided clinical and laboratory data. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

### **Conflict of interest declaration**

The authors declare no conflict of interest.

### 3.1.7 References

- [1]. AIDS by the number-UNAIDS 2016 [Available from: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/AIDS-by-the-numbers-2016\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf).
- [2]. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol* 2012, 875821 (2012).
- [3]. Shacklett BL. Cell-mediated immunity to HIV in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 83, 190-195 (2009).
- [4]. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol* 88, 185-194 (2011).
- [5]. Wira CR, Fahey JV. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *AIDS (London, England)* 22, 1909-1917 (2008).
- [6]. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 63, 544-565 (2010).
- [7]. (CDC) CfDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30, 250-252 (1981).
- [8]. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 57, 61-79 (2002).
- [9]. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 206, 306-335 (2005).
- [10]. Trifonova RT, Doncel GF, Fichorova RN. Polyanionic microbicides modify Toll-like receptor-mediated cervicovaginal immune responses. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1490-1500 (2009).
- [11]. Pala P, Gomez-Roman VR, Gilmour J, Kaleebu P. An African perspective on mucosal immunity and HIV-1. *Mucosal immunology* 2, 300-314 (2009).
- [12]. Gribar SC, Anand RJ, Sodhi CP, Hackam DJ. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol* 83, 493-498 (2008).
- [13]. Yeaman GR, Guyre PM, Fanger MW, Collins JE, White HD, Rathbun W, et al. Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *Journal of leukocyte biology* 61, 427-435 (1997).
- [14]. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation* 119, 2441-2450 (2009).
- [15]. 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* 348, 1347-1351 (1996).
- [16]. Jennes W, Verheyden S, Demanet C, Adje-Toure CA, Vuylsteke B, Nkengasong JN, et al. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol* 177, 6588-6592 (2006).
- [17]. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihhi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal immunology* 5, 277-287 (2012).
- [18]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol* 30, 90-98 (2010).

- [19].Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal immunology* 1, 309-316 (2008).
- [20].Yao XD, Omenge RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal Immunol*, (2013).
- [21].Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PloS one* 6, e25185 (2011).
- [22].Card CM, Ball TB, Fowke KR. Immune Quiescence: a model of protection against HIV infection. *Retrovirology* 10, 141 (2013).
- [23].Lajoie J, Kimani M, Plummer FA, Nyamiobo F, Kaul R, Kimani J, et al. Association of sex work with reduced activation of the mucosal immune system. *J Infect Dis* 210, 319-329 (2014).
- [24].Amodio G, Mugione A, Sanchez AM, Vigano P, Candiani M, Somigliana E, et al. HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy. *Human immunology* 74, 406-411 (2013).
- [25].Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243 (2002).
- [26].Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116, 935-944 (2010).
- [27].Ristich V, Zhang W, Liang S, Horuzsko A. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Human immunology* 68, 264-271 (2007).
- [28].Verhoeven D, George MD, Hu W, Dang AT, Smit-McBride Z, Reay E, et al. Enhanced innate antiviral gene expression, IFN-alpha, and cytolytic responses are predictive of mucosal immune recovery during simian immunodeficiency virus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 192, 3308-3318 (2014).
- [29].Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* 19, 739-746 (2013).
- [30].Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nature reviews Microbiology* 13, 403-413 (2015).
- [31].Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* 511, 601-605 (2014).
- [32].Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol* 5, 670-680 (2012).
- [33].Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203, 2271-2279 (2006).
- [34].Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS pathogens* 6, e1000852 (2010).
- [35].Cerovic V, Houston SA, Scott CL, Aumeunier A, Yrlid U, Mowat AM, et al. Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal immunology* 6, 104-113 (2013).
- [36].Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature reviews Immunology* 10, 236-247 (2010).

- [37].Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *Journal of leukocyte biology* 93, 811-818 (2013).
- [38].de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* 174, 915-924 (1991).
- [39].Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 5530-5539 (2001).
- [40].Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99, 2468-2476 (2002).
- [41].Min WP, Zhou D, Ichim TE, Strejan GH, Xia X, Yang J, et al. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 170, 1304-1312 (2003).
- [42].Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *International immunology* 11, 803-811 (1999).
- [43].LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7064-7069 (2004).
- [44].Naji A, Durrbach A, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways. *Hum Immunol* 68, 233-239 (2007).
- [45].Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, et al. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177, 7784-7793 (2006).
- [46].Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine* 205, 2139-2149 (2008).
- [47].Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases* 199, 1318-1322 (2009).
- [48].Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* 44, 1052-1068 (2016).
- [49].Khaitan A, Kravietz A, Mwamzuka M, Marshed F, Ilmet T, Said S, et al. FOXP3+Helios+ Regulatory T Cells, Immune Activation, and Advancing Disease in HIV-Infected Children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 72, 474-484 (2016).
- [50].Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757-1764 (2007).
- [51].Siddiqui KR, Laffont S, Powrie F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32, 557-567 (2010).

### 3.1.8 Figures legends

**Table 1.** Distribution of demographic and sexual behavior characteristics in HIV-1.

	HIV-1- uninfected CSWs N=22	HIV-1- infected CSWs N=24	HIV-1- uninfected non-CSWs N=13	p-value <sup>a</sup>
Age, mean (SD), years	37 (3)	44 (8)	34 (7)	0.001
Duration of sex work , mean (SD), years	5 (1)	6 (1)	NA	NS
Number of client past week, mean (SD)	15 (10)	23 (22)	NA	NS
Condom always used with clients past week	19 (86%)	21 (88%)	NA	NS
HSV positive serology	19/22 (86%)	22/24 (92%)	7/13 (54%)	NS
Vaginal douching	22 (100%)	24 (100%)	13 (100%)	NS

Uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, HIV-1-uninfected non-CSW women

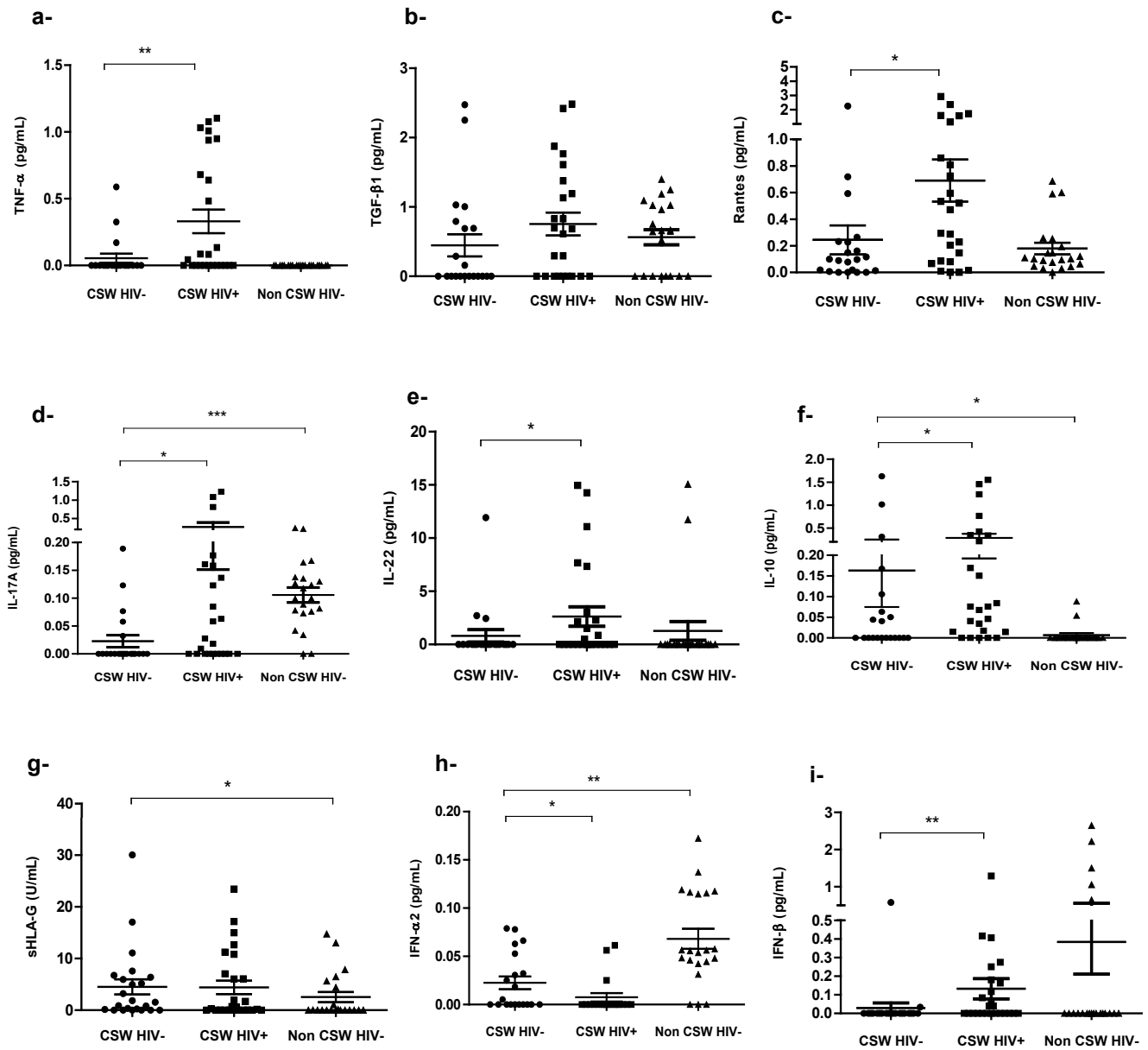
CSW, commercial sex workers; HIV, human immunodeficiency virus; HSV, herpes virus; N, number of participants; NA, non-applicable; NS, non-significant; SD, standard deviation.

<sup>a</sup> p-value for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA analysis for variance of age; Unpaired T- test for the duration of sex work and number of clients; Fisher's exact test for condom use, vaginal douching and HSV sero-positivity.

HIV prevalence among CSWs and male clients in Cotonou at the time of recruitment was 31% and 8.8%, respectively. The Cohort HIV incidence is 3.1%.

**Figure 1. Cytokines/chemokines and sHLA-G levels in cervicovaginal lavages (CVLs) of HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW controls.** Levels of TNF- $\alpha$  (a), TGF- $\beta$ 1 (b), Rantes (c), IL-17A (d), IL-22 (e), IL-10 (f), HLA-G (g), IFN- $\alpha$ 2 (h), IFN- $\beta$  (i) were measured in CVLs of the three study groups. Sample measurements below the Lower Detection Limit (LDL) were assigned a value of 0. Cytokine/Chemokine values are expressed in pg/mL and sHLA-G values are expressed in U/mL. P-values for the comparison between two groups were calculated with a Mann-Whitney U test. Data shown are Mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  and \*\*\* $p < 0.0001$ . CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TNF, tumor necrosis factor; TGF- $\beta$ , transforming growth factor; Rantes, regulated on activation normal T cell expressed and secreted; IL, interleukin ; IFN, interferon; and sHLA-G, soluble human leukocyte antigen-G.

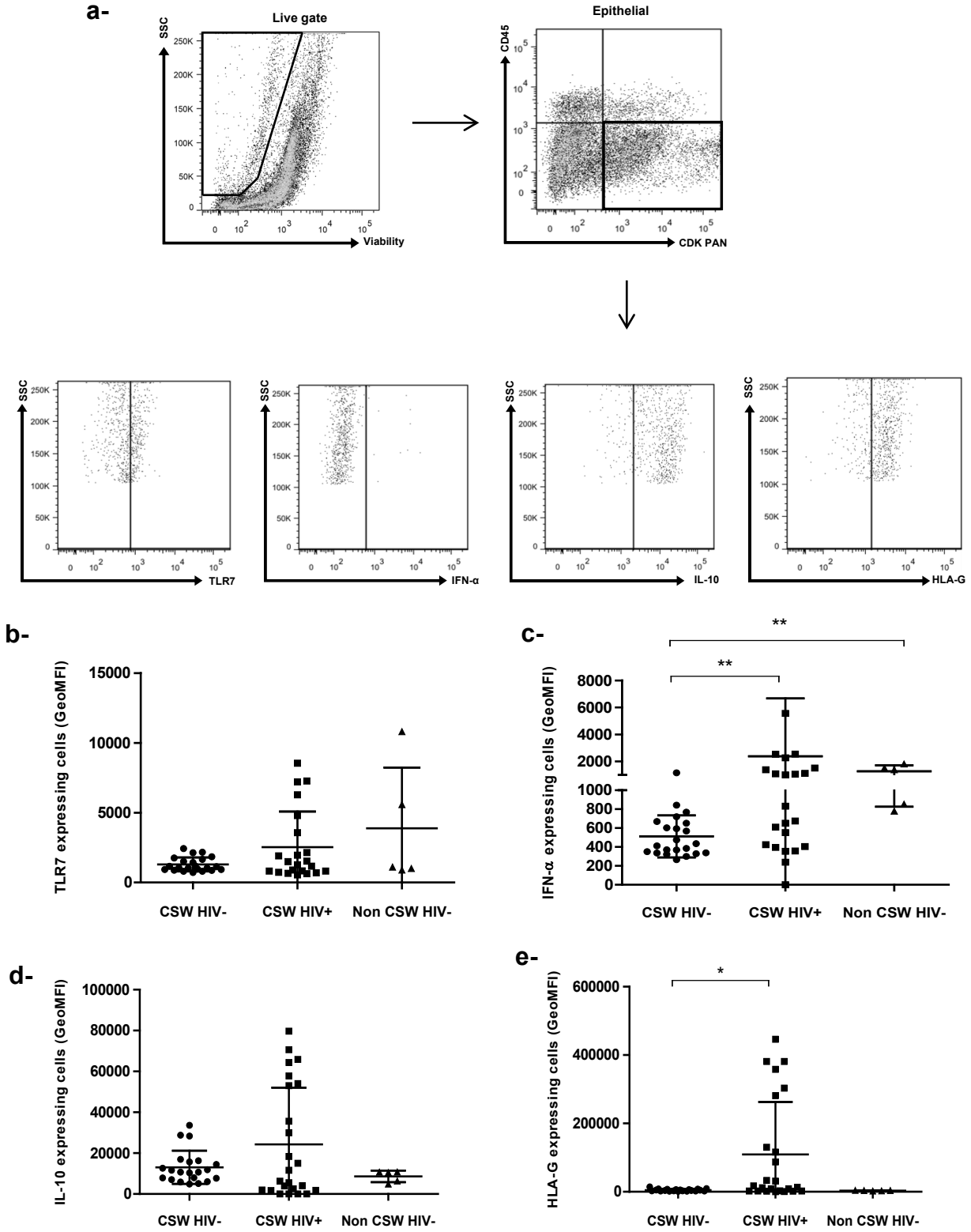
Figure 1





**Figure 2. Flow-Cytometry analysis of live endocervical epithelial cells of HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW controls.** a) Gating strategies by flow-cytometry of an endocervical sample. Cells were first gated on live endocervical cells and then on CD45<sup>-</sup>CDKPAN<sup>+</sup> epithelial cells. Epithelial cells from the three study groups were characterized for their intensity of expression of TLR7 (b), IFN- $\alpha$  (c), IL-10 (d) and HLA-G (e). Data are expressed as Geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI). Representative FMO staining controls can be viewed in supplementary Fig. S1. Statistical significance of differences in levels of expression (GeoMFI) was evaluated with Mann-Whitney U test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.001$ . CSW, commercial sex worker; TLR, Toll-like receptor; IL, interleukin; IFN, interferon; HLA, human leukocyte antigen.

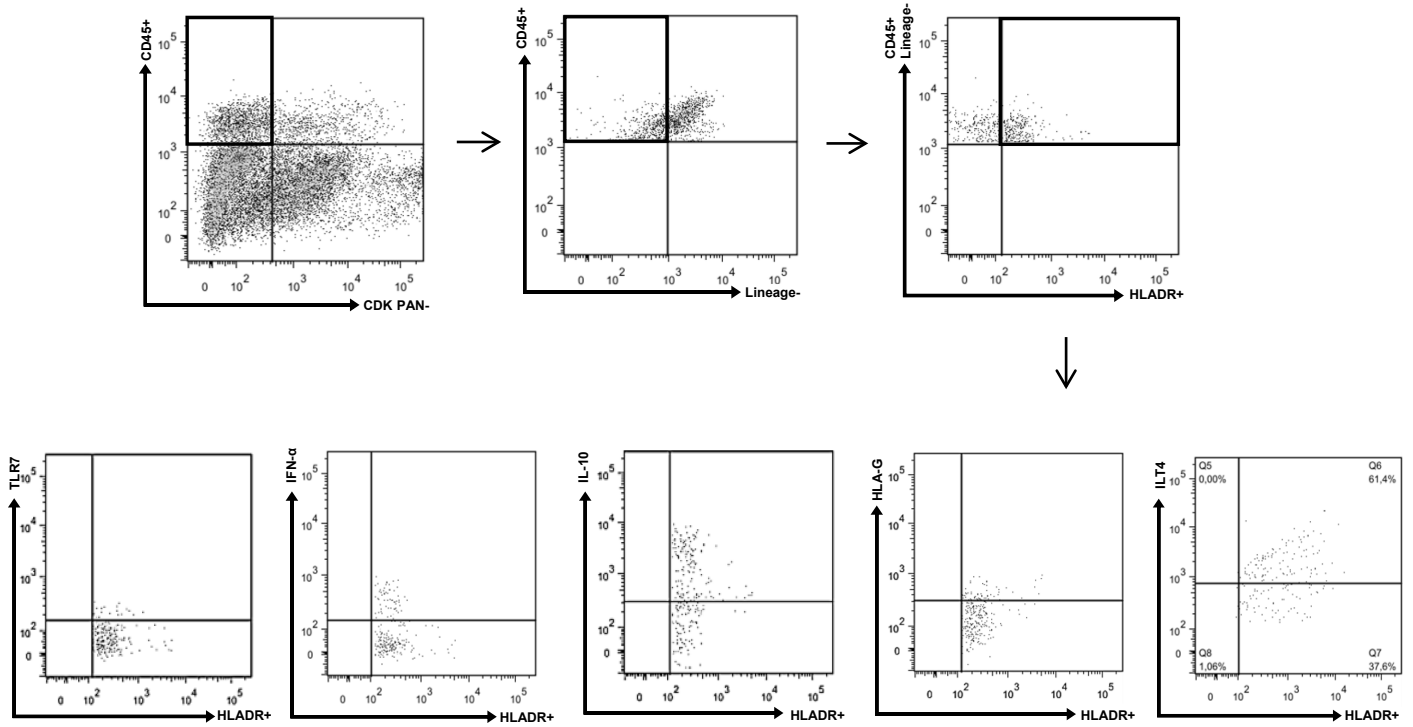
**Figure 2**



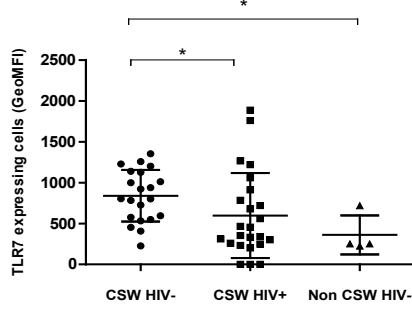
**Figure 3. Flow-Cytometry analysis of live endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup> cells of HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW controls.** a) Gating strategies by flow-cytometry of an endocervical sample. Cells were first gated on live endocervical cells and then on CD45<sup>+</sup>CDKPAN<sup>-</sup> leukocytes. Leukocytes were gated on CD45<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup> and subsequently on HLA-DR<sup>+</sup>. Lineage HLA-DR<sup>+</sup> cells from the three study groups were characterized for their expression levels of TLR7 (b), IFN- $\alpha$  (c), IL-10 (d), HLA-G (e) and ILT-4 (f). Data are presented as geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI). Representative FMO staining controls can be viewed in supplementary Fig. S2. Statistical significance of differences in levels of expression (GeoMFI) was evaluated with Mann-Whitney U test \*p<0.05, \*\*p<0.001 and \*\*\*p<0.0001. CSW, commercial sex worker; TLR, Toll-like receptor; IL, interleukin; IFN, interferon; HLA, human leukocyte antigen; ILT, immunoglobulin like transcript.

**Figure 3**

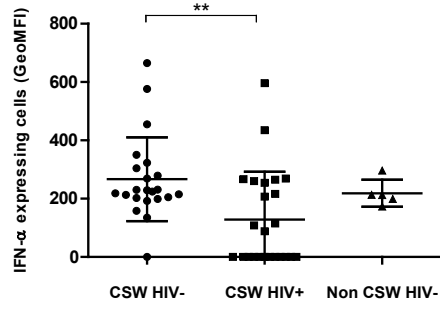
**a-**



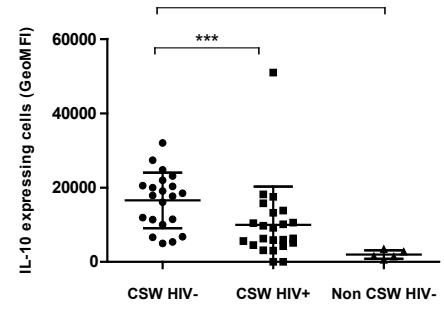
**b-**



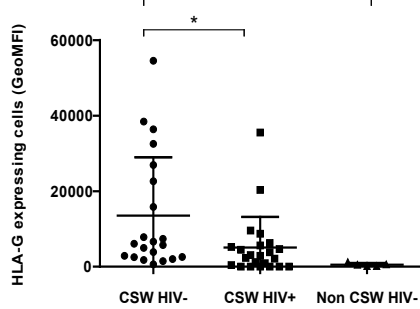
**c-**



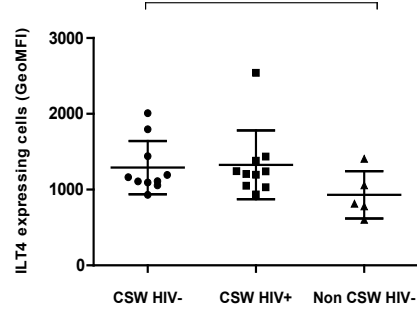
**d-**



**e-**



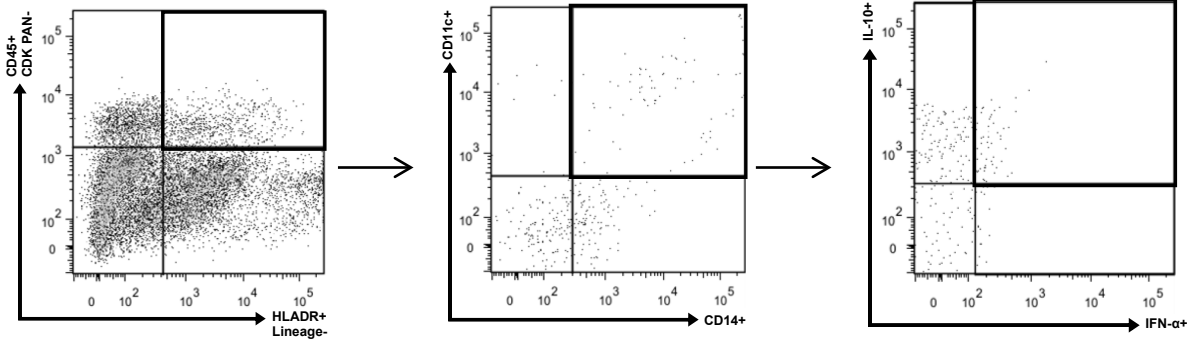
**f-**



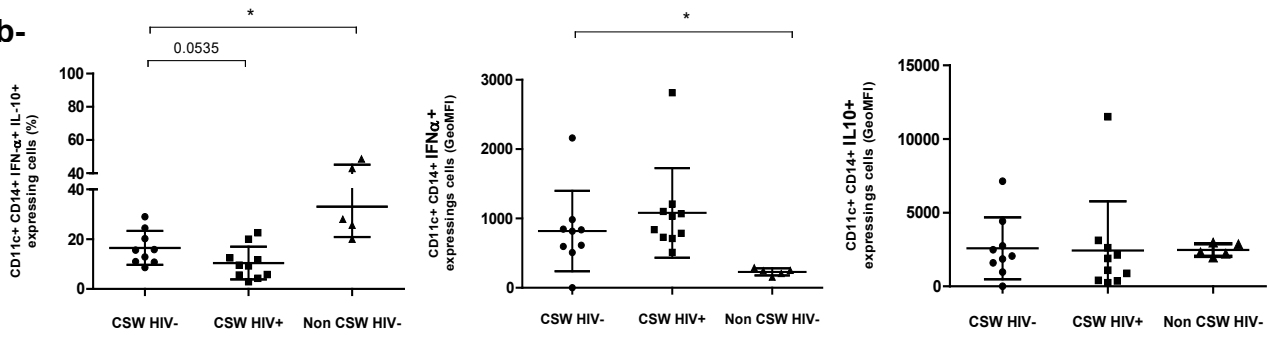
**Figure 4. Flow-Cytometry analysis of live endocervical myeloid HLA-DR+CD11c+CD14+ and HLA-DR+CD11c-CD14- cells of HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW controls.** a) Gating strategies by flow-cytometry of an endocervical sample. Cells were first gated on live endocervical cells and then on CD45<sup>+</sup>CDKPAN<sup>-</sup> leukocytes. Leukocytes were gated on CD45<sup>+</sup>Lineage<sup>-</sup> and subsequently on HLA-DR<sup>+</sup>. Lineage<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells were then gated based on their expression of CD11c and/or CD14 and subsequently IFN- $\alpha$  and IL-10. b) The frequencies (%) of CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells (left panel), and geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of their IFN- $\alpha$  expression levels (middle panel) and IL-10 (right panel) expression levels are shown for the three study groups. c) The frequencies (%) of CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells (left panel), and GeoMFI of their IFN- $\alpha$  expression levels (middle panel) and IL-10 (right panel) expression levels are shown for the three study groups. Statistical significance of differences in the relative frequencies (%) and levels of expression (GeoMFI) were evaluated with Mann-Whitney U test when statistical non-parametric and with Unpaired T test when statistical parametric. \*p<0.05, \*\*p<0.001 and \*\*\*p<0.0001. CSW, commercial sex worker; IL, interleukin; IFN, interferon.

**Figure 4**

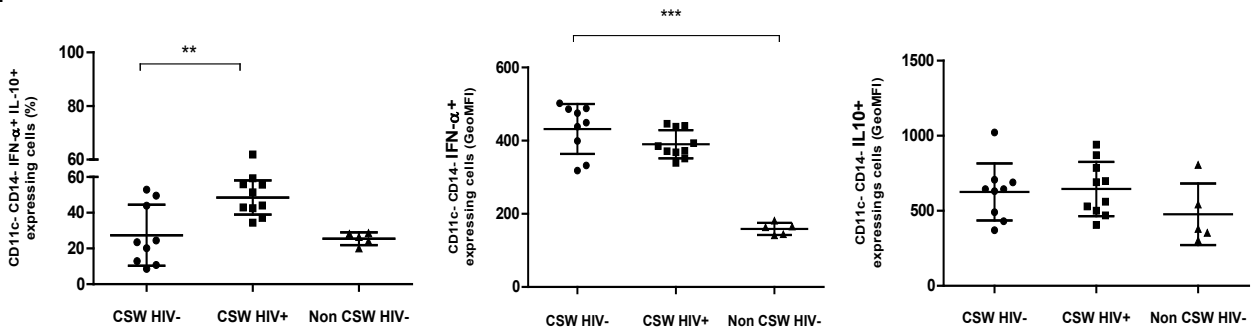
**a-**



**b-**



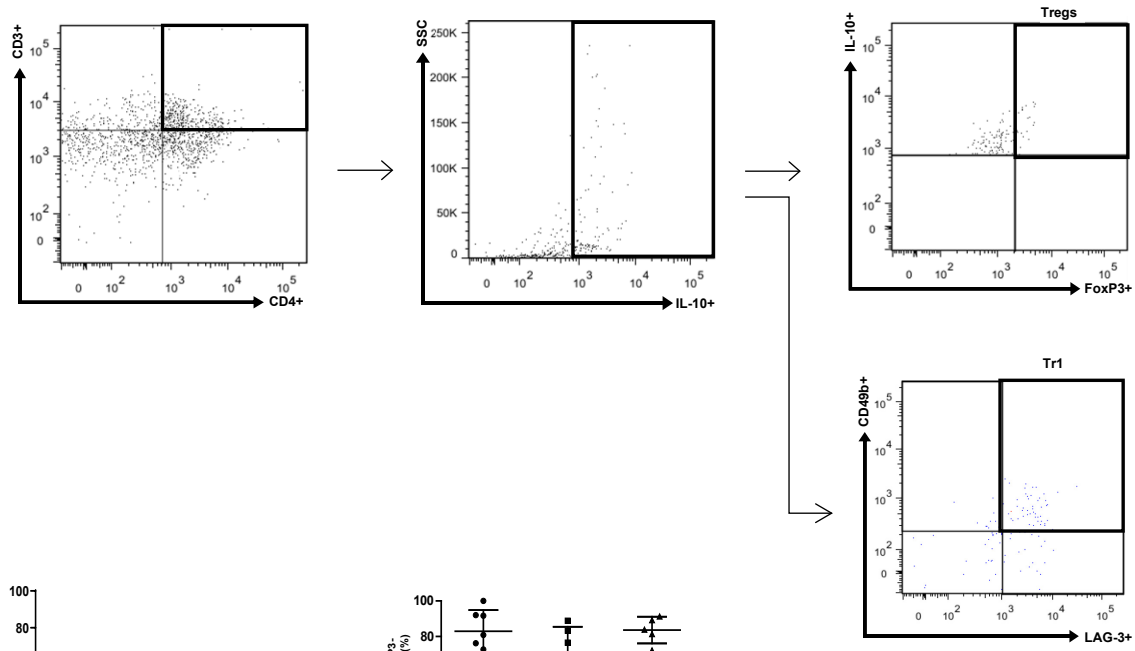
**c-**



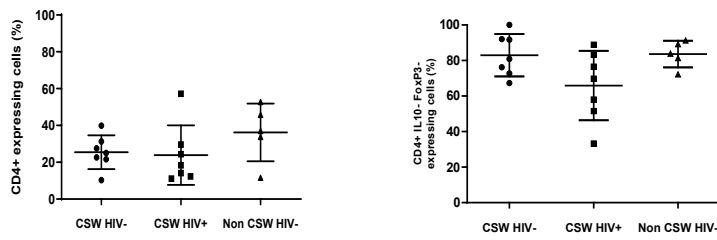
**Figure 5. Flow-Cytometry analysis of live endocervical CD4<sup>+</sup> T-cells of HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW controls.** a) Gating strategies by flow-cytometry of an endocervical sample. Cells were first gated on live endocervical cells and then on CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-cells. CD4<sup>+</sup> T-cells were selected based on expression of IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Treg) and IL-10<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> (T<sub>rl</sub>). The frequencies (%) of b) total CD4<sup>+</sup> T-cells (left panel) and CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T-cells (right panel), and c) CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> (left panel) and CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> T<sub>rl</sub> cells (right panel) are shown for the three study groups. The geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of d) PD-1 (right panel), IL-10 (middle panel) and FoxP3 (right panel) is presented for CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>, and e) PD-1 (right panel), CTLA-4 (middle panel) and LAG-3 (right panel) is presented for CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> T<sub>rl</sub> cells. Representative FMO staining controls can be viewed in supplementary Fig. S3. Statistical significance of differences in the relative frequencies (%) and levels of expression (GeoMFI) were evaluated with Unpaired T test. \*p<0.05 and \*\*p<0.001. CSW, commercial sex worker; IL, interleukin; LAP, latency associated peptide; FoxP3, forkhead box P3; PD-1, Programmed cell death protein 1; LAG-3, Lymphocyte activation gene-3.

**Figure 5**

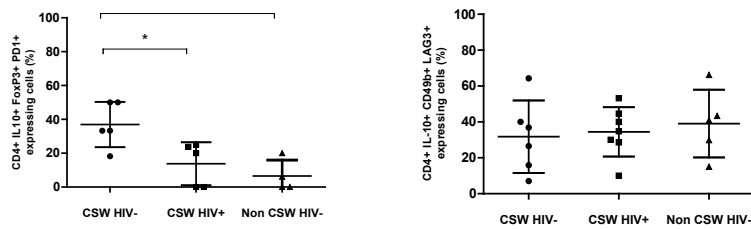
**a-**



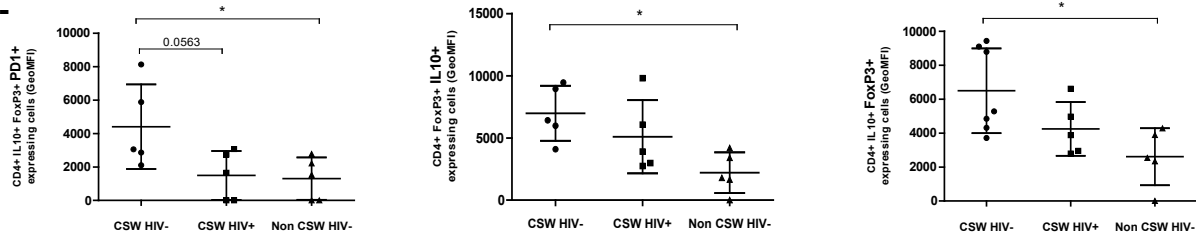
**b-**



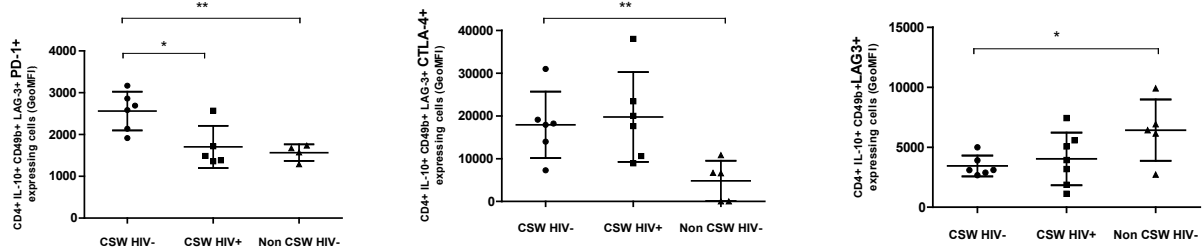
**c-**



**d-**



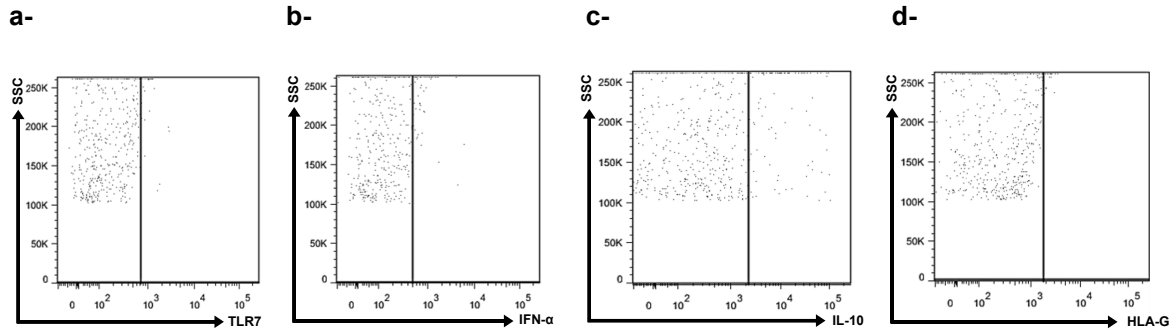
**e-**





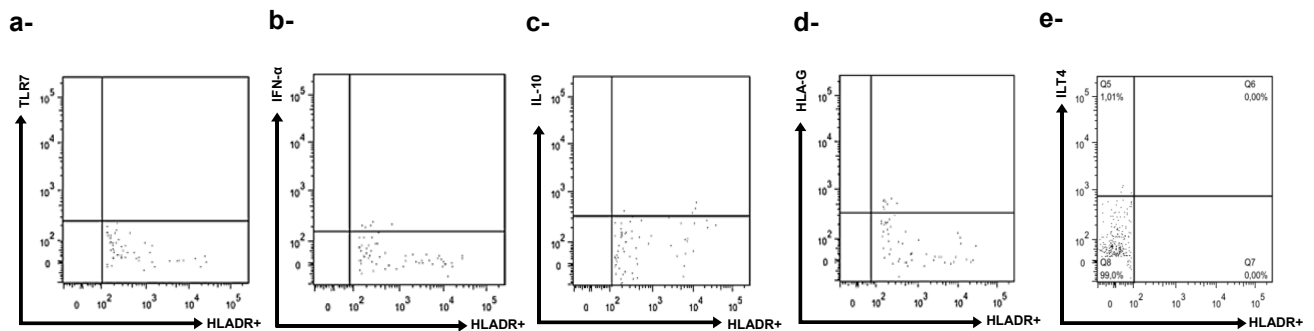
### 3.1.9 Supplementary Figures

Figure S1



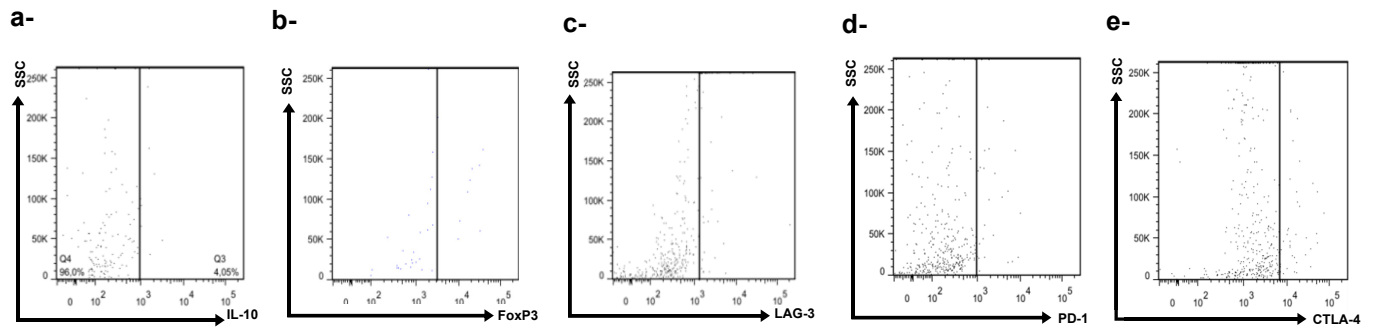
**Supplementary Figure S1. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figure 2.** FMO of toll-like receptor (TLR)-7 (a), FMO of interferon (IFN)-α (b), and FMO of interleukin (IL-10) (c), FMO of human leukocyte antigen (HLA)-G (d) staining on gated live endocervical epithelial cells.

Figure S2



**Supplementary Figure S2. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figure 3.** FMO of TLR7 (a), FMO of IFN-α (b), FMO of IL-10 (c), FMO of HLA-G (d), and FMO of immunoglobulin like transcript ILT-4 (e) on gated live endocervical lineage<sup>-</sup> HLA-DR<sup>+</sup> cells.

Figure S3



**Supplementary Figure S3. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figures 5.** FMO of IL-10 (a), FMO of forkhead box P3 (FoxP3) (b), FMO of Lymphocyte activation gene (LAG)-3 (c), FMO of Programmed cell death protein (PD)-1 (d), and FMO of cytotoxic T-lymphocyte associated protein (CTLA)-4 (e) on gated live endocervical CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-cells.

## CHAPITRE IV

### Rôle des monocytes dans la formation du profil tolérogénique des cellules dendritiques chez les HESN (*en préparation*)

#### 4.1 Mise en contexte

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré que de faibles concentrations de BLyS/BAFF soluble pourraient contribuer au maintien d'un faible profil inflammatoire chez les HESN (chapitre 2). En accord avec ces résultats, nous avons identifié une population de DCs tolérogéniques exprimant des niveaux élevés de molécules immunorégulatrice et antivirale. Ces DCs tolérogéniques, semblables aux MoDCs, favorisent la différenciation des cellules Tregs/Tr1 retrouvées dans la muqueuse génitale des HESN et maintiennent un équilibre homéostatique entre la tolérance et l'inflammation (chapitre 3).

À la suite de ces données, nous avons décidé de caractériser les DCs tolérogéniques dans le TGF des femmes béninoises afin de déterminer leurs capacités à réguler l'expression de l'IFN- $\alpha$ . Toutefois, les DCs étant peu nombreuses dans les échantillons endocervicaux récoltés, nous avons décidé de dériver, *in vitro*, les monocytes sanguins des femmes de la cohorte en DCs (MoDCS).

## 4.2 Contribution des auteurs

Auteurs: **Lyvia Fourcade**, Laurence Blondin-Ladrie, Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier, Michel Roger.

✚ **Statut de l'article** : en préparation.

✚ **Expériences effectuées, analyses des données statistiques et présentation des figures** :

- J'ai réalisé toutes les expériences concernant le marquage et l'isolation des monocytes par tri cellulaire. Aussi, j'ai effectué la différenciation des MoDCs pour les différents groupes de femmes, ainsi qu'une partie des analyses statistiques et le montage des figures de cytométrie en flux – Contribution 70 %.
- Raphaëlle Lambert et Patrick Gendron, de la plateforme génomique et informatique de l'IRIC (Montréal), ont respectivement participé à l'extraction d'ARN et à l'analyse transcriptomique des monocytes.
- Laurence Blondin-Ladrie effectuera la caractérisation phénotypique des monocytes – Contribution 30 %.

✚ **Contribution en approvisionnement en réactifs, matériels et outils d'analyses** :

Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier et Michel Roger.

✚ **Rédaction préliminaire de l'article** : Lyvia Fourcade.

Johanne Poudrier et Michel Roger ont supervisé toutes les expériences et les analyses statistiques.

### 4.3 Introduction

Les monocytes sont des cellules myéloïdes qui proviennent de la moelle osseuse et s'infiltrant dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus périphériques [1]. Ils contribuent à l'homéostasie tissulaire et à l'immunité innée et adaptative à la recherche d'agents pathogènes, en particulier lors de la différenciation en cellules dendritiques (DCs) ou macrophages à la suite de différents stimuli [1-3]. Ainsi, en collaboration avec des cellules épithéliales, les DCs dans lesquelles on retrouve les DCs myéloïdes (*mDCs*), les DCs plasmacytoïdes (*pDCs*) et les DCs dérivées de monocytes (MoDCs) [4] aident à maintenir une balance homéostatique immunitaire entre tolérance et inflammation [5]. Elles sont impliquées dans la production de molécules immunorégulatrices et orchestrent la réponse lymphocytaire T et B face aux agents pathogènes [5, 6].

Le tractus génital féminin (TGF) est la principale porte d'entrée pour le VIH-1 et son immunité joue un rôle important dans le contrôle d'une flore commensale et la défense de l'organisme contre les microorganismes pathogènes [7, 8]. Un groupe de travailleuses du sexe (CSWs<sup>+</sup>) a été recruté à Cotonou, au Bénin, dans lequel ont été identifiées des femmes dites hautement exposées séronégatives (HESN). Ces femmes ne deviennent pas infectées par le VIH-1, et ce, après plus de sept ans de travail sexuel actif. Nous avons démontré la présence de cellules myéloïdes de type HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> à des fréquences élevées dans le FGT des HESN. Ces cellules myéloïdes rappellent les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoDCs), et expriment des niveaux élevés d'IL-10, de HLA-G et d'ILT4, ainsi que l'INF- $\alpha$ , dans des échantillons endocervicaux des HESN. Ce profil tolérogénique concorde bien avec des fréquences élevées de cellules T<sub>regs</sub> exprimant des niveaux élevés de PD-1, également trouvés dans le FGT des HESN (Article 2).

Basée sur ces données, notre **hypothèse** est que les populations de MoDCs observées au niveau du FGT des HESN peuvent induire un potentiel antiviral et réguler une réponse immune au site initial de l'infection au VIH-1. Ainsi, un phénotype différentiel au niveau des monocytes sanguins pourrait être impliqué dans la génération de MoDCs tolérogéniques. **Les objectifs** consistent donc à caractériser génotypiquement et phénotypiquement les différentes sous-populations de monocytes sanguins puis de caractériser leur différenciation en MoDCs, *in vitro*, chez les HESN.

## 4.4 Matériels et méthodes

### 4.4.1 Le groupe d'étude

Les travailleuses du sexe (CSWs) féminin ont été recrutées dans une clinique dédiée aux travailleuses du sexe à Cotonou, au Bénin. Parmi elles, on retrouve les femmes séropositives (CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>), les femmes séronégatives ayant moins de deux années de prostitution (non HESN) et celles ayant plus de 7 années de prostitution (HESN). Des femmes de la population générale séronégative pour le VIH-1, Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, et à faible risque d'exposition ont été recrutées dans une clinique de santé générale séparée, à Cotonou. Les femmes de moins de 18 ans, enceintes ou ayant leurs règles ont été exclues de l'étude.

Les femmes recrutées ont été invitées à répondre à un questionnaire sur leur âge, la durée de la prostitution (le cas échéant), le nombre de clients par semaine (le cas échéant), leur comportement sexuel, les pratiques de douche vaginale et l'utilisation de préservatifs ou de contraceptifs hormonaux. De plus, elles ont subi un examen gynécologique par un médecin. Des échantillons vaginaux ont été récoltés pour le diagnostic, par examen microscopique de la candidose, la *trichomoniose* et la vaginose bactérienne, et par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour l'infection par le virus de l'herpès simplex (HSV). Des écouvillons endocervicaux ont été obtenus pour la détection de *Neisseria gonorrhoea* et de *Chlamydia trachomatis* (système BD ProbeTec Et). Des échantillons de sang ont été prélevés et testés pour déterminer leur statut VIH-1, le diagnostic de syphilis et les niveaux de progestérone. Les sujets présentant de la fièvre, une inflammation vaginale visible et une infection autre que le VIH-1 ont été exclus de l'étude. La positivité du VIH-1 était définie par la présence d'IgG spécifiques du VIH-1 testés avec Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, Pays-Bas). Les échantillons non réactifs ont été considérés séronégatifs pour le VIH, tandis que les échantillons réactifs ont été testés avec le gène Genie II VIH-1/VIH-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Aucune de ces femmes n'était une consommatrice de drogues injectables. Les trois groupes de l'étude étaient tous dans la phase folliculaire de leur cycle menstruel, ne prenaient pas de contraception orale, n'avaient pas de co-infections, de vaginose bactérienne, de trichomonose ou de candidose.

#### 4.4.2 Prélèvement et préparation des échantillons

Les cellules mononucléées du sang périphérique, PBMCs, ont été isolées du sang total par centrifugation sur des gradients de Ficoll, lavées et mises en suspension dans du milieu de congélation contenant 90 % de sérum fœtal bovin inactivé par la chaleur (FBSi) et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le tout a été conservé dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation. Le plasma et le sérum ont été conservés et congelés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

#### 4.4.3 Évaluation préliminaire des populations de monocytes par cytométrie en flux

Les monocytes, de profil HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>, ont été enrichis négativement à l'aide de billes immunomagnétiques (Dynabeads<sup>TM</sup> Untouched<sup>TM</sup> Human Monocytes, Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Après isolation les monocytes circulants des femmes Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> ont été caractérisés par cytométrie en flux (FACS). L'exclusion des cellules mortes a été accomplie à l'aide de la coloration Aqua-LIVE/DEAD (Invitrogen Life technologies). Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'un tampon de tri cellulaire (PBS 1x, 2 % de FBSi et 0,1 % d'azide de sodium) additionné de 20 % de FBSi, 0,2µg/ml d'IgG de souris (Sigma-Aldrich) et 5µg/1 x 10<sup>6</sup> cellules de Fc-block humain (BD Biosciences, San Jose, CA). Les cellules ont été marquées avec les anticorps conjugués anti-humains monoclonaux de souris suivants : BV6450 anti-CD19, anti-CD3 et anti-CD56, BV786 anti-CD14, PE-Cy7 anti-HLA-DR (BD-Biosciences) et PE-Cy5.5 anti-CD11c (eBioscience, San Diego, CA, É.-U.). Les cellules ont été maintenues à 4 °C dans du paraformaldéhyde à 2 % puis analysées. L'acquisition de 10<sup>4</sup> à 10<sup>5</sup> événements par échantillon a été obtenue avec le cytomètre LSRFortessa (BD-Biosciences), et l'analyse a été effectuée avec le logiciel FlowJo10 (Treestar, Ashland, OR, USA). Des *compbeads* Ig (κ) anti-souris (BD-Biosciences) ont été utilisés pour optimiser les paramètres de compensation de fluorescence et étalonner le LSRFortessa.

#### 4.4.4 Culture et stimulation des MoDCs

Les monocytes de profil HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> ont été enrichis négativement à l'aide de billes immunomagnétiques (Dynabeads<sup>TM</sup> Untouched<sup>TM</sup> Human Monocytes, Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Les monocytes ont été cultivés dans des plaques de 48 puits (Falcon, Fisher Scientific, ON, CA), à raison de  $5 \times 10^5$  cellules/ml dans du milieu (Iscove's Modified DulbeccoS Medium 1x, Gibco/ ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10 % FBSi, 2 % de pénicilline/streptomycine (ThermoFisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) et  $10^{-4}$  M de béta-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.). De l'IL-4 (100 ng/mL) et du GM-CSF (250 ng/mL) recombinants humains (Invitrogen Life technologies) ont été ajoutés à J0 et J3 de culture. À J6 de culture, les MoDCs ont été récoltés.

#### 4.4.5 Tri cellulaire des monocytes, extraction d'ARN et séquençage

Les PBMCs des femmes Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> ont été utilisées pour le tri cellulaire. L'exclusion des cellules mortes a été produite à l'aide de la coloration Aqua-LIVE/DEAD (Invitrogen Life technologies). Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'un tampon de tri cellulaire (FACS buffer) (PBS 1x, 2 % de FBSi et 0,1 % d'azide de sodium) additionné de 20 % de FBSi, 0,2µg/ml d'IgG de souris (Sigma-Aldrich) et 5µg/1 x 10<sup>6</sup> cellules de Fc-block humain (BD Biosciences, San Jose, CA). Les cellules ont été marquées avec les anticorps conjugués anti-humains monoclonaux de souris suivants : BV6450 anti-CD19, anti-CD3 et anti-CD56, BV786 anti-CD14, PE-Cy7 anti-HLA-DR (BD-Biosciences) et PE-Cy5.5 anti-CD11c (eBioscience, San Diego, CA, É.-U.). Les monocytes totaux CD14<sup>+</sup> ont été sélectionnés puis resuspendus dans du trizol (Invitrogen Life technologies) à raison de  $1 \times 10^5$  à  $9 \times 10^5$  cellules/0,5ml puis conservées -80 °C jusqu'à utilisation. Les monocytes totaux ont été envoyés à la plateforme génomique de l'IRIC pour une extraction d'ARN suivie d'un séquençage sur tous les échantillons. Par la suite, une analyse transcriptomique et bioinformatique a été effectuée par la plateforme d'informatique et de bioanalyses de l'IRIC. Les bibliothèques ont été préparées en utilisant Clontech Ultra Low RNA SMARTer v4 (Takara) et séquencées sur un HiSeq2000. Les gènes exprimant un taux d'erreur



(FDR) < 0,05 ont été considérés comme exprimés différentiellement. Les niveaux d'expression des gènes ont été comparés en utilisant le nombre de lectures brutes et le modèle de distribution binomiale négatif mis en œuvre dans DESeq2 (25516281), un ensemble d'analyse d'expression différentielle développé pour R, qui s'ajuste aux variations de l'échantillon avec l'hypothèse que la grande majorité des gènes devraient avoir des niveaux d'expression corrélés. Plus spécifiquement, la régularisation de la transformation de log (rlog) installée dans DESeq2 a été utilisée pour transformer des données brutes en log<sub>2</sub> (lecture) pour l'analyse et la visualisation.

## 4.5 Résultats

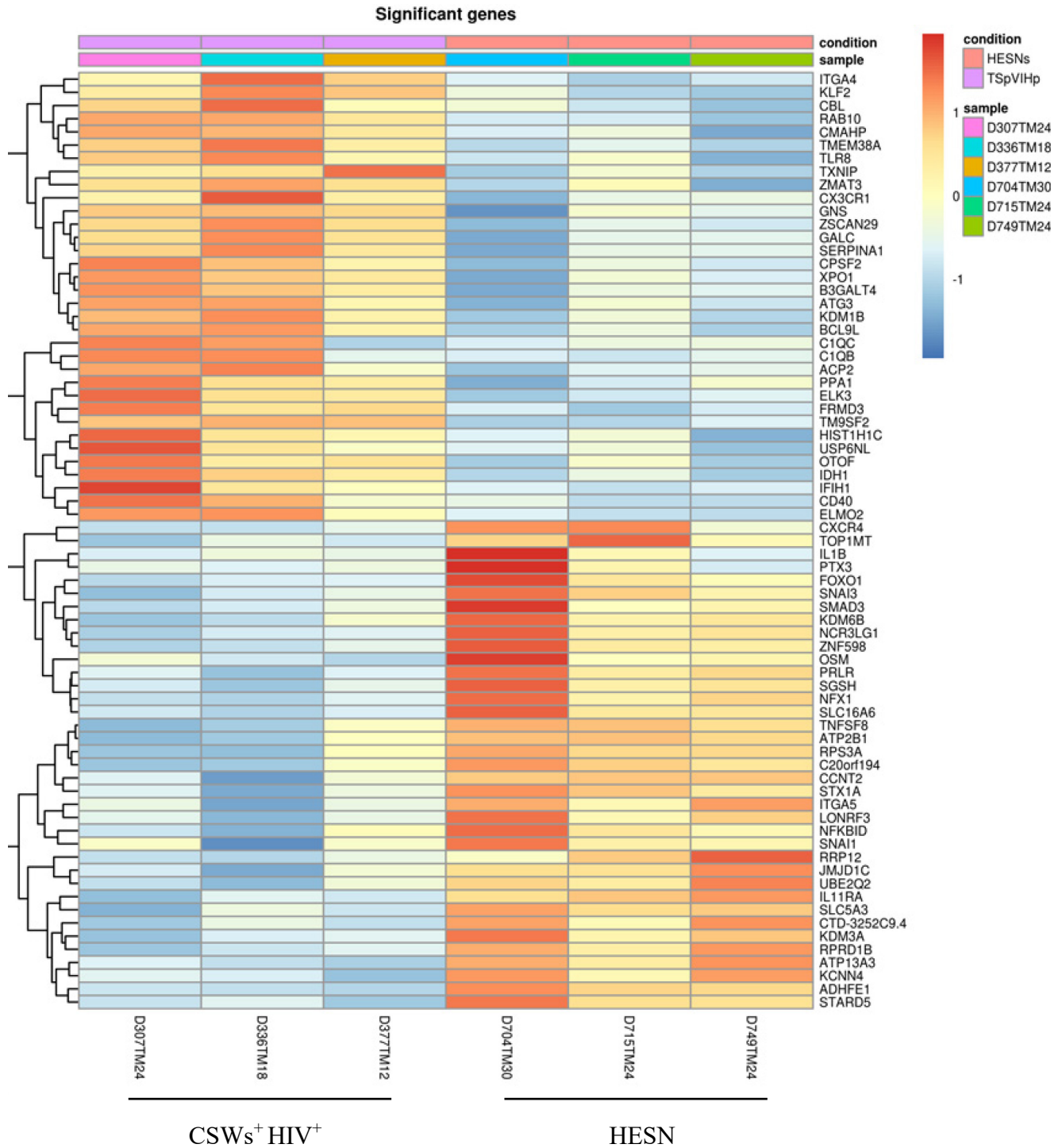
Les résultats préliminaires présentés ici ont été effectués sur quatre groupes de femmes de la cohorte béninoise : (1) les Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, femmes contrôles de la population générale; (2) les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> qui ne sont pas des HESN et ont moins de deux années de prostitution; (3) les HESN, femmes séronégatives avec plus de sept années de prostitution et (4) les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> qui sont séropositives.

Il est important de mentionner que la cytométrie en flux et les analyses transcriptomiques réalisées sur les monocytes ont été effectuées sur trois femmes/groupe, sauf pour le groupe des HESN qui comptabilise quatre femmes.

### 4.5.1 Analyses transcriptomiques des monocytes sanguins totaux

Les monocytes totaux HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> du sang des femmes Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> (non HESN), HESN et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> ont été triés par cytométrie en flux. Les analyses transcriptomiques *RNA-Seq* ont été faites sur les 500 premiers gènes exprimés par les monocytes totaux des femmes béninoises sélectionnées.

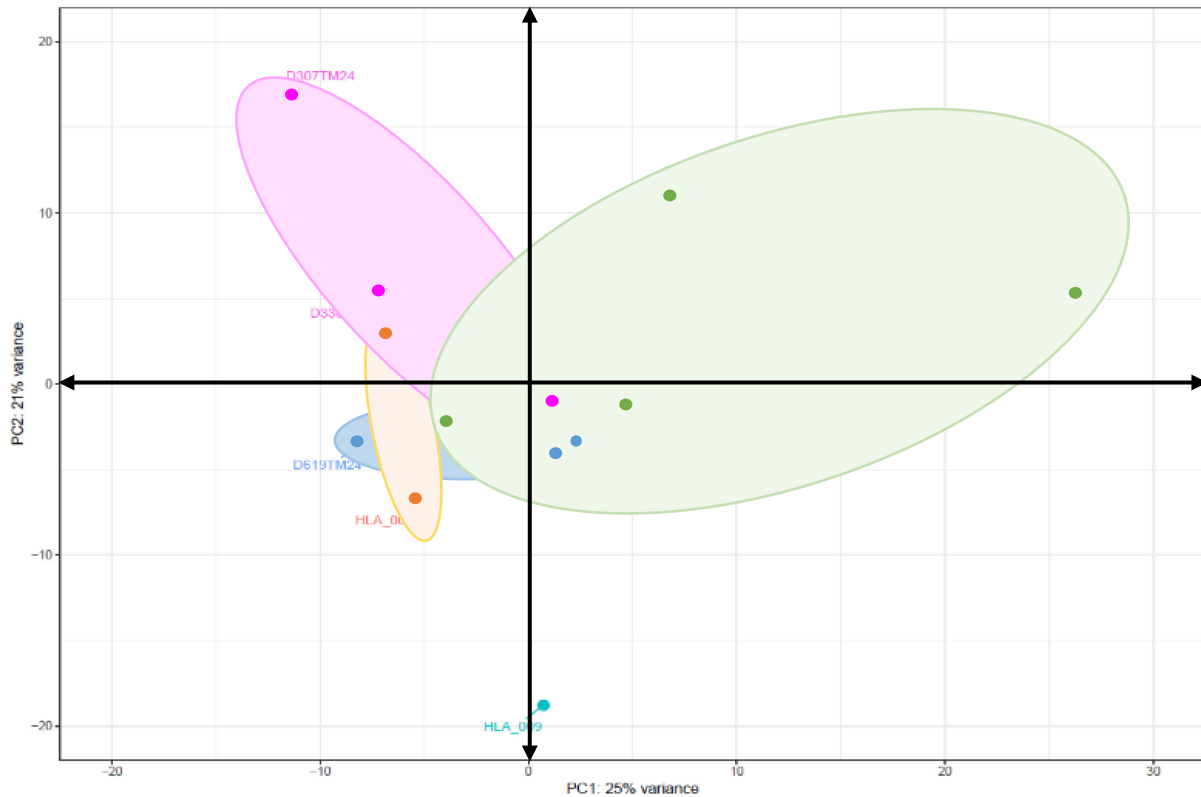
La « *Heatmap* » nous permet d'observer une très grande différence dans le profil d'expression génétique entre les groupes. Ainsi, une partie des gènes observés dans les monocytes totaux des HESN sont régulés à la hausse comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> (Figure 4.1).



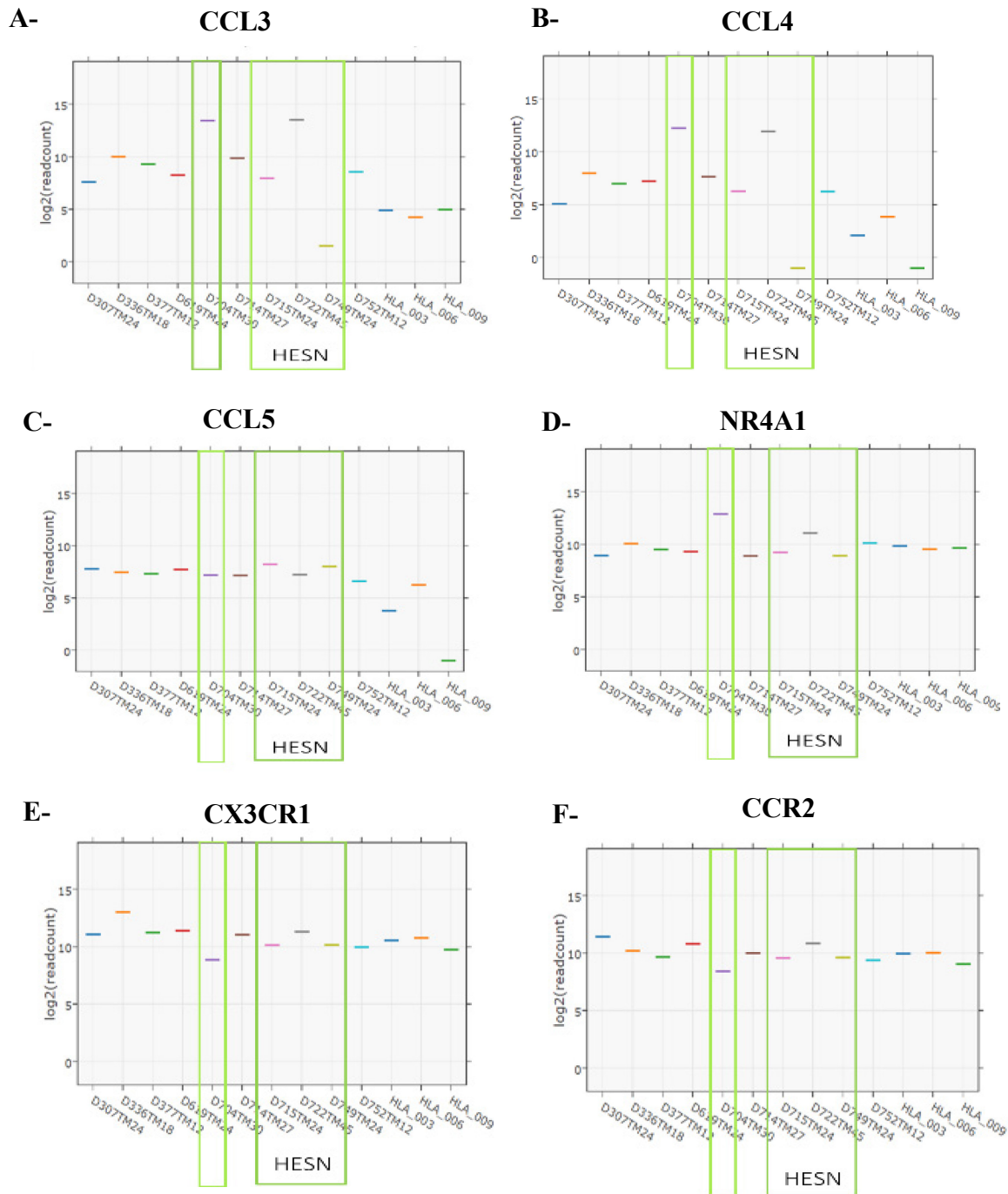
**Figure 4.1. Modulation des gènes exprimés dans les monocytes sanguins chez les  $CSWs^+ HIV^+$  et les HESN.** Les données présentées constituent la valeur d'un échantillon pour une femme béninoise.

L'analyse de composants principaux (*PCA*) ne montre pas de grandes divergences génétiques entre les femmes appartenant aux groupes Non-CSWs HIV<sup>-</sup> et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>. Les femmes HESN D722 (15 années de prostitution, ± 10 clients/semaine) et D704 (17 années de prostitution, ±15 clients/semaine) montrent une séparation distincte des femmes HESN D715 (16 années de prostitution, ±5 clients/semaine) et D749 (10 années de prostitution, ±3 clients/semaine). Ces femmes D722 et D704 se distinguent également des trois autres groupes. La femme HLA 009 du groupe Non-CSWs HIV<sup>-</sup> est à exclure de l'analyse pour quantité limitée d'ARN (Figure 4.2).

Les analyses transcriptomiques *RNA-Seq* démontrent les transcrits de gènes pour les molécules CCL3, CCL4, CCL5, NR4A1, CXCR1 et CCR2 (Figure 4.3). On constate que les transcrits géniques de CCL3, CCL4 et NR4A1 sont régulés à la hausse pour deux HESN (D704 et D722) (Fig. 4.3 A, B et D). On n'observe pas de modulation pour les transcrits de CX3CR1, CCR2 et CCL5 (Fig. 4.3 C, E et F).



**Figure 4.2. Représentation graphique (PCA) montrant la variabilité 2D des gènes exprimés dans les monocytes sanguins totaux à J0 entre les Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>, les HESN et les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>.** Les deux premiers composants principaux (PC1 et PC2) représentent les 46 % de différences génétiques entre les quatre groupes de femmes. La direction des vecteurs par rapport aux deux axes PC reflète le degré de divergence entre les gènes des femmes béninoises. Les Non-CSWs HIV<sup>-</sup> sont représentées en orange, les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> en bleu, les HESN en vert et les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> en rose. Les données présentées expriment la valeur d'un échantillon pour une femme béninoise. *PCA (Principal Components Analysis).*



**Figure 4.3.** Analyses RNA-Seq de l'expression de CCL3, CCL4, CCL5, NR4A1, CX3CR1 et CCR2 sur les monocytes circulant des Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>, HESN et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Les données présentées expriment la valeur d'un échantillon pour une femme béninoise.

#### 4.5.2 Différenciation des monocytes en DCs (MoDCs)

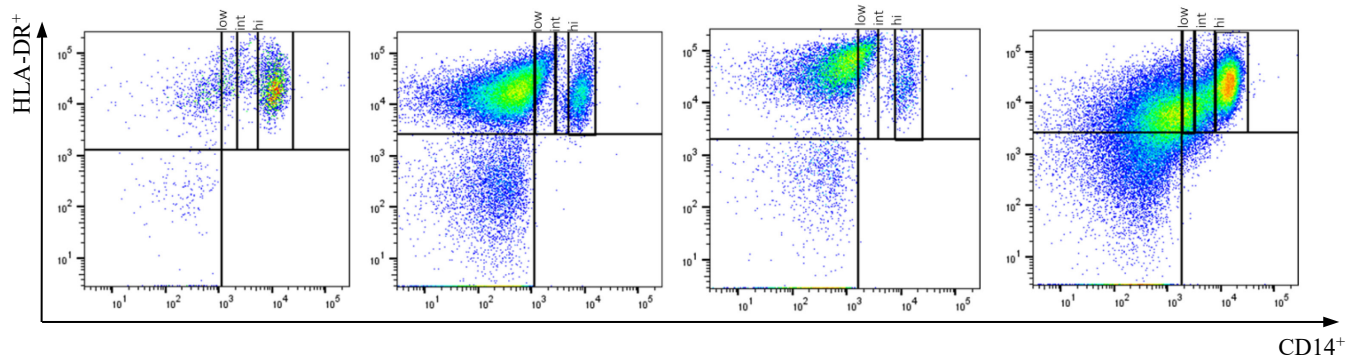
Suite à la sélection négative des monocytes circulant à partir de PBMCs et de leur mise en culture en présence de GM-CSF (250 ng/ml) et d'IL-4 pendant six jours, nous avons étudié le profil phénotypique des MoDCs à J0 et à J6, de façon préliminaire, par cytométrie en flux (Fig. 4.4). Notons que la différenciation cellulaire en MoDCs a été effectuée chez toutes les femmes de chaque groupe. La figure ci-dessous n'est représentative que pour une femme/groupe, les résultats de l'analyse des autres femmes pour chaque groupe étant semblables à celle présentée.

À J0, différentes sous-populations de monocytes ont été observées, à savoir les HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> non classique (*low*), intermédiaire (*int*) et classique (*Hi*) dans les différents groupes de femmes. Nous avons observé également la présence de fréquences élevées de monocytes non classiques chez les HESN par rapport aux autres groupes, alors que les monocytes classiques y restent minoritaires (Fig. 4.4 A).

À J6, les monocytes ont été différenciés en MoDCs avec un profil HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> pour les Non-CSW HIV<sup>-</sup> et les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Toutefois, on constate que le niveau d'expression de CD11c<sup>+</sup> est régulé à la baisse et que la fréquence de MoDCs diminue chez les CSWs<sup>+</sup>. Chez les HESN, nous constatons une absence de différenciation en MoDCs, avec un profil HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> alors que pour les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> nous observons une différenciation en MoDCs, avec un profil HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+/-</sup> (Fig. 4.4 B).

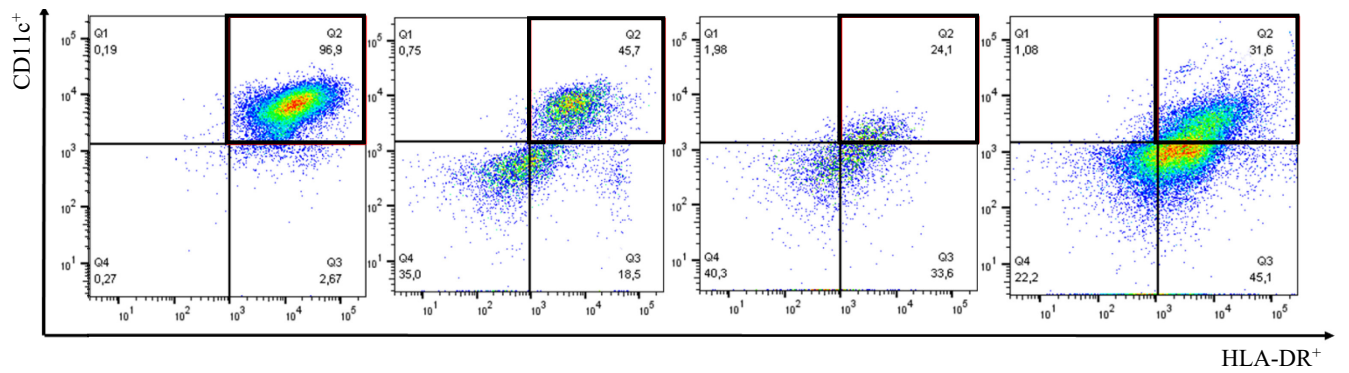
Ainsi, par rapport aux autres groupes, les HESN semblent avoir un fort taux de monocytes non classiques et une non-différenciation en MoDCs.

A-



CD14<sup>+</sup>

B-



HLA-DR<sup>+</sup>

Non-CSWs HIV<sup>-</sup>

Non HESN

HESN

CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>

CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>

**Figure 4.4. Différenciation des MoDCs chez les Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup>, les HESN et les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>.** Les cellules en culture ont été récoltées puis analysées par cytométrie en flux à J0 et à J6. **(A)** Les monocytes HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>(CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>) à J0 et **(B)** les MoDCs HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup>(CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>) à J6. Les données présentées expriment la valeur d'un échantillon pour une femme béninoise.

## 4.6 Discussion

Nous et plusieurs autres auteurs avons montré que l'immunité naturelle au VIH-1 est associée à de faibles conditions inflammatoires au niveau de la muqueuse vaginale [9-14]. Afin de mieux comprendre les mécanismes qui orchestrent ce faible profil inflammatoire et confèrent aux HESN une protection contre le VIH-1, nous nous sommes penchés sur la caractérisation des monocytes circulants et leur maturation en MoDCs chez les travailleuses du sexe béninoises.

Nous rapportons ici une cartographie phylogénétique montrant une grande variabilité dans les niveaux d'expression des gènes chez les HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. De plus, on constate que la femme D704 (17 années de prostitution, ±15 clients/semaine) montre un niveau d'expression de ses gènes beaucoup plus élevé par rapport aux HESN qui ont peu de clients/semaine (Fig. 4.1). Les analyses *PCA* démontrent une très grande différence génétique chez les HESN qui ont à la fois beaucoup d'années de prostitution et de clients, par rapport aux autres groupes (Fig. 4.2). L'étude effectuée sur les transcrits génétiques des monocytes sanguins totaux présente une augmentation de l'expression des gènes codant pour les chimiokines CCL3 et CCL4, ainsi que pour le récepteur NR4A1, chez les HESN ayant un grand nombre d'années de prostitution et de clients comparativement aux trois autres groupes (Fig. 4.3 A, B et D). Ces résultats suggèrent donc qu'une exposition régulière et soutenue de l'hôte face au VIH-1 pourrait réguler les niveaux d'expression de certains gènes aidant à maintenir une immunité naturelle.

Les hauts niveaux de gènes, CCL3 et CCL4, codant pour MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  respectivement, qui ont été observés dans les monocytes sanguins des HESN, sont en accord avec nos études antérieures. En effet, nous avons démontré un taux élevé de l'expression de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  dans le sang des HESN [12]. L'augmentation de l'expression de ces mêmes chimiokines a également été associée à une diminution de la charge virale chez des femmes d'Afrique du Sud [15]. De plus, les études démontrent que les polymorphismes observés au niveau des gènes CCL3 et CCL4 influencent la sensibilité à l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie [16, 17]. Par ailleurs, les LT-CD4<sup>+</sup> spécifiques au VIH-1 identifiés chez les HESN expriment eux aussi une plus grande quantité de  $\beta$ -chimiokines, RANTES codé par CCL5, et MIP-1 $\alpha$ . Avec MIP-1 $\beta$ , ces  $\beta$ -chimiokines sont connues pour leurs activités



immunomodulatrices et antivirales, en plus d'être des ligands naturels du corécepteur CCR5. En abondance, elles entrent en compétition avec le corécepteur du virus, diminuant ainsi la propagation du virus à travers l'organisme ou en modulant le niveau d'expression de surface des récepteurs [18, 19]. Ainsi, des niveaux élevés de CCL3 et CCL4 semblent nécessaires pour amorcer une réponse immunitaire précoce afin d'empêcher la dissémination du virus et permettre une certaine protection face au VIH-1.

Les monocytes présentent une large gamme de molécules d'adhésion ainsi que des récepteurs de chimiokines, comme notamment CCR2 et CX3CR1, utiles dans leur migration vers les sites inflammatoires [1]. L'évaluation des niveaux d'expression de ces récepteurs est généralement faible à la surface des monocytes totaux [20], ce qui pourrait expliquer l'absence de variabilité pour le CX3CR1 et le CCR2 entre les groupes (Fig. 4.3 E et F). En effet, les niveaux d'expression de CCR2 étaient plus faibles à la surface des monocytes classiques (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) chez les EC et les patients sous ART, alors que l'expression de CX3CR1 s'est vue plus élevée sur les monocytes non classiques (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) par rapport aux personnes saines [21]. En outre, CX3CR1 semble contribuer à la survie de ces monocytes non classiques [22]. Nos précédentes études ont démontré que les HESN ont un profil semblable aux « *Elite Controllers* » de la cohorte HARSAH [23]; ainsi, il se pourrait que l'on retrouve une similitude dans les niveaux d'expression des récepteurs de chimiokines, à savoir un niveau d'expression plus élevé de CX3CR1 chez nos HESN. Fait intéressant, les résultats de cytométrie en flux sur les monocytes des femmes béninoises nous ont permis de distinguer plusieurs sous-populations de monocytes, à différentes proportions (Fig. 4.4 A). Même si ces résultats sont préliminaires et que le marqueur CD16 est absent, on peut apercevoir une tendance à la hausse de la fréquence d'une sous-population que l'on pourrait qualifier de monocytes non classiques (*low*). À ce stade, nous ne pouvons pas attribuer la dominance d'une sous-population de monocytes à un groupe de femmes en particulier, c'est pour cela qu'une caractérisation phénotypique des monocytes circulants, chez les femmes béninoises, reste fortement nécessaire.

En absence d'inflammation, les monocytes classiques retournent dans la moelle osseuse pour se différencier en monocytes non classiques [24]. Ces monocytes non classiques sont connus pour leur implication dans les réponses précoces à l'inflammation et dans la réparation des tissus. Des études faites chez la souris ont établi que leurs monocytes non classiques sont caractérisés, entre autres, par la faible expression de l'antigène lymphocytaire 6 C, Ly6C, à la

différence de leurs monocytes classiques qui expriment un taux élevé de Ly6C [24]. Le groupe de Hanna *et al.* a montré que les monocytes classiques, chez la souris, Ly6C<sup>hi</sup> déficients en NR4A1, molécule appartenant à la famille des récepteurs nucléaires orphelins (NR4A) ne se différenciaient pas en monocytes non classiques Ly6C<sup>low</sup> [22]. D'autres études ont confirmé ces résultats [25, 26], suggérant ainsi que les monocytes non classiques de profil LyC<sup>low</sup>CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>hi</sup> chez la souris dépendent du récepteur nucléaire NR4A1 pour leur survie et leur différenciation dans le sang et les tissus. Autre fait intéressant, le NR4A3, une autre molécule appartenant à la famille des récepteurs nucléaires orphelins (NR4A) participe à la régulation des molécules d'adhérence qui jouent un rôle essentiel dans la dérivation des MoDCs. Récemment, une étude réalisée chez la souris a exposé que l'absence de NR4A3 dans les monocytes altérait leur différenciation en MoDCs [27]. De plus, il semblerait que la transcription de NR4A3 soit induite lors de la différenciation des monocytes en MoDCs, tandis que celle de NR4A1 serait abrogée [28].

Ces données sont encourageantes puisque, même si nous n'avons pas observé de différence dans la modulation de NR4A3 dans les monocytes des HESN par rapport aux autres groupes (données non présentées), nos résultats montrent des niveaux élevés de NR4A1 trouvés chez les HESN D704 et D722 (Fig. 4.4 A) et une altération du profil des MoDCs chez ces mêmes HESN, lors de leur différenciation à J6, comparativement aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, non HESN<sup>-</sup> et CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> (Fig. 4.4 B). Fait intéressant, certaines études ont démontré qu'une régulation à la hausse de NR4A1 et l'absence de NR4A3 entraînent l'arrêt de la différenciation des monocytes en macrophages [27, 29], ce qui pourrait faire penser à une possible différenciation en macrophages chez les HESN au lieu des MoDCs. Toutefois, d'autres expériences restent à concevoir afin de vérifier l'implication des NR4A dans le processus de différenciation des MoDCs chez les HESN.

## 4.7 Références

- [1]. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 669-692. 10.1146/annurev.immunol.021908.132557
- [2]. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010; 33: 375-386. 10.1016/j.immuni.2010.08.012
- [3]. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14: 392-404. 10.1038/nri3671
- [4]. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature Reviews Immunology.* 2019; 19: 89-103. 10.1038/s41577-018-0088-1
- [5]. Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol.* 2005; 53: 65-76. 10.1111/j.1600-0897.2004.00248.x
- [6]. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 2009; 119: 2441-2450. 10.1172/jci39134
- [7]. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 592187. 10.1155/2012/592187
- [8]. Trifonova RT, Lieberman J, van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol.* 2014; 71: 252-264. 10.1111/aji.12198
- [9]. Card CM, Ball TB, Fowke KR. Immune quiescence: a model of protection against HIV infection. *Retrovirology.* 2013; 10: 141. 10.1186/1742-4690-10-141
- [10]. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup>FOXP3<sup>(+)</sup> regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1318-1322. 10.1086/597801
- [11]. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol.* 2012; 5: 277-287. 10.1038/mi.2012.7
- [12]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol.* 2010; 30: 90-98. 10.1007/s10875-009-9343-3
- [13]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol.* 2008; 1: 309-316. 10.1038/mi.2008.18
- [14]. Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS One.* 2011; 6: e25185. 10.1371/journal.pone.0025185
- [15]. Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Schramm DB, Donninger SL, Gray GE, Sherman GG, et al. Host CCL3L1 gene copy number in relation to HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses and viral load in South African women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008; 48: 245-254. 10.1097/QAI.0b013e31816fdc77
- [16]. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005; 307: 1434-1440. 10.1126/science.1101160
- [17]. Modi WS, Lautenberger J, An P, Scott K, Goedert JJ, Kirk GD, et al. Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 120-128. 10.1086/505331

- [18]. Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, Mummidi S, Geevarghese R, Catano G, et al. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5199-5204. 10.1073/pnas.091056898
- [19]. Shang L, Duan L, Perkey KE, Wietgreffe S, Zupancic M, Smith AJ, et al. Epithelium-innate immune cell axis in mucosal responses to SIV. *Mucosal Immunol*. 2017; 10: 508-519. 10.1038/mi.2016.62
- [20]. McCausland MR, Juchnowski SM, Zidar DA, Kuritzkes DR, Andrade A, Sieg SF, et al. Altered Monocyte Phenotype in HIV-1 Infection Tends to Normalize with Integrase-Inhibitor-Based Antiretroviral Therapy. *PLoS One*. 2015; 10: e0139474. 10.1371/journal.pone.0139474
- [21]. Krishnan S, Wilson EM, Sheikh V, Rupert A, Mendoza D, Yang J, et al. Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *J Infect Dis*. 2014; 209: 931-939. 10.1093/infdis/jit581
- [22]. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C<sup>-</sup> monocytes. *Nat Immunol*. 2011; 12: 778-785. 10.1038/ni.2063
- [23]. Gauvin J, Chagnon-Choquet J, Poudrier J, Roger M. Fluctuations in Blood Marginal Zone B-Cell Frequencies May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status. *PLoS One*. 2016; 11: e0155868. 10.1371/journal.pone.0155868
- [24]. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 762-774. 10.1038/nri3070
- [25]. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C<sup>low</sup> monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013; 153: 362-375. 10.1016/j.cell.2013.03.010
- [26]. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, et al. Ly-6C<sup>high</sup> monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*. 2014; 114: 1611-1622. 10.1161/circresaha.114.303204
- [27]. Boulet S, Daudelin JF, Odagiu L, Pelletier AN, Yun TJ, Lesage S, et al. The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116: 15150-15159. 10.1073/pnas.1821296116
- [28]. Briseno CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Kc W, et al. Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep*. 2016; 15: 2462-2474. 10.1016/j.celrep.2016.05.025
- [29]. Shaked I, Hanna RN, Shaked H, Chodaczek G, Nowyhed HN, Tweet G, et al. Transcription factor Nr4a1 couples sympathetic and inflammatory cues in CNS-recruited macrophages to limit neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2015; 16: 1228-1234. 10.1038/ni.3321

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

Comprendre les mécanismes de contrôle du VIH-1 chez les personnes dites « résistantes » au virus est susceptible de fournir des informations cruciales pour les stratégies préventives et thérapeutiques actuelles.

Nos précédents travaux (4, 5, 399), ainsi que d'autres études (3, 406-408), ont démontré que l'immunité naturelle contre le VIH-1 dans le TGF des HESN est associée à des niveaux inflammatoires bas, comparativement aux CSW infectées par le VIH-1 et aux Non-CSW non infectées par le VIH-1. Pour approfondir notre compréhension des mécanismes qui orchestrent ce faible profil inflammatoire et qui confèrent une protection contre le VIH-1, nous avons mesuré les niveaux d'expression de BLYS/BAFF et des cytokines dans la muqueuse vaginale des femmes béninoises. Par la suite, nous avons identifié et caractérisé le phénotype des cellules immunitaires génitales ayant un profil tolérogénique dans le TGF de ces femmes.

#### 5.1 Les cellules B innées dans l'immunité naturelle des HESN

Comme il a été mentionné dans l'introduction, l'infection au VIH-1 s'accompagne généralement de dérégulations au sein du compartiment B, altérant ainsi la réponse humorale (403, 409). Jusqu'à présent, très peu d'études ont évalué le profil des cellules B et leur production d'anticorps dans le contexte de l'immunité naturelle contre le VIH-1. Une meilleure compréhension de la nature et de la manière dont les populations de lymphocytes B sont sollicitées pour lutter contre le VIH-1 semble importante pour la conception d'approches préventives.

Le premier article présenté ici fait suite aux études effectuées dans le compartiment systémique des femmes de la cohorte béninoise, afin d'identifier les populations des cellules B innées et leur production en anticorps dans la muqueuse génitale des femmes HESN.

### 5.1.1 Les niveaux d'expression de BLyS/BAFF soluble et membranaire

Nos précédentes études effectuées dans le compartiment systémique des femmes de la cohorte béninoise (Annexe 1) ont démontré que l'immunité naturelle au VIH-1 rencontrée chez les HESN peut impliquer des fréquences relativement élevées de cellules exprimant BLyS/BAFF, tout en préservant la régulation homéostatique de son niveau d'expression de surface cellulaire et de sa libération soluble. Alors, nous avons voulu savoir si nos observations dans le TGF seraient similaires ou différentes de celles trouvées dans le sang des HESN.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les niveaux de BLyS/BAFF soluble ainsi que la fréquence des cellules exprimant BLyS/BAFF dans la muqueuse vaginale des HESN comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup>. Nous avons constaté que les HESN présentent de faibles niveaux de BLyS/BAFF soluble dans leur CVL comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Fig. 1, p. 79). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans le compartiment systémique (Annexe 1, Fig. 1, p. 228). En revanche, même si le taux de cellules exprimant BLyS/BAFF à leur surface est plus faible chez les HESN, le niveau d'expression de BLyS/BAFF par cellule se révèle être plus élevé chez les HESN par rapport aux deux autres groupes, CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Fig. 2, p. 81). Ces données sont à l'opposé de celles trouvées en périphérie (Annexe 1, Fig. 3, p. 232). Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc que l'immunité naturelle au VIH-1 chez les HESN pourrait impliquer une régulation à la hausse de l'expression de BLyS/BAFF, tout en préservant la régulation homéostatique de sa libération soluble dans le TGF, afin de prévenir les effets délétères et les lésions au niveau de la muqueuse vaginale.

En 2016, l'équipe de Richard Y. *et al.* a démontré *in vitro* que les *p*DCs exposées au VIH-1 régulent à la hausse l'expression de BLyS/BAFF à la surface des cellules qui l'exprime, sans pour autant libérer la molécule sous forme soluble (410). Des résultats similaires ont été rapportés dans les *p*DCs de souris (411) et dans les *p*DCs humains exposés au rotavirus (412). Cela soulève la possibilité que les faibles taux de BLyS/BAFF soluble mesurés dans le sérum et dans le CVL des HESN pourraient être liés à certains signaux, encore mal connus, qui empêcheraient ou diminueraient le clivage de BLyS/BAFF soluble chez ces femmes. Une telle régulation pourrait non seulement être limitée à la population cellulaire, mais également être

influencée par le statut inflammatoire de l'hôte. En ce sens, le profil inflammatoire bas décrit chez les HESN pourrait être lié à la modulation de la machinerie intracellulaire des cellules synthétisant BLyS/BAFF, menant à son expression et à sa libération. Bien évidemment, une étude plus approfondie sur la caractérisation des *p*DCs et les molécules de signalisation intervenant dans l'expression/surexpression de BLyS/BAFF dans les deux compartiments reste à réaliser, afin de valider ou infirmer cette hypothèse.

Autre fait intéressant, l'équipe de He *et al.* a décrit une expression accrue de BLyS/BAFF par les monocytes en réponse à la gp120 recombinante se liant à des lectines de surface. Dans cette étude, ils ont montré que la gp120 soluble peut augmenter directement la production de BLyS/BAFF, par les monocytes, en se liant à certaines lectines, mais également en se fixant aux CD4, CXCR4 ou CCR5 (413). Il est possible que des particules solubles de la gp120 ou du VIH-1 puissent se lier directement aux monocytes et stimuler la production de BLyS/BAFF dans une certaine mesure. Toutefois, certaines études utilisant des cultures de monocytes appauvris en *p*DCs démontrent que les monocytes primaires humains répondent mal aux particules de VIH-1. De plus, la sécrétion de BLyS/BAFF par les monocytes classiques CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> et intermédiaires CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> ne se produit qu'en réponse à l'IFN-I, induite par le virus (414). Ceci concorderait avec le profil de monocytes observés chez les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>-</sup> (Fig. 4.4 A, p. 140). Mais, là encore, des études fonctionnelles sur les *p*DCs et les populations de monocytes de la cohorte béninoise, dans les deux compartiments, apparaissent nécessaires.

Nous avons également pensé que les faibles niveaux de BLyS/BAFF soluble chez les HESN pouvaient être liés à certains polymorphismes génétiques. De ce fait, nous avons analysé les mutations des régions -871, -2841 et -2701 du promoteur BAFF associées à des taux plasmatiques de BLyS/BAFF élevés et à une susceptibilité à des maladies auto-immunes (415, 416) dans notre cohorte du Bénin. Cependant, nous n'avons trouvé aucune association entre les mutations du promoteur BAFF, les taux de BLyS/BAFF dans le sang et dans le CVL, et l'infection par le VIH-1 (données non présentées). Un séquençage de la totalité du gène BLyS/BAFF reste à établir afin de détecter la présence de possibles mutations pouvant être liées à ces facteurs.

Les hauts niveaux de BLyS/BAFF soluble mesurés dans le surnageant du CVL et dans le sang des femmes CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>, comparativement aux HESN, concordent avec ceux que nous avons précédemment observés dans la cohorte HARSAH, pour les progresseurs classiques et rapides infectés par le VIH-1 (403). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'expression de facteurs directs et indirects associés au VIH-1. En effet, nos précédentes études ont démontré que Nef soluble peut moduler directement l'expression de BLyS/BAFF à la surface des cellules et son relargage par les MoDCs (417). De plus, d'autres études sur le VIH-ENV ont décrit une régulation positive de l'expression de BLyS/BAFF par les macrophages (413). Des éléments de translocation microbienne, tels que le LPS, sont également connus pour réguler à la hausse l'expression et la libération de BLyS/BAFF (417, 418).

### **5.1.2 Les cellules B de la zone marginale du TGF des femmes béninoises**

BLyS/BAFF est très reconnu pour son rôle dans l'ontogenèse et la survie des cellules B, ainsi que dans leur sélection vers le pool de cellules B innées de la MZ (256, 272). Nous avons démontré que la surexpression de BLyS/BAFF dans le sang de progresseurs infectés par le VIH-1 coïncidait avec une hyperglobulinémie et une augmentation de la fréquence des cellules B innées de la MZ de type précurseur exprimant IL-10 (419).

À la suite de cela, nous avons décidé d'évaluer les niveaux de BLyS/BAFF dans la muqueuse vaginale des HESN (section précédente), puis d'identifier et de caractériser une population génitale de cellules B innées appartenant à la MZ, de type CD1c<sup>+</sup>. De façon générale, on constate que les cellules prélevées au niveau de l'exocol des HESN présentent un pourcentage de cellules B MZ innées de type CD1c<sup>+</sup> relativement plus faible comparativement aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Fig. 3 A, p. 83). Ces résultats concordent avec les faibles niveaux de BLyS/BAFF soluble mesurés dans le surnageant de CVL des HESN (Fig. 1, p. 79). Par ailleurs, en accord avec les résultats démontrés par l'équipe de Cerutti A. (256), nous observons que ces cellules B endocervicales de type CD1c<sup>+</sup> de la MZ, se lient naturellement à la gp120 entièrement glycosylée avec des fréquences supérieures aux cellules B n'exprimant pas CD1c (Fig. 4, p. 85). Ces résultats suggèrent que les populations B innées de type CD1c<sup>+</sup>



seraient capables de transférer le VIH-1 aux cellules cibles, mais également pourraient répondre efficacement et rapidement à travers la production d'anticorps reconnaissant les protéines de l'enveloppe virale.

Étant donné leur emplacement dans les organes lymphoïdes et dans les structures associées aux muqueuses, les cellules B innées de type CD1c<sup>+</sup> participent aux réponses immunitaires locales, visant à contrôler la microflore et les nombreux pathogènes ou, au contraire, à favoriser la progression de certaines espèces commensales. Ces cellules B de type CD1c<sup>+</sup> répondent en générant des anticorps contre ces pathogènes envahisseurs afin d'éradiquer les potentielles infections bactériennes ou virales (256). Fait intéressant, il a été démontré que les cellules B MZ humaines sont capables de se lier naturellement à la gp120 entièrement glycosylée via leur BCR polyréactif et des lectines de surface. En présence de BLyS/BAFF, ces cellules B MZ produisent des IgG et IgA polyréactifs, dont une fraction reconnaît la gp120 (413). En accord avec ces observations, nous avons démontré que les cellules B innées de la MZ des femmes de la cohorte béninoise sont capables de se lier à la gp120 glycosylée.

De plus, nous avons observé que les HESN présentent des fréquences relatives de cellules B totales CD19<sup>+</sup> capables de se lier à la gp120 plus élevées que les autres groupes CSWs<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> et Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Fig. 4 A, p. 85). Il est possible que les récepteurs de la gp120 chez les CSWs<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> soient saturés, d'où la capacité de liaison à la gp120 *in vitro* plus faible chez les CSWs<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> par rapport aux HESN. Concernant la fréquence des sous-populations des cellules B innées CD19<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup> liant la gp120, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les HESN et les deux autres groupes (Fig. 4 B, C et D, p. 85). Ces résultats peuvent laisser penser que d'autres sous-populations de cellules B génitales des HESN, autres que les CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> et CD1c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>, ont une plus grande capacité de se lier à la gp120 que ceux des CSWs<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> et des Non-CSWs HIV<sup>-</sup>.

En plus d'une exposition fréquente au VIH-1, la présence de cellules réservoirs locales du VIH-1 dans le TGF des HESN pourrait expliquer le maintien des populations B innées de première ligne chez les HESN; cependant, nous n'avons pas réussi à le déterminer à cause d'un faible nombre de cellules dans nos échantillons. De plus, il a été démontré que l'arrêt du travail du sexe conduit les HESN à une séroconversion lors de leur reprise de l'activité sexuelle, et ce, malgré des réponses spécifiques au VIH-1 préexistantes (420). Ces données suggèrent donc

qu'une exposition fréquente au VIH-1 est nécessaire pour maintenir les populations cellulaires innées de première ligne, et non mémoires, ainsi que leurs réponses protectrices rapides en anticorps dans la muqueuse génitale. Ces cellules innées pourraient être également maintenues à la suite d'un pool de cellules B réactives au microbiote ou d'une autre infection, réagissant ainsi de manière croisée avec le virus.

### 5.1.3 Les immunoglobulines et isotypes dans le CVL des femmes béninoises

Chez l'humain, les cellules B innées de la MZ sont capables de commutation de classe des Igs, principalement envers les IgG et les IgA. Elles expriment un répertoire BCR polyréactif, de faible affinité, prédiversifié et muté somatiquement (256). Ce BCR comprend le gène IGHV1-2 (421) et participe à la production d'anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs), comme le VRC01 (422). Toutefois, des taux élevés de BLyS/BAFF augmentent l'expansion, l'activation et le dérèglement de populations de cellules B innées, contribuant probablement à la surproduction d'anticorps polyréactifs de faible affinité et autoréactifs (423), au détriment des réponses en anticorps plus spécifiques contre le VIH-1. Bien que nous n'ayons pas trouvé de différence significative dans les fréquences de plasmoblastes/plasmocytes totaux, et pour ceux exprimant IgG à leur surface (Fig. 5, p. 86), les pourcentages relatifs totaux des ASC de profil  $CD138^+CD1c^+CD1a^+IgG^+$  sont significativement plus élevés chez les  $CSWs^+HIV^+$  par rapport aux HESN. Nous n'avons pas pu déterminer si ces cellules étaient directement impliquées dans les niveaux élevés d'IgG<sub>1</sub> et d'IgG<sub>3</sub> totaux mesurés dans le surnageant de CVL des  $CSWs^+HIV^+$  comparés aux HESN (Fig. 5, p. 86), à cause d'un trop faible nombre de cellules viables à la suite du tri cellulaire. Ces résultats, associés à un excès de BLyS/BAFF soluble dans le CVL des  $CSWs^+HIV^+$ , sont en accord avec l'hyperglobulinémie trouvée en périphérie chez les  $CSWs^+HIV^+$  de la cohorte, tout comme nous l'avons montré pour les progresseurs de la cohorte HARSAH (419).

En ce qui a trait aux isotypes, nous avons observé que les IgG<sub>1</sub> sont réactives à la gp41 de l'enveloppe chez certaines HESN (Fig. 6 B, p. 898). De plus, la réactivité des IgG<sub>1</sub> et des IgA<sub>1</sub> avec la gp120 et la gp41 de l'enveloppe, ainsi que la reconnaissance de la gp41 par les

IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA<sub>2</sub> et IgM ont été observées dans le surnageant de CVL pour la majorité des CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. Cependant, malgré les fréquences élevées de cellules B innées de type CD1c<sup>+</sup> se liant à la gp120, aucuns isotypes se liant à la gp120 n'a été détecté dans le surnageant de CVL de HESN. Étant donné que la plupart des anticorps localisés dans les muqueuses interagissent avec la flore microbienne, la réactivité des IgG<sub>1</sub> vis-à-vis de la gp41 détectée chez certaines femmes HESN pourrait provenir d'un pool de lymphocytes B réactifs avec le microbiote, probablement de première ligne (424, 425). Cependant, nous n'avons pas pu déterminer si les IgG<sub>1</sub> qui se lient à la gp41 dans le CVL de HESN peuvent conférer un certain niveau de protection, toujours à cause de ce faible nombre de cellules dans nos échantillons. Il faut savoir que la plupart des immunoglobulines génitales qui sont présentes dans le mucus (426), a malheureusement été retiré avant la collecte de nos échantillons. Ceci pourrait expliquer en partie la faible détection des isotypes se liant à la gp120 ou la gp41 de l'enveloppe chez les HESN. Une autre explication serait que l'immunité naturelle n'est probablement pas associée aux activités de neutralisation ou d'ADCC médiées par la production d'IgG spécifiques du VIH-1. En effet, une étude de notre laboratoire a démontré la présence des IgG anti-VIH-1 dans le sang et dans le CVL des CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> de notre cohorte, mais pas chez les HESN (352). Toutefois, des études de fonctionnalités des Igs au sein de la muqueuse vaginale des femmes HESN devraient être effectuées, si possible, afin de déterminer leurs caractéristiques et leurs fonctions spécifiques.

Concernant les IgA totaux présents dans le surnageant du CVL, nous n'avons pas observé de différence entre les groupes (Fig. 5, p.86). Sans étonnement, nous n'avons pas pu détecter de réactivité importante pour les isotypes IgA<sub>1</sub> et IgA<sub>2</sub> avec gp120 ou gp41 dans le surnageant de CVL des HESN (Fig. 6, p.88). Les études actuelles concernant la présence d'IgA spécifiques contre le VIH-1 dans le tractus génital de HESN sont assez contradictoires (396, 427-429). Ces divergences entre les études pourraient être dues à la taille relativement réduite de l'échantillonnage ou aux différentes techniques utilisées pour détecter ces anticorps réactifs à l'enveloppe. Néanmoins, il se pourrait que les faibles taux d'IgA observés dans le CVL des HESN et l'absence de leur réactivité avec les glycoprotéines de l'enveloppe soient liés à la compétitivité avec la fonction des IgG dirigée contre le même épitope. En effet, Fouda G. *et al.*, ont démontré que les IgG spécifiques à l'enveloppe du VIH-1 ont une meilleure capacité de

déclencher une activité ADCC uniquement lorsque les niveaux des IgA spécifiques au même épitope sont faibles (430). Là encore, d'autres études sur la fonctionnalité des IgA et IgG devraient être effectuées.

Pour conclure, les faibles niveaux de BLYS/BAFF observés dans la muqueuse vaginale des HESN semblent permettre des réponses contrôlées de première ligne, contribuant à maintenir un profil inflammatoire bas et donc une immunité naturelle au VIH-1. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure sur le rôle protecteur des cellules B innées liant la gp120 contre le VIH-1. Des études longitudinales et d'autres caractérisations phénotypiques et fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer la nature exacte des cellules B innées CD1c<sup>+</sup> génitales et de leurs réponses en anticorps.

## **5.2 Les populations endocervicales immunorégulatrices dans l'immunité naturelle des HESN**

Pour approfondir notre compréhension sur les mécanismes qui orchestrent ce faible profil inflammatoire et confèrent une protection contre le VIH-1, nous avons comparé les cytokines inflammatoires et tolérogéniques dans le surnageant du CVL des femmes béninoises. Par la suite, nous avons décidé de caractériser le phénotype des cellules myéloïdes et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> endocervicaux ainsi que leurs activités tolérogéniques au sein du TGF des HESN.

### **5.2.1 Les molécules solubles dans le CVL des femmes béninoises**

Sans grande surprise, nous avons observé un faible taux de cytokines pro-inflammatoires, à savoir TNF- $\alpha$ , RANTES, IL-17A, IL-22 et IFN- $\beta$ , dans le surnageant du CVL des HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> (Fig. 1, p. 117). Ces résultats corroborent ceux de plusieurs études effectuées sur d'autres cohortes de HESN (3-5, 399, 406, 408) montrant ainsi qu'une faible production de cytokines pro-inflammatoires dans les muqueuses génitales des HESN reflète probablement la résistance à l'infection par le VIH-1 et un contrôle de la maladie

au site initial d'exposition. Néanmoins, les HESN présentent des niveaux plus élevés d'IL-10 et de HLA-G soluble par rapport aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, suggérant qu'une augmentation modérée d'IL-10 peut être bénéfique et favoriser un microenvironnement immunorégulateur. En effet, le maintien d'un milieu régulateur par le biais d'IL-10 empêche l'établissement d'une infection par le VIH-1, en réduisant la disponibilité des cellules cibles (431). Cependant, les taux d'IL-10 sont souvent élevés dans le contexte du VIH-1, comme nos résultats le démontrent pour les CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>. De ce fait, un excès d'IL-10 pourrait entraver l'éradication virale (298), en maintenant une activation et une dérégulation cellulaire chronique. Ceci entraînerait un déséquilibre entre les cellules régulatrices et les cellules effectrices (432, 433), associés à la progression de l'infection (179, 434).

Nous avons également observé des niveaux plus élevés d'IFN- $\alpha$  dans le surnageant du CVL des HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, ce qui pourrait être essentiel pour maintenir l'homéostasie immunitaire antivirale des facteurs de restriction dans les cellules au site d'entrée du virus. Les interférons de type I sont indispensables pour protéger l'hôte contre les virus; toutefois, lors d'inflammation chronique, ils deviennent délétères et augmentent les niveaux de BLYS/BAFF. Dans le contexte d'une infection par le VIH-1, les IFN-I favorisent les réponses inflammatoires via les TLRs 7/8 (343, 435) et régulent à la hausse l'expression des ISG, qui se sont révélé interférer avec plusieurs virus à différents stades du cycle répliatif (317, 436). En effet, des études réalisées chez les macaques rhésus ont démontré que le blocage du récepteur de l'IFN-I entraîne une réduction de l'expression des gènes antiviraux, une augmentation de la taille du réservoir de SIV et une déplétion accélérée des LT-CD4<sup>+</sup> aboutissant à la phase SIDA (437). De plus, les IFN-I sont capables de réguler l'activité antivirale de SAMHD1 *in vitro*, en activant l'inhibiteur de cycline dépendante des kinases, CDK, réduisant ainsi la phosphorylation de SAMDH1 sur la thréonine 592 (438, 439). Les niveaux élevés d'IFN que nous avons observé dans le CVL des Non-CSWs HIV<sup>-</sup> pourraient laisser penser que ces femmes appartenant à la population générale ont été exposées à certains facteurs microbiens, ou bien ont vécu des conditions inflammatoires/infectieuses autres que le VIH-1, favorisant la production d'IFN.

Donc, les niveaux d'IFN- $\alpha$  et d'IL-10 mesurés dans les CVL des HESN favoriseraient à la fois une réponse antivirale puissante et un environnement immunorégulateur.

## 5.2.2 Les populations endocervicales tolérogéniques/régulatrices chez les HESN

Dans les populations endocervicales des HESN, nous avons observé que les cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup> expriment de hauts niveaux d'expression de TLR-7, IFN- $\alpha$ , IL-10 et HLA-G par rapport aux deux autres groupes (Fig. 3, p. 121). Ces résultats confirment les niveaux élevés d'IFN- $\alpha$  et d'IL-10 que nous avons mesurés dans le surnageant du CVL des HESN, soutenant le puissant profil antiviral et immunorégulateur des HESN. Toutefois, à l'inverse des cellules myéloïdes, les cellules épithéliales des HESN ont exprimé de faibles niveaux d'expression de TLR7, IFN- $\alpha$ , IL-10 et HLA-G par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> (Fig. 2, p. 119). Des analyses supplémentaires devront suivre afin de déterminer si les niveaux d'IFN- $\alpha$  mesurés dans les CVL des HESN correspondent à des mécanismes de relargage/production par les cellules épithéliales.

Nous avons remarqué que certaines cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup> exprimaient CD11c et CD14. Ces cellules de profil HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> exprimant également HLA-G, ILT4, IFN- $\alpha$  et IL-10 étaient plus élevées chez les HESN par rapport aux CSW<sup>+</sup>HIV<sup>+</sup> (Fig. 4, p. 123). Ces résultats rappellent le profil tolérogénique des DCs décrit par l'équipe de S. Gregori (440, 441). Ils ont démontré que cette sous-population de DCs « tolérogéniques », encore appelée « DC-10 », est capable de sécréter de grandes quantités d'IL-10 en plus d'exprimer des taux élevés de HLA-G et d'ILT-4, induisant ainsi des cellules T<sub>H1</sub> (442). De plus, l'IL-10 étant l'une des cytokines clés induisant l'expression de HLA-G sur les cellules myéloïdes (308), l'engagement de ce dernier sur ILT-2, ILT-3 et ILT-4 inhibe la régulation des molécules costimulatrices, favorisant ainsi l'induction des T<sub>regs</sub> (443, 444) (Fig. 1.8). En effet, Liang S. et ses collègues ont montré que l'interaction HLA-G/ILT4 induit le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2, améliorant de cette façon l'activation des facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B et STAT3, ce qui diminue le niveau d'expression des molécules du CMH-II et atténue l'activation des lymphocytes T effecteurs (445).

De plus, des études *in vitro* ont démontré que les monocytes traités avec de l'IL-10 ou de l'IFN- $\alpha$  sont capables de se différencier en MoDCs tolérogéniques régulant à la hausse ILT-3 et ILT-4, ce qui entraîne la différenciation des cellules T<sub>H1</sub> (443, 444). Fait intéressant, nous avons identifié des fréquences élevées de cellules T<sub>regs</sub> dans l'exocol des HESN par rapport aux

deux groupes de femmes béninoises (Fig. 5, p. 125). Des résultats similaires observés dans le sang des HESN de la cohorte au Kenya (446) ont également été montrés. Par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup> et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup>, l'expression significativement élevée de PD-1 observée sur les T<sub>regs</sub> et les T<sub>r1</sub> de nos HESN pourraient traduire une activité homéostatique, participant au maintien des cellules T<sub>regs</sub> et de leur activité suppressive. Francisco L.M *et al.* ont établi que l'interaction PD-1/PD-L1 est capable de stabiliser et de maintenir la fonction des T<sub>regs</sub> en périphérie (447), similaire aux effets rapportés pour TGF- $\beta$  (448, 449). De plus, cette interaction joue un rôle essentiel dans l'induction des T<sub>regs</sub>, via la régulation négative des voies de signalisation AKT/mTOR (447). Ils ont également constaté que cette interaction PD-1/PD-L1 peut médier l'induction des cellules T<sub>regs</sub> en modulant l'activité ERK2 et, par conséquent, la cascade de signalisation des MAP kinases. D'autres travaux ont confirmé le rôle de l'inhibition de ces voies de signalisation dans le développement des T<sub>regs</sub> (450-453).

D'autre part, des études ont observé que l'induction de PD-1 joue un rôle majeur dans la reprogrammation métabolique des lymphocytes T activés (454). En effet, le métabolisme du glucose implique la voie de la glycolyse permettant la conversion du glucose en pyruvate et produisant de faibles taux d'ATP, et la voie de la phosphorylation oxydative, OXPHOS, capable également de produire de l'ATP, mais de façon beaucoup plus importante. Ces deux voies métaboliques sont donc toutes les deux nécessaires au maintien de la croissance, de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T effecteurs (455). Ainsi, cette reprogrammation métabolique empêche l'engagement des cellules T dans la glycolyse à la suite de l'inhibition de l'expression des récepteurs et des enzymes impliquées dans l'absorption et le métabolisme du glucose. Cependant, cette reprogrammation métabolique favorise l'augmentation de l'enzyme régulatrice de la voie métabolique de l'oxydation des acides gras, la carnitine palmitoyl transférase, ce qui entraîne l'augmentation du taux d'oxydation des acides gras et l'utilisation de la voie OXPHOS dans la cellule, permettant ainsi la génération de T<sub>regs</sub> (419, 454).

Nous avons également observé que ces cellules myéloïdes tolérogéniques de profil HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> expriment des niveaux élevés de l'intégrine CD103 (données non présentées), ce qui pourrait correspondre à leur fonction de « gardien » dans le maintien de la tolérance et de l'homéostasie tissulaire des muqueuses. En effet, suite à la capture du pathogène,

il a été trouvé dans la muqueuse intestinale que ces DCs HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>DC103<sup>+</sup> migrent vers les tissus lymphoïdes résidents, induisant la différenciation des LT-CD4<sup>+</sup> en T<sub>regs</sub> (218, 233, 238, 239). Il est donc possible que la grande majorité des cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> des HESN exprime principalement CD103 et HLA-G, jouant un rôle similaire dans leur TGF. En revanche, la majorité des cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> observées dans l'exocol des CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>, expriment des niveaux inférieurs de CD103 et de HLA-G à leur surface. Ces données suggèrent un phénotype plus actif que les cellules myéloïdes de type CD103<sup>+</sup>. Contrairement aux DCs CD103<sup>+</sup>, les DCs CD103<sup>-</sup> ont un phénotype plus immunogène à l'état d'équilibre (198) mais également dans un contexte inflammatoire (456), ce qui induit la différenciation des cellules T effectrices, productrices d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 (432). Ainsi, il se pourrait que les cellules myéloïdes retrouvées dans la muqueuse génitale des femmes séropositives contribuent au maintien du milieu inflammatoire, augmentant ainsi le risque de progression de l'infection par le VIH-1 au site d'exposition.

Pour conclure, nous ne pouvons pas déterminer si la fréquence augmentée des cellules myéloïdes tolérogéniques et des T<sub>regs</sub> identifiées dans le TGF des HESN participe à la protection du VIH-1. En revanche, les niveaux d'IFN- $\alpha$  et d'IL-10 mesurés dans les CVL HESN favorisent probablement des conditions immunorégulatrices et une réponse antivirale contribuant à l'immunité naturelle des HESN.

### **5.3 Les DCs tolérogéniques des HESN sont-elles induites à la suite d'un phénotype différentiel de monocytes ?**

Les DCs sont l'une des premières cellules à rencontrer le VIH-1 dans le tractus génital et contribuent à maintenir un équilibre homéostatique entre la tolérance et l'inflammation (457). Elles jouent un rôle majeur dans l'orchestration des réponses immunitaires en détectant des pathogènes via les TLRs (7, 458) et en produisant des cytokines immunorégulatrices. Par la suite, ces DCs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires régulant ainsi les réponses des cellules B et T (459). Au sein du TGF des HESN, nous avons identifié une population



endocervicale de DCs exprimant des niveaux élevés de molécules immunorégulatrices (IL-10, HLA-G, ILT4) et antivirales (IFN- $\alpha$ ), mais également des fréquences élevées de cellules T régulatrices, participant toutes deux à la prévention d'une activation immunitaire excessive. En accord avec ces résultats, nous avons également démontré que de faibles concentrations de BLyS/BAFF soluble pourraient contribuer au maintien d'un faible profil inflammatoire, et donc favoriser l'intégrité de la barrière muqueuse des HESN.

À la suite de ces données, nous avons décidé d'étudier le rôle des DCs endocervicales afin de déterminer leurs capacités à induire un signal dépendant des TLRs, régulant ainsi l'expression de cytokines spécifiques, notamment l'IFN- $\alpha$ , dans le TGF des HESN. Étant donné le faible pourcentage de DCs dans les échantillons génitaux des femmes de la cohorte, nous avons choisi d'utiliser des MoDCs. Ces cellules sont utilisées pour des études à plus grande échelle et sont connues comme étant phénotypiquement et fonctionnellement semblables aux DCs (186). Étonnamment, nous avons constaté que la différenciation des MoDCs était altérée chez les HESN à la différence des autres groupes, qui eux, se différenciaient (Fig. 4.4 B, p. 140).

Pour mieux comprendre le mécanisme de non-différenciation des monocytes en DCs chez les HESN, nous avons décidé de caractériser le phénotype et le transcriptome des monocytes circulants des femmes de la cohorte. Les premiers résultats obtenus nous ont permis d'observer une grande variabilité transcriptomique dans les monocytes des HESN, ceci, plus particulièrement pour celles qui avaient à la fois un nombre élevé d'années de prostitution et de clients (Fig. 4.2, p. 137). Nous avons également constaté un niveau d'expression élevé des gènes codant pour MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  chez les HESN ayant un grand nombre d'années de prostitution et de clients comparativement aux trois autres groupes (Fig. 4.3 A et B, p. 138). Ces résultats sont conformes à ce que nous avons démontré précédemment, à savoir une augmentation de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  dans le compartiment périphérique des HESN de notre cohorte, suggérant alors une migration des cellules immunitaires, après stimulation, vers leur TGF (4). Fait intéressant, des études *in vitro* ont montré la capacité de PBMCs provenant de HESN à exprimer des fréquences plus élevées des  $\beta$ -chimiokines après stimulation, comparativement aux personnes infectées par le VIH-1 (400). D'autre part, l'équipe de Winkler C. *et al.* a démontré que MIP-1 $\alpha$  est associée à trois polymorphismes localisés dans le gène CCL3 (ss46566437, ss46566439 et ss46566438), conférant de ce fait une protection face au VIH-1 chez les

personnes afro-américaines (460). CCL3L1 étant l'une des isoformes de MIP- $\alpha$  est un puissant agoniste de CCR5. Le niveau de CCL3L1 est principalement déterminé par le nombre de copies du gène que possède un individu et peut varier de 2 à 10 copies. Néanmoins, il semblerait qu'une diminution du nombre de copies en dessous de la moyenne de la population pourrait augmenter de façon importante le risque d'infection au VIH-1 (461). Concernant MIP-1 $\beta$  qui est codé par les gènes CCL4 et CCL4L1, deux polymorphismes (L1 et L2) ont été décrits. Ainsi, comparativement aux personnes séronégatives, les personnes séropositives ont une fréquence plus élevée de L2, suggérant un rôle dans la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (462). Étant donné que les chimiokines décrites ci-dessus sont les ligands principaux de CCR5, une stimulation récurrente de ces molécules chez les HESN (due aux nombres élevés de clients et d'années de travail du sexe) pourrait participer à l'élaboration d'une meilleure réponse, favorisant ainsi une immunité naturelle face au VIH-1 (4, 399).

La famille des récepteurs nucléaires NR4A se compose de trois protéines hautement homologues NR4A1 (*Nurr77/TR3/NGFI-B*), NR4A2 (*Nurr1/NOT/TINUR*) et NR4A3 (*NOR1/TEC/MINOR*). Ces protéines peuvent être induites simultanément par des stimuli similaires et, pour l'instant, l'existence de ligands correspondants reste contestée. Les membres de la famille NR4A peuvent être induits par divers stimuli comme les cytokines inflammatoires, les médiateurs lipidiques, le calcium et les hormones dans divers tissus et cellules (463, 464). Ces récepteurs nucléaires fonctionnent comme des facteurs de transcription et plusieurs rôles dans la lignée myéloïde leur ont été suggérés. Chacun possède sa propre fonction non redondante. Par exemple, NR4A1 joue un rôle sélectif dans le développement des monocytes qui ne peut pas être compensé par NR4A2 ou NR4A3 (465). De cette façon, NR4A1 s'est révélé contrôler la génération du sous-ensemble de monocytes Ly6C<sup>low</sup> et de certaines fonctions de macrophages chez la souris (465-468). La caractérisation phénotypique spécifique pour déterminer les différents sous-ensembles de monocytes dans notre cohorte reste à faire; néanmoins, ce profil de monocytes Ly6C<sup>low</sup> chez la souris ou de son équivalent en monocytes non classiques chez l'humain semble être plus important chez les HESN par rapport aux CSWs<sup>+</sup> HIV<sup>+</sup>, aux non HESN et aux Non-CSWs HIV<sup>-</sup> (Fig. 4.4 A, p. 140). Ces données concordent avec les niveaux élevés de NR4A1 observés chez ces mêmes HESN par rapport aux autres groupes (Fig. 4.3 D,

p. 138), suggérant que les monocytes non classiques dépendent de NR4A1 pour leur survie et leur différenciation dans le sang et les tissus.

Il a été démontré que NR4A1 et NR4A3 fonctionnent de façon opposée. En effet, la transcription de NR4A1 est inhibée lors de la différenciation des MoDCs, alors que celle de NR4A3 ne l'est pas (469). Ceci concorde avec nos résultats ne montrant ni de régulation de NR4A3 (données non présentées) ni de différenciation des MoDCs chez les HESN (Fig. 4.4 B, p. 140). Ainsi, NR4A3 semble nécessaire pour la génération de MoDCs, en présence de GM-CSF et IL-4 *in vitro* et, en son absence, les monocytes se différencient en macrophages (470). De plus, en absence d'infection, les monocytes classiques migrent dans la moelle osseuse afin de se différencier en monocytes non classiques (217). En accord avec le profil inflammatoire bas observé chez les HESN précédemment décrits, ces données pourraient expliquer la possible augmentation de monocytes non classiques observés chez les HESN. Toutefois des expériences sur la caractérisation phénotypique des monocytes s'avèrent nécessaires.

Concernant les DCs HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> exprimant IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup> et CD103<sup>+</sup> qui ont été identifiées au sein de l'exocol des HESN, il se pourrait que ces cellules puissent générer un microenvironnement tolérogénique/régulateur. Même si le rôle spécifique de NR4A3 dans les monocytes n'a pas encore été étudié de façon précise, ce n'est que récemment qu'un rôle a été attribué au NR4A3 dans la migration des DCs (471). En 2016, le groupe de Hedrick *et al.* a démontré *in vivo* que l'expression élevée de NR4A3 dans les *m*DCs CD103<sup>+</sup> par rapport aux DCs CD103<sup>-</sup> est essentielle pour leur fonction migratoire vers les organes lymphoïdes secondaires, mais pas pour leur développement à partir de précurseurs provenant de la moelle osseuse ou du sang (471). Ces données suggèrent donc que NR4A3 pourrait jouer un rôle dans le profil tolérogénique de ces cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, induisant par la suite la différenciation des cellules T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub> et des cellules B innées de la MZ potentiellement « B<sub>regs</sub> », identifiés dans le TGF des HESN.

Basé sur ces observations préliminaires, notre modèle illustré à la figure 5.1 suggère les possibles rôles des membres de la famille du facteur de transcription NR4A dans la modulation des MoDCs tolérogéniques, maintenant un microenvironnement tolérogénique/régulateur chez les HESN.

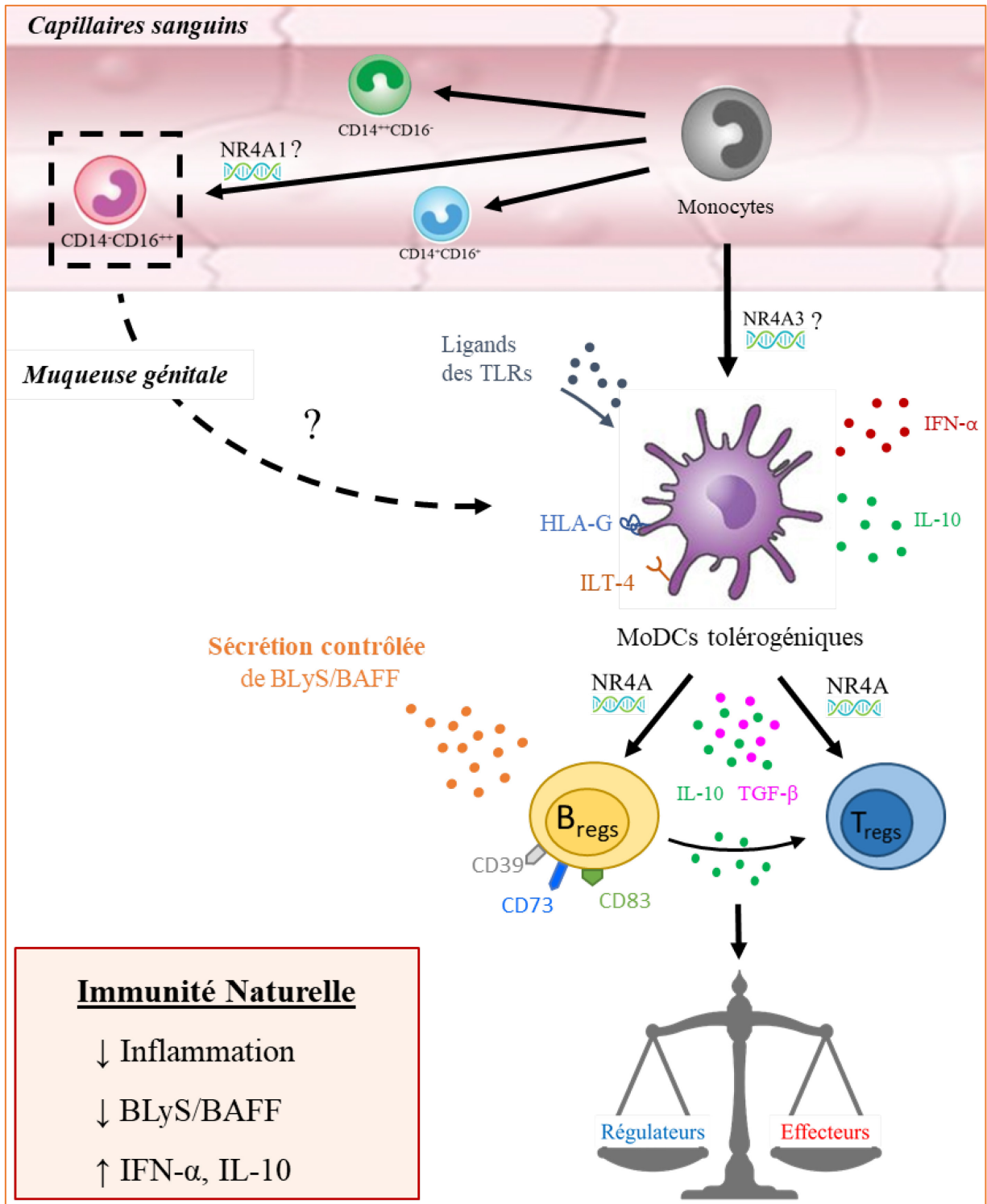


Figure 5.1. Microenvironnement tolérogénique retrouvé dans la muqueuse génitale des HESN.

Le phénotype différentiel des monocytes sanguins retrouvés chez les HESN pourrait être régulé par les récepteurs nucléaires NR4A mais également être impliqué dans la génération de MoDCs tolérogéniques. Ces cellules tolérogéniques, en plus des  $T_{regs}$  et éventuellement des  $B_{regs}$ , contribueraient à un milieu faiblement inflammatoire dans le TGF entraînant des réponses équilibrées des populations effectrices. Parallèlement, le faible niveau de BLyS/BAFF soluble pourrait entraîner la mise en place des réponses contrôlées des cellules B MZ de première ligne. Cette réponse favoriserait la sécrétion d'IgG et/ou d'IgA dans la muqueuse vaginale capables de se lier à l'enveloppe du VIH-1. Ainsi, l'immunité naturelle des HESN impliquerait l'orchestration de réponses immunitaires innées, afin de maintenir l'homéostasie de la muqueuse génitale et d'empêcher une invasion virale au niveau systémique.

## **5.4 Implications thérapeutiques**

La compréhension des mécanismes de protection contre l'infection par le VIH-1 mis en place par les HESN peut aider à concevoir des stratégies de traitement, tant au niveau des muqueuses et qu'en périphérie.

### **5.4.1 Ciblage de BLyS/BAFF soluble**

Comme mentionné dans le chapitre II, les faibles niveaux de BLyS/BAFF observés dans la muqueuse vaginale des HESN permettraient d'établir des réponses contrôlées de première ligne au sein des cellules B innées de la MZ, contribuant de cette façon à l'immunité naturelle au VIH-1. En effet, la surexpression de BLyS/BAFF conduit à la dérégulation des cellules B et à une hyperglobulinémie chez les personnes infectées par le VIH-1 (179).

Semblable à ce que nous retrouvons dans le contexte d'une infection au VIH-1, les niveaux élevés de BLyS/BAFF soluble et des populations B innées précurseurs appartenant à la MZ, sont retrouvés dans le contexte de plusieurs maladies auto-immunes, d'infections chroniques inflammatoires et de certains cancers. Plusieurs études effectuées chez les personnes

atteintes du lupus érythémateux disséminé ont rapporté qu'un traitement avec le belimumab, anticorps monoclonal qui inhibe BLYS/BAFF soluble, réduit l'activité de la maladie et le nombre de poussées (472-475). Les mécanismes d'action du belimumab dans le lupus érythémateux disséminé ne semblent pas être basés sur la déplétion des cellules B, mais sur la liaison entre BLYS/BAFF et ses trois récepteurs BCMA, TACI et BR3, entraînant la réduction des autoanticorps. De plus, ce traitement n'affecte pas les réponses des anticorps à la suite d'immunisations antigrippales contre le pneumocoque, le tétanos ou la grippe, ce qui est compatible avec la préservation du compartiment mémoire des lymphocytes B (475, 476). Par conséquent, dans le cadre de l'infection au VIH-1, un traitement ciblant le blocage de BLYS/BAFF pourrait réduire de façon significative le taux accru d'inflammation et la production excessive d'immunoglobulines chez les personnes infectées.

#### **5.4.2 Les immunoglobulines réactives à l'enveloppe virale**

L'induction de bNAbs est un objectif principal de la vaccination (477); toutefois, certaines études réalisées chez les macaques rhésus traités passivement avec les bNAbs ont montré la persistance de certains foyers viraux précoces dans leur muqueuse vaginale (425, 478, 479). L'essai du vaccin RV144 a démontré que la protection contre le VIH-1, significative de 31 %, n'était pas associée à la présence d'anticorps neutralisants, mais plutôt à une activité ADCC. Cela suggère que des anticorps non bNAbs médiant l'ADCC peuvent assurer une certaine protection contre le VIH-1 (480). Il convient de noter que les non-bNAbs et les bNAbs présentent une liaison différentielle aux trimères solubles, aux protéines *Env* non clivées et aux sous-unités monomériques de l'enveloppe du VIH-1 (481). Les épitopes ciblés des non bNAbs peuvent se lier à la boucle V3 de la gp120 et au domaine immunodominant de la gp41 (482, 483). Ainsi, la réactivité des IgG<sub>1</sub> se liant à la gp41 observée dans les muqueuses vaginales des HESN béninoises est un bon indice quant à leur niveau de protection face au VIH-1. Ces données suscitent l'approfondissement des recherches sur l'action simultanée des non-bNAbs et des bNAbs à des fins vaccinales ou de microbicides capables de solliciter l'activité des cellules B innées CD1c<sup>+</sup> qui lient gp120 dans le TGF.

### 5.4.3 Cellules myéloïdes tolérogéniques

Nous avons identifié une fréquence élevée de cellules myéloïdes HLA-DR<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> chez les HESN qui seraient associées à un profil tolérogénique (chapitre III). Cette sous population pourrait provenir des DCs dérivées de monocytes (MoDCs). Exploiter ces cellules pour prévenir l'infection par le VIH-1 serait considéré comme une stratégie clé. En effet, jouant un rôle essentiel dans les réponses innées, ces MoDCs tolérogéniques pourraient permettre de maintenir un environnement tolérogénique/régulateur afin de réduire le nombre de cellules cibles au site initial de l'infection.

Dans l'infection du VIH-1, les DCs de l'hôte sont altérées ce qui entraîne une mauvaise maturation cellulaire et l'altération de la réponse immunitaire antivirale. L'immunothérapie cellulaire consiste à administrer à l'hôte, des MoDCs tolérogéniques préalablement sensibilisées aux particules d'ARN virales *in vitro*. Ce traitement entraîne une meilleure réponse immunitaire, ciblée et spécifique, améliorant ainsi la réponse anti-VIH-1. Toutefois, les taux de réussite des tests cliniques n'ont pas été atteints, à cause de l'altération des monocytes et des DCs des patients infectés (484). Cela suggère que d'autres facteurs, en plus de l'état clinique du patient, peuvent interférer avec la technique de dérivation des monocytes en DCs et de leur stimulation spécifique. D'autres approches plus récentes ont proposé une stratégie utilisant les MoDCs stimulés pour réactiver les réservoirs du VIH-1, avec un puissant médicament antirétroviral, ce qui est prometteur pour la découverte d'un traitement antiviral (485, 486).

Autre point intéressant, les résultats préliminaires présentés dans le chapitre IV semblent indiquer que les membres de NR4A pourraient influencer la différenciation des monocytes en différents sous-types et en MoDCs. Les résultats préliminaires de notre laboratoire démontrent une diminution importante de l'expression des NR4A au sein des cellules B innées de la MZ chez les patients infectés par le VIH-1, possiblement à cause des niveaux élevés de BLyS/BAFF. Ainsi, la capacité unique des récepteurs nucléaires NR4A à réguler la génération des T<sub>regs</sub> (246) et potentiellement des B<sub>regs</sub> (300), en fait des cibles attrayantes pour le traitement du VIH-1.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux présentés dans cette étude avaient pour objectif de caractériser les cellules immunitaires observées dans le TGF, qui sont impliquées dans l'immunité naturelle des HESN.

Dans un premier temps, nous avons montré que le maintien de faibles niveaux de BLyS/BAFF chez les HESN, par rapport aux femmes séropositives, semble être associé à une immunité naturelle contre le VIH-1. De plus, l'identification de cellules B innées endocervicales, potentiellement « B<sub>regs</sub> », capables de se lier naturellement à la gp120 entièrement glycosylée, rend ces cellules de première ligne particulièrement intéressantes; elles pourraient être exploitées pour l'élaboration de microbicides ou de stratégies vaccinales, au sein des muqueuses vaginales.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré une forte réponse antivirale, IFN- $\alpha$ , dans le CVL des HESN par rapport aux personnes infectées par le VIH-1. Cela suggère que l'immunité naturelle contre le VIH-1 est associée à de fortes réponses antivirales, mais contrôlées. Parallèlement, l'identification des DCs tolérogéniques et des T<sub>regs</sub>/T<sub>r1</sub> présentes dans le col utérin des HESN, suggèrent la participation de ces cellules dans le contrôle et le maintien des faibles conditions inflammatoires au site initial d'exposition.

Face à la non-différenciation des MoDCs chez les HESN, nous avons voulu connaître le rôle et l'impact des monocytes sur la différenciation des MoDCs. Les résultats préliminaires nous ont permis de constater que l'expression des récepteurs nucléaires NR4A1 dans les monocytes des HESN pourrait être impliquée dans la modulation des populations immunorégulatrices retrouvées chez les HESN.

Le déroulement des événements moléculaires et cellulaires qui prennent place à la suite de l'exposition au VIH-1 jusqu'à l'établissement de l'infection n'est pas encore très clair. Toutefois, la présente étude nous a permis d'améliorer notre compréhension sur les mécanismes de protection contre l'infection par le VIH-1 mis en place par les HESN de la cohorte béninoise. Ceci pourrait aider à concevoir des stratégies vaccinales et thérapeutiques visant à moduler les affections inflammatoires au sein du TGF, afin d'établir une défense rapide et de première ligne contre le VIH-1, au sein de la muqueuse génitale.



## PERSPECTIVES

Premièrement, une **évaluation des possibles rôles des récepteurs nucléaires NR4A dans la modulation de la réponse immunorégulatrice chez les HESN** serait à envisager. En effet, les résultats préliminaires obtenus dans le chapitre IV nous ont permis de constater que les récepteurs nucléaires NR4A1/3 ont un impact sur la différenciation des sous-ensembles de monocytes et sur la différenciation des MoDCs. Ainsi, il serait intéressant de caractériser phénotypiquement les sous-types de monocytes en vue de déterminer la dominance des sous-populations qui existent dans chaque groupe de femmes. Aussi, une évaluation des niveaux d'expression de NR4A1,2,3 pour chaque sous-ensemble de monocytes serait à envisager.

Deuxièmement, **l'identification et la caractérisation de la fonction des cellules B CD1c<sup>+</sup> de type MZ des HESN ayant un potentiel profil « B<sub>regs</sub> »** seraient à évaluer. Les résultats présentés au chapitre II ont montré l'identification de cellules B innées de type CD1c<sup>+</sup> dans le TGF des HESN, ainsi que la présence d'isotypes mucosaux capables d'interagir avec l'enveloppe virale. Parallèlement, notre laboratoire a montré que les cellules B de la MZ provenant de patients sains, ont un potentiel B<sub>regs</sub>, notamment par l'expression de gènes NR4A et la co-expression de CD39, CD73, et CD83 (300). Pour faire suite à la caractérisation des cellules B innées présentes dans la muqueuse utérine des HESN, il serait intéressant d'étudier le statut de différenciation, la capacité de fonction régulatrice et le profil d'expression transcriptionnelle des cellules B innées de type CD1c<sup>+</sup>, afin d'examiner le rôle de ces cellules dans la protection du VIH-1. Par la suite, l'étude de la spécificité de chaque isotype localisé dans la muqueuse génitale et de leur capacité de lier les protéines de l'enveloppe virale chez les HESN sera nécessaire pour déterminer leur rôle dans l'immunité naturelle au VIH-1.

Pour terminer, **la caractérisation du phénotype et du transcriptome des cellules NK localisées dans la circulation sanguine et dans la muqueuse génitale des HESN** serait à considérer. Les cellules NK représentent une composante essentielle de la réponse immunitaire innée de l'hôte contre les infections virales. De plus en plus de données scientifiques reconnaissent le rôle important de ces cellules dans toutes les phases de l'infection par le VIH-1 (487-489). Il a été démontré que les cellules NK humaines sont capables d'induire la

maturation des DCs via la sécrétion du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$ . Inversement, les DCs sont capables d'activer les cellules NK, à la fois *in vitro* et *in vivo*, par la sécrétion de l'IL-15 (490, 491). Plusieurs études ont abordé le rôle des allèles du CMH-I et de leurs ligands KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) associés à la résistance à l'infection par le VIH-1 et à la progression de la maladie (492-494). De plus, la modulation fonctionnelle des réponses des cellules NK, leur activation et leur dégranulation ont été corrélées avec la résistance à l'infection par le VIH-1 dans plusieurs cohortes indépendantes d'individus HESN (495). Il serait donc intéressant de caractériser le profil phénotypique et transcriptomique des cellules NK présentes dans la muqueuse génitale des HESN. Par la suite, l'étude de leur interaction avec les DCs et les cellules B innées de la MZ dans le TGF des HESN serait à envisager, afin de déterminer si les cellules NK sont impliquées dans la médiation d'un profil tolérogénique des HESN.

## LIMITES DE L'ÉTUDE

Une des faiblesses de cette étude est le nombre restreint de cellules par échantillon. En effet, l'acquisition de PBMCs a été effectuée à partir de 7 ml de sang maximum, ce qui diminue de beaucoup la quantité finale de leucocytes récoltés. Il n'a pas été possible d'obtenir le nombre de PBMCs généralement fournis par tube, soit  $50 \times 10^6$  cellules, car ceci aurait nécessité un volume de sang supérieur à 10 ml, et les croyances de la région à propos de la sorcellerie ou autres y sont très fortes. À cet égard, l'obtention de deux tubes de PBMCs correspond à une visite/femme. Pour un tube de PBMCs décongelé, le nombre de cellules vivantes varie entre  $0,3 \times 10^6 - 4 \times 10^6$  cellules. Concernant les cellules vaginales, un tube de cellules endocervicales ou de CVL correspond à une visite/femme, le nombre de cellules vivantes par tube ne dépassant pas les  $0,3 \times 10^6$  cellules. De plus, le TGF étant un site effecteur, les cellules restent très sensibles à la congélation/décongélation, augmentant le niveau de difficulté pour l'isolement et l'analyse de certaines populations (ou sous-populations) pour des études fonctionnelles et du transcriptome. Ainsi, certaines études sont limitées uniquement au compartiment sanguin. Afin d'obtenir un nombre plus élevé de cellules endocervicales, il serait intéressant d'avoir accès à des biopsies génitales des femmes de cette cohorte. Toutefois, cette pratique reste peu éthique et risque d'accroître l'infection par le VIH-1 ainsi qu'à d'autres IST pour ces travailleuses du sexe.

Ces quelques facteurs parmi tant d'autres démontrent le haut niveau de difficulté rencontré dans cette étude, d'où la nécessité de sélectionner et de privilégier avec minutie les types cellulaires pour les expériences qui seront effectuées.

## RÉFÉRENCES

1. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics - 2019 fact sheet. 2019.
2. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity*, 2011. 34(2), 269-80.
3. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol*, 2012. 5(3), 277-87.
4. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol*, 2010. 30(1), 90-8.
5. Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PLoS One*, 2011. 6(9), e25185.
6. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012, 875821.
7. Trifonova RT, Lieberman J, van Baarle D. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. *Am J Reprod Immunol*, 2014. 71(3), 252-64.
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(9038), 1347-51.
9. Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, Maranan L, Jaoko W, Wachihi C, et al. Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS*, 2009. 23(13), 1669-77.
10. (CDC) CfDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1981. 30(21), 250-2.
11. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983. 220(4599), 868-71.

12. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 1986. 233(4761), 343-6.
13. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 2014. 346(6205), 56-61.
14. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011. 1(1), a006841.
15. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 1999. 397(6718), 436-41.
16. Tebit DM, Arts EJ. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect Dis*, 2011. 11(1), 45-56.
17. Marx PA, Alcibes PG, Drucker E. Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*, 2001. 356(1410), 911-20.
18. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of virology*, 2005. 79(19), 12515-27.
19. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids*, 1991. 5(6), 617-37.
20. Niedrig M, Gelderblom HR, Pauli G, Marz J, Bickhard H, Wolf H, et al. Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol*, 1994. 75 ( Pt 6), 1469-74.
21. Darlix JL, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fosse P, Mauffret O, Mely Y. Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol*, 2011. 410(4), 565-81.
22. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67, 1-25.
23. Robinson HL. New hope for an aids vaccine. *Nature Reviews Immunology*, 2002. 2(4), 239-50.
24. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology*, 2005. 2, 69.

25. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 1998. 251(1), 1-15.
26. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 1988. 331(6153), 280-3.
27. Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk HD, Garten W. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*, 1992. 360(6402), 358-61.
28. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res*, 2005. 15(11-12), 923-34.
29. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*, 2010. 46(1), 5-14.
30. Quinones-Mateu ME, Mas A, Lain de Lera T, Soriano V, Alcamí J, Lederman MM, et al. LTR and tat variability of HIV-1 isolates from patients with divergent rates of disease progression. *Virus Res*, 1998. 57(1), 11-20.
31. Malim MH, Emerman M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe*, 2008. 3(6), 388-98.
32. Sauter D, Unterwiesing D, Vogl M, Usmani SM, Heigele A, Kluge SF, et al. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. *PLoS Pathog*, 2012. 8(12), e1003093.
33. Sugden SM, Bego MG, Pham TN, Cohen EA. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses*, 2016. 8(3), 67.
34. de Silva S, Planelles V, Wu L. Differential effects of Vpr on single-cycle and spreading HIV-1 infections in CD4+ T-cells and dendritic cells. *PLoS One*, 2012. 7(5), e35385.
35. Subbramanian RA, Kessous-Elbaz A, Lodge R, Forget J, Yao XJ, Bergeron D, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *J Exp Med*, 1998. 187(7), 1103-11.
36. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 1984. 312(5996), 763-7.

37. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, et al. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*, 1998. 280(5371), 1949-53.
38. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 1996. 85(7), 1135-48.
39. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, 1996. 381(6584), 667-73.
40. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997. 89(2), 263-73.
41. Clapham PR, McKnight A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol*, 2002. 83(Pt 8), 1809-29.
42. Chesebro B, Buller R, Portis J, Wehrly K. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J Virol*, 1990. 64(1), 215-21.
43. Clapham PR, Blanc D, Weiss RA. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology*, 1991. 181(2), 703-15.
44. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med*, 2003. 9(7), 853-60.
45. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015. 1, 15035.
46. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 2000. 100(5), 587-97.
47. Hong PW, Flummerfelt KB, de Parseval A, Gurney K, Elder JH, Lee B. Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol*, 2002. 76(24), 12855-65.
48. Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*, 1992. 257(5068), 383-7.
49. Knight SC, Patterson S. Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu Rev Immunol*, 1997. 15, 593-615.

50. Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell*, 1994. 78(3), 389-98.
51. Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, et al. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem*, 2002. 277(13), 11314-20.
52. Goff SP. Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. *J Gene Med*, 2001. 3(6), 517-28.
53. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. Dans: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, rédacteurs. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 1997.
54. Friedrich TC, Valentine LE, Yant LJ, Rakasz EG, Piaskowski SM, Furlott JR, et al. Subdominant CD8<sup>+</sup> T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol*, 2007. 81(7), 3465-76.
55. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*, 2012. 13(3), 223-28.
56. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*, 2002. 8(7), 673-80.
57. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, et al. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(1), 372-81.
58. Van Maele B, Busschots K, Vandekerckhove L, Christ F, Debyser Z. Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(2), 98-105.
59. Skalka AM, Katz RA. Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death Differ*, 2005. 12 Suppl 1, 971-8.
60. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*, 2012. 10(4), 279-90.
61. Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. Dans: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, rédacteurs. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 1997.



62. Bieniasz PD. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*, 2009. 5(6), 550-8.
63. Lamothe B, Joshi S. Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front Biosci*, 2000. 5, D527-55.
64. Malim MH, Cullen BR. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell*, 1991. 65(2), 241-8.
65. Farjot G, Sergeant A, Mikaelian I. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem*, 1999. 274(24), 17309-17.
66. Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbash M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*, 1997. 7(10), 767-75.
67. Pereira EA, daSilva LL. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic*, 2016. 17(9), 976-96.
68. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*, 2015. 526(7572), 218-23.
69. Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol*, 1995. 69(11), 6810-8.
70. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 2008. 451, 425.
71. Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe*, 2007. 2(3), 193-203.
72. Douglas JL, Viswanathan K, McCarroll MN, Gustin JK, Früh K, Moses AV. Vpu Directs the Degradation of the Human Immunodeficiency Virus Restriction Factor BST-2/Tetherin via a  $\beta$ TrCP-Dependent Mechanism. 2009. 83(16), 7931-47.
73. Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, Barnes TG, et al. Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, 1985. 1(8428), 537-40.
74. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*, 1993. 57(1), 183-289.

75. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med*, 1991. 324(14), 954-60.
76. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 2004. 200(6), 761-70.
77. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 2014. 384(9939), 258-71.
78. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*, 1997. 156, 145-66.
79. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*, 2006. 12(3), 289-95.
80. Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 1998. 101(4), 746-54.
81. Rueda CM, Velilla PA, Chougnet CA, Montoya CJ, Rugeles MT. HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment. *PLoS One*, 2012. 7(1), e30307.
82. Veazey RS, Tham IC, Mansfield KG, DeMaria M, Forand AE, Shvetz DE, et al. Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol*, 2000. 74(1), 57-64.
83. Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, et al. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*, 1997. 3(11), 1259-65.
84. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*, 2011. 364(20), 1943-54.
85. Carrington M, Alter G. Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(7), a007070.
86. Phillips AN. Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science*, 1996. 271(5248), 497-9.
87. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*, 1996. 50, 825-54.

88. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6, 223-48.
89. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 2004. 200(6), 749-59.
90. Bonnet F, Lewden C, May T, Heripret L, Jouglu E, Bevilacqua S, et al. Malignancy-related causes of death in human immunodeficiency virus-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *Cancer*, 2004. 101(2), 317-24.
91. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, Shelhamer JH, Baird BF, Travis W, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med*, 1989. 111(3), 223-31.
92. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*, 2005. 206, 306-35.
93. Iwasaki A. Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(10), 699-711.
94. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol*, 2015. 15(4), 217-30.
95. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod*, 2005. 73(6), 1253-63.
96. Hein WR. Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. 236, 1-15.
97. Wira CR, Fahey JV. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *Aids*, 2008. 22(15), 1909-17.
98. King AE, Critchley HO. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010. 120(2-3), 116-26.
99. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol*, 1997. 38(5), 350-9.
100. Yeaman GR, Collins JE, Fanger MW, Wira CR, Lydyard PM. CD8+ T cells in human uterine endometrial lymphoid aggregates: evidence for accumulation of cells by trafficking. *Immunology*, 2001. 102(4), 434-40.

101. Evans J, Salamonsen LA. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev Endocr Metab Disord*, 2012. 13(4), 277-88.
102. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. 2, 33.
103. Henning TR, Butler K, Hanson D, Sturdevant G, Ellis S, Sweeney EM, et al. Increased susceptibility to vaginal simian/human immunodeficiency virus transmission in pig-tailed macaques coinfecting with *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Infect Dis*, 2014. 210(8), 1239-47.
104. Schust DJ, Ibane JA, Buckner LR, Ficarra M, Sugimoto J, Amedee AM, et al. Potential mechanisms for increased HIV-1 transmission across the endocervical epithelium during *C. trachomatis* infection. *Curr HIV Res*, 2012. 10(3), 218-27.
105. Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis*, 1990. 12(5), 856-72.
106. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*, 1999. 180(6), 1950-6.
107. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*, 2004. 150(8), 2565-73.
108. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *New England Journal of Medicine*, 2005. 353(18), 1899-911.
109. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol*, 2004. 4, 16.
110. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol*, 2002. 92(3), 451-9.
111. Paavonen J. Physiology and ecology of the vagina. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1983. 40, 31-5.
112. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun*, 1999. 67(10), 5170-5.

113. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, et al. Influence of the Normal Menstrual Cycle on Vaginal Tissue, Discharge, and Microflora. *Clinical Infectious Diseases*, 2000. 30(6), 901-07.
114. Richey CM, Schwebke JR, Weiss HL. Correlation of Behaviors with Microbiological Changes in Vaginal Flora. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999. 180(5), 1632-36.
115. Meier AS, Patton DL, Aura J, Agnew K, Eschenbach DA, Stapleton A, et al. Effects of Vaginal Intercourse with and without a Condom on Vaginal Flora and Vaginal Epithelium. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001. 183(6), 913-18.
116. WITKIN SS. Immunology of Recurrent Vaginitis. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 1987. 15(1), 34-37.
117. Koumans EH, Kendrick JS. Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis: a public health program and research agenda. *Sex Transm Dis*, 2001. 28(5), 292-7.
118. Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, et al. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 178(3), 580-7.
119. Neutra MR, Kraehenbuhl J-P. Chapter 7 - Cellular and Molecular Basis for Antigen Transport Across Epithelial Barriers. Dans: Mestecky J, Lamm ME, McGhee JR, Bienenstock J, Mayer L, Strober W, rédacteurs. *Mucosal Immunology (Third Edition)*. Burlington: Academic Press; 2005. p. 111-30.
120. Vetvicka V, Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R. Effects of microflora antigens on lymphocyte migration patterns in germfree and conventional rats. *Folia Biol (Praha)*, 1983. 29(6), 412-8.
121. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl J-P. ANTIGEN SAMPLING ACROSS EPITHELIAL BARRIERS AND INDUCTION OF MUCOSAL IMMUNE RESPONSES. *Annual Review of Immunology*, 1996. 14(1), 275-300.
122. Shukair SA, Allen SA, Cianci GC, Stieh DJ, Anderson MR, Baig SM, et al. Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal Immunol*, 2013. 6(2), 427-34.
123. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol*, 2008. 1(3), 183-97.
124. Cortés ME, Vigil P, Riquelme J, Zúñiga A, Ceric F. Scanning electron and light microscopy study of the cervical mucus in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Electron Microscopy*, 2009. 58(1), 21-27.

125. Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, et al. Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod*, 1997. 56(4), 999-1011.
126. Barros C, Vigil P, Herrera E, Arguello B, Walker R. Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Arch Androl*, 1984. 12 Suppl, 95-107.
127. Elstein M. Functions and physical properties of mucus in the female genital tract. *Br Med Bull*, 1978. 34(1), 83-8.
128. Cole AM. Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 306, 199-230.
129. Shukair SA, Allen SA, Cianci GC, Stieh DJ, Anderson MR, Baig SM, et al. Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement. *Mucosal immunology*, 2013. 6(2), 427-34.
130. Fahrback KM, Malykhina O, Stieh DJ, Hope TJ. Differential binding of IgG and IgA to mucus of the female reproductive tract. *PLoS One*, 2013. 8(10), e76176.
131. 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 pathogens*, 2016. 12(8), e1005817-e17.
132. Hashemi FB, Mollenhauer J, Madsen LD, Sha BE, Nacken W, Moyer MB, et al. Myeloid-related protein (MRP)-8 from cervico-vaginal secretions activates HIV replication. *Aids*, 2001. 15(4), 441-9.
133. Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, Huang PL, Kung HF, Blithe DL, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(6), 2678-81.
134. Novak RM, Donoval BA, Graham PJ, Boksa LA, Spear G, Hershov RC, et al. Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginoses in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. *Clin Vaccine Immunol*, 2007. 14(9), 1102-7.
135. Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 187(1), 137-44.
136. Shin LY, Kaul R. Stay it with flora: maintaining vaginal health as a possible avenue for prevention of human immunodeficiency virus acquisition. *J Infect Dis*, 2008. 197(10), 1355-7.

137. McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, Wahl SM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood*, 1997. 90(3), 1141-9.
138. Fourcade L, Poudrier J, Roger M. Natural Immunity to HIV: A Template for Vaccine Strategies. *Viruses*, 2018. 10(4),
139. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(1), 129-35.
140. Holdsworth SR, Gan PY. Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015. 10(12), 2243-54.
141. Legler DF, Thelen M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia (Aarau)*, 2016. 70(12), 856-59.
142. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *Biofactors*, 2009. 35(1), 14-20.
143. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics*, 2010. 5(1), 30-55.
144. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, 2011. 317(5), 575-89.
145. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(7), 533-44.
146. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 2002. 168(7), 3536-42.
147. Grant-Tschudy KS, Wira CR. Paracrine mediators of mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance in culture. *J Reprod Immunol*, 2005. 67(1-2), 1-12.
148. Borsutzky S, Cazac BB, Roes J, Guzman CA. TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *J Immunol*, 2004. 173(5), 3305-9.
149. Cazac BB, Roes J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*, 2000. 13(4), 443-51.
150. 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*, 2017. 10(2), 531-44.

151. Rancez M, Couëdel-Courteille A, Cheynier R. Chemokines at mucosal barriers and their impact on HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2012. 23(4), 233-43.
152. Langbein L, Grund C, Kuhn C, Praetzel S, Kartenbeck J, Brandner JM, et al. Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol*, 2002. 81(8), 419-35.
153. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*, 2010. 5, 119-44.
154. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. 1(6), a002899.
155. Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(11), 2499-515.
156. Gorodeski GI. Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. *Endocrinology*, 2007. 148(1), 218-31.
157. Blaskewicz CD, Pudney J, Anderson DJ. Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biol Reprod*, 2011. 85(1), 97-104.
158. Zeng R, Li X, Gorodeski GI. Estrogen abrogates transcervical tight junctional resistance by acceleration of occludin modulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(10), 5145-55.
159. Gorodeski GI. Aging and estrogen effects on transcervical-transvaginal epithelial permeability. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(1), 345-51.
160. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*, 2010. 6(4), e1000852.
161. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*, 2010. 464(7286), 217-23.
162. Magerus-Chatinet A, Yu H, Garcia S, Ducloux E, Terris B, Bomsel M. Galactosyl ceramide expressed on dendritic cells can mediate HIV-1 transfer from monocyte derived dendritic cells to autologous T cells. *Virology*, 2007. 362(1), 67-74.
163. Tudor D, Derrien M, Diomede L, Drillet AS, Houimel M, Moog C, et al. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol*, 2009. 2(5), 412-26.



164. Nasu K, Narahara H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm*, 2010. 2010, 976024.
165. Berg RK, Melchjorsen J, Rintahaka J, Diget E, Soby S, Horan KA, et al. Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA. *PLoS One*, 2012. 7(1), e29291.
166. Ghosh M, Shen Z, Fahey JV, Crist SG, Patel M, Smith JM, et al. Pathogen recognition in the human female reproductive tract: expression of intracellular cytosolic sensors NOD1, NOD2, RIG-1, and MDA5 and response to HIV-1 and *Neisseria gonorrhoea*. *Am J Reprod Immunol*, 2013. 69(1), 41-51.
167. den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. 58(7), 1149-57.
168. Aflatoonian R, Tuckerman E, Elliott SL, Bruce C, Aflatoonian A, Li TC, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum Reprod*, 2007. 22(2), 586-93.
169. Pioli PA, Amiel E, Schaefer TM, Connolly JE, Wira CR, Guyre PM. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. *Infect Immun*, 2004. 72(10), 5799-806.
170. Schaefer TM, Desouza K, Fahey JV, Beagley KW, Wira CR. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*, 2004. 112(3), 428-36.
171. Ghosh M, Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, Wira CR. Antiviral responses of human Fallopian tube epithelial cells to toll-like receptor 3 agonist poly(I:C). *Fertil Steril*, 2008. 89(5 Suppl), 1497-506.
172. Andersen JM, Al-Khairy D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod*, 2006. 74(5), 824-31.
173. Hart KM, Murphy AJ, Barrett KT, Wira CR, Guyre PM, Pioli PA. Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract. *J Reprod Immunol*, 2009. 80(1-2), 33-40.
174. Sentman CL, Wira CR, Eriksson M. NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol*, 2007. 57(2), 108-15.
175. Gregg CR, Melly MA, Hellerqvist CG, Coniglio JG, McGee ZA. Toxic activity of purified lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* for human fallopian tube mucosa. *J Infect Dis*, 1981. 143(3), 432-9.

176. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, et al. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol*, 2007. 74(1-2), 53-60.
177. Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod*, 2005. 20(5), 1372-8.
178. Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *Journal of Biomedical Science*, 2012. 19(1), 58.
179. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012, 592187.
180. Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, Lucas K, Waithman J, O'Keeffe M, et al. The lymphoid part of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol*, 2003. 170(10), 4926-32.
181. Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(3), 176-86.
182. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med*, 2006. 203(8), 1999-2008.
183. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 2013. 31, 563-604.
184. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, Baumjohann D, Morton J, Kim SJ, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol*, 2014. 15(1), 98-108.
185. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*, 2008. 29(3), 325-42.
186. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol*, 2015. 41, 9-22.
187. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature Reviews Immunology*, 2019. 19(2), 89-103.
188. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 1992. 176(6), 1693-702.

189. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392(6673), 245-52.
190. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, 2005. 6(5), 507-14.
191. Duluc D, Gannevat J, Anguiano E, Zurawski S, Carley M, Boreham M, et al. Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. *Mucosal Immunol*, 2013. 6(3), 626-38.
192. Moody DB, Young DC, Cheng TY, Rosat JP, Roura-Mir C, O'Connor PB, et al. T cell activation by lipopeptide antigens. *Science*, 2004. 303(5657), 527-31.
193. Zajonc DM, Elsliger MA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nat Immunol*, 2003. 4(8), 808-15.
194. Shen R, Kappes JC, Smythies LE, Richter HE, Novak L, Smith PD. Vaginal Myeloid Dendritic Cells Transmit Founder HIV-1. *Journal of Virology*, 2014. 88(13), 7683-88.
195. Mann ER, Bernardo D, English NR, Landy J, Al-Hassi HO, Peake ST, et al. Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. *Gut*, 2016. 65(2), 256-70.
196. Kim TS, Braciale TJ. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell responses. *PLoS One*, 2009. 4(1), e4204.
197. Krueger PD, Kim TS, Sung SS, Braciale TJ, Hahn YS. Liver-resident CD103<sup>+</sup> dendritic cells prime antiviral CD8<sup>+</sup> T cells in situ. *J Immunol*, 2015. 194(7), 3213-22.
198. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(6), 435-46.
199. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103<sup>+</sup> dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med*, 2008. 205(9), 2139-49.
200. del Rio ML, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa JI, Forster R. Development and functional specialization of CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunol Rev*, 2010. 234(1), 268-81.
201. Persson EK, Uronen-Hansson H, Semmrich M, Rivollier A, Hagerbrand K, Marsal J, et al. IRF4 transcription-factor-dependent CD103<sup>(+)</sup>CD11b<sup>(+)</sup> dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity*, 2013. 38(5), 958-69.

202. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature*, 2009. 462(7272), 510-3.
203. Ghosh M, Shen Z, Fahey JV, Cu-Uvin S, Mayer K, Wira CR. Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract. *Immunology*, 2010. 129(2), 207-19.
204. Gonzalez SM, Taborda NA, Feria MG, Arcia D, Aguilar-Jimenez W, Zapata W, et al. High Expression of Antiviral Proteins in Mucosa from Individuals Exhibiting Resistance to Human Immunodeficiency Virus. *PLoS One*, 2015. 10(6), e0131139.
205. Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest*, 2013. 123(2), 844-54.
206. Spiering R, Margry B, Keijzer C, Petzold C, Hoek A, Wagenaar-Hilbers J, et al. DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis. *J Immunol*, 2015. 194(10), 4804-13.
207. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*, 2003. 101(12), 4862-9.
208. Wu J, Horuzsko A. Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Hum Immunol*, 2009. 70(5), 353-6.
209. Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol*, 2013. 14(10), 1054-63.
210. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19, 683-765.
211. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, 2002. 297(5588), 1867-70.
212. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 2007. 204(8), 1757-64.
213. Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, Noelle RJ. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(27), 9331-6.

214. Comi M, Amodio G, Gregori S. Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. *Front Immunol*, 2018. 9, 682.
215. Horton C, Shanmugarajah K, Fairchild PJ. Harnessing the properties of dendritic cells in the pursuit of immunological tolerance. *Biomed J*, 2017. 40(2), 80-93.
216. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27, 669-92.
217. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(11), 762-74.
218. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research*, 2012. 53(1), 41-57.
219. Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol*, 2000. 30(7), 1872-83.
220. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 2003. 19(1), 71-82.
221. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(12), 953-64.
222. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*, 2000. 67(5), 699-704.
223. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 2011. 118(5), e16-31.
224. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, 2011. 118(12), e50-61.
225. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 2010. 33(3), 375-86.
226. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*, 1996. 87(1), 373-7.

227. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol*, 2010. 28, 445-89.
228. Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, Brichacek B, Fitzgerald W, Margolis L, et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol*, 2010. 3(3), 280-90.
229. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(2), 79-89.
230. Thome JJ, Farber DL. Emerging concepts in tissue-resident T cells: lessons from humans. *Trends Immunol*, 2015. 36(7), 428-35.
231. Kumar BV, Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep*, 2017. 20(12), 2921-34.
232. Moylan DC, Goepfert PA, Kempf MC, Saag MS, Richter HE, Mestecky J, et al. Diminished CD103 (alphaEbeta7) Expression on Resident T Cells from the Female Genital Tract of HIV-Positive Women. *Pathog Immun*, 2016. 1(2), 371-87.
233. Swaims-Kohlmeier A, Haaland RE, Haddad LB, Sheth AN, Evans-Strickfaden T, Lupo LD, et al. Progesterone Levels Associate with a Novel Population of CCR5+CD38+ CD4 T Cells Resident in the Genital Mucosa with Lymphoid Trafficking Potential. *J Immunol*, 2016. 197(1), 368-76.
234. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, et al. Alpha4(+)beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol*, 2009. 2(5), 439-49.
235. Stieh Daniel J, Matias E, Xu H, Fought Angela J, Blanchard James L, Marx Preston A, et al. Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques. *Cell Host & Microbe*, 2016. 19(4), 529-40.
236. Wang X, Xu H, Alvarez X, Pahar B, Moroney-Rasmussen T, Lackner AA, et al. Distinct expression patterns of CD69 in mucosal and systemic lymphoid tissues in primary SIV infection of rhesus macaques. *PLoS One*, 2011. 6(11), e27207.
237. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*, 2009. 15(8), 893-900.
238. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, 1999. 5(5), 512-7.

239. Wightman F, Solomon A, Khoury G, Green JA, Gray L, Gorry PR, et al. Both CD31(+) and CD31(-) naive CD4(+) T cells are persistent HIV type 1-infected reservoirs in individuals receiving antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 2010. 202(11), 1738-48.
240. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*, 2010. 11(1), 7-13.
241. Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci (Lond)*, 2009. 116(8), 639-49.
242. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol*, 2009. 182(1), 259-73.
243. Caramalho I, Nunes-Cabaco H, Foxall RB, Sousa AE. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. *Front Immunol*, 2015. 6, 395.
244. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol*, 2006. 176(6), 3593-602.
245. Nazzal D, Gradolatto A, Truffault F, Bismuth J, Berrih-Aknin S. Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death Dis*, 2014. 5, e1420.
246. Bandukwala HS, Rao A. 'Nurr'ishing Treg cells: Nr4a transcription factors control Foxp3 expression. *Nat Immunol*, 2013. 14(3), 201-3.
247. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21, 685-711.
248. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2004. 172(10), 5986-93.
249. Gregori S, Roncarolo MG. Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application. *Front Immunol*, 2018. 9, 233.
250. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997. 389(6652), 737-42.
251. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest*, 2004. 114(10), 1372-8.

252. Allers K, Loddenkemper C, Hofmann J, Unbehauen A, Kunkel D, Moos V, et al. Gut mucosal FOXP3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells and Nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells are differentially affected by simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *J Virol*, 2010. 84(7), 3259-69.
253. McGary CS, Deleage C, Harper J, Micci L, Ribeiro SP, Paganini S, et al. CTLA-4(+)/PD-1(-) Memory CD4(+) T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity*, 2017. 47(4), 776-88.e5.
254. Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens*, 2011. 77(2), 89-99.
255. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(11), 767-77.
256. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(2), 118-32.
257. Nescakova Z, Bystricky S. B cells - ontogenesis and immune memory development. *Gen Physiol Biophys*, 2011. 30(1), 1-10.
258. Kulkarni V, Ruprecht RM. Mucosal IgA Responses: Damaged in Established HIV Infection-Yet, Effective Weapon against HIV Transmission. *Front Immunol*, 2017. 8, 1581.
259. Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, et al. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS. *J Exp Med*, 2003. 197(3), 297-302.
260. Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, 2001. 97(1), 198-204.
261. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol*, 2002. 3(9), 822-9.
262. Lavie F, Miceli-Richard C, Quillard J, Roux S, Leclerc P, Mariette X. Expression of BAFF (BLYS) in T cells infiltrating labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Pathol*, 2004. 202(4), 496-502.
263. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(7), 491-502.
264. Cancro MP, D'Cruz DP, Khamashta MA. The role of B lymphocyte stimulator (BLYS) in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 2009. 119(5), 1066-73.



265. Do RK, Hatada E, Lee H, Tourigny MR, Hilbert D, Chen-Kiang S. Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. *J Exp Med*, 2000. 192(7), 953-64.
266. Kanakaraj P, Migone TS, Nardelli B, Ullrich S, Li Y, Olsen HS, et al. BLyS BINDS TO B CELLS WITH HIGH AFFINITY AND INDUCES ACTIVATION OF THE TRANSCRIPTION FACTORS NF-kappaB AND ELF-1. *Cytokine*, 2001. 13(1), 25-31.
267. Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(3), 282-9.
268. Ogden CA, Pound JD, Bath BK, Owens S, Johannessen I, Wood K, et al. Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J Immunol*, 2005. 174(5), 3015-23.
269. Xu G, Shen XJ, Pu J, Chu SP, Wang XD, Wu XH, et al. BLyS expression and JNK activation may form a feedback loop to promote survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Cytokine*, 2012. 60(2), 505-13.
270. Wenzel J, Landmann A, Vorwerk G, Kuhn A. High expression of B lymphocyte stimulator in lesional keratinocytes of patients with cutaneous lupus erythematosus. *Exp Dermatol*, 2018. 27(1), 95-97.
271. Huang Y, Fu X, Lyu X, Xu Z, He Z, Zhang Y, et al. Activation of LXR attenuates collagen-induced arthritis via suppressing BLyS production. *Clin Immunol*, 2015. 161(2), 339-47.
272. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27, 267-85.
273. Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol*, 1997. 27(9), 2366-74.
274. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol*, 1999. 162(12), 7198-207.
275. Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol*, 1992. 51, 1-84.
276. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26, 261-92.
277. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*, 2000. 37(18), 1141-9.

278. Chen K, Cerutti A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev*, 2010. 237(1), 160-79.
279. Gutzeit C, Chen K, Cerutti A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur J Immunol*, 2018. 48(7), 1101-13.
280. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*, 2006. 208(2), 270-82.
281. de Taeye SW, Rispens T, Vidarsson G. The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. *Antibodies (Basel)*, 2019. 8(2),
282. Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol*, 1986. 63(1), 127-34.
283. Brezski RJ, Jordan RE. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity? *MAbs*, 2010. 2(3), 212-20.
284. Seino J, Eveleigh P, Warnaar S, van Haarlem LJ, van Es LA, Daha MR. Activation of human complement by mouse and mouse/human chimeric monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol*, 1993. 94(2), 291-6.
285. Hui GK, Gardener AD, Begum H, Eldrid C, Thalassinos K, Gor J, et al. The solution structure of the human IgG2 subclass is distinct from those for human IgG1 and IgG4 providing an explanation for their discrete functions. *J Biol Chem*, 2019. 294(28), 10789-806.
286. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 2014. 5, 520.
287. Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev*, 2015. 268(1), 139-59.
288. Underdown BJ, Schiff JM. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol*, 1986. 4, 389-417.
289. Ribatti D. The discovery of immunoglobulin E. *Immunol Lett*, 2016. 171, 1-4.
290. Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev*, 1999. 171, 45-87.
291. von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity*, 2001. 14(5), 573-82.
292. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CI. TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol*, 1991. 3(11), 1099-106.

293. Oh JE, Iijima N, Song E, Lu P, Klein J, Jiang R, et al. Migrant memory B cells secrete luminal antibody in the vagina. *Nature*, 2019. 571(7763), 122-26.
294. Iwasaki A. The role of dendritic cells in immune responses against vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Microbes Infect*, 2003. 5(13), 1221-30.
295. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 2015. 42(4), 607-12.
296. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010. 32(1), 129-40.
297. Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, Lindner S, Trzaska T, van der Merwe JA, et al. CD4+ T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients. *J Immunol*, 2015. 194(8), 3768-77.
298. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol*, 2013. 93(5), 811-8.
299. Han J, Sun L, Fan X, Wang Z, Cheng Y, Zhu J, et al. Role of regulatory b cells in neuroimmunologic disorders. *J Neurosci Res*, 2016. 94(8), 693-701.
300. Doyon-Laliberte K, Chagnon-Choquet J, Byrns M, Aranguren M, Memmi M, Chrobak P, et al. NR4A Expression by Human Marginal Zone B-Cells. *Antibodies (Basel)*, 2019. 8(4),
301. Figueiro F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AM, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39(high) human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology*, 2016. 5(2), e1082703.
302. Ashouri JF, Weiss A. Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J Immunol*, 2017. 198(2), 657-68.
303. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*, 2008. 226, 205-18.
304. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 2002. 80(5), 477-83.
305. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood*, 2002. 99(7), 2468-76.

306. Zheng Z, Narita M, Takahashi M, Liu A, Furukawa T, Toba K, et al. Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004. 27(2), 93-103.
307. Murray PJ. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(24), 8686-91.
308. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*, 1999. 11(5), 803-11.
309. Newman GE. Pulmonary thromboembolism: a historical perspective. *J Thorac Imaging*, 1989. 4(4), 1-3.
310. Sun JB, Flach CF, Czerkinsky C, Holmgren J. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J Immunol*, 2008. 181(12), 8278-87.
311. Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). *Clin Cancer Res*, 2013. 19(20), 5564-71.
312. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(44), 16412-7.
313. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*, 1997. 186(11), 1809-18.
314. Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(21), 11520-5.
315. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol*, 2001. 22(10), 553-5.
316. Derrien M, Pizzato N, Dolcini G, Menu E, Chaouat G, Lenfant F, et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 7), 1945-54.
317. Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol*, 2015. 13(7), 403-13.
318. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 2010. 32(3), 305-15.

319. Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, DaSilva I, Kavanagh DG, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*, 2005. 115(11), 3265-75.
320. Bruel T, Dupuy S, Demoulins T, Rogez-Kreuz C, Dutrieux J, Corneau A, et al. Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon- $\alpha$  production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog*, 2014. 10(1), e1003915.
321. Kader M, Smith AP, Guiducci C, Wonderlich ER, Normolle D, Watkins SC, et al. Blocking TLR7- and TLR9-mediated IFN- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells does not diminish immune activation in early SIV infection. *PLoS Pathog*, 2013. 9(7), e1003530.
322. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, et al. CD4<sup>+</sup> T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4<sup>+</sup> T cells. *J Infect Dis*, 2011. 204(12), 1927-35.
323. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 2008. 26, 677-704.
324. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*, 2003. 33(10), 2706-16.
325. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4), 252-64.
326. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29), 10691-6.
327. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2002. 169(9), 4712-6.
328. Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. 38(1), 255.
329. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*, 2007. 8(11), 1246-54.
330. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 1999. 397(6716), 263-6.

331. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*, 1999. 402(6763), 827-32.
332. Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, et al. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med*, 2000. 192(1), 53-61.
333. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*, 2013. 4, 82.
334. Busse M, Krech M, Meyer-Bahlburg A, Hennig C, Hansen G. ICOS mediates the generation and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells conveying respiratory tolerance. *J Immunol*, 2012. 189(4), 1975-82.
335. Rottman JB, Smith T, Tonra JR, Ganley K, Bloom T, Silva R, et al. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*, 2001. 2(7), 605-11.
336. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 1990. 171(5), 1393-405.
337. Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, 2005. 174(2), 688-95.
338. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*, 2008. 180(9), 5916-26.
339. Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*, 2012. 71 Suppl 2, i96-100.
340. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 2005. 79(14), 9217-27.
341. Cleret-Buhot A, Zhang Y, Planas D, Goulet JP, Monteiro P, Gosselin A, et al. Identification of novel HIV-1 dependency factors in primary CCR4(+)CCR6(+)Th17 cells via a genome-wide transcriptional approach. *Retrovirology*, 2015. 12, 102.
342. Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*, 1997. 3(1), 42-7.
343. Gringhuis SI, van der Vlist M, van den Berg LM, den Dunnen J, Litjens M, Geijtenbeek TB. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol*, 2010. 11(5), 419-26.

344. Shang L, Duan L, Perkey KE, Wietgreffe S, Zupancic M, Smith AJ, et al. Epithelium-innate immune cell axis in mucosal responses to SIV. *Mucosal Immunol*, 2017. 10(2), 508-19.
345. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(5), a006940.
346. Fontenot D, He H, Hanabuchi S, Nehete PN, Zhang M, Chang M, et al. TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(39), 16776-81.
347. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*, 2006. 126(6), 1121-33.
348. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nat Immunol*, 2008. 9(6), 641-9.
349. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu Rev Med*, 2011. 62, 127-39.
350. Schutyster E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(5), 409-26.
351. Li Q, Estes JD, Schlievert PM, Duan L, Brosnahan AJ, Southern PJ, et al. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature*, 2009. 458(7241), 1034-8.
352. Batrville LA, Richard J, Veillette M, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Short communication: Anti-HIV-1 envelope immunoglobulin Gs in blood and cervicovaginal samples of Beninese commercial sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014. 30(11), 1145-9.
353. 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(17), 2086-95.
354. 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(9), F13-20.
355. Anglemeyer A, Rutherford GW, Easterbrook PJ, Horvath T, Vitoria M, Jan M, et al. Early initiation of antiretroviral therapy in HIV-infected adults and adolescents: a systematic review. *Aids*, 2014. 28 Suppl 2, S105-18.

356. Kostense S, Raaphorst FM, Joling J, Notermans DW, Prins JM, Danner SA, et al. T cell expansions in lymph nodes and peripheral blood in HIV-1-infected individuals: effect of antiretroviral therapy. *Aids*, 2001. 15(9), 1097-107.
357. Nguyen VK, Greenwald ZR, Trottier H, Cadieux M, Goyette A, Beauchemin M, et al. Incidence of sexually transmitted infections before and after preexposure prophylaxis for HIV. *Aids*, 2018. 32(4), 523-30.
358. Smith DK, Grohskopf LA, Black RJ, Auerbach JD, Veronese F, Struble KA, et al. Antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection-drug use, or other nonoccupational exposure to HIV in the United States: recommendations from the U.S. Department of Health and Human Services. *MMWR Recomm Rep*, 2005. 54(Rr-2), 1-20.
359. Herrera C, Shattock RJ. Candidate microbicides and their mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. 383, 1-25.
360. 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.
361. Robb ML, Rerks-Ngarm S, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Kaewkungwal J, Kunasol P, et al. Risk behaviour and time as covariates for efficacy of the HIV vaccine regimen ALVAC-HIV (vCP1521) and AIDSVAX B/E: a post-hoc analysis of the Thai phase 3 efficacy trial RV 144. *Lancet Infect Dis*, 2012. 12(7), 531-7.
362. Kim JH, Excler JL, 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.
363. Caskey M, Klein F, Nussenzweig MC. Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic. *Nat Med*, 2019. 25(4), 547-53.
364. Burton DR, Hangartner L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annu Rev Immunol*, 2016. 34, 635-59.
365. 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(3), 289-301.
366. Mendoza P, Gruell H, Nogueira L, Pai JA, Butler AL, Millard K, et al. Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature*, 2018. 561(7724), 479-84.
367. Falkowska E, Le KM, Ramos A, Doores KJ, Lee JH, Blattner C, et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity*, 2014. 40(5), 657-68.



368. Phair JP. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994. 10(8), 883-5.
369. Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1991. 4(7), 704-12.
370. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, 1994. 68(7), 4650-5.
371. Khanlou H, Salmon-Ceron D, Sicard D. [Characteristics of rapid progressors in HIV infection]. *Ann Med Interne (Paris)*, 1997. 148(2), 163-6.
372. Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, 2007. 27(3), 406-16.
373. Imami N, Westrop SJ, Grageda N, Herasimtschuk AA. Long-Term Non-Progression and Broad HIV-1-Specific Proliferative T-Cell Responses. *Front Immunol*, 2013. 4, 58.
374. Poropatich K, Sullivan DJ, Jr. 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.
375. Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(7), 487-98.
376. Bailey JR, Williams TM, Siliciano RF, Blankson JN. Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B\*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations. *J Exp Med*, 2006. 203(5), 1357-69.
377. den Uyl D, van der Horst-Bruinsma IE, van Agtmael M. Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27? *AIDS Rev*, 2004. 6(2), 89-96.
378. Hersperger AR, Migueles SA, Betts MR, Connors M. Qualitative features of the HIV-specific CD8+ T-cell response associated with immunologic control. *Current opinion in HIV and AIDS*, 2011. 6(3), 169-73.
379. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*, 2008. 29(6), 1009-21.

380. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(6), 2709-14.
381. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix ML, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy JF, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *Aids*, 2007. 21(8), 1043-5.
382. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2009. 360(7), 692-8.
383. Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, et al. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol*, 1996. 70(12), 8355-60.
384. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 2019. 568(7751), 244-48.
385. Yukl SA, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun TW, Douek D, et al. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog*, 2013. 9(5), e1003347.
386. Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *J Infect Dis*, 2010. 202 Suppl 3, S377-81.
387. Meyers AF, Fowke KR. International symposium on natural immunity to HIV: a gathering of the HIV-exposed seronegative clan. *J Infect Dis*, 2010. 202 Suppl 3, S327-8.
388. Alimonti JB, Koesters SA, Kimani J, Matu L, Wachihi C, Plummer FA, et al. CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J Infect Dis*, 2005. 191(1), 20-4.
389. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*, 2000. 164(3), 1602-11.
390. Erickson AL, Willberg CB, McMahan V, Liu A, Buchbinder SP, Grohskopf LA, et al. Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol*, 2008. 15(11), 1745-8.

391. Schenal M, Lo Caputo S, Fasano F, Vichi F, Saresella M, Pierotti P, et al. Distinct patterns of HIV-specific memory T lymphocytes in HIV-exposed uninfected individuals and in HIV-infected patients. *Aids*, 2005. 19(7), 653-61.
392. Pattacini L, Murnane PM, Kahle EM, Bolton MJ, Delrow JJ, Lingappa JR, et al. Differential regulatory T cell activity in HIV type 1-exposed seronegative individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013. 29(10), 1321-9.
393. Belec 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.
394. Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis*, 1999. 179 Suppl 3, S448-53.
395. Broliden K, Hinkula J, Devito C, Kiama P, Kimani J, Trabbatoni D, et al. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett*, 2001. 79(1-2), 29-36.
396. 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(9), 5170-6.
397. Hirbod T, Broliden K, Kaul R. Genital immunoglobulin A and HIV-1 protection: virus neutralization versus specificity. *Aids*, 2008. 22(17), 2401-2.
398. 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(1), 83-92.
399. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol*, 2008. 1(4), 309-16.
400. Suresh P, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Spontaneous and antigen-induced chemokine production in exposed but uninfected partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007. 23(2), 261-8.
401. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Pare G, Calvo EL, Hanna Z, et al. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity*, 2001. 15(2), 173-85.

402. Aureli A, Oumhani K, Del Beato T, El Aouad R, Piancatelli D. CD1A, D and E gene polymorphisms in a North African population from Morocco. *Hum Immunol*, 2016. 77(7), 566-70.
403. Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood*, 2011. 117(1), 145-55.
404. Sabourin-Poirier C, Fourcade L, Chagnon-Choquet J, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci Rep*, 2016. 6, 32318.
405. Seaton KE, Ballweber L, Lan A, Donathan M, Hughes S, Vojtech L, et al. HIV-1 specific IgA detected in vaginal secretions of HIV uninfected women participating in a microbicide trial in Southern Africa are primarily directed toward gp120 and gp140 specificities. *PLoS One*, 2014. 9(7), e101863.
406. Card CM, Ball TB, Fowke KR. Immune quiescence: a model of protection against HIV infection. *Retrovirology*, 2013. 10, 141.
407. Lajoie J, Mwangi L, Fowke KR. Preventing HIV infection without targeting the virus: how reducing HIV target cells at the genital tract is a new approach to HIV prevention. *AIDS Res Ther*, 2017. 14(1), 46.
408. Yao XD, Omange RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal Immunol*, 2014. 7(2), 268-79.
409. Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, Breen EC, Macatangay B, Penugonda S, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *Aids*, 2015. 29(4), 463-71.
410. Borhis G, Burelout C, Chaoul N, Smith N, Goujard C, Meyer L, et al. Plasmacytoid dendritic cells and myeloid cells differently contribute to B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor superfamily overexpression during primary HIV infection. *Aids*, 2016. 30(3), 365-76.
411. Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, et al. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity*, 2011. 34(2), 247-57.
412. Deal EM, Lahl K, Narvaez CF, Butcher EC, Greenberg HB. Plasmacytoid dendritic cells promote rotavirus-induced human and murine B cell responses. *J Clin Invest*, 2013. 123(6), 2464-74.

413. He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, et al. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol*, 2006. 176(7), 3931-41.
414. Gomez AM, Ouellet M, Tremblay MJ. HIV-1-triggered release of type I IFN by plasmacytoid dendritic cells induces BAFF production in monocytes. *J Immunol*, 2015. 194(5), 2300-8.
415. Ayad MW, Elbanna AA, Elneily DA, Sakr AS. Association of BAFF -871C/T Promoter Polymorphism with Hepatitis C-Related Mixed Cryoglobulinemia in a Cohort of Egyptian Patients. *Mol Diagn Ther*, 2015. 19(2), 99-106.
416. Zayed RA, Sheba HF, Abo Elazaem MA, Elsaadany ZA, Elmessery LO, Mahmoud JA, et al. B-cell activating factor promoter polymorphisms in egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Clin Lab Sci*, 2013. 43(3), 289-94.
417. Chagnon-Choquet J, Gauvin J, Roger J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. HIV Nef promotes expression of B-lymphocyte stimulator by blood dendritic cells during HIV infection in humans. *J Infect Dis*, 2015. 211(8), 1229-40.
418. Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol*, 2007. 179(9), 5947-57.
419. Gauvin J, Chagnon-Choquet J, Poudrier J, Roger M. Fluctuations in Blood Marginal Zone B-Cell Frequencies May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status. *PLoS One*, 2016. 11(5), e0155868.
420. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, et al. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest*, 2001. 107(3), 341-9.
421. Bikos V, Karypidou M, Stalika E, Baliakas P, Xochelli A, Sutton LA, et al. An Immunogenetic Signature of Ongoing Antigen Interactions in Splenic Marginal Zone Lymphoma Expressing IGHV1-2\*04 Receptors. *Clin Cancer Res*, 2016. 22(8), 2032-40.
422. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*, 2010. 329(5993), 811-7.
423. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjogren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev*, 2010. 9(9), 604-8.
424. Williams WB, Liao HX, Moody MA, Kepler TB, Alam SM, Gao F, et al. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science*, 2015. 349(6249), aab1253.

425. Wills S, Hwang KK, Liu P, Dennison SM, Tay MZ, Shen X, et al. HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. *J Virol*, 2018. 92(7),
426. Gunn B, Schneider J, Shansab M, Bastian AR, Fahrback K, Smith At, et al. Enhanced binding of antibodies generated during chronic HIV infection to mucus component MUC16. *Mucosal Immunol*, 2016. 9(6), 1549-58.
427. Alexander R, Mestecky J. Neutralizing antibodies in mucosal secretions: IgG or IgA? *Curr HIV Res*, 2007. 5(6), 588-93.
428. Dorrell L, Hessel AJ, Wang M, Whittle H, Sabally S, Rowland-Jones S, et al. Absence of specific mucosal antibody responses in HIV-exposed uninfected sex workers from the Gambia. *Aids*, 2000. 14(9), 1117-22.
429. 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.
430. Fouda GG, Cunningham CK, McFarland EJ, Borkowsky W, Muresan P, Pollara J, et al. Infant HIV type 1 gp120 vaccination elicits robust and durable anti-V1V2 immunoglobulin G responses and only rare envelope-specific immunoglobulin A responses. *J Infect Dis*, 2015. 211(4), 508-17.
431. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*, 1991. 174(4), 915-24.
432. Cerovic V, Houston SA, Scott CL, Aumeunier A, Yrlid U, Mowat AM, et al. Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol*, 2013. 6(1), 104-13.
433. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(4), 236-47.
434. Shacklett BL. Cell-mediated immunity to HIV in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*, 2009. 83(1-2), 190-5.
435. Saitoh SI, Abe F, Kanno A, Tanimura N, Mori Saitoh Y, Fukui R, et al. TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun*, 2017. 8(1), 1592.
436. Verhoeven D, George MD, Hu W, Dang AT, Smit-McBride Z, Reay E, et al. Enhanced innate antiviral gene expression, IFN-alpha, and cytolytic responses are predictive of mucosal immune recovery during simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol*, 2014. 192(7), 3308-18.

437. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*, 2014. 511(7511), 601-5.
438. Cribier A, Descours B, Valadao AL, Laguette N, Benkirane M. Phosphorylation of SAMHD1 by cyclin A2/CDK1 regulates its restriction activity toward HIV-1. *Cell Rep*, 2013. 3(4), 1036-43.
439. Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene*, 1998. 16(2), 217-25.
440. Amodio G, Comi M, Tomasoni D, Gianolini ME, Rizzo R, LeMaoult J, et al. HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10. *Haematologica*, 2015. 100(4), 548-57.
441. Amodio G, Gregori S. Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications. *Transplant Res*, 2012. 1(1), 14.
442. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*, 2010. 116(6), 935-44.
443. LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(18), 7064-9.
444. Ristich V, Zhang W, Liang S, Horuzsko A. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Hum Immunol*, 2007. 68(4), 264-71.
445. Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, Horuzsko A. Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(24), 8357-62.
446. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis*, 2009. 199(9), 1318-22.
447. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*, 2009. 206(13), 3015-29.
448. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 2005. 201(7), 1061-7.

449. Pyzik M, Piccirillo CA. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(2), 335-46.
450. Qu Y, Zhang B, Zhao L, Liu G, Ma H, Rao E, et al. The effect of immunosuppressive drug rapamycin on regulatory CD4+CD25+Foxp3+T cells in mice. *Transpl Immunol*, 2007. 17(3), 153-61.
451. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(22), 7797-802.
452. Luo X, Zhang Q, Liu V, Xia Z, Pothoven KL, Lee C. Cutting edge: TGF-beta-induced expression of Foxp3 in T cells is mediated through inactivation of ERK. *J Immunol*, 2008. 180(5), 2757-61.
453. Huber S, Schrader J, Fritz G, Presser K, Schmitt S, Waisman A, et al. P38 MAP kinase signaling is required for the conversion of CD4+CD25- T cells into iTreg. *PLoS One*, 2008. 3(10), e3302.
454. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun*, 2015. 6, 6692.
455. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell*, 2013. 153(6), 1239-51.
456. Siddiqui KR, Laffont S, Powrie F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity*, 2010. 32(4), 557-67.
457. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest*, 2009. 119(9), 2441-50.
458. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*, 2013. 97(1), 74-84.
459. Teijeira A, Russo E, Halin C. Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Semin Immunopathol*, 2014. 36(2), 261-74.
460. Modi WS, Lautenberger J, An P, Scott K, Goedert JJ, Kirk GD, et al. Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(1), 120-8.
461. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*, 2005. 307(5714), 1434-40.



462. Colobran R, Adreani P, Ashhab Y, Llano A, Este JA, Dominguez O, et al. Multiple products derived from two CCL4 loci: high incidence of a new polymorphism in HIV+ patients. *J Immunol*, 2005. 174(9), 5655-64.
463. Hamers AA, Hanna RN, Nowyhed H, Hedrick CC, de Vries CJ. NR4A nuclear receptors in immunity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2013. 24(5), 381-5.
464. Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*, 2006. 4, e002.
465. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat Immunol*, 2011. 12(8), 778-85.
466. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, et al. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res*, 2014. 114(10), 1611-22.
467. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 2013. 153(2), 362-75.
468. Shaked I, Hanna RN, Shaked H, Chodaczek G, Nowyhed HN, Tweet G, et al. Transcription factor Nr4a1 couples sympathetic and inflammatory cues in CNS-recruited macrophages to limit neuroinflammation. *Nat Immunol*, 2015. 16(12), 1228-34.
469. Briseno CG, Haldar M, Kretzer NM, Wu X, Theisen DJ, Kc W, et al. Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cell Rep*, 2016. 15(11), 2462-74.
470. Boulet S, Daudelin JF, Odagiu L, Pelletier AN, Yun TJ, Lesage S, et al. The orphan nuclear receptor NR4A3 controls the differentiation of monocyte-derived dendritic cells following microbial stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019. 116(30), 15150-59.
471. Park K, Mikulski Z, Seo GY, Andreyev AY, Marcovecchio P, Blatchley A, et al. The transcription factor NR4A3 controls CD103+ dendritic cell migration. *J Clin Invest*, 2016. 126(12), 4603-15.
472. Stohl W, Hilbert DM. The discovery and development of belimumab: the anti-BLyS-lupus connection. *Nat Biotechnol*, 2012. 30(1), 69-77.
473. Cavazzana I, Kumar R, Pozzari C, Ottaviani R, Fredi M, Piantoni S, et al. Autoantibodies' titre modulation by anti-BlyS treatment in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2019. 28(9), 1074-81.

474. Shin W, Lee HT, Lim H, Lee SH, Son JY, Lee JU, et al. BAFF-neutralizing interaction of belimumab related to its therapeutic efficacy for treating systemic lupus erythematosus. *Nat Commun*, 2018. 9(1), 1200.
475. Chatham WW, Wallace DJ, Stohl W, Latinis KM, Manzi S, McCune WJ, et al. Effect of belimumab on vaccine antigen antibodies to influenza, pneumococcal, and tetanus vaccines in patients with systemic lupus erythematosus in the BLISS-76 trial. *J Rheumatol*, 2012. 39(8), 1632-40.
476. Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzova D, et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2011. 63(12), 3918-30.
477. Day TA, Kublin JG. Lessons learned from HIV vaccine clinical efficacy trials. *Curr HIV Res*, 2013. 11(6), 441-9.
478. 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(6303), 1045-49.
479. Ng CT, Jaworski JP, Jayaraman P, Sutton WF, Delio P, Kuller L, et al. Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques. *Nat Med*, 2010. 16(10), 1117-9.
480. 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.
481. Yasmeeen A, Ringe R, Derking R, Cupo A, Julien JP, Burton DR, et al. Differential binding of neutralizing and non-neutralizing antibodies to native-like soluble HIV-1 Env trimers, uncleaved Env proteins, and monomeric subunits. *Retrovirology*, 2014. 11, 41.
482. Pollara J, Bonsignori M, Moody MA, Pazgier M, Haynes BF, Ferrari G. Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses. *Curr HIV Res*, 2013. 11(5), 378-87.
483. Lewis GK, Finzi A, DeVico AL, Pazgier M. Conformational Masking and Receptor-Dependent Unmasking of Highly Conserved Env Epitopes Recognized by Non-Neutralizing Antibodies That Mediate Potent ADCC against HIV-1. *Viruses*, 2015. 7(9), 5115-32.
484. Coelho AV, de Moura RR, Kamada AJ, da Silva RC, Guimaraes RL, Brandao LA, et al. Dendritic Cell-Based Immunotherapies to Fight HIV: How Far from a Success Story? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(12),

485. van der Sluis RM, van Montfort T, Pollakis G, Sanders RW, Speijer D, Berkhout B, et al. Dendritic cell-induced activation of latent HIV-1 provirus in actively proliferating primary T lymphocytes. *PLoS Pathog*, 2013. 9(3), e1003259.
486. van Montfort T, Speijer D, Berkhout B. Dendritic cells as natural latency reversing agent: A wake-up call for HIV-1. *Virulence*, 2017. 8(8), 1494-97.
487. Brenner BG, Dascal A, Margolese RG, Wainberg MA. Natural killer cell function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related diseases. *J Leukoc Biol*, 1989. 46(1), 75-83.
488. Alter G, Teigen N, Davis BT, Addo MM, Suscovich TJ, Waring MT, et al. Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood*, 2005. 106(10), 3366-9.
489. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, Kim D, Follman D, Marcenaro E, et al. Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(8), 2886-91.
490. Koka R, Burkett P, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells. *J Immunol*, 2004. 173(6), 3594-8.
491. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 2007. 26(4), 503-17.
492. Liu C, Carrington M, Kaslow RA, Gao X, Rinaldo CR, Jacobson LP, et al. Association of polymorphisms in human leukocyte antigen class I and transporter associated with antigen processing genes with resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 2003. 187(9), 1404-10.
493. MacDonald KS, Fowke KR, Kimani J, Dunand VA, Nagelkerke NJ, Ball TB, et al. Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 2000. 181(5), 1581-9.
494. Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ, Roger M. Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *Aids*, 2004. 18(3), 427-31.
495. Tomescu C, Abdulhaqq S, Montaner LJ. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clin Exp Immunol*, 2011. 164(2), 158-69.

## ANNEXES

### ANNEXE 1 : Article

#### **Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS/BAFF) levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers**

Article publié dans *Scientific Reports* 2016, 6, 32318, DOI: 10.1038/srep32318.

#### Contribution détaillée des auteurs :

##### **✚ Conception et mise au point des expériences :**

Catherine Sabourin-Poirier, Josiane Chagnon-Choquet, Johanne Poudrier et Michel Roger.

##### **✚ Manipulation des échantillons et expériences effectuées :**

Catherine Sabourin-Poirier – Contribution (70%).

##### **✚ Analyse des données statistiques et présentation des figures :**

Lyvia Fourcade – contribution (30%).

Johanne Poudrier et Michel Roger ont supervisé toutes les expériences et les analyses statistiques.

##### **✚ Contribution en approvisionnement en réactifs, matériels et outils d'analyses :**

Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Johanne Poudrier et Michel Roger.

##### **✚ Rédaction de l'article :**

Johanne Poudrier et Michel Roger.

**Blood B Lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers**

Catherine Sabourin-Poirier<sup>1,2</sup>, Lyvia Fourcade<sup>1,2</sup>, Josiane Chagnon-Choquet<sup>1,2</sup>, Annie-Claude Labbé<sup>2</sup>, Michel Alary<sup>3,4</sup>, Fernand Guédou<sup>5</sup>, Johanne Poudrier<sup>1,2\*</sup>, and Michel Roger<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, <sup>2</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada, <sup>3</sup>Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, Canada, <sup>4</sup>Département de médecine sociale et préventive, Université Laval, Québec, <sup>5</sup>Dispensaire des IST, Cotonou, Benin.

\*co-seniorship

Word count in text: 3 561

Word count in abstract: 193

Short Title: BLyS in natural immunity to HIV

Key Words: HIV, B-cells, BLyS/BAFF, HESN, natural immunity

Number of figures 6; table 1; supplementary figures 5

Reference count: 47

Address correspondence to: Johanne Poudrier (johanne.poudrier@crchum.qc.ca); Michel Roger (michel.roger@ssss.gouv.qc.ca).

## **ABSTRACT**

We have previously shown that excess B lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF in plasma and on the surface of blood dendritic cells (1) of HIV-infected progressors coincides with B-cell dysregulations and increased frequencies of “precursor” innate marginal zone (2)-like B-cells. In contrast, both blood BLyS levels and frequencies of this population remained unaltered in HIV elite-controllers. Based on these observations, we hypothesized that control of BLyS and innate B-cell status could be associated with natural immunity against HIV infection. Therefore, we assessed blood BLyS levels and B-cell status in HIV highly-exposed commercial sex workers (CSWs) from Benin. We found blood BLyS levels of HIV-uninfected CSWs were lower than those observed in both HIV-infected CSW and HIV-uninfected non-CSW groups. Furthermore, levels of BLyS expression on blood T-cells and monocytes were lower in HIV-uninfected CSWs when compared to HIV-infected CSWs, but higher than those observed for HIV-uninfected non-CSWs. Concomitantly, HIV-infected CSWs presented a dysregulated blood B-cell compartment, characterized by increased total IgG1, increased frequencies of populations presenting immature and/or innate profiles and a higher ratio of IgG<sup>+</sup>/IgA<sup>+</sup> plasmablasts. In contrast, relatively low levels of BLyS in the blood of HIV-uninfected CSWs coincided with a rather preserved B-cell compartment.

## INTRODUCTION

Worldwide, most HIV infections are acquired through heterosexual intercourse, and in sub-Saharan Africa, 60% of new HIV infections affect women<sup>1</sup>. Vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV, and the success of designing such agents will benefit from the study of HIV highly-exposed seronegative (HESN) individuals, who provide a model of natural immunity to HIV. High levels of anti-inflammatory and neutralizing proteins, such as anti-proteases and HIV-specific immunoglobulins (Igs) are found in the genital mucosa of HESN<sup>2,3</sup>. In a cohort of HESN women from Ivory Coast, HIV-specific mucosal IgA were shown to block viral transcytosis through tight epithelial barriers<sup>3-5</sup>. In a Kenyan female commercial sex worker (CSW) cohort, HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses as well as cross-clade neutralizing IgA have been found in both the blood and genital tract of HESN CSWs<sup>2,3,6-10</sup>. In these individuals a low activation T-cell profile corresponds with a greater ability to proliferate in response to HIV p24 peptides when compared to HIV-infected CSWs<sup>11</sup>. Furthermore, elevated frequencies of T-regulatory lymphocytes have been found in the blood of HESN CSWs<sup>12</sup>. In addition, we have previously shown that Beninese female HESN CSWs had significantly lower genital levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  than HIV-infected CSWs<sup>13</sup>. Altogether, these findings suggest that the capacity to maintain a low-key activation/inflammatory profile is associated with protection against HIV infection.

Until now, few studies have assessed B-cell expression profiles in the context of natural immunity against HIV. The detailed characterization of the Ig repertoire of cervical and systemic B-cells from a Kenyan HESN individual revealed that site-specific responses occur with unique regulation of tolerance and recruitment into local memory or blast B-cell compartments, and the infusion of systemic post-germinal center (GC) B-cells to the cervix seems to be a common event<sup>14</sup>. Understanding the nature and how these B-cell populations are solicited appears important to the design of preventive approaches.

Although the specific factors responsible for the natural immunity against HIV have yet to be fully unraveled, we believe that observations from HIV elite-controllers (EC) can shed some light. As such, our previous studies suggest that control of HIV disease progression may be linked to B lymphocyte Stimulator (BLyS)/BAFF expression status, and to its capacity of orchestrating B-cell population dynamics and responses<sup>15</sup>. Indeed, we have shown that BLyS over-expression in the blood of HIV-1-infected progressors coincided with major B-cell dysregulations and hyperglobulinemia, with increased frequencies of an activated population presenting characteristics of both transitional immature and innate marginal zone (2)-like B-cells, designated as “precursor MZ-like”<sup>16,17</sup>. In contrast, in EC, BLyS levels and precursor MZ-like B-cell frequencies remained similar to those observed in HIV-negative donors. Rather, percentages of MZ-like B-cells presenting a more “mature” profile were decreased when compared to both HIV progressors and HIV-negative individuals<sup>16,17</sup>. These findings suggest that the presence of these cells in a preserved BLyS non-inflammatory environment, such as encountered in EC, could be beneficial to the battle and even control of HIV. In an effort to further unravel elements associated with natural immunity to HIV, we have assessed blood BLyS levels and B-cell status in female CSWs from Benin.

## **RESULTS**

### **Socio-demographic characteristics of the study population**

The socio-demographic characteristics of female CSWs and non-CSWs are shown in Table 1. The three study groups were similar with respect to age and vaginal douching practice. Duration of sex work, average number of clients and condom use were similar between the HIV-infected and HIV-uninfected CSW groups.



## **Levels of expression of BLyS in serum and on blood T-cells, monocytes, myeloid dendritic cells (mDC) of HIV-uninfected CSWs, HIV-infected CSWs, and HIV-uninfected non-CSWs**

BLyS levels measured in serum of HIV-uninfected CSWs were significantly lower than those observed in HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 1). Because determining and comparing frequencies of cells expressing BLyS might be influenced by the fluctuations in cell populations between the study groups<sup>16,18</sup>, we have assessed the relative percentages of T-cells, monocytes and mDC in the blood of the three study groups. The percentages of HLA-DR<sup>-</sup> T-cells were increased in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSWs when compared to HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 2B) whereas the frequencies of activated HLA-DR<sup>+</sup> T-cells were lower in the HIV-uninfected groups (Fig. 2C) when compared to HIV-infected CSWs. For consistency and comparison with our previously published observations<sup>16,18,19</sup>, we have analyzed the minor fraction of CD14<sup>+</sup> monocytes which do not express detectable levels of CD11c, separately from the bulk of CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes. In fact, when compared to CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> monocytes, CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cell percentage greatly fluctuated in HIV<sup>+</sup> progressors<sup>18</sup>, and these cells expressed greater levels of surface BLyS<sup>16,17</sup>. For means of comparison with the current consensus on monocyte nomenclature, CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> and 90-95% of CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes are CD16<sup>-</sup>, and fall into the classical monocytes. A minor fraction of the CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes are CD14<sup>lo</sup> and express CD16 (not shown), and fall into the non-classical nomenclature<sup>20</sup>. Although no significant differences were observed in frequencies of the minor CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> monocytes between the three study groups (Fig. 2D), we found frequencies of CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes were greatly diminished in the blood of both CSWs groups when compared to HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 2E). Frequencies of total CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells, which comprise a majority of myeloid DC (mDC)<sup>20,21</sup>, and will be referred to mDC throughout the manuscript, were lower in HIV-uninfected CSWs when compared to both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 2F).

Taking into account these observations, we found significantly higher relative frequencies of T-cells, monocytes and mDC expressing BLYS in the blood of HIV-uninfected CSWs when compared to those observed in HIV-uninfected non-CSWs, and a similar trend when comparing to those of HIV-infected non-CSWs (Fig. 3 B-F, left panels). BLYS surface expression levels for these cell populations in HIV-uninfected CSWs were higher than those observed in HIV-uninfected non-CSWs but lower than those observed in HIV-infected CSWs (Fig. 3 B-F, right panels). Overall, HIV-uninfected (HESN) CSWs had the lowest levels of BLYS in their serum, but presented greater frequencies of BLYS expressing cells in their blood when compared to both HIV-uninfected non-CSWs and HIV-infected CSWs. However, HIV-infected CSWs presented the highest levels of BLYS cell surface expression.

#### **Analysis of B-cell populations in the blood of HIV-uninfected CSWs, HIV-infected CSWs, and HIV-uninfected non-CSWs**

Relative percentages of total B-cells were lower in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSWs when compared to that of control non-CSWs (not shown). Naïve resting B-cell frequencies were higher in HIV-uninfected CSWs when compared to those in HIV-infected CSWs, but lower than those found in HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 4B). Conversely, the frequency of mature activated B-cells was lower in HIV-uninfected CSWs than in HIV-infected CSWs, but higher than in HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 4C). No significant difference in the frequencies of resting switched memory and transitional immature B cells were observed (Fig. 4D-E). As for mature MZ-like B-cells, frequencies were decreased in the blood of HIV-uninfected CSWs when compared to HIV-uninfected non-CSWs (Fig. 4F). As stated earlier, we had previously described increased frequencies of precursor MZ-like B-cells presenting an activated phenotype in the blood of HIV-infected progressors<sup>16,17</sup>. As such, we found a significant increased frequency of B-cells presenting this phenotype in the blood of HIV-infected CSWs when compared to the HIV-uninfected CSWs (Fig. 4G), we also found higher frequencies of B-cells presenting similar IgM<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD21<sup>-/lo</sup> and GC-like CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD10<sup>+</sup>CD21<sup>-/lo</sup> characteristics in the blood of HIV-infected CSWs (Fig. 4H-J). Altogether, these findings observed in HESN female

CSWs suggest that natural immunity to HIV does not lead to increase in B-cell populations presenting immature and/or innate “activated” profiles, but may involve other populations such as mature MZ-like, such as observed in EC<sup>16,17</sup>.

**Frequencies of plasmablasts, total immunoglobulin and isotype concentrations in the blood of HIV-uninfected CSWs, HIV-infected CSWs, and HIV-uninfected non-CSWs**

HIV-uninfected CSWs had lower frequencies of blood IgM<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> plasmablasts but higher percentages of IgA<sup>+</sup> plasmablasts when compared to HIV-infected CSWs (Fig. 5 A-C). The relative frequencies of IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> plasmablasts were similar between the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. However, HIV-uninfected CSWs had lower frequencies of IgM<sup>+</sup> plasmablasts than in HIV-uninfected non-CSWs. The evaluation of total serum immunoglobulin and isotypes profile demonstrated that HIV-uninfected CSWs had lower concentration of IgG1, but higher concentration of IgG2 and IgG4 compared to HIV-infected CSWs (Fig. 6). Overall, these observations are consistent with a seemingly preserved/controlled B-cell compartment in HESN CSWs.

## **DISCUSSION**

Although HIV-uninfected CSWs had the lowest levels of BLyS in their serum, they presented greater frequencies of BLyS expressing cells in their blood when compared to both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. However, HIV-infected CSWs presented the highest levels of BLyS cell surface expression. Altogether these findings suggest that natural immunity to HIV, as encountered in HIV-uninfected (HESN) CSWs, may involve relatively high frequencies of BLyS expressing cells while preserving homeostatic regulation of its cell surface expression level and soluble release. Recent studies have shown that in contrast to mDCs, plasmacytoid DCs exposed to HIV *in vitro* upregulate BLyS cell surface expression without release, and that this may depend on cellular intrinsic factors<sup>22</sup>. Such a regulation might not only be cell population restricted but may also be influenced by the overall inflammatory status of the host. Therefore, the

low-inflammatory response we have previously described in these HIV-uninfected CSWs<sup>13</sup> may be linked to the modulation of the intracellular machinery leading to BLYS expression and/or release. As to whether these are related to advantageous genetic polymorphisms remains to be established.

The relatively higher levels of BLYS observed in the serum of HIV-infected CSWs is consistent with previous reports by us and others showing that BLYS expression is increased in the context of HIV disease, and not fully restored following therapy<sup>16,23</sup>. This is likely due to direct and indirect factors associated with HIV infection. Indeed, soluble HIV-Nef can directly modulate BLYS membrane expression and soluble release by monocyte derived DCs (mo-DCs)<sup>19</sup>, and HIV-Env has been shown to upregulate BLYS expression by macrophages<sup>24</sup>. Furthermore, BLYS has been shown to be directly induced by type I IFNs<sup>25,26</sup>. Moreover, the elevated inflammatory status we have previously described in HIV-infected CSWs<sup>3,13</sup> as well as elements of microbial translocation, such as LPS (Supplementary Fig. S1), are known to up-regulate BLYS expression and release<sup>19,27</sup>. However, blood sCD14 levels were similar between the HIV-infected and HIV-uninfected groups (Supplementary Fig. S1), suggesting that these African women might be exposed to microbial factors<sup>28</sup> other than HIV that can also lead to inflammation and microbial translocation, through diarrhea for example. This may help explain why soluble levels of BLYS measured in the serum of control HIV-uninfected non-CSWs are comparable to those observed in HIV-infected CSWs, and may suggest that these individuals have inflammatory/infectious conditions other than HIV favoring soluble release of BLYS, as we did not find increased expression on the surface of blood cells we analyzed from these individuals. Albeit, our sample processing method did not allow us to assess expression by neutrophils, which are a substantial source of BLYS<sup>29</sup>.

In contrast to HIV-uninfected CSWs, and consistent with previous findings by us and others<sup>15,30,31</sup>, the high BLYS levels found in the blood of HIV-infected CSWs were concomitant with elevated serum IgG1 and major B-cell dysregulations, such as increased activation and possibly pre-exhausted profiles and a decrease in switched memory.

Furthermore, in agreement with the high prevalence of IgG<sup>+</sup> plasmablasts recently described in the blood of HIV-infected individuals<sup>32</sup>, we found that the majority of plasmablasts in HIV-infected CSWs were IgG<sup>+</sup>, whereas IgA<sup>+</sup> plasmablasts were found predominantly in HIV-uninfected CSWs and controls, likely reflecting homeostatic requirements at mucosal interfaces such as the GALT<sup>32</sup>. The high frequencies of IgG<sup>+</sup> plasmablasts and IgG1 hyperglobulinemia in the blood of HIV-infected CSWs is consistent with polyclonal B-cell activation found in chronic viral infections. However, we noticed a relative reduction in serum IgG2 in these individuals when compared to HIV-uninfected CSWs, which could reflect an increased trigger/need for IgG1 or perhaps IgG2 class switch interference by HIV factors such as Nef<sup>33,34</sup>.

The fact that relative frequencies of “mature” MZ-like B-cells were reduced in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSW groups may reflect chronic exposure to HIV at peripheral mucosal entry and/or replication sites, and recruitment of this cell population and its involvement in immunity against HIV. We have previously observed the reduction of this population in the blood of HIV-infected slow progressors and EC<sup>16</sup>, and recent observations demonstrate that “mature” MZ-like B-cells from these individuals present a greater migration index in response to CXCL12 and CCL25<sup>35</sup>. Whether there is a genetic relationship with the reduced frequencies of mature MZ-like B-cells we observe warrants further investigation. However, in contrast to HIV-uninfected CSWs, HIV-infected CSWs presented increased frequencies of MZ-like B-cells with an activated and precursor profile. This is likely related to the over-expression of BLyS found in HIV-infected CSWs, which favors expansion and activation of innate B-cell populations, which are likely to support over-representation of polyreactive at the expense of high affinity HIV-specific eradicated antibody (Ab) responses. Altogether, our findings in HESN female CSWs suggest that natural immunity to HIV does not lead to increase in B-cell populations presenting an immature and/or innate “activated” possibly “pre-exhausted” phenotype but may involve other populations such as mature MZ-like and their recruitment to peripheral sites.

The B-cell phenotype we describe in the blood of HIV-uninfected CSWs likely reflects an active but regulated immune response against HIV, and is reminiscent of that we reported for EC<sup>16,17</sup>. Whereby, upregulation of BLyS seems required, but regulated as to prevent deleterious effects. The fact that we find decreased frequencies of monocytes and mDCs in the blood of both HIV-uninfected and HIV-infected CSW groups would be consistent with recruitment of these populations to peripheral sites in battling against HIV<sup>18,36</sup>. Furthermore, we find that an increased percentage of monocytes and mDC express BLyS in the blood of HIV-uninfected CSWs. In a murine HIV-transgenic model, we reported that mDCs accumulated in enlarged MZ areas<sup>37,38</sup>, likely promoting expansion of the MZ B-cell pool through cellular interactions<sup>39,40</sup>. DC surface expression may be more efficient in targeting and delivering BLyS signals to populations such as MZ-like B-cells, which express BLyS receptor TACI especially permissive to the action of BLyS in its 60 mer soluble or membrane-bound form<sup>41</sup>. In fact, MZ B-cells have been shown to express the short isoform of TACI, which activation leads to rapid differentiation into plasma cells<sup>42</sup>. We believe a regulated scheme of DC/BLyS/innate B-cell interactions could be involved in natural immunity against HIV.

As such, the recent characterization of transient Gp41-specific IgA in mucosal genital fluids from patients within the first weeks after HIV transmission, suggest these Abs might have originated from first-line B-cell populations<sup>43</sup>. Of note, BLyS was elevated immediately preceding the appearance of these Abs. Interestingly, repeated treatment of mice with BLyS increased the MZ compartment, and generated an increased response to Env immunization and bNAbs from these animals<sup>44</sup>. Understanding the dynamics of BLyS and its role in homeostasis of immune responsiveness appears pivotal to the design of vaccine strategies soliciting protective B-cell responses. Based on our observations, the capacity to contain BLyS expression levels seems concomitant with natural immunity against HIV, whereas excessive BLyS may promote immune dysregulation and disease progression<sup>45</sup>. However, because of the cross-sectional design and small number of samples analyzed herein, the present study cannot address whether low levels of blood BLyS and MZ-like B-cells have a protective role against HIV infection. Nevertheless the

findings reported herein are in line with growing evidence suggesting that first-line B-cell responses are involved in the battle against HIV<sup>46</sup>, and with the importance of MZ type B-cells in health and disease<sup>47</sup>.

## **METHODS**

### **Subjects**

Female CSWs were recruited through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin. Non-CSW HIV negative community control subjects at low risk for exposure were enrolled from a separate general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women under 18 years old, pregnant or menstruating were excluded from the study. Recruited women were asked to answer a questionnaire about their age, duration of prostitution (if applicable), number of clients per week (if applicable), sexual behavior, vaginal douching practices, and use of condom or hormonal contraceptive. Subjects underwent vaginal examination by a physician and vaginal specimens were used for diagnosis of candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis by microscopic examination and Herpes simplex virus (HSV) infection by polymerase chain reaction (PCR). Endocervical swabs were obtained for the detection of *Neisseria gonorrhoea* and *Chlamydia trachomatis* (BD ProbeTec Et system). Blood samples were collected and tested for HIV status, diagnosis of syphilis and progesterone levels. Subjects with fever, visible vaginal inflammation and infection other than HIV were excluded from the study. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV-1 specific IgG tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV seronegative, whereas reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II (non-reactive)) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). For the present study we selected samples from 10 HIV-1-uninfected and 10 treatment-

naïve HIV-1-infected CSWs, and 21 HIV-1-uninfected non-CSW control subjects from the general population. CD4<sup>+</sup> blood T-cell counts and HIV plasma viral loads are provided for HIV-infected CSWs in Supplementary Fig. S2. None of these women were injecting drug users. The three study groups were all in the follicular phase of their menstrual cycle, not taking oral contraception, had no co-infections, bacterial vaginosis, trichomoniasis or candidiasis.

### **Ethics statement**

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. The investigation and methods reported in this paper were approved and carried out in accordance with guidelines and regulations by the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou and the CHUM Research Ethics Committee.

### **Sample collection and preparation**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by centrifugation on Ficoll gradients, washed and suspended in freezing medium (90% heat inactivated fetal bovine serum (hi-FBS), 10% DMSO) and kept in liquid nitrogen until use. Plasma and serum were kept frozen at -80°C until use.

### **Determination of blood LPS, LBP, sCD14 and soluble BLyS concentration**

Serum levels of lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide binding protein (LBP) and soluble CD14 (sCD14) were measured respectively with commercial Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits by CUSABIO (Wuhan, China), Hycult Biotech (Plymouth Meeting, USA), and R&D systems (Minneapolis, USA) according to manufacturer's protocol. Serum levels of BLyS were determined by a commercial ELISA kits by R&D systems (Minneapolis, USA).

### **Determination of blood immunoglobulin and isotypes concentration**

Levels of total immunoglobulin and isotypes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA were measured in serum using the multiplex bead assay Milliplex Map Kit with human



immunoglobulin isotyping Magnetic Bead panel by EMD Millipore (Billerica, USA) according to manufacturer's protocol. Analysis was performed on a Luminex 200 System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

### **Evaluation of B<sub>LYS</sub> cell surface expression on T-cells, monocytes and mDC by flow cytometry**

PBMCs were thawed and washed with RPMI 1640 followed by 1X PBS. A maximum of  $10^6$  PBMCs per sample were used for staining. Live/Dead cell exclusion was performed using AQUA Live/Dead Fixable stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, USA). Non-specific binding sites were blocked using a Fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1X PBS, 2% hi-FBS and 0,1 % sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10ug mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) per  $10^6$  cells. PBMCs were stained using the following fluorochrome conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: AlexaFluor 700-A anti-CD16, APC anti-CD11c, FITC anti-CD3, PE-Cy7 anti-HLA-DR, and PerCP-Cy5.5 anti-CD14 (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), PE anti-B<sub>LYS</sub> (eBioscience, San Jose, CA, USA). PBMCs were fixed with 1.25% paraformaldehyde and kept at 4°C for a minimum of 12 hours before flow cytometry analysis. A minimum of  $10^5$  events per sample were acquired with an LSRFortessa (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). Flow-cytometry data analysis quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S3.

### **Evaluation of blood B-cell populations by flow cytometry**

PBMCs processing, staining and analysis were performed as mentioned above. PBMCs were stained using the following fluorochrome conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies: APC-Cy7 anti-CD10, Pacific Blue anti-CD19 (BioLegend, San Diego, CA, USA), Alexa Fluor700 anti-CD27, FITC anti-IgM, PE anti-CD21, BV650-anti-CD19, APC-H7-anti-IgG, BV605-anti-IgM ( BD-Biosciences, San Jose, CA, USA), APC-anti-CD3, APC-anti-CD56, PE-Cy7-anti-CD20, PE-anti-CD38, PerCP efluor710 anti-CD1c

(eBioscience, San Jose, CA, USA), and FITC-anti-IgA (EMD Millipore, Temecula, CA, USA). Flow-cytometry data analysis quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S4 and S5.

Data from HIV-uninfected CSWs were compared separately from those of HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs. The statistical significance of difference between groups was determined by Fisher's exact test for categorical variables and unpaired Student's T-test or one-way ANOVA analysis for variance when continuous variables were normally distributed or by Mann-Whitney U test otherwise. The D'Agostino-Pearson normality test was used to determine whether the values were sampled from a Gaussian distribution. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## **Acknowledgments**

We are indebted to N. Geraldo, A. Gabin, and C. Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M. Massinga-Loembe, G. Ahotin, L.Djossou, and E. Goma for their technical assistance and to G. Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We thank Dr M. Bourbonnière from eBioscience and Dr D. Gauchat from the flow cytometry core facility of the CRCHUM for their assistance and expertise. We are thankful to K. Beauchemin and V. Thibodeau for their help in managing the Benin-Montreal specimen importation. We are thankful to C. Charbonneau for his bio-imaging assistance.

## **Authors' Contributions**

CSP performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. LF and JCC helped with data management, ACL, MA and FG were responsible for the participants' recruitment and provided clinical and laboratory data. JP and MR designed the experiments, analyzed the data and wrote the article.

## **Conflict of interest declaration**

The authors declare no conflict of interest.

## **Funding**

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119406) and the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses, Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

## References

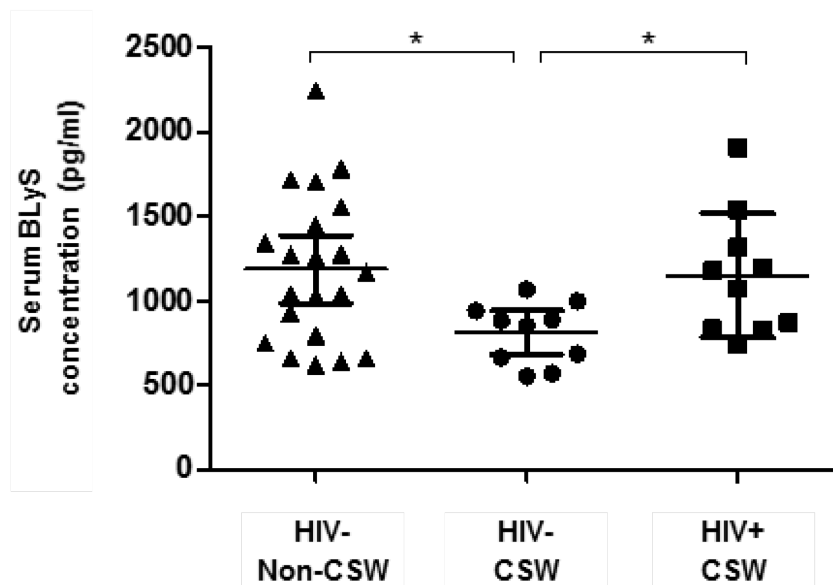
1. [http://www.unaids.org/globalreport/Global\\_report.htm](http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm).
2. Schellenberg, J. J. & Plummer, F. A. The Microbiological Context of HIV Resistance: Vaginal Microbiota and Mucosal Inflammation at the Viral Point of Entry. *Int. J. Inflam.* **2012**, 131243 (2012).
3. Poudrier, J., Thibodeau, V. & Roger, M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 875821 (2012).
4. Bélec, L. *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.* **184**, 1412–22 (2001).
5. Hocini, H. & Bomsel, M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* **179 Suppl**, S448–53 (1999).
6. McMichael, A. J. & Rowland-Jones, S. L. Cellular immune responses to HIV. *Nature* **410**, 980–7 (2001).
7. McKinnon, L. R. *et al.* Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J. Immunol.* **187**, 6032–42 (2011).
8. Kaul, R. *et al.* HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* **13**, 23–9 (1999).
9. Fowke, K. R. *et al.* HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 586–95 (2000).
10. Kaul, R. *et al.* HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Immunol.* **164**, 1602–11 (2000).
11. Alimonti, J. B. *et al.* CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J. Infect. Dis.* **191**, 20–4 (2005).
12. Card, C. M. *et al.* Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* **199**, 1318–22 (2009).
13. Lajoie, J. *et al.* Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol.* **1**, 309–16 (2008).
14. Gaudet, R. G., Breden, F., Plummer, F. & Berry, J. D. Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: Unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV-1 resistant individual. *MAbs* **3**, 181–91 (2011).
15. Poudrier, J., Chagnon-Choquet, J. & Roger, M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 592187 (2012).
16. Fontaine, J., Chagnon-Choquet, J., Valcke, H. S., Poudrier, J. & Roger, M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLyS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood* **117**, 145–155 (2011).
17. Chagnon-Choquet, J., Fontaine, J., Poudrier, J. & Roger, M. IL-10 and lymphotoxin- $\alpha$  expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS One* **9**, e101949 (2014).
18. Fontaine, J. *et al.* HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J. Infect. Dis.* **199**, 1007–1018 (2009).
19. Chagnon-Choquet, J. *et al.* HIV Nef Promotes Expression of B-Lymphocyte Stimulator by

- Blood Dendritic Cells During HIV Infection in Humans. *J. Infect. Dis.* (2014). doi:10.1093/infdis/jiu611
20. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. **116**, 5–7 (2014).
  21. Fromm, P. D. *et al.* A multi-laboratory comparison of blood dendritic cell populations. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, 1–9 (2016).
  22. Borhis, G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells and myeloid cells differently contribute to B-cell-activating factor belonging to the tumor necrosis factor superfamily overexpression during primary HIV infection. *AIDS* **30**, 365–76 (2016).
  23. Wada, N. I. *et al.* The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *AIDS* **29**, 463–471 (2015).
  24. He, B. *et al.* HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J. Immunol.* **176**, 3931–41 (2006).
  25. Gomez, A. M., Ouellet, M. & Tremblay, M. J. HIV-1-triggered release of type I IFN by plasmacytoid dendritic cells induces BAFF production in monocytes. *J. Immunol.* **194**, 2300–8 (2015).
  26. Sjöstrand, M. *et al.* The Expression of BAFF Is Controlled by IRF Transcription Factors. *J. Immunol.* **196**, 91–6 (2016).
  27. Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G. & Berek, C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J. Immunol.* **179**, 5947–5957 (2007).
  28. The World Factbook. 2013–2014. <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/index.html>.
  29. Puga, I. *et al.* B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**, 170–80 (2012).
  30. Moir, S. & Fauci, A. S. B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 235–45 (2009).
  31. Moir, S. & Fauci, A. S. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol. Rev.* **254**, 207–24 (2013).
  32. Buckner, C. M. *et al.* Characterization of plasmablasts in the blood of HIV-infected viremic individuals: evidence for nonspecific immune activation. *J. Virol.* **87**, 5800–11 (2013).
  33. Qiao, X. *et al.* Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells. *Nat. Immunol.* **7**, 302–10 (2006).
  34. Xu, W. *et al.* HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat. Immunol.* **10**, 1008–17 (2009).
  35. Gauvin, J., Chagnon-Choquet, J., Poudrier, J. & Roger, M. Fluctuations in Blood Marginal Zone B-cell Frequencies may Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status. *PloS one* doi:10.1371/journal.pone.0155868 (2016).
  36. Fontaine, J., Poudrier, J. & Roger, M. Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **27**, 655–657 (2011).
  37. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D. G., Hanna, Z. & Jolicoeur, P. The AIDS-Like Disease of CD4C/Human Immunodeficiency Virus Transgenic Mice Is Associated with Accumulation of Immature CD11b<sup>Hi</sup> Dendritic Cells. *J. Virol.* **77**, 11733–11744 (2003).
  38. Poudrier, J. *et al.* The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN- $\gamma$  and IL-6. *Immunity* **15**, 173–85 (2001).

39. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 15–27 (2009).
40. MacPherson, G., Kushnir, N. & Wykes, M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol. Rev.* **172**, 325–34 (1999).
41. Mackay, F. & Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 491–502 (2009).
42. Garcia-Carmona, Y. *et al.* Differential induction of plasma cells by isoforms of human TACI. *Blood* **125**, 1749–58 (2015).
43. Yates, N. L. *et al.* HIV-1 gp41 envelope IgA is frequently elicited after transmission but has an initial short response half-life. *Mucosal Immunol.* **6**, 692–703 (2013).
44. Pujanauski, L., Janoff, E., McCarter, M., Pelanda, R. & Torres, R. Mouse marginal zone B cells harbor specificities similar to human broadly neutralizing HIV antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **110**, 1422–1427 (2013).
45. Poudrier, J. & Roger, M. Dendritic cell status modulates the outcome of HIV-related B cell disease progression. *PLoS Pathog.* **7**, e1002154 (2011).
46. Borrow, P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 353–63 (2011).
47. Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 118–32 (2013).

**Figure 1. Concentration of BLyS in the serum of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Serum BLyS concentrations (pg/ml) as mean  $\pm$ SEM were compared with unpaired T test for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*( $p < 0.05$ ). The mean BLyS serum level of the 10 non-CSWS used for the phenotype assays was 1152 pg/ml, which is similar to the mean of the whole non-CSW group (1186 pg/ml) shown here.

**Figure 1.**

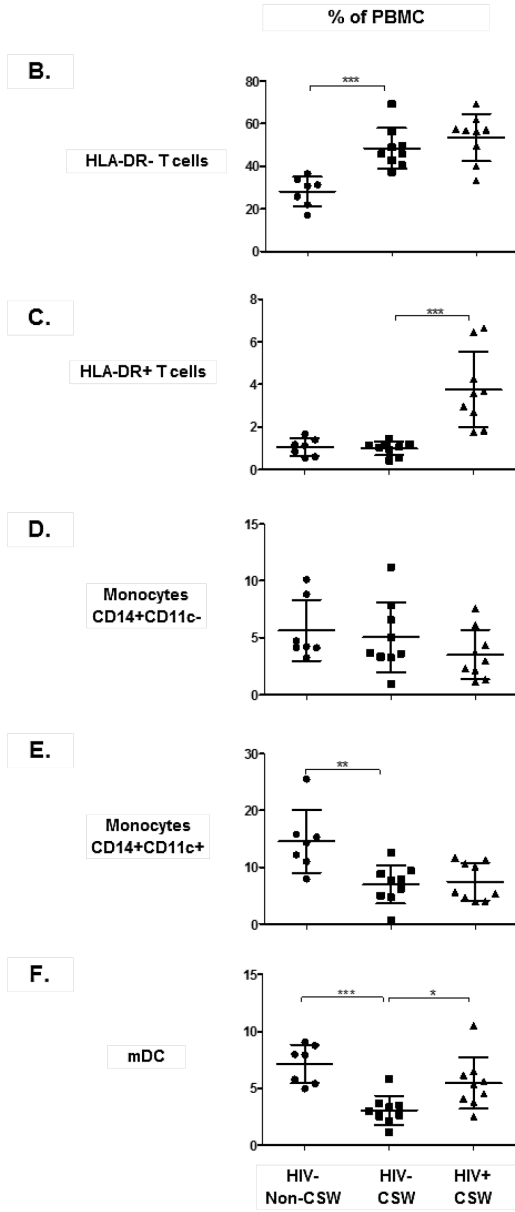
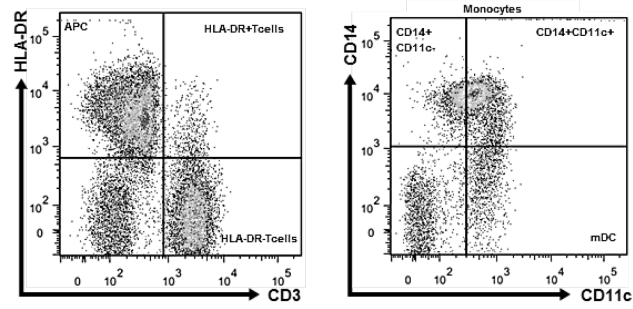


**Figure 2. Frequencies of T-cells, monocytes, and myeloid DC (mDC) in the blood of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Analysis by flow-cytometry was performed as follows: A) Cells were gated on live PBMCs and then on HLA-DR<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>-</sup> T-cells), HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup> T-cells) and HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (APCs). APCs were further characterized as CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> and CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes, and total CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells, which comprise a majority of myeloid DC (mDC). Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Frequencies (%) of B) HLA-DR<sup>-</sup> T-cells, C) HLA-DR<sup>+</sup> T-cells cells, D) CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> monocytes, E)CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes, and F) mDC are relative to live PBMCs. The mean events gated for these populations are in the range of: CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> monocytes (1490 ± 625), CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes (9892 ± 962), total mDC (CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) (1004 ± 300). Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S3. Cell population percentages were compared with the Mann-Whitney U tests for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).



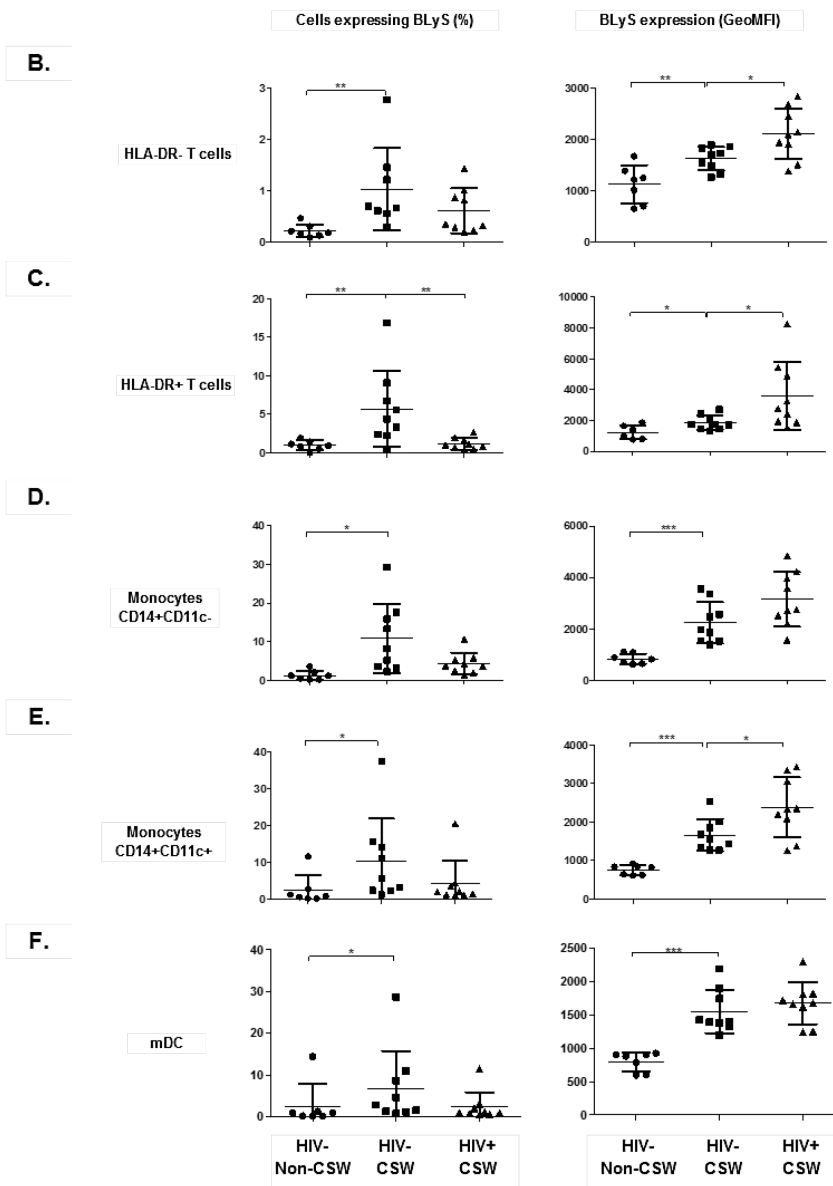
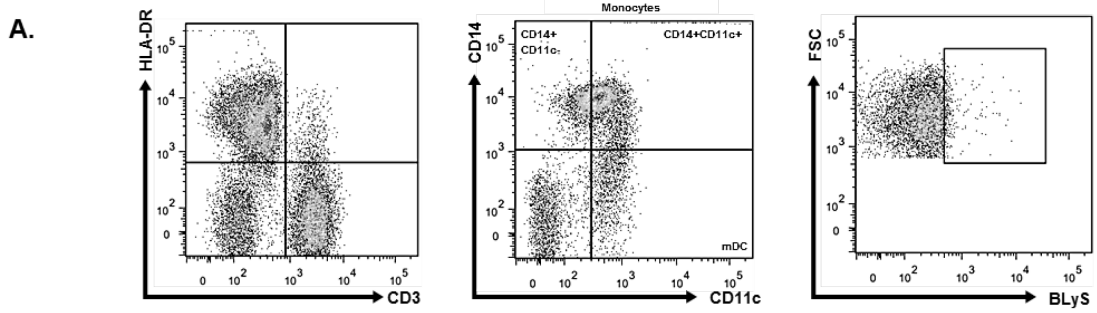
Figure 2

A.



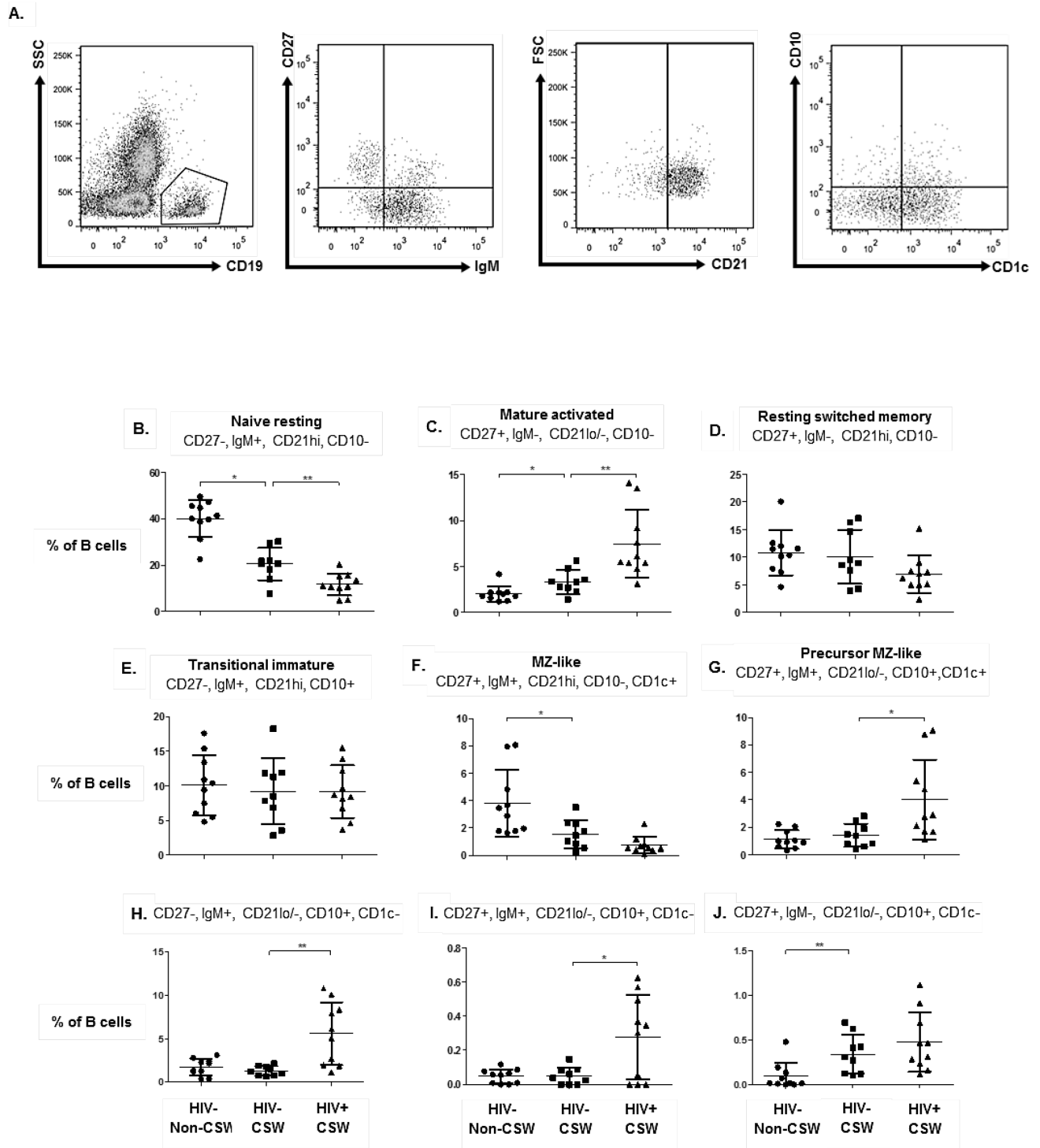
**Figure 3. BLyS surface expression levels by T-cells, monocytes, and myeloid DC (mDC) in the blood of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Analysis by flow-cytometry was performed as follows: A) Cells were gated on live PBMCs and then on HLA-DR<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>-</sup> T-cells), HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup> T-cells) and HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (APC). APCs were further characterized as CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> and CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes, and mDC (CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>). Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Percentages (%) of cells expressing BLyS (left panels) and Geometric mean fluorescence intensity (GeoMFI) of membrane BLyS expression levels (right panels) are relative to each following population: B) HLA-DR<sup>-</sup> T-cells, C) HLA-DR<sup>+</sup> T-cells cells, D) CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> monocytes, E) CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes, and F) CD14<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> cells (mostly mDC). Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S3. Percentages of cells expressing BLyS and levels of BLyS expression (GeoMFI) were compared with the Mann-Whitney U tests for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

Figure 3



**Figure 4. B-cell populations in the blood of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Analysis by flow-cytometry was performed as follows: A) Cells were gated on live PBMCs and then on total B-cells (CD19<sup>+</sup>). Total CD19<sup>+</sup> B-cells were selected based on expression of CD27 and/or IgM, and then on their expression levels of CD21. CD1c and CD10 expression were used for further characterization of blood marginal zone (2) and transitional immature (TI) B-cell populations. Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. Naïve resting B-cells were defined as CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD1c<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>, Mature activated B-cells were defined as CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD21<sup>lo</sup>CD1c<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>, resting switched memory B-cells were CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD21<sup>hi</sup>CD1c<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>, transitional immature (TI) B-cells were CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD1c<sup>-</sup>CD10<sup>+</sup>, mature MZ-like B-cells were CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD1c<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>, precursor marginal-zone (2)-like B-cells were CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>CD1c<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>. The Frequencies (%) of B) naïve resting, C) mature activated, D) resting switched memory, E) TI, F) mature MZ-like, G) precursor MZ-like, H) (CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>CD10<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>), I) (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD21<sup>lo</sup>CD10<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>), and J) (CD27<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD21<sup>lo</sup>CD10<sup>+</sup>CD1c<sup>-</sup>). B-cell populations and/or differentiation stages are relative to total B-cells. The mean events gated for these populations are in the range of: total B-cells (9320 ± 1750), naïve (3728 ± 1045), mature activated (360 ± 67), resting switched memory (632 ± 301), TI (944 ± 174), mature MZ-like (327 ± 233), precursor MZ-like (145 ± 36). Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S4. B-cell population percentages were compared with the Mann-Whitney U tests for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*(p<0.05), \*\*(p<0.01).

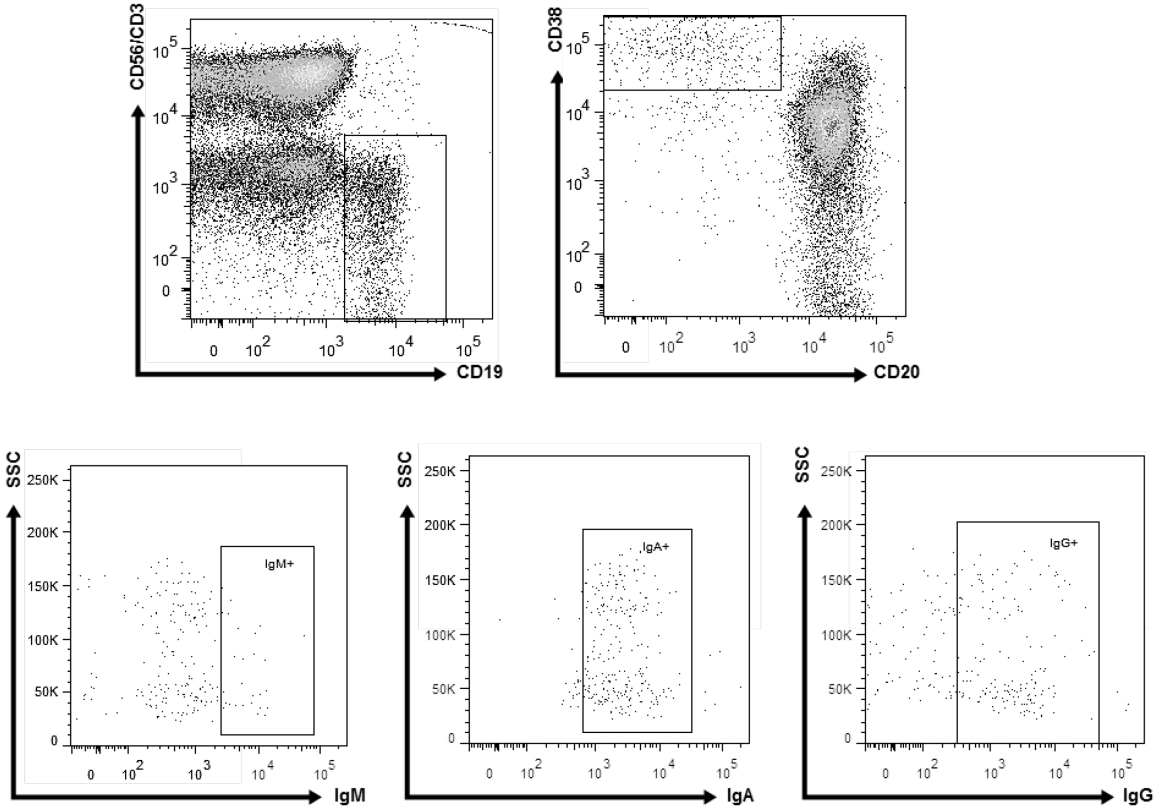
**Figure 4**



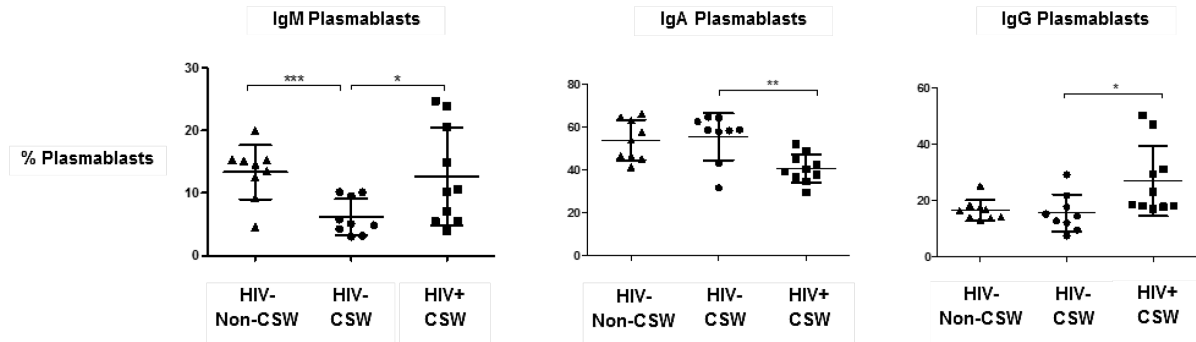
**Figure 5. Plasmablasts frequencies in the blood of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Analysis by flow-cytometry was performed as follows: A) Cells were gated on live PBMCs and then on total B-cells (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>). Plasmablasts were gated on CD20<sup>-</sup>CD38<sup>++</sup> B-cells and further characterized as IgM<sup>+</sup>, IgA<sup>+</sup> or IgG<sup>+</sup>. Quadrants were set based on the expression values obtained with fluorescence minus one (FMO) and isotype controls. B) The frequencies (%) of IgM<sup>+</sup> (left panel), IgA<sup>+</sup> (middle panel) and IgG<sup>+</sup> (right panel) plasmablasts are relative to total plasmablasts. The mean events gated for these populations are in the range of: CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD38<sup>++</sup> total plasmablasts (238 ± 112), IgM<sup>+</sup> (25 ± 10), IgA<sup>+</sup> (120 ± 50), IgG<sup>+</sup> (45 ± 30). Representative FMO staining controls can be viewed in Supplementary Fig. S5. Plasmablast percentages were compared with the Mann-Whitney U tests for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), \*\*\*(p<0.001).

Figure 5

A.

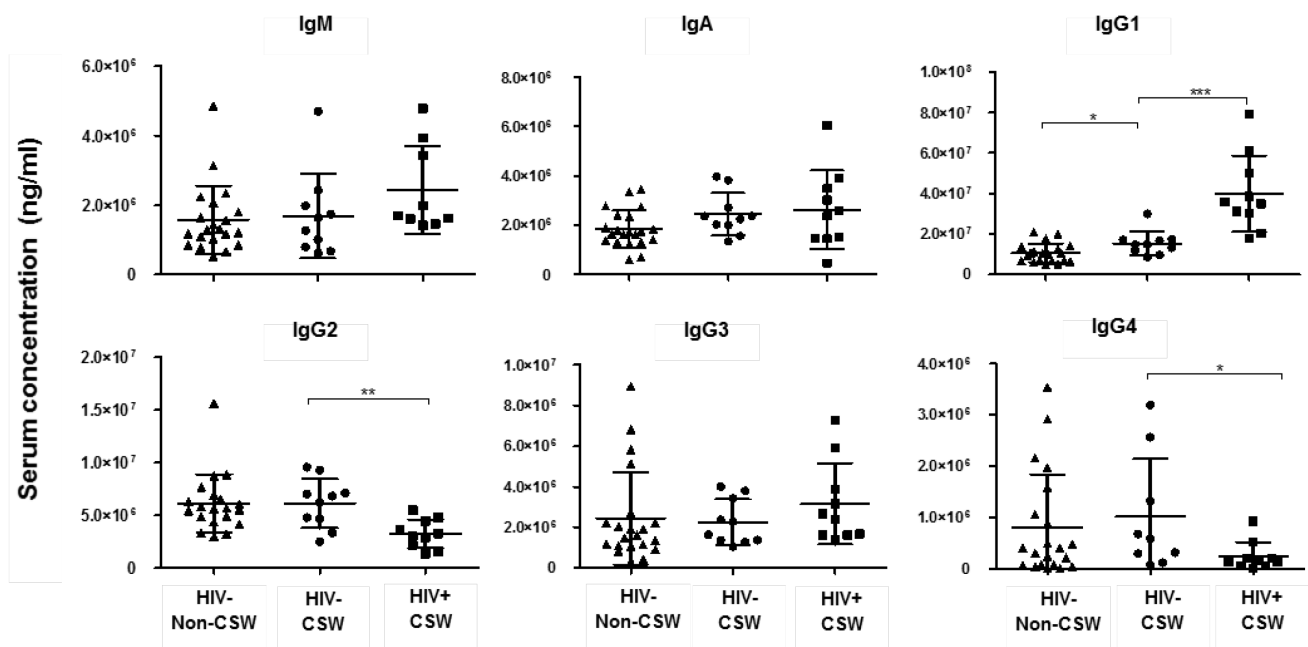


B.



**Figure 6. Immunoglobulin isotype concentrations in the blood of HIV-uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-uninfected CSWs and HIV-infected CSWs.** Serum immunoglobulin isotype concentrations (ng/ml) as mean  $\pm$  SEM were compared with unpaired T tests for pair-wise comparisons between HIV-uninfected CSWs and the two other groups. Significance levels are shown as \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

**Figure 6**





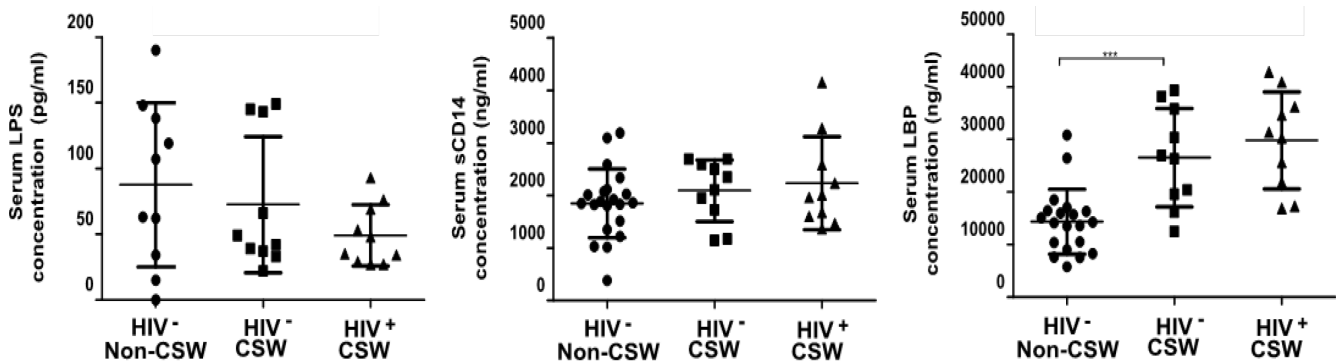
**Table 1** Distribution of demographic and sexual behavior characteristics in HIV uninfected non-CSW control subjects, HIV-uninfected and HIV-infected CSWs.

	HIV- uninfected non-CSWs	HIV- uninfected CSWs	HIV- infected CSWs	p-value <sup>a</sup>
	N=21	N=10	N=10	
Age, mean (SD), years	37.6 (9.5)	41.4 (8.3)	43.1 (10.1)	NS
Duration of sex work , mean (SD), years	NA	5.6 (1.4)	5.4 (3.3)	NS
Number of client past week, mean (SD)	NA	17.6 (14.9)	19.6 (14.3)	NS
Condom always used with clients past week	NA	8/10 (80%)	3/10 (30%)	NS
Vaginal douching	21/21 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	NS

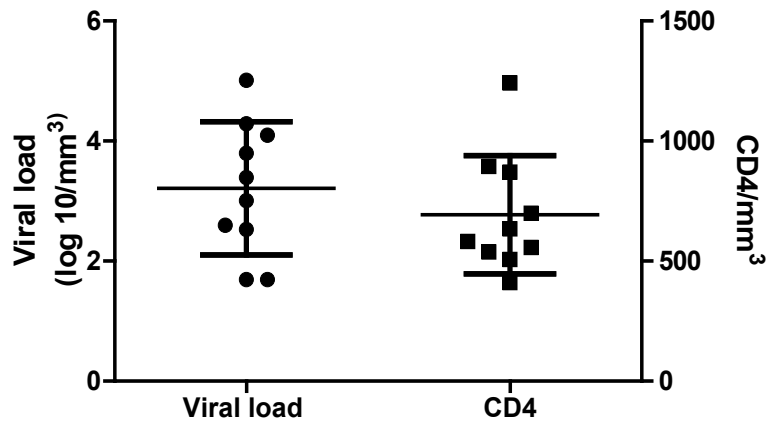
CSW, commercial sex workers; HIV, human immunodeficiency virus; N, number of participants; NA, non-applicable; NS, non-significant; SD, standard deviation.

<sup>a</sup> p-value for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA analysis for variance of the age; Mann-Whitney U test for the duration of sex work and number of clients; Fisher's exact test for condom use and vaginal douching.

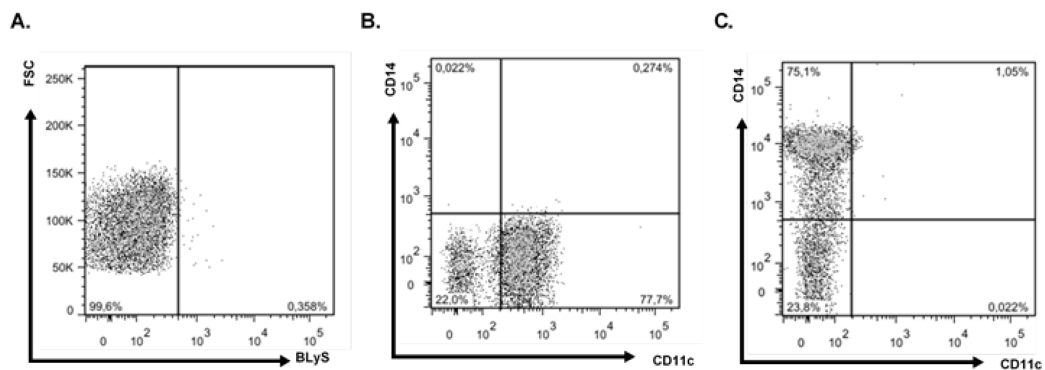
**Supplementary Figure S1. Concentration of lipopolysaccharide (LPS), lipopolysaccharide binding protein (LBP) and soluble CD14 (CD14s) in the blood of HIV-1 uninfected non-commercial sex workers (CSWs), HIV-1 uninfected CSWs and HIV-1 infected CSWs** Serum concentrations as mean  $\pm$  SEM (pg/ml), (ng/ml) and (ng/ml) respectively, were compared with unpaired T test. Significance levels are shown as \*\*\*( $p < 0.001$ ).



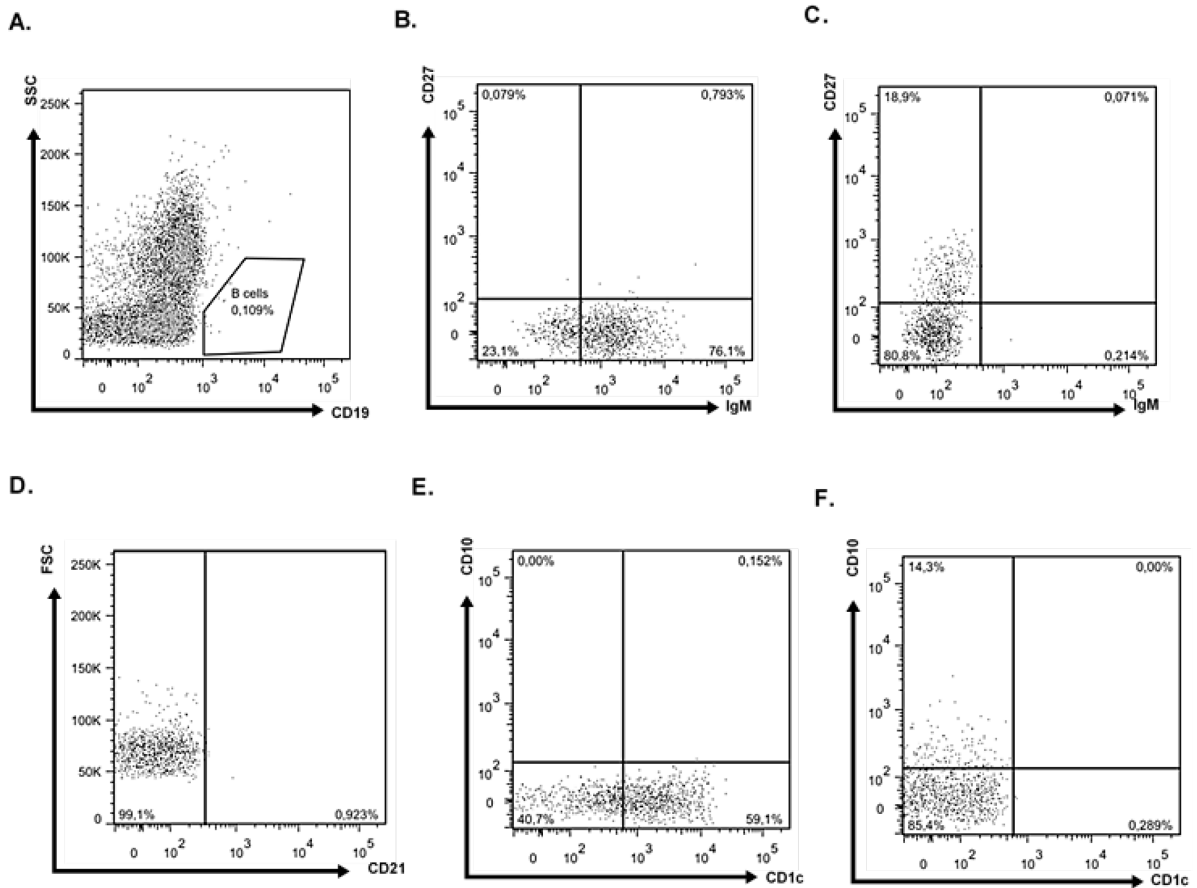
**Supplementary Figure S2. Plasma viral loads and blood CD4+ T-cell counts of HIV-infected commercial sex workers (CSWs).** CD4+ T cell counts (cell/mm<sup>3</sup>) and viral loads (log<sup>10</sup> copies/ml) as mean ± SEM.



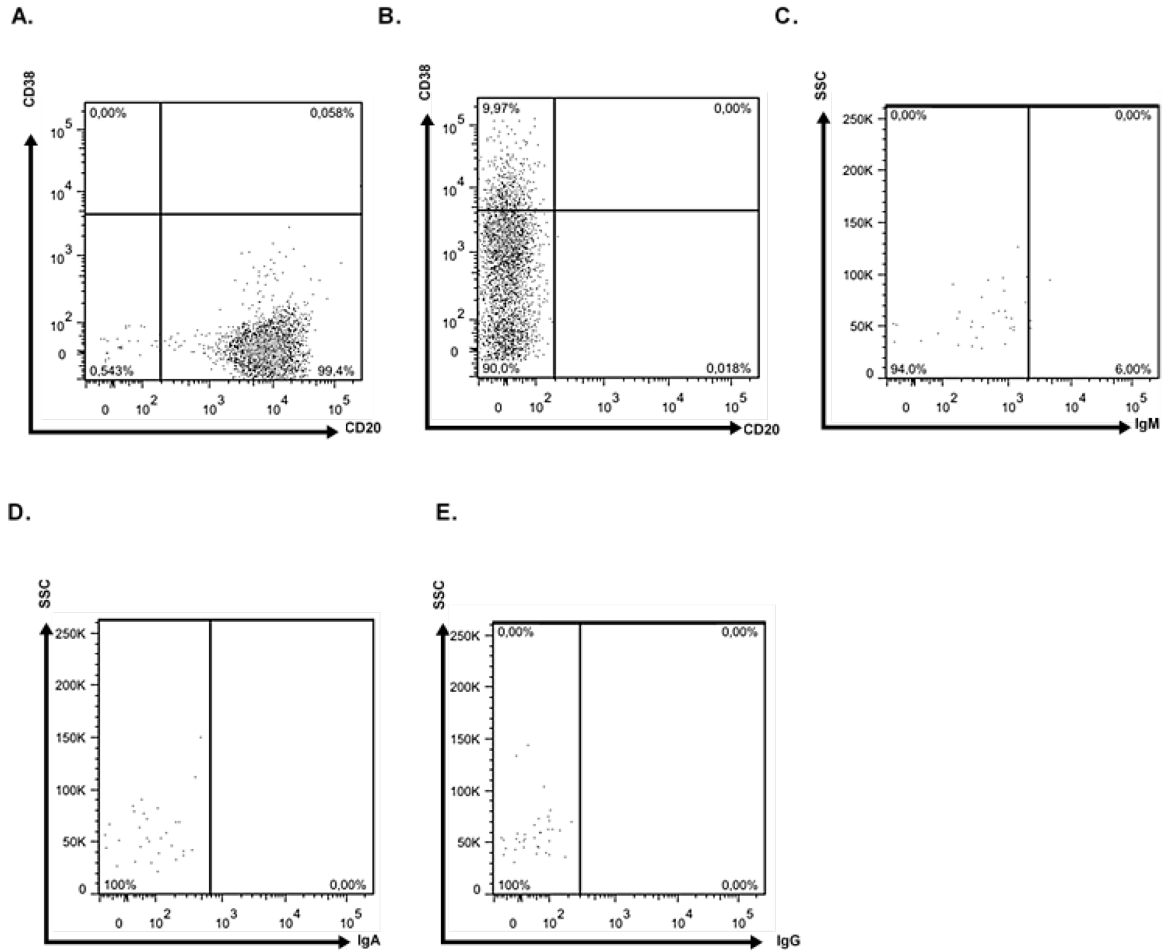
**Supplementary Figure S3. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figures 2 and 3.** FMO of BLyS (A), FMO of CD14 vs CD11c positive staining (B), and FMO of CD11c vs CD14 positive staining (C) on gated live HLA-DR+CD3- APCs.



**Supplementary Figure S4. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figure 4.** FMO of CD19 on live gate (A), FMO of CD27 vs IgM positive staining (B), FMO of IgM vs CD27 positive staining (C), and FMO of CD21 (D) on gated live CD19+ B-cells. FMO of CD10 vs CD1c positive staining (E), and FMO of CD1c vs CD10 positive staining (F) on gated live CD27+IgM+ B-cells.



**Supplementary Figure S5. Representative fluorescence minus one (FMO) staining controls for Figure 5.** FMO of CD38 vs CD20 positive staining (A), and FMO of CD20 vs CD38 positive staining (B) on live gated B-cells. FMO of IgM (C), FMO of IgA (D), FMO of IgG on gated live CD38<sup>++</sup>CD20<sup>-</sup> plasmablasts.



## ANNEXE 2 : Revue

### Natural Immunity to HIV: a template for vaccine strategies

Contribution détaillée des auteurs :

 **Rédaction de l'article :**

Lyvia Fourcade, Johanne Poudrier et Michel Roger.

Viruses **2018**, 10, 215; doi:10.3390/v10040215

Lyvia Fourcade<sup>a,b</sup>, Johanne Poudrier<sup>a,b,\*</sup>, Michel Roger<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada, <sup>b</sup>Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montréal, Canada

\*co-seniorship

Word count in text: 4008

Word count in abstract: 250

Short Title: Natural Immunity to HIV

Number of figures 1

Reference count: 95

Address correspondence to: Johanne Poudrier (johanne.poudrier@crchum.qc.ca); Michel Roger (michel.roger@ssss.gouv.qc.ca).

## **Abstract**

Africa accounts for the majority of global human immunodeficiency virus [1] infections, most of which affect women through heterosexual intercourse. Currently, there is no cure for HIV and the development of vaccines and microbicides remains the best solution to eradicate the pandemic. We and others have identified HIV highly-exposed seronegative (HESN) individuals amongst African female commercial sex workers (CSWs). Analyses of genital samples from HESNs have demonstrated potent innate and anti-inflammatory conditions, HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells as well as immunoglobulins (Igs), and increased regulatory cell populations, all of which support a delicate balance between strength and control against HIV intrusion. Moreover, we have recently shown that frequencies of innate marginal zone [2] B-cells are decreased in the blood of HESNs when compared to HIV-uninfected non-CSW women, suggesting their recruitment to peripheral sites. This coincides with the fact that levels of B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF), known to shape the MZ pool and which overexpression leads to MZ deregulation in HIV-infected progressors, are significantly lower in the blood of HESNs when compared to both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSW women. Interestingly, MZ B-cells can bind HIV gp120 and produce specific IgG and IgA, and have a propensity for B regulatory potential, which could help both the fight against HIV and maintenance of low inflammatory conditions in HESNs. HESN individuals provide an exceptional opportunity to determine important clues for the development of protective devices, and efforts should aim at soliciting immune responses observed in the context of their natural immunity to HIV.

Key Words: HIV, HESN, Natural Immunity, Regulatory Dendritic and T-cells, BLyS/BAFF, Innate Marginal Zone B-cells

## **Introduction**

Worldwide, it is estimated that nearly 36.7 million people live with human immunodeficiency virus [1]. In 2016, around 1.8 million became newly infected and 1 million died from AIDS. Africa accounts for 69% of global infections, most of which affect women through heterosexual intercourse [3]. Currently, there is no cure for HIV and the development of preventive strategies such as vaccines and microbicides remains the best solution to eradicate the pandemic. To date, the transmission mechanisms of the virus and immune responsiveness at the initial site of infection are not fully understood. Frequent mucosal exposure to HIV in the absence of infection was documented in different cohorts, including the Beninese commercial sex workers (CSWs) [4]. As such, individuals highly exposed to HIV and persistently seronegative (HESN) have been shown to possess low-inflammatory conditions and immune responsiveness towards the virus [4-6], which suggest that the capacity to maintain a low-key inflammatory profile along with anti-HIV responses is associated with protection against HIV infection. We believe that efforts to develop effective devices should aim at mimicking conditions and soliciting immune responses observed in the context of natural immunity to HIV.

## **Immunology of the female genital tract**

The female genital tract (FGT) is part of the major mucosal associated lymphoid tissue (MALT) [7]. The FGT constitutes a main portal of entry for many infections and plays a role in protecting the host against pathogens while maintaining a tolerance to a commensal flora [7, 8]. FGT immunity is tightly regulated by a hormonal/inflammatory process throughout the menstrual cycle, having to deal with the pressure of procreation and microbial control [9, 10]. FGT is subdivided into 2 regions presenting distinct phenotypic profiles. The upper FGT consists of the sterile endometrium, fallopian tubes and the endocervix in which sterility may be temporally related to the menstrual cycle phase. In contrast, the lower FGT, which is composed of the non-sterile vagina and ectocervix is colonized by a commensal microflora [10]. FGT immunity involves genital epithelial cells as well as dendritic cells (DCs), Langerhans cells (LC), macrophages, natural killer (NK) cells, neutrophils and lymphoid cells, which confer protection through the production of



antimicrobial agents, antibodies, chemokines and cytokines [7]. Wira and colleagues have shown that the upper FGT contains unique lymphoid aggregates constituted of CD8<sup>+</sup> T cells that surround a central B-cell core, which are encapsulated by macrophages [9]. Even if mechanisms of immune induction in the FGT remain poorly understood [4, 8, 9], the FGT is provided with an array of protective mechanisms from the innate and adaptive arms of the immune system to maintain a delicate balance between protection and tolerance [11]. Together with epithelial cells, DCs are one of the earliest cell types to sense the virus through pattern recognition receptors (PRRs), such as toll-like receptors (TLRs), lectins and NOD-like receptors [4, 12, 13]. Cross-talk between epithelial cells and sub-mucosal DCs involve immunomodulatory cytokines and lead to activation of effector and regulatory cells in the lamina propria [4, 13]. It is well known that DCs are important for the generation of first-line innate as well as adaptive immune responses [13] during infection. Indeed, DCs are involved in the delivery of cognate and non-cognate molecular events as well as production of immunomodulatory molecules, such as cytokines and growth factors that can overall shape the outcome of T and B lymphocyte responses [13].

### **The female genital tract in the context of HIV**

The study of the FGT in CSWs is often complicated by numerous difficulties associated with ethics and sampling, and therefore studies are often guided by that observed in the gastro-intestinal lymphoid tissue (GALT) [14]. The FGT involves the mucous lining of a tight epithelial cell (EC) barrier, stratified at the vaginal and ectocervical levels [9]. Integrity of epithelial cells could be influenced by pro-inflammatory factors such as tumor necrosis factor (TNF) [15] but also by sustained Th17 cell activity [16] in the context of early HIV infection. This could affect tight junctions of mucosal epithelial cells, and could increase risks of microbial translocation and chronic infection [14], and also facilitate virus transcytosis across epithelial cells [15, 17, 18], particularly via the galactosylceramide (GalCer) receptor [19]. In fact, although HIV does not productively infect ECs [4], GalCer, a glycosphingolipid highly enriched at the luminal pole of epithelial cells, can bind both HIV glycoproteins gp120 and gp41 [20], and allows endocytosis by epithelial cells, which subsequently transfer the virus to DCs and target cells [4, 21, 22]. HIV has also been shown

to be internalized by FGT ECs via gp340, a scavenger receptor, subsequently promoting the production of pro-inflammatory thymic stromal lymphopoietin (TSLP) via TLR7 signaling, which then activates DCs and promotes HIV transmission to CD4<sup>+</sup> T cells [23]. Although DCs can be infected by HIV, mostly at an immature stage, they express potent restriction factors such as SAMHD1 [24] and do not constitute the main target for the virus and are rather involved in its transmission to CD4<sup>+</sup> T-cells [25]. Sub-mucosal DCs express high levels of C type lectins, such as DC-SIGN (CD209), which can bind gp120 [22, 26]. This allows internalization of the virus and transfer to CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> effector target T-cells, either locally or following migration to draining lymphoid organs [27].

Using macaque simian immunodeficiency virus (SIV) vaginal-infection models [28, 29], numerous infectious foci throughout the FTG were identified early after infection. It has been shown that CCR6<sup>+</sup> Th17 cells are the preferential targets of SIV following vaginal transmission [28, 29]. These Th17 targets express ROR $\gamma$ t, a transcriptional regulator required for their generation and differentiation [30, 31]. Th17 cells also express  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 another co-receptor for HIV [32]. Factors such as transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-21 and IL-23 are required for Th17 differentiation [30]. CCR6 is a major ligand for the chemokine macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ /CCL20), which is secreted by mucosal epithelial cells and is known to attract immature Langerhans cells and DCs [2, 33]. It has been shown that strong doses of SIV in the vaginal mucosa caused an increase of the chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCL20 [21] and recruitment of pDC, DCs and macrophages at the cervical epithelium [25]. Early blocking of MIP-3 $\alpha$  and pro-inflammatory cytokines prevented cellular recruitment, establishment of an inflammatory milieu, and infection despite repeated intravaginal exposure to high doses of SIV [18, 34]. CD4<sup>+</sup>T cells can also be recruited via MIP-1 $\alpha$ /CCL3 and MIP-1 $\beta$ /CCL4, and interferon (IFN)- $\alpha$  is an important promotor of their clonal expansion at the vaginal mucosa, and subsequently in the blood and secondary lymphoid organs [21]. Establishment of systematic infection eventually leads to a massive depletion of sub-mucosa CD4<sup>+</sup>T cells, in particular Th17 cells (CCR4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>), that is associated with an increased regulatory T cell (Treg) profile, leading to an imbalance in the ratio of T effector vs Treg cell populations [4, 16, 18, 25].

### **Natural immunity to HIV in the FGT of HESNs**

Numerous genetic variants have been associated with natural immunity to HIV-1 in HESN cohorts, several of which have been reviewed elsewhere [4]. Blood and genital mucosal factors that constitute a low-inflammatory “immune” profile have also been linked with protection in HESNs [4, 35, 36]. Indeed, it has been shown that high levels of anti-inflammatory and neutralizing proteins, such as anti-proteases are found in the genital mucosa of HESN CSWs [4, 6, 35]. HIV-Env reactive immunoglobulins (Igs) have also been documented in blood and FGT of HESNs, and will be discussed later in this review. Levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , as well as monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG) and IFN- $\gamma$  induced protein (IP)-10 chemokines have been reported to be lower in cervicovaginal lavages (CVLs) of HESNs when compared to HIV-infected CSWs [37, 38]. In fact, production of MIG and IP-10 is induced by expression of IFN- $\gamma$ , and polymorphisms in the IRF-1 regulating IFN- $\gamma$  were associated with protection to HIV-1 [39, 40]. In a Kenyan female CSW cohort, HIV-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses have been found in both the blood and genital tract of HIV-uninfected CSWs [41-44]. In these individuals a low activation T-cell profile corresponds with a greater ability to proliferate in response to HIV p24 peptides when compared to HIV-infected CSWs [45]. Moreover, these studies also described advantageous poly-functionality of effector T-cells in HESNs.

Interestingly, we have shown that Beninese HESN CSWs presented higher levels of IFN- $\alpha$  in their CVLs when compared to HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSWs [46], which could be critical to sustain immune homeostasis, antiviral activity and restriction factors such as SAMHD1, APOBEC3, or tetherin in cells at the portal of entry for the virus. Indeed, type I interferons are indispensable to protect the host against viruses [47], although in uncontrolled situations such as in the context of HIV-infection, type I IFNs promote inflammatory responses as well as recruitment of target cells [48]. Type I IFNs induce a myriad of IFN-stimulated genes (ISGs), which have been shown to interfere with multiple viruses at various life cycle stages [48]. Type I IFNs can be triggered via TLRs 3, 7, 8 and 9 [49], and ssRNA of HIV triggers TLR8 and TLR7 [17, 47]. Interestingly, genital epithelial and myeloid cell populations of Beninese HESN CSWs

expressed high levels of TLR7 [46]. IL-10, which is known to promote immunoregulatory responses was elevated in the CVLs of Beninese HESNs, but a lower than that observed in CVLs of HIV-infected CSWs [46]. IL-10 levels are often elevated in the context of HIV, unfortunately the overall outcome of excessive IL-10 may well be to sustain chronic activation and dysregulation associated with HIV disease progression, and may impede on the viral eradication [50-52]. A more modest elevation of IL-10, such as observed for HESN CSWs, may be beneficial and promote an immunoregulatory microenvironment preventing HIV attempts to establish infection by lowering availability of targets [53]. Therefore, IFN- $\alpha$  and IL-10 levels measured in the CVLs of Beninese HESN CSWs likely promote a potent antiviral and yet at the same time immunoregulatory profile.

### **Immunoregulatory cell populations in HESNs**

Studies of the genital immune profile in HESN CSWs suggest that natural immunity in the context of HIV-1 may be associated with the host's capacity to orchestrate dynamics of cellular populations to maintain low inflammatory conditions at the initial site of exposition. In this view, we recently reported that endocervical myeloid HLA-DR<sup>+</sup> cells from Beninese HESN CSWs expressed higher levels of IFN- $\alpha$ , TLR7, IL-10 and HLA-G than those from both HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs. Further characterization of these cells in HESNs revealed a CD103<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> "DC-like" population expressing high levels of IFN- $\alpha$  and IL-10 [46], which is reminiscent of the recently described tolerogenic profile of "DC-10" [54]. Interestingly, the majority of the myeloid CD11c<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells also expressed HLA-G and ILT-4 [46], as do DC-10 [54, 55]. Concomitantly, Beninese HESN CSWs had higher frequencies of endocervical regulatory CD4<sup>+</sup> T-cells (Tregs) when compared to those from the two other groups of women [46], which is consistent with that reported in the blood of Kenyan CSWs [56]. Moreover, we found an increased frequency of endocervical Tregs expressing programmed cell death protein (PD)-1<sup>+</sup>, as well as higher intensity of PD-1, IL-10 and CTLA expression for both Tregs and type 1 regulatory cells (Tr1) (CD49b<sup>+</sup> and LAG-3<sup>+</sup>) [57] in Beninese HESNs [46]. This could be reflective of their ongoing regulatory activity [58], which likely confers an advantage to these individuals.

Thus, to date, observations on HESNs suggest that natural immunity against HIV involves a capacity to induce/maintain strong innate and HIV-specific immune responses, and at the same time, regulatory populations such as “DC-10-like”, Treg and Tr1 to help control/maintain low inflammatory conditions at the initial site of exposure. Understanding how the potent antiviral but regulated inflammatory response observed in HESNs is achieved at the initial site of infection is crucial for the development of effective mucosal microbicides or vaccines.

### **The importance of HIV ENV reactive immunoglobulins: Lessons from vaccination trials**

Although the induction of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) is a main goal in vaccination [59], there is growing evidence suggesting that both neutralizing and non-neutralizing Abs can mediate some level of protection against HIV [60]. Analyses of correlates of protection from the RV144 vaccine trial suggested that increased blood derived IgG1 and IgG3-mediated Ab dependent cell cytotoxicity (ADCC) activity towards HIV ENV V1V2 region was linked with decreased HIV acquisition [61]. Genetic analyses demonstrated that RV144 vaccinees bearing HLA class II alleles such as DQB1\*06 presented increased risk of HIV-1 acquisition possibly associated with elevated ENV-specific IgA interfering with ADCC activity [60, 61]. However, non-neutralizing ENV-reactive IgA derived from blood memory B-cells of RV144 vaccinees who didn't bear susceptibility HLA alleles, blocked *in vitro* HIV-1 ENV binding to GalCer and mediated *in vitro* phagocytosis by monocytes expressing FcR $\alpha$  [60]. Raising the possibility that the RV144 regimen may have induced a certain level of non-neutralizing, protective IgA in some individuals [60]. Albeit, one of these ENV reactive IgA antibodies did not bind to the RV144 immunogen, and was possibly derived from a pre-existing B-cell pool, expanded by vaccination and possibly microbiota reactive [60], as it has been shown that some HIV ENV reactive Abs cross-react with microbiota [62].

Samples from mucosal ports of entry were not collected during the RV144 trial and the reactivity of mucosal immunoglobulins have not been assessed. The importance of mucosal immunoglobulins, in particular IgA, in fighting HIV has been highlighted by vaccination

and passive immunization studies [63]. At mucosal sites, IgA is produced in the lamina propria by local plasma cells, mainly as dimeric (dIgA) containing a joining J chain. It can translocate across epithelial cells to generate luminal secretory IgA (SIgA) via the polymeric Ig receptor (pIgR). Mucosal IgA can mediate protection by trapping, neutralizing and preventing transcytosis [63]. In 2011, the elegant study by the group of Morgan Bomsel had shown that vaccination of non-human primates with HIV gp41 virosomes induced mucosal IgA and IgG, which prevented systemic invasion following vaginal simian-HIV challenge, by blocking transcytosis and by mediating ADCC, respectively [64]. The fact that these animals lacked serum neutralizing antibody activity highlighted the importance of effector antibodies at the mucosal portal of entry [64]. More recently, passive immunization studies showed that rhesus macaques given anti-HIV-1 neutralizing monoclonal Ab (NmAb) HGN194 as mucosal dIgA2 together with systemic IgG1 with the same epitope specificity were completely protected against high-dose intra rectal SHIV-1157ipEL-p challenge [65, 66]. Furthermore, the dIgA1 version of the same mAb was significantly more protective compared to the dIgA2 version, highlighting the importance of characterizing different isotypes of IgA, as they differ predominantly in the hinge region and may confer varying effector functions [63]. The fact that these NmAb were poorly efficient when used alone implies that inducing mucosal IgA as first-line defense in conjunction with immunity against HIV at the systemic level is required to prevent virus acquisition [65, 66].

### **HIV ENV reactive immunoglobulins in HESNs**

Given the 31% HIV protection conferred by the RV144 vaccine regimen, we were inclined to screen sera and genital samples from the Benin CSW cohort for the presence of anti-HIV trimeric ENV IgG as well as for their potential to neutralize HIV-1 viral particles and/or mediate ADCC. Although anti-HIV ENV IgG, neutralizing or ADCC activities were detected in samples from HIV-infected CSWs, no such activities were observed in blood and CVLs from HESN CSWs [67]. Therefore suggesting that natural immunity may not be associated with the production of HIV-specific IgG mediating neutralizing or ADCC activities. We and others have detected ENV reactive IgA in HESN individuals, which may

help prevent HIV infection [38, 63]. Indeed, it has been shown that HESNs present HIV cross-clade neutralizing-IgA in their blood and FGT, which are mostly directed towards ENV glycoproteins [68-72]. Furthermore, in a cohort of HESN women from Ivory Coast, mucosal IgA were shown to block HIV transcytosis through tight epithelial barriers [73, 74]. Whether these IgA are generated and maintained in response to frequent HIV exposition and/or a contained local HIV reservoir and/or expanded from pre-existing microbiota reactive B-cell pools that cross-react with HIV-ENV remains to be established. The sole fact that sex-break will eventually lead to seroconversion in HESN CSWs who return to sex work, despite pre-existing HIV-specific responses [75] suggests frequent exposition to HIV is required for maintenance of immune populations and their protective responses in the mucosal niche. This could possibly operate via a mechanism analogous to that described in the GALT in context of host-microbiota immune “tolerance” system [76].

### **Innate B-cells and BLyS/BAFF in natural immunity to HIV**

Until now, few studies have assessed the nature of B-cells involved in production of Abs in the context of natural immunity against HIV. The detailed characterization of the Ig repertoire of cervical and systemic B-cells from a Kenyan HESN individual revealed that site-specific responses occur with unique regulation of tolerance and recruitment into local memory or blast B-cell compartments, and the infusion of systemic post-germinal center (GC) B-cells to the cervix seems to be a common event [77]. Further understanding the nature and how B-cell populations are solicited to fight against HIV appears important to the design of preventive approaches.

Growing importance is given to innate marginal zone [2] type B-cells in health and disease [78]. Indeed, given their location in lymphoid organs and mucosal-associated structures, human MZ B-cells constitute early first-line defense against invading pathogens. Although the Abs generated from innate B-cells may be important in some circumstances, such as with MZ B-cells in the context of encapsulated bacteria [78], in others such as with viral infections more refined adaptive Ab responses are also required to eradicate the infection. In viral infections, innate populations such as MZ B-cells likely provide a quick efficient

first-line response and participate in the development of the adaptive Ab responses. Indeed, MZ B-cells can traffic Ag to follicular B-cell areas of lymphoid structures and promote GC reactions, where T-cell dependent B-cell class switch recombination (CSR) and affinity maturation lead to the production of highly specific Abs with potent neutralizing and ADCC effector functions [79]. MZ B-cells are capable of CSR, mostly towards IgG and IgA in humans [78]. MZ B-cells express a polyreactive BCR repertoire, which comprises usage of the IGHV1-2 gene [80], which product has been shown to take part to HIV-ENV reactive broadly neutralizing Abs (bNAbs) such as VRC01 [81]. Moreover, human MZ B-cells have been shown to naturally bind to fully glycosylated gp120 via surface lectins, and in the presence of BLyS/BAFF subsequently produced polyreactive IgG and IgA, of which a fraction recognized gp120 [82].

BLyS/BAFF is highly recognized for its role in B-cell ontogenesis, as well as cell fate decision towards the innate MZ B-cell pool [78, 83]. Interestingly, repeated treatment of mice with BLyS/BAFF increased their MZ B-cell compartment, and generated an increased response to ENV immunization and bNAbs [84]. Although the capacity of MZ B-cells to bind gp120 suggest they could possibly transfer HIV, it is unlikely that they get infected by the virus. Indeed, despite the fact that HIV has been shown to replicate in CD40 stimulated B-cells *in vitro* [85], the virus has not yet been convincingly shown to infect or replicate in B-cells *in vivo* [86]. Moreover, our HiSeq gene expression analysis of MZ B-cells reveals relatively high levels of viral restriction factors such as SAMHD1 (unpublished).

Previous reports by us and others demonstrated that BLyS/BAFF expression is increased in the context of HIV disease, and not fully restored following therapy [87, 88]. This is likely due to direct and indirect factors associated with HIV infection. Indeed, soluble HIV-Nef can directly modulate BLyS/BAFF membrane expression and soluble release by monocyte derived DCs [89], and HIV-ENV has been shown to upregulate BLyS/BAFF expression by macrophages [82]. Furthermore, BLyS/BAFF has been shown to be directly induced by type I IFNs [90, 91]. Elements of microbial translocation, such as LPS are also known to up-regulate BLyS/BAFF expression and release [89, 92].



We have previously shown that BLyS/BAFF overexpression in blood of HIV-infected progressors coincides with hyperglobulinemia and increased frequencies of IL-10 expressing precursor-like MZ B-cells [51, 87], which HiSeq gene expression analyses reveal several dysregulated genes (unpublished). We also found overexpression of BLyS/BAFF and increased frequencies of precursor-like MZ B-cells in the blood of HIV-infected CSWs from Benin [93]. Elevated BLyS/BAFF levels likely favor expansion, activation and dysregulation of innate B-cell populations such as MZ, contributing to the over-representation of polyreactive and auto-reactive Abs [94] at the expense of eradicated anti-HIV Ab responses. Interestingly, cumulating evidence point to the fact that increased BLyS/BAFF and dysregulated B-cells sharing similar features with the precursor-like MZ B-cells we identified in the blood of HIV-infected individuals are a common trait of chronic inflammatory diseases [95].

In contrast to that observed in HIV-infected progressors, both blood BLyS/BAFF levels and frequencies of precursor-like MZ B-cells remained unaltered in HIV-infected Elite-Controllers (EC) [51, 87]. Rather, frequencies of more mature MZ B-cells were found to be decreased in blood, implying that their recruitment to periphery, as suggested by their elevated migratory potential [96], may be involved in control of HIV disease progression. Although the mechanisms conferring natural immunity against HIV remain to be elucidated, we hypothesize they may share some similarities with than we observed in EC. Accordingly, in the Benin cohort, plasma and cellular BLyS/BAFF levels were significantly lower in the blood of HESN CSWs when compared to those measured in HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSW women [93]. These low BLyS/BAFF levels are consistent with the low-inflammatory response we have previously described in these individuals [38], and may be linked to the modulation of the intracellular machinery leading to BLyS/BAFF expression and/or release. As to whether they are related to advantageous genetic polymorphisms remains to be established. Frequencies of precursor-like MZ B-cells remained unaltered in HESNs when compared to HIV-infected CSWs [93]. However, as for EC, frequencies of more mature MZ B-cells were decreased in their blood when compared to HIV-uninfected non-CSWs [93]. It is conceivable that these cells are recruited to the periphery, where they generate first-line responses against HIV. Moreover,

given their propensity for B regulatory potential [51] they could also contribute to the maintenance of low inflammatory conditions observed in HESNs. Furthermore, since MZ B cells promote GC reactions, it is likely that they also participate in the development of adaptive B-cell responses against HIV. Therefore, immunomodulation of BLyS/BAFF levels and innate MZ-like B-cell populations may benefit to mucosal preventive devices viewed to produce a rapid and potent first line antiviral immune response at the initial site of exposure, and which could be combined with refined adaptive immunity. Understanding the dynamics of BLyS/BAFF and its role in homeostasis of immune responsiveness appears pivotal to the design of vaccine strategies soliciting first-line B-cell responses. Based on our observations, the capacity to contain BLyS/BAFF expression levels seems concomitant with natural immunity against HIV, whereas excessive BLyS/BAFF may promote immune dysregulation and disease progression.

### **Concluding remarks**

As pictured in Figure 1, natural immunity to HIV in HESN CSWs likely implies a strong capacity to generate efficient anti-viral responses and at the same time to prevent excessive inflammation. It likely involves orchestration of first-line innate immune responses in conjunction with matured high affinity adaptive responses, which is expected to operate at cervico-vaginal mucosal sites, which are ports of entry and replication for the virus. Regulatory DC-10-like, Treg, Tr1 and possibly Breg cells locally contribute to the maintenance of a low-inflammatory genital milieu. This allows balanced responses from effector populations. The fact that BLyS/BAFF levels are contained helps to maintain the integrity of innate, possibly MZ-like, B-cell responses. The latter which, likely produce IgG and/or IgA capable of binding to HIV Env.

Understanding the nature and how immune populations are recruited and maintained within mucosal niche to fight HIV is important to the design of effective preventive/therapeutic approaches. This is critical, especially for innate first-line B-cell populations, such as MZ, which do not generate memory, and possibly require a frequent degree of Ag exposure to be maintained in the mucosal niche. This suggests any protective device soliciting first-line responses, will likely require frequent boosting to the vaccine regimen.

**Acknowledgments**

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119406, PJT-148529) and the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses, Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS).

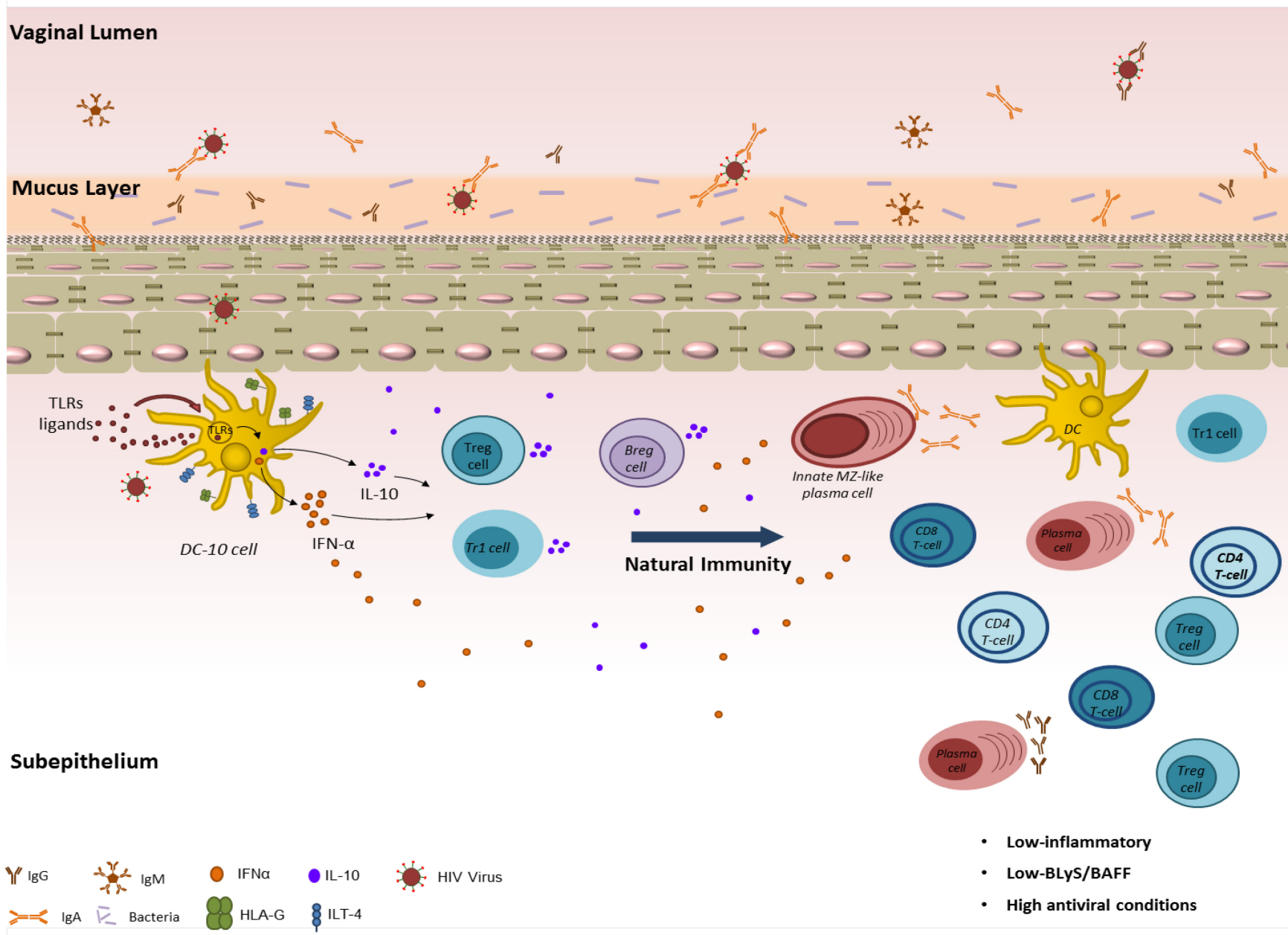


Figure 1

## References

- [1]. Falkowska E, Le KM, Ramos A, Doores KJ, Lee JH, Blattner C, et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers. *Immunity*. 2014; 40: 657-668. 10.1016/j.immuni.2014.04.009
- [2]. Cremel M, Berlier W, Hamzeh H, Cognasse F, Lawrence P, Genin C, et al. Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. *J Leukoc Biol*. 2005; 78: 158-166. 10.1189/jlb.0305147
- [3]. UNAIDS. UNAIDS DATA 2017 2017 [Available from: [http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017\\_data\\_book](http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book).
- [4]. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 875821. 10.1155/2012/875821
- [5]. 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. 10.1016/s0140-6736(95)12269-2
- [6]. Yao XD, Omenge RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal Immunol*. 2014; 7: 268-279. 10.1038/mi.2013.44
- [7]. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*. 2005; 206: 306-335. 10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x
- [8]. Shacklett BL. Cell-mediated immunity to HIV in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 2009; 83: 190-195. 10.1016/j.jri.2009.07.012
- [9]. Wira CR, Fahey JV. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *Aids*. 2008; 22: 1909-1917. 10.1097/QAD.0b013e3283060ea4
- [10]. Wira CR, Rodriguez-Garcia M, Patel MV. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 217-230. 10.1038/nri3819
- [11]. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011; 88: 185-194. 10.1016/j.jri.2011.01.005
- [12]. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004; 5: 987-995. 10.1038/ni1112
- [13]. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 592187. 10.1155/2012/592187
- [14]. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000852. 10.1371/journal.ppat.1000852
- [15]. Grant-Tschudy KS, Wira CR. Paracrine mediators of mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance in culture. *J Reprod Immunol*. 2005; 67: 1-12. 10.1016/j.jri.2005.06.001
- [16]. Cleret-Buhot A, Zhang Y, Planas D, Goulet JP, Monteiro P, Gosselin A, et al. Identification of novel HIV-1 dependency factors in primary CCR4(+)CCR6(+)Th17 cells via a genome-wide transcriptional approach. *Retrovirology*. 2015; 12: 102. 10.1186/s12977-015-0226-9
- [17]. Gringhuis SI, van der Vlist M, van den Berg LM, den Dunnen J, Litjens M, Geijtenbeek TB. HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol*. 2010; 11: 419-426. 10.1038/ni.1858
- [18]. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. 2010; 464: 217-223. 10.1038/nature08757

- [19]. Magerus-Chatinet A, Yu H, Garcia S, Ducloux E, Terris B, Bomsel M. Galactosyl ceramide expressed on dendritic cells can mediate HIV-1 transfer from monocyte derived dendritic cells to autologous T cells. *Virology*. 2007; 362: 67-74. 10.1016/j.virol.2006.11.035
- [20]. Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*. 1997; 3: 42-47.
- [21]. Shang L, Duan L, Perkey KE, Wietgreffe S, Zupancic M, Smith AJ, et al. Epithelium-innate immune cell axis in mucosal responses to SIV. *Mucosal Immunol*. 2017; 10: 508-519. 10.1038/mi.2016.62
- [22]. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000; 100: 587-597.
- [23]. Fontenot D, He H, Hanabuchi S, Nehete PN, Zhang M, Chang M, et al. TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 16776-16781. 10.1073/pnas.0907347106
- [24]. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2: a006940. 10.1101/cshperspect.a006940
- [25]. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 127-139. 10.1146/annurev-med-080709-124959
- [26]. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Geijtenbeek TB. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat Immunol*. 2009; 10: 1081-1088. 10.1038/ni.1778
- [27]. Teijeira A, Russo E, Halin C. Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Semin Immunopathol*. 2014; 36: 261-274. 10.1007/s00281-013-0410-8
- [28]. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 2005; 79: 9217-9227. 10.1128/jvi.79.14.9217-9227.2005
- [29]. Stieh Daniel J, Matias E, Xu H, Fought Angela J, Blanchard James L, Marx Preston A, et al. Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques. *Cell Host & Microbe*. 2016; 19: 529-540. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.005>
- [30]. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006; 126: 1121-1133. 10.1016/j.cell.2006.07.035
- [31]. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nat Immunol*. 2008; 9: 641-649. 10.1038/ni.1610
- [32]. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, et al. Alpha4(+)-beta7(hi)CD4(+) memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol*. 2009; 2: 439-449. 10.1038/mi.2009.90
- [33]. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14: 409-426.
- [34]. Li Q, Estes JD, Schlievert PM, Duan L, Brosnahan AJ, Southern PJ, et al. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature*. 2009; 458: 1034-1038. 10.1038/nature07831

- [35]. Schellenberg JJ, Plummer FA. The Microbiological Context of HIV Resistance: Vaginal Microbiota and Mucosal Inflammation at the Viral Point of Entry. *Int J Inflam*. 2012; 2012: 131243. 10.1155/2012/131243
- [36]. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal Immunol*. 2012; 5: 277-287. 10.1038/mi.2012.7
- [37]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol*. 2010; 30: 90-98. 10.1007/s10875-009-9343-3
- [38]. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol*. 2008; 1: 309-316. 10.1038/mi.2008.18
- [39]. Ball TB, Ji H, Kimani J, McLaren P, Marlin C, Hill AV, et al. Polymorphisms in IRF-1 associated with resistance to HIV-1 infection in highly exposed uninfected Kenyan sex workers. *Aids*. 2007; 21: 1091-1101. 10.1097/QAD.0b013e3280ef6ae1
- [40]. Ji H, Ball TB, Ao Z, Kimani J, Yao X, Plummer FA. Reduced HIV-1 long terminal repeat transcription in subjects with protective interferon regulatory factor-1 genotype: a potential mechanism mediating resistance to infection by HIV-1. *Scand J Infect Dis*. 2010; 42: 389-394. 10.3109/00365540903496536
- [41]. Fowke KR, Kaul R, Rosenthal KL, Oyugi J, Kimani J, Rutherford WJ, et al. HIV-1-specific cellular immune responses among HIV-1-resistant sex workers. *Immunol Cell Biol*. 2000; 78: 586-595. 10.1046/j.1440-1711.2000.00944.x
- [42]. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*. 2000; 164: 1602-1611.
- [43]. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, Izulla P, Kimani M, Huibner S, et al. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol*. 2011; 187: 6032-6042. 10.4049/jimmunol.1101836
- [44]. McLaren PJ, Ball TB, Wachihi C, Jaoko W, Kelvin DJ, Danesh A, et al. HIV-exposed seronegative commercial sex workers show a quiescent phenotype in the CD4+ T cell compartment and reduced expression of HIV-dependent host factors. *J Infect Dis*. 2010; 202 Suppl 3: S339-344. 10.1086/655968
- [45]. Alimonti JB, Koesters SA, Kimani J, Matu L, Wachihi C, Plummer FA, et al. CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women. *J Infect Dis*. 2005; 191: 20-24. 10.1086/425998
- [46]. Thibodeau V, Fourcade L, Labbe AC, Alary M, Guedou F, Poudrier J, et al. Highly-Exposed HIV-1 seronegative Female Commercial Sex Workers sustain in their genital mucosa increased frequencies of tolerogenic myeloid and regulatory T-cells. *Sci Rep*. 2017; 7: 43857. 10.1038/srep43857
- [47]. Saitoh SI, Abe F, Kanno A, Tanimura N, Mori Saitoh Y, Fukui R, et al. TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun*. 2017; 8: 1592. 10.1038/s41467-017-01687-x
- [48]. Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13: 403-413. 10.1038/nrmicro3449
- [49]. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11: 373-384. 10.1038/ni.1863

- [50]. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol.* 2013; 93: 811-818. 10.1189/jlb.0912436
- [51]. Chagnon-Choquet J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PLoS One.* 2014; 9: e101949. 10.1371/journal.pone.0101949
- [52]. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol.* 2012; 189: 3925-3935. 10.4049/jimmunol.1103139
- [53]. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991; 174: 915-924.
- [54]. Amodio G, Gregori S. Human tolerogenic DC-10: perspectives for clinical applications. *Transplant Res.* 2012; 1: 14. 10.1186/2047-1440-1-14
- [55]. Amodio G, Comi M, Tomasoni D, Gianolini ME, Rizzo R, LeMaout J, et al. HLA-G expression levels influence the tolerogenic activity of human DC-10. *Haematologica.* 2015; 100: 548-557. 10.3324/haematol.2014.113803
- [56]. Card CM, McLaren PJ, Wachihhi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009; 199: 1318-1322. 10.1086/597801
- [57]. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* 2013; 19: 739-746. 10.1038/nm.3179
- [58]. Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity.* 2016; 44: 1052-1068. 10.1016/j.immuni.2016.04.022
- [59]. Day TA, Kublin JG. Lessons learned from HIV vaccine clinical efficacy trials. *Curr HIV Res.* 2013; 11: 441-449.
- [60]. Wills S, Hwang KK, Liu P, Dennison SM, Tay MZ, Shen X, et al. HIV-1-Specific IgA Monoclonal Antibodies from an HIV-1 Vaccinee Mediate Galactosylceramide Blocking and Phagocytosis. *J Virol.* 2018; 92. 10.1128/jvi.01552-17
- [61]. Kim JH, Excler JL, 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. 10.1146/annurev-med-052912-123749
- [62]. Williams WB, Liao HX, Moody MA, Kepler TB, Alam SM, Gao F, et al. HIV-1 VACCINES. Diversion of HIV-1 vaccine-induced immunity by gp41-microbiota cross-reactive antibodies. *Science.* 2015; 349: aab1253. 10.1126/science.aab1253
- [63]. Kulkarni V, Ruprecht RM. Mucosal IgA Responses: Damaged in Established HIV Infection-Yet, Effective Weapon against HIV Transmission. *Front Immunol.* 2017; 8: 1581. 10.3389/fimmu.2017.01581
- [64]. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity.* 2011; 34: 269-280. 10.1016/j.immuni.2011.01.015
- [65]. 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. 10.1016/j.vaccine.2015.02.020
- [66]. 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. 10.1097/QAD.0b013e328360eac6
- [67]. Batrville LA, Richard J, Veillette M, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Short communication: Anti-HIV-1 envelope immunoglobulin Gs in blood and cervicovaginal samples of Beninese commercial sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014; 30: 1145-1149. 10.1089/aid.2014.0163
- [68]. 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: 2155-2163. 10.1097/QAD.0b013e328359b99b
- [69]. Seaton KE, Ballweber L, Lan A, Donathan M, Hughes S, Vojtech L, et al. HIV-1 specific IgA detected in vaginal secretions of HIV uninfected women participating in a microbicide trial in Southern Africa are primarily directed toward gp120 and gp140 specificities. *PLoS One*. 2014; 9: e101863. 10.1371/journal.pone.0101863
- [70]. 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.
- [71]. 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.
- [72]. Kaul R, Plummer F, Clerici M, Bomsel M, Lopalco L, Broliden K. Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: evidence for a role in protection against HIV infection. *Aids*. 2001; 15: 431-432.
- [73]. Belec 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. 10.1086/324375
- [74]. Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis*. 1999; 179 Suppl 3: S448-453. 10.1086/314802
- [75]. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, et al. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest*. 2001; 107: 341-349. 10.1172/jci10714
- [76]. Slack E, Balmer ML, Macpherson AJ. B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunol Rev*. 2014; 260: 50-66. 10.1111/imr.12179
- [77]. Gaudet RG, Breden F, Plummer F, Berry JD. Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: Unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV-1 resistant individual. *MAbs*. 2011; 3: 181-191.
- [78]. Cerutti A, Cols M, Puga I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: 118-132. 10.1038/nri3383
- [79]. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30: 429-457. 10.1146/annurev-immunol-020711-075032
- [80]. Bikos V, Karypidou M, Stalika E, Baliakas P, Xochelli A, Sutton LA, et al. An Immunogenetic Signature of Ongoing Antigen Interactions in Splenic Marginal Zone

- Lymphoma Expressing IGHV1-2\*04 Receptors. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 2032-2040. 10.1158/1078-0432.ccr-15-1170
- [81]. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science.* 2010; 329: 811-817. 10.1126/science.1192819
- [82]. He B, Qiao X, Klasse PJ, Chiu A, Chadburn A, Knowles DM, et al. HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol.* 2006; 176: 3931-3941.
- [83]. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 267-285. 10.1146/annurev.immunol.021908.132607
- [84]. Dosenovic P, Soldemo M, Scholz JL, O'Dell S, Grasset EK, Pelletier N, et al. BLYS-mediated modulation of naive B cell subsets impacts HIV Env-induced antibody responses. *J Immunol.* 2012; 188: 6018-6026. 10.4049/jimmunol.1200466
- [85]. Moir S, Lapointe R, Malaspina A, Ostrowski M, Cole CE, Chun TW, et al. CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir. *J Virol.* 1999; 73: 7972-7980.
- [86]. Moir S, Fauci AS. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. *Immunol Rev.* 2013; 254: 207-224. 10.1111/imr.12067
- [87]. Fontaine J, Chagnon-Choquet J, Valcke HS, Poudrier J, Roger M. High expression levels of B lymphocyte stimulator (BLYS) by dendritic cells correlate with HIV-related B-cell disease progression in humans. *Blood.* 2011; 117: 145-155. 10.1182/blood-2010-08-301887
- [88]. Wada NI, Jacobson LP, Margolick JB, Breen EC, Macatangay B, Penugonda S, et al. The effect of HAART-induced HIV suppression on circulating markers of inflammation and immune activation. *Aids.* 2015; 29: 463-471. 10.1097/qad.0000000000000545
- [89]. Chagnon-Choquet J, Gauvin J, Roger J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M. HIV Nef promotes expression of B-lymphocyte stimulator by blood dendritic cells during HIV infection in humans. *J Infect Dis.* 2015; 211: 1229-1240. 10.1093/infdis/jiu611
- [90]. Gomez AM, Ouellet M, Tremblay MJ. HIV-1-triggered release of type I IFN by plasmacytoid dendritic cells induces BAFF production in monocytes. *J Immunol.* 2015; 194: 2300-2308. 10.4049/jimmunol.1402147
- [91]. Sjostrand M, Johansson A, Aqrabi L, Olsson T, Wahren-Herlenius M, Espinosa A. The Expression of BAFF Is Controlled by IRF Transcription Factors. *J Immunol.* 2016; 196: 91-96. 10.4049/jimmunol.1501061
- [92]. Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C. In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol.* 2007; 179: 5947-5957.
- [93]. Sabourin-Poirier C, Fourcade L, Chagnon-Choquet J, Labbe AC, Alary M, Guedou F, et al. Blood B Lymphocyte Stimulator (BLYS)/BAFF levels may reflect natural immunity to HIV in highly exposed uninfected Beninese Commercial Sex Workers. *Sci Rep.* 2016; 6: 32318. 10.1038/srep32318
- [94]. Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, Saulep D, Mackay F, Pers JO. B-cell tolerance breakdown in Sjogren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev.* 2010; 9: 604-608. 10.1016/j.autrev.2010.05.006
- [95]. Borhis G, Richard Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunol.* 2015; 16: 15. 10.1186/s12865-015-0079-y
- [96]. Gauvin J, Chagnon-Choquet J, Poudrier J, Roger M. Fluctuations in Blood Marginal Zone B-Cell Frequencies May Reflect Migratory Patterns Associated with HIV-1 Disease Progression Status. *PLoS One.* 2016; 11: e0155868. 10.1371/journal.pone.0155868