

Université de Montréal

**Implication de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la
transmission mère-enfant du VIH-1**

par

Geneviève Boily-Larouche

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Virologie et Immunologie

Février 2012

© Geneviève Boily-Larouche, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Implication de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la transmission mère-enfant du VIH-1

Présentée par :
Geneviève Boily-Larouche

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns, président-rapporteur
Dr Michel Roger, directeur de recherche
Dr Petronela Ancuta, membre du jury
Dr Benoît Barbeau, examinateur externe
Dr Yves Langelier, représentant du doyen de la FES

Résumé

La transmission mère-enfant du VIH-1 (TME) représente le principal mode d'infection chez l'enfant et se produit durant la grossesse (*in utero*, IU), l'accouchement (*intrapartum*, IP) ou l'allaitement (*postpartum*, PP). Les mécanismes qui sous-tendent le passage du VIH-1 à travers le placenta et les muqueuses intestinales du nouveau-né sont encore très peu décrits. « Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin » (DC-SIGN) et son homologue DC-SIGN « related » (DC-SIGNR) sont des récepteurs d'antigènes exprimés au niveau du placenta et capables de capter et de transmettre le VIH-1 aux cellules adjacentes. Ils pourraient donc participer au passage trans placentaire du VIH-1 et le polymorphisme génétique affectant l'expression ou modifiant l'interaction avec le virus aurait une influence sur la TME du VIH-1. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons procédé à une analyse exhaustive du polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population du Zimbabwe. Par la suite, nous avons déterminé l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR et la TME du VIH-1 dans une cohorte d'enfants nés de mères VIH-positives à Harare, au Zimbabwe. Enfin, nous avons défini l'impact fonctionnel des mutations associées.

Les enfants homozygotes pour les haplotypes H1 et H3 dans le gène de DC-SIGNR sont 4 à 6 fois plus à risque de contracter le VIH-1 par voie IU et IP. H1 et H3 contiennent la mutation du promoteur p-198A et la mutation de l'intron 2, int2-180A, et des études fonctionnelles nous ont permis de démontrer que p-198A diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGNR et l'expression des transcrits d'ARNm dans le placenta, alors que int2-180A modifie le répertoire d'isoformes de DC-SIGNR vers une proportion diminuée d'isoformes membranaires.

Les enfants porteurs des haplotypes H4 et H6 de DC-SIGN sont 2 à 6 fois plus à risque de contracter le VIH-1 par voie IU. Ces haplotypes contiennent deux mutations du promoteur (p-336T/C et p-201C/A) et quatre mutations codant pour un changement d'acide aminé dans l'exon 4 (R198Q, E214D, R221Q ou L242V) associées à un risque augmenté de transmission IU, IP et PP du VIH-1. Des études fonctionnelles ont démontré que les

mutations du promoteur diminuent l'expression de DC-SIGN dans les macrophages placentaires. Toutefois, l'exposition IU au VIH-1 module le niveau d'expression de DC-SIGN, résultant en des niveaux d'expression similaires entre les macrophages des porteurs des allèles sauvages et mutés. Les mutations de l'exon 4 augmentent l'affinité de DC-SIGN pour le VIH-1 et sa capacité à capturer et à transmettre le virus aux lymphocytes T, favorisant possiblement la dissémination du VIH-1 à travers le placenta. L'association entre les mutations de DC-SIGN et la transmission IP et PP du VIH-1 suggèrent qu'il aurait aussi un rôle à jouer dans les muqueuses intestinales de l'enfant.

Notre étude démontre pour la première fois l'implication de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la TME du VIH-1. L'augmentation des capacités de capture et de transmission de DC-SIGN résulte en une susceptibilité accrue de l'enfant à l'infection au VIH-1 et concorde avec un rôle dans la dissémination transplacentaire. Toutefois, la diminution préférentielle des transcrits membranaires de DC-SIGNR au placenta augmente la TME du VIH-1 et laisse croire à son implication via un autre mécanisme. Ces mécanismes pourraient aussi s'appliquer à d'autres pathogènes reconnus par DC-SIGN et DC-SIGNR et transmis de la mère à l'enfant.

Mots-clés : DC-SIGN, DC-SIGNR, polymorphisme, VIH-1, transmission mère-enfant (TME), infection en *trans*

Abstract

Mother-to-child transmission (MTCT) is the main cause of HIV-1 infection in children worldwide. MTCT of HIV-1 can occur during pregnancy (*in utero*, IU), delivery (*intrapartum*, IP) or breastfeeding (*postpartum*, PP). Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin (DC-SIGN) and its homolog DC-SIGN related (DC-SIGNR) are attachment receptors for HIV-1 and are expressed in the placenta. They have been implicated in viral capture and transmission to T cells. To investigate the potential role of DC-SIGN and DC-SIGNR in MTCT of HIV-1, we carried out a genetic association study in a well-characterized cohort of 197 HIV-infected mothers and their infants recruited in Harare, Zimbabwe.

Infants harbouring two copies of DC-SIGNR H1 and/or H3 haplotypes (H1-H1, H1-H3, H3-H3) had a 4-fold increased risk of IU and 6-fold increased risk of IP HIV-1 infection after adjusting for a number of maternal factors. The implicated H1 and H3 haplotypes share two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in promoter region (p-198A) and intron 2 (int2-180A) that were associated with increased risk of both IU and IP HIV-1 infection. The promoter variant reduced transcriptional activity *in vitro*. In homozygous H1 infants bearing both the p-198A and int2-180A mutations, we observed a 4-fold decrease in the level of placental DC-SIGNR transcripts, disproportionately affecting the expression of membrane-bound isoforms compared to infant noncarriers.

Infants carrying H4 and H6 haplotypes in DC-SIGN gene were more likely to be HIV-1-infected during pregnancy. These haplotypes contain promoter variants (p-336T/C and p-201C/A) and exon 4 variants (R198Q, E214D, R221Q and L242V) that were all significantly associated with increased risk of MTCT of HIV-1. Compared with wild-type sequence, the promoter variants reduced both the DC-SIGN transcription *in vitro* and expression (2-fold) in placental macrophages of HIV-1-unexposed infants. However, in HIV-1-exposed infants, the level of DC-SIGN expression in placental macrophages was similar in infants carrying either the promoter wild-type or variant sequences. Exon 4

variants increased HIV-1 capture and transmission to T cells *in vitro*. Association between DC-SIGN SNPs and HIV-1 IP and PP infection also suggests that DC-SIGN plays an important role in intestinal mucosa.

This is the first study reporting on functional impact of DC-SIGN and DC-SIGNR natural polymorphisms on HIV-1 transmission from mother-to-child. Decreased levels of expression of membrane DC-SIGNR isoforms at the placental endothelial cell surface increased child susceptibility to HIV-1. Presence of DC-SIGN variants increasing its affinity for the virus augmented child susceptibility to HIV-1 and may favour viral dissemination across the placental barrier. This study provides compelling evidence to support an important role of DC-SIGN and DC-SIGNR in various modes of MTCT of HIV-1 and shed light on the possible mechanisms involved in HIV-1 passage from mother-to-infant. These findings raise the possibility that similar mechanisms may operate with other human pathogens known to interact with DC-SIGN and DC-SIGNR.

Keywords : DC-SIGN, DC-SIGNR, genetic variant, mother-to-child transmission (MTCT), HIV-1, cell-to-cell transfer

Table des matières

Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	1
Revue de littérature.....	3
1. Le virus du VIH.....	3
1.1 Les origines.....	3
1.2 Le cycle répliatif.....	4
1.2.1 L'entrée du virus.....	6
1.2.2 La décapsidation, la transcription inverse et l'intégration du virus.....	7
1.2.3 L'assemblage et le bourgeonnement des virions.....	9
2. La pathogenèse du VIH-1.....	10
2.1 La phase éclipse, la phase aiguë, la phase chronique et la réponse immunitaire...	12
2.2 L'avènement des antirétroviraux.....	18
3. Les modes de transmission du VIH-1.....	19
3.1 La transmission sexuelle.....	19
3.2 La transmission parentérale.....	21
3.3 La transmission mère-enfant.....	21
3.3.1 L'exposition par le placenta.....	25
3.3.1.1 La transcytose du VIH-1 à travers les trophoblastes.....	28
3.3.1.2 L'infection des cellules placentaires.....	29
3.3.1.3 La perte d'intégrité de la barrière placentaire.....	31
3.3.2 L'exposition par les muqueuses.....	32
4. Les facteurs influençant la TME du VIH-1.....	35
4.1 Les facteurs maternels obstétriques et cliniques.....	35
4.2 Les facteurs virologiques.....	36

4.3 Les facteurs génétiques	38
4.4 Les facteurs immunologiques	45
4.4.1 L'environnement immunitaire et la réponse innée.....	46
4.4.2 La réponse adaptative.....	50
4.4.2.1 La réponse cellulaire	50
4.4.2.2 La réponse humorale.....	54
4.5 La présence de co-infections.....	55
5. Les lectines de type C : DC-SIGN et DC-SIGNR	58
5.1 La structure et l'expression	58
5.2 Les ligands endogènes et exogènes.....	63
5.3 L'interaction avec le VIH-1	64
5.4 La signalisation et l'implication dans la réponse immunitaire.....	69
5.5 Le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR.....	71
6. DC-SIGN et DC-SIGNR dans la TME du VIH-1.....	76
6.1 Le placenta	76
6.2 Les muqueuses intestinales	77
6.3 Le lait maternel	77
Hypothèse.....	78
Objectifs	79
1. Définir le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population zimbabwéenne.....	79
2. Déterminer l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR et la TME du VIH-1.....	79
3. Définir l'impact fonctionnel des mutations de DC-SIGN et DC-SIGNR.....	79
Description des populations	80
1. Cohorte du Zimbabwe.....	80
2. Cohorte du Bénin	81
Article 1.....	82
Article 2.....	106

Article 3.....	141
Discussion.....	181
1. DC-SIGNR et la TME du VIH-1	183
1.1 Association entre le polymorphisme génétique de DC-SIGNR dans la population du Zimbabwe et la TME du VIH-1	183
1.2 Impact fonctionnel des mutations associées avec un risque augmenté de TME du VIH-1	184
1.3 Rôle de DC-SIGNR dans la TME du VIH-1	186
2. DC-SIGN et la TME du VIH-1	191
2.1 Association entre le polymorphisme génétique de DC-SIGN dans la population du Zimbabwe et la TME du VIH-1	191
2.2 Impact fonctionnel des mutations de DC-SIGN associées à la TME du VIH-1 ..	192
2.3 Rôle de DC-SIGN dans la TME du VIH-1	195
3. La TME chez l'hôte naturel et les autres facteurs impliqués	204
Conclusion	208
Perspectives.....	210
Bibliographie.....	i
Annexes.....	xlvi

Liste des tableaux

Article 1 :

Article 1-Table 1 : Allelic frequency distribution of selected DC-SIGN SNPs in different populations	101
Article 1-Table 2 : Distribution of DC-SIGNR repeat-region genotypes among different populations	102

Article 2 :

Article 2-Table 1 : Baseline characteristics of mother and infants risk factors for intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.	129
Article 2-Table 2 : Associations between infant DC-SIGNR haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission. ...	130
Article 2-Table 3 : Associations between infant DC-SIGNR promoter p-198 and intron 2 (int2)-180 variants and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.	131
Article 2-Supplementary Table 1 : Associations between child DC-SIGNR htSNPs and mother-to-child HIV-1 transmission.....	135
Article 2-Supplementary Table 2 : Associations between child DC-SIGNR exon 4 repeated region genotypes and mother-to-child HIV-1 transmission.....	136
Article 2-Supplementary Table 3 : Primer pairs and qRT-PCR conditions for DC-SIGNR expression assays	137

Article 3 :

Article 3-Table 1 : Associations between child DC-SIGN haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) HIV-1 transmission.	172
--	-----

Article 3-Table 2 : Associations between child DC-SIGN promoter or exon 4 mutations and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) HIV-1 transmission.	173
Article 3-Supplementary Table 1 : Associations between maternal DC-SIGN haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.	177

Liste des figures

Figure 1: Cycle réplcatif du VIH-1.....	5
Figure 2: Évolution de la pathogenèse de l'infection au VIH-1.	11
Figure 3: Représentation schématique d'un placenta humain à terme.....	27
Figure 4: Représentation schématique de DC-SIGN et DC-SIGNR	60
Figure 5: Représentation schématique de l'organisation génomique de DC-SIGN et DC-SIGNR.....	75
Figure 6: Implication de DC-SIGNR dans la TME du VIH-1.....	189
Figure 7: Implication de DC-SIGN dans la TME IU du VIH-1.	202
Article 1:	
Article 1-Figure 1 : Inferred haplotypes of DC-SIGN (A) and DC-SIGNR (B).	104
Article 2:	
Article 2-Figure 1 : DC-SIGNR haplotypes reconstruction in Zimbabwean population...	132
Article 2-Figure 2 : Effect of the int2-180A variant on placental DC-SIGNR isoform expression.....	133
Article 2-Figure 3 : Transcriptional activity of DC-SIGNR promoter.	134
Article 2-Supplementary Figure 1 : DC-SIGNR transcripts repertoire in placenta.	138
Article 2-Supplementary Figure 2: Effect of DC-SIGNR promoter variant on transcriptional activity in luciferase reporter assay <i>in vitro</i> in transfected HeLa cells.	140
Article 3:	
Article 3-Figure 1 : DC-SIGN major haplotypes in Zimbabwean population.....	174

Article 3-Figure 2 : DC-SIGN promoter variants reduced transcriptional activity <i>in vitro</i> and reduced DC-SIGN expression in placental macrophages.	175
Article 3-Figure 3 : DC-SIGN neck variants enhance HIV-1 capture and transmission. ...	176
Article 3-Supplementary Figure 1 : Effect of DC-SIGN promoter variants on transcriptional activity.....	178
Article 3-Supplementary Figure 2 : HIV-1 capture by Raji transfectants.	180
 Annexes :	
Figure annexe 1 : Expression de CD16 sur les populations de macrophages DC-SIGN ⁺ CD163 ⁺ et de cellules CD14 ⁻ CD3 ⁻ CD19 ⁻ CD56 ⁻ DC-SIGN ⁻ CD68 ⁻ du placenta.	xlix
Figure annexe 2 : Potentiel de différenciation des monocytes du sang de cordon en macrophages placentaires et en MDM.....	li
Figure annexe 3 : Influence des mutations de la région « neck » sur la capacité de multimérisation et le profil de glycosylation de DC-SIGN.	liii

Liste des abbréviations

- A : adénine
- ADN : acide désoxyribonucléotidique
- ADNc : ADN complémentaire
- AP-1 : « activated protein 1 »
- APOBEC3G : « apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G »
- ARN : acide ribonucléotidique
- ARNt : ARN de transfert
- BST-2 : « bone marrow stromal antigen 2 »
- C : cytosine
- CA : capsid
- CBMC : « cord blood mononuclear cell »
- CCR5 : récepteur de chimiokines CC de type 5
- CCR5 Δ 32 : délétion de 32 paires de bases du CCR5
- CEACAM1 : « carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 »
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- CMV : cytomégalovirus
- CRD : « carbohydrate recognition domain »
- CTL : lymphocytes T cytotoxiques
- CTLA-4 : « cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 »
- CXCR4 : récepteur de chimiokine CXC de type 4
- DC : cellule dendritique
- DCIR : « dendritic cell immunoreceptor »
- DC-SIGN : « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin »
- DC-SIGNR : « dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin related »
- ELISA : « enzyme-linked immunosorbent assay »
- EMSA : « electrophoretic mobility shift assay »
- ERK1/2 : « extracellular signal-regulated kinase 1/2 »

ESCRT : « endosomal sorting complex required for transport »
G : guanine
GALT : « gut-associated lymphoid tissue »
GB-C : GB virus C
HAART : « highly active antiretroviral therapy »
HLA : « human leucocyte antigen »
HSV-2 : « herpes simplex virus type 2 »
HTLV : « human T-cell leukemia virus »
HUVEC : « human umbilical vein endothelial cells »
ICAM-3 : « intracellular adhesion molecule 3 »
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
INF : interféron
IP : *intrapartum*
IU : *in utero*
JAK : « Janus Kinase »
KIR : « killer cell immunoglobulin-like receptor »
LARG : « leukemia-associated Rho guanine nucleotide-exchange factor »
LFA-1 : « lymphocyte function-associated antigen-1 »
LIF : « leukemia inhibitory factor »
LPS : lipopolysaccharides
LSP1 : « leucocyte-specific protein 1 »
LTR : « long terminal repeat »
MA : matrice
MBL2 : « mannose binding lectin 2 »
MDDC : « monocyte derived dendritic cell »
MEK : « mitogen-activated protein kinase kinase »
MIP : « macrophage inflammatory protein »
miR-155 : micro RNA-155

MR : « mannose receptor »
NC : nucléocapside
NF-AT : « nuclear factor of activated T-cells »
NF-κB : « nuclear factor kappa B »
NK : « natural killer »
PBMC : peripheral blood mononuclear cell
PD-1 : « programmed-death 1 »
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
PI3K : « phosphatidylinositol-3-OH kinase »
PIC : « preintegration complex »
PLAP : phosphatase alcaline placentaire
PP : *postpartum*
RRE : « Rev responsive element »
SARS : « severe acute respiratory syndrome »
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SDF-1 : « stromal cell-derived factor 1 »
siARN : « small interfering » ARN
SLP1 : « secretory leucocyte protease inhibitor 1 »
SNP : « single nucleotide polymorphism »
Sp1 : « specific protein 1 »
STAT : « Signal Transducer and Activator of Transcription »
T : thymine
TAR : « transcription elongation factor »
TAG-72 : « tumor-associated glycoprotein-72 »
Tim-3 : « T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3 »
TLR : « Toll-like receptor »
TME : transmission mère-enfant
TNF : « tumor necrosis factor »
Treg : lymphocyte T régulateur

UDI : utilisateurs de drogues injectables

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

VHC : virus de l'hépatite C

V1/V2 : régions variables 1 et 2

V3 : région variable 3

ZVITAMBO : « Zimbabwe Vitamin A for Mothers and Babies trial »

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Par un support académique ou moral, toutes ces personnes m'ont aidé à parachever ces études doctorales.

D'abord un grand merci à toutes les participantes du projet ZVITAMBO, à Harare, au Zimbabwe, et du projet Placenta, à Cotonou, au Bénin, sans qui la réalisation de cette étude n'aurait jamais eu lieu. Merci à toute l'équipe qui a travaillé à la réalisation de l'étude ZVITAMBO et nous a permis d'obtenir des échantillons aussi précieux. Aussi, je dois souligner l'importante participation de Dr Annie-Claude Labbé, Prof. Djimon Zannou et Dr René Kéké, et François Leblond sans qui la mise sur pied et le bon déroulement du projet Placenta à Cotonou n'auraient pas été possible. Je dois aussi souligner l'extraordinaire participation de Dr Marie-Anne Dovonou, de Dr Honorine Onibon et de leur équipe de sages-femmes qui ont, avec enthousiasme, mener à bien le recrutement des participantes et le prélèvement des échantillons du projet Placenta. Merci à Prof. Zannou, Dr Kéké, au personnel du DIST, plus particulièrement à Ella, Aubert et Mr Anani, et au personnel de Bethesda et de St-Luc, qui ont contribué à rendre mon expérience au Bénin inoubliable.

Je me dois aussi de remercier mon directeur de recherche Dr Michel Roger, pour son soutien, ses bons conseils, et pour m'avoir donné la chance et les moyens de poursuivre mes idées les plus folles. J'ai bénéficié d'une latitude extraordinaire pour poursuivre ce projet et j'en suis reconnaissante. Merci aussi à Dre Johanne Poudrier, pour tous ses bons conseils et son expertise qui ont été fort utiles et appréciés tout au long de ces années de travail. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'immunogénétique, présente et passée, avec qui j'ai partagé mon quotidien pendant une longue ou une courte période, qui m'ont fourni une aide technique précieuse, ou avec qui j'ai partagé des discussions enrichissantes, de bons moments et de longs fou rires. Merci à Anne-Laure Iscache qui a été une aide technique considérable.

Je dois aussi souligner la participation de nos collaborateurs, Dr Andrew Mouland et Dr Éric Cohen, qui ont permis, avec le personnel et les étudiants de leur labo, la réalisation des études *in vitro*. Merci à Miroslav Milev, Johanne Mercier, Jonathan Richard et Mathieu Dubé qui ont tous offert, à leur manière, conseils ou matériel.

Enfin, je termine ces remerciements avec une mention spéciale à ma famille et mes amis qui, tous les jours, rendent la réalisation de tous types de projets, aussi rocambolesques que boire une bouteille de vin ou écrire une thèse de doctorat, une aventure extraordinaire. Merci à ma mère, Danielle et ma sœur, Marianne, dont l'amour inconditionnel est toujours une source de réconfort. Merci à Stéphane, mon beau Belge, à mes amis Liliane, Jérôme, Cindy, Marianne, Jean-François, David, Nicolas, Alexandre, les loups de la meute, les amis plus récents ou plus anciens que je côtoie régulièrement et qui ajoutent un grain de folie à ma vie. Marjorie, merci à toi d'avoir amélioré l'orthographe de cette thèse.

Avant-propos

Depuis son identification en 1983, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a rapidement atteint des niveaux endémiques, se propageant à coup de millions de nouvelles infections chaque année et atteignant des niveaux records en 1997. Bien qu'on ait assisté à un déclin graduel du nombre des nouvelles infections depuis, encore 2,6 millions de personnes ont contracté le VIH en 2009, se joignant aux 32,8 millions de personnes infectées à travers le monde. L'Afrique sub-saharienne porte à elle seule la majorité du fardeau de cette pandémie, comptant 22,5 millions de personnes infectées. Le visage de la pandémie a lentement évolué pour toucher plus particulièrement les femmes en âge d'avoir des enfants, ce qui représente 52% des personnes infectées. Par conséquent, 370 000 enfants ont été nouvellement infectés par le VIH en 2009, et ce, majoritairement par la transmission mère-enfant du VIH (TME) et 90% des 2,5 millions d'enfants infectés vivent sur le continent africain à ce jour¹.

L'arrivée des traitements antirétroviraux (ARV) a permis de mettre en place des politiques efficaces de prévention de la transmission mère-enfant du VIH, diminuant le taux de TME de 14 à 42% en absence d'ARV à 1 à 2 %². Malheureusement, l'accès inadéquat aux services anténataux et postnataux dans les pays à faible et moyen revenus ne permet de rejoindre qu'une moitié des femmes enceintes infectées par le VIH¹. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la TME du VIH pourrait contribuer à mettre en place des stratégies d'intervention plus efficaces et des mesures à meilleur coût pour rejoindre les populations les plus touchées.

Les mécanismes qui sous-tendent le passage du VIH de la mère à l'enfant sont encore peu connus. L'enfant peut s'infecter au moment de la grossesse (*in utero*), durant l'accouchement (*intrapartum*) ou via le lait maternel (*postpartum*)^{3,4}. Ces trois modes impliquent des mécanismes différents qui demandent à faire l'objet d'études plus approfondies. Malgré cela, la barrière placentaire demeure plutôt étanche au passage du virus. Même en absence de thérapie, moins d'un enfant sur trois s'infecte durant la grossesse. Certains enfants sont donc plus susceptibles que d'autres d'acquérir le VIH, et les facteurs de l'hôte qui contribuent à augmenter cette susceptibilité sont encore très peu

connus. L'étude de ces facteurs qui restreignent ou favorisent le passage du VIH de la mère à l'enfant peut donc être d'une grande utilité pour identifier des corrélats de protection ou de susceptibilité à l'infection.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à DC-SIGN et à son homologue DC-SIGNR. Membres de la famille des lectines de type C, ces récepteurs d'antigènes sont connus pour capter le VIH et favoriser sa transmission aux lymphocytes T CD4⁺⁵⁻⁷, cibles du virus. De plus, la liaison de DC-SIGN au VIH module la réponse immunitaire suivant l'infection^{8,9}. Dans le but de déterminer l'implication de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la transmission mère-enfant du VIH-1, nous avons caractérisé le polymorphisme de ces gènes dans une population africaine provenant du Zimbabwe. Nous avons ensuite déterminé l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR et le risque de transmission *in utero*, *intrapartum* et *postpartum* du VIH. Enfin, nous avons identifié l'impact des mutations associées avec un risque augmenté de transmission sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN et de DC-SIGNR, sur l'expression de l'ARNm au niveau du placenta, l'expression de la protéine dans les cellules placentaires et sur l'interaction avec le VIH.

Avant d'aborder le travail de recherche, le virus du VIH sera d'abord présenté sous les aspects de son origine, de son cycle répliatif, de sa pathogénèse et de ses modes de transmission. Par la suite, la transmission mère-enfant sera abordée plus en profondeur. L'influence de facteurs tels que les facteurs maternels cliniques et obstétriques, les facteurs virologiques, génétiques et immunitaires seront décrits. Enfin, nous aborderons plus en détails DC-SIGN et DC-SIGNR, membres de la famille des lectines de type C, et le rôle qu'ils pourraient jouer dans la transmission *in utero*, *intrapartum* et *postpartum* du VIH. Ceci nous mènera aux hypothèses et objectifs de cette étude. Les résultats seront présentés sous forme d'articles et démontreront l'implication de DC-SIGN et DC-SIGNR dans les trois modes de transmission du VIH. Enfin, nous terminerons par une discussion de ces résultats ainsi qu'une conclusion, et nous aborderons les perspectives de ce projet.

Revue de littérature

1. Le virus du VIH

1.1 Les origines

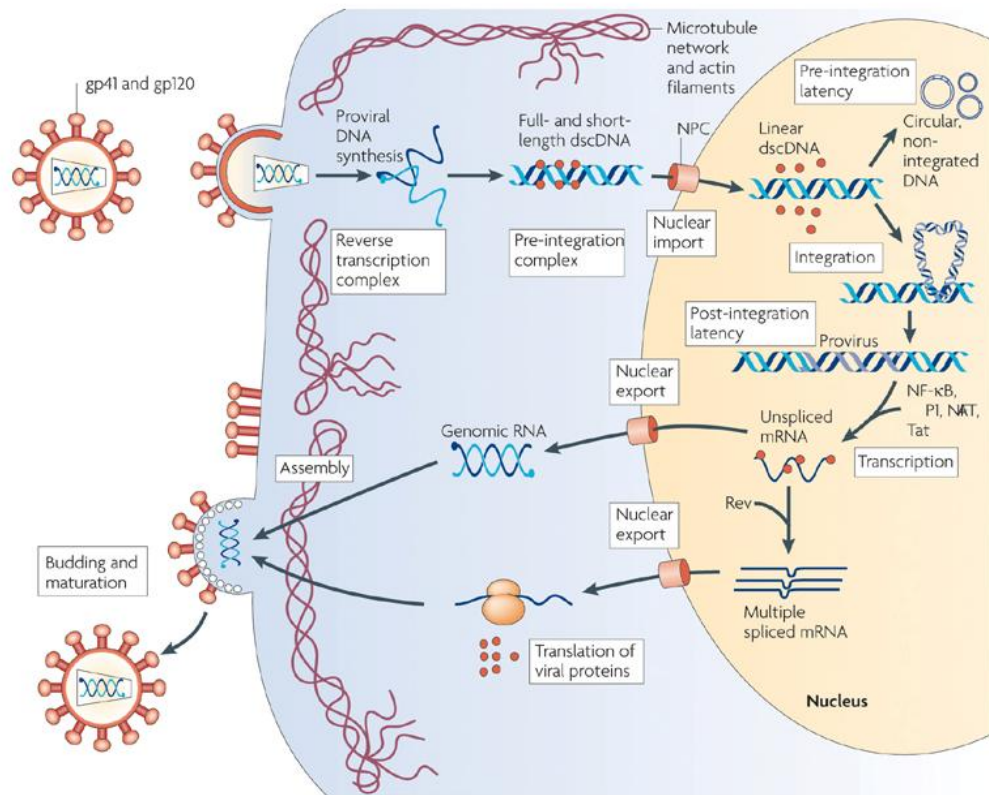
Identifié en 1983, l'infection par le VIH a atteint des niveaux pandémiques dès les années 1990¹. Ce rétrovirus est un virus enveloppé codé par un simple brin d'acide ribonucléotidique (ARN). Chaque particule virale contient 2 brins d'ARN génomique rétrotranscrits en acide désoxyribonucléotidique (ADN) provirale par la transcriptase inverse virale. Une fois rétrotranscrit, l'ADN proviral s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Son génome, de moins de 10 kb, code pour 9 protéines. Gag, Pol et Env codent pour les protéines de structure. Tat et Rev sont, pour leur part, impliquées dans la régulation et le transport des ARN messagers (ARNm) et génomiques alors que Vif, Vpr, Vpu et Nef sont considérées comme des protéines accessoires du virus et participent activement à sa pathogénèse¹⁰. Le virus du VIH présente les caractéristiques typiques du genre Lentivirus, causant une maladie dont la pathogénèse évolue lentement et cible des lignages de cellules hématopoïétiques, particulièrement les lymphocytes et les macrophages¹⁰.

Le virus de l'immunodéficience humaine le plus commun, nommé VIH-1, tient son origine du virus de l'immunodéficience simienne du chimpanzé (VIScpz) et du gorille (VISgor) retrouvé dans la forêt équatoriale du Cameroun^{11,12}. L'analyse phylogénétique des diverses souches de VIS et du VIH-1 a permis d'estimer à quel moment ce rétrovirus serait apparu chez l'homme. Il aurait été transmis à l'homme par infection zoonotique autour de 1908¹¹. Subséquemment identifié, le VIH-2, un autre rétrovirus humain qui ressemble fortement au VIH-1, proviendrait de la souche VIS des sootys mangabey de Côte d'Ivoire et aurait infecté l'homme à partir de 1932^{11,13}. Moins pathogène que son homologue, le VIH-2 représente moins d'un million des infections totales au VIH et se restreint à l'Afrique de l'Ouest^{11,13}. L'infection au VIH-1 est donc la plus répandue, touchant plus de 30 millions de personnes à travers le monde¹¹, et fera l'objet des présents travaux.

L'activité peu fidèle de la transcriptase inverse du VIH-1 et le haut taux de recombinaison entre les génomes viraux ont mené à une diversification rapide des souches virales. L'analyse phylogénétique des diverses séquences du génome complet du VIH-1 a permis le classement des différents isolats viraux en trois groupes distincts : O (« outlier ») provenant du SIVgor, et M (« major ») et N (non M et non O), provenant du VIScpz. Le groupe M représente plus de 95 % des infections chez l'humain et se divise en sous-sections, soit les clades (A-D, F, G, H, J et K) et les souches recombinantes désignées par CRF¹¹. L'épidémie en Afrique sub-saharienne est principalement causée par des virus de clade C qui compte 55 à 60 % de toutes les infections à travers le monde. Les infections identifiées en Amérique du Nord, en Europe et en Australie sont dues, quant à elles, au virus de clade B.¹⁴

1.2 Le cycle répliatif

La figure 1 montre les différentes étapes du cycle répliatif du VIH-1.



Nature Reviews | Microbiology

Figure 1: Cycle répliatif du VIH-1.

L'interaction entre la protéine de l'enveloppe du VIH-1 et le récepteur CD4 de la cellule cible débute le cycle de répliation du VIH-1. Par la suite, la reconnaissance du corécepteur permet la fusion entre les membranes virales et plasmiques, la décapsulation de la particule et la relâche du matériel génétique viral dans le cytoplasme de l'hôte. S'ensuit la transcription inverse du matériel génétique, son intégration dans le génome de l'hôte et la transcription et production des protéines virales qui bourgeonneront à la membrane plasmique. Après la relâche de ces particules, un processus de maturation permet de générer des virions matures capables d'infecter une nouvelle cellule cible.

Tiré de Coiras et coll., Nat.Rev Microbiol. 2009, 7(11), p. 798.

Avec l'autorisation de Nature Publishing Group

1.2.1 L'entrée du virus

L'entrée du virus débute par l'adsorption de la particule virale à la surface de la cellule cible. D'abord, la glycoprotéine de surface du VIH-1, le gp120, s'attache à la molécule de CD4 en surface des cellules cibles^{10,15}. La présence d'un corécepteur en surface de la cellule est indispensable pour produire le changement de conformation nécessaire à la fusion avec la membrane plasmique. Ainsi, après la liaison au CD4, le site de liaison au corécepteur du gp120 est exposé et permet son interaction avec le récepteur de chimiokine CXC de type 4 (CXCR4) ou le récepteur de chimiokines CC de type 5 (CCR5). Le domaine variable 3 (V3) du gp120 détermine l'usage du corécepteur de la souche virale. Une souche R5 reconnaît le CCR5 et une souche X4; le CXCR4. Une souche virale capable d'interagir avec ces 2 corécepteurs est qualifiée de « dualtropic » ou R5X4¹⁴. La variabilité génétique retrouvée dans les régions variables 1 et 2 (V1/V2) et 3 (V3) du gp120 influence aussi le tropisme de la souche virale. Un virus de tropisme M infecte majoritairement les lymphocytes T CD4⁺ primaires et les macrophages via l'utilisation du CCR5 alors qu'une souche de tropisme T infecte les lymphocytes T CD4⁺ primaires et de lignées cellulaires principalement via le CXCR4¹⁶.

Les souches R5 sont prédominantes dans la transmission du virus alors que les souches X4 ou R5X4 émergent chez environ 50 % des individus infectés et ce, durant la phase tardive de l'infection^{14,16,17}. Ce changement d'utilisation du corécepteur associé à une progression plus rapide de l'infection n'arrive presque exclusivement que chez les individus infectés par la clade B^{14,16}.

Suivant l'interaction avec le corécepteur, un second changement de conformation de la seconde sous-unité de la protéine de l'enveloppe, le gp41, permet la formation d'une structure à six hélices aidant au rapprochement entre la membrane virale et la membrane plasmique de la cellule cible. Cette structure, très stable, favorise la fusion entre les deux membranes et conduit au relâchement de la capsid dans le cytoplasme de la cellule hôte^{10,15,16}.

1.2.2 La décapsidation, la transcription inverse et l'intégration du virus

Après le désassemblage de la capsid virale dans le cytoplasme, le complexe de transcription contenant les deux brins d'ARN virale; une amorce d'ARN de transfert (ARNt); la protéase; la transcriptase inverse et l'intégrase virale, amorce son travail. Durant cette étape, la transcriptase inverse du virus débute la rétrotranscription du matériel génétique viral en ADN complémentaire (ADNc)¹⁸. Le processus de transcription du génome du VIH-1 par la transcriptase inverse virale conduit à une diversification importante du répertoire des souches virales. En effet, la protéine virale responsable de la transcription inverse ne peut répliquer fidèlement son gabarit et produit des erreurs à haute fréquence dans la reproduction du matériel génétique¹⁹. Cette forte diversification des souches virales mène à la génération de quasi-espèces à mesure que l'infection progresse.

L'environnement cellulaire dans lequel la rétrotranscription du génome viral prend place demeure réfractaire à l'invasion par un pathogène. La présence de facteurs de restriction exprimés par la cellule hôte peut contrer ce processus. APOBEC3G (« apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G ») est exprimée par les cellules susceptibles à l'infection au VIH-1^{18,19} et introduit des hypermutations guanine- adénine (G-A) dans le génome viral au moment de la transcription inverse^{18,20}. Incorporé dans la particule virale durant le bourgeonnement, APOBEC3G exerce son action sur le simple brin ADNc durant la rétrotranscription et conduit à la perte de l'information génétique contenue dans le brin d'ADNc viral. Cependant, le VIH-1 n'est pas en reste face à cette stratégie cellulaire. La présence de la protéine accessoire Vif permet au virus de contrer l'effet d'APOBEC3G. Vif neutralise l'action de ce facteur de restriction en favorisant sa dégradation par le protéasome¹⁸.

Après le désassemblage partiel du complexe de transcription, le transport du matériel génétique du VIH-1 se fait sous la forme d'un complexe de préintégration (PIC, « preintegration complex »)¹⁸. Ce complexe formé aussi par de multiples protéines de l'hôte permet le transport actif du PIC sur les microtubules de la cellule vers son noyau. Une fois

à la membrane du noyau, le PIC favorise le passage du double brin linéaire d'ADNc du génome viral à travers les pores nucléaires où l'intégrase virale, de concert avec la machinerie de réparation de l'ADN de l'hôte¹⁹, permet son intégration dans la région transcriptionnellement active du chromosome de la cellule hôte^{10,19}. Les « long terminal repeat » (LTR) flanquent les extrémités de l'ADN viral linéaire et conduisent l'insertion de celui-ci dans l'ADN de l'hôte, permettant à l'ADN proviral d'agir à titre de gène cellulaire. L'étape d'intégration du provirus permet à celui-ci de rester latent chez certains types cellulaires, contribuant au réservoir viral¹⁸. Une fois le génome viral intégré dans le chromosome de la cellule, la machinerie de transcription cellulaire est recrutée au LTR et la réplication virale débute^{18,20}.

La formation d'une boucle en épingle à cheveux à l'extrémité 5' du brin naissant d'ARN (« transcription elongation factor », TAR) entame le processus de réplication virale et crée un site de liaison pour la protéine régulatrice virale Tat. La formation d'un complexe d'élongation par Tat mène au recrutement efficace de l'ARN polymérase II et d'autres facteurs d'élongation cellulaires au LTR. Le LTR sert de promoteur et plusieurs facteurs de transcription de l'hôte, tels que «nuclear factor kappa B » (NF-κB), « specific protein 1 » (Sp1), « activated protein 1 » (AP-1) et « nuclear factor of activated T-cells » (NF-AT), sont recrutés au site d'élongation et encouragent une transcription active et efficace de l'ARN proviral^{10,18}. L'activation de la cellule T et la signalisation de gp120 par le corécepteur favorise ce processus. Mais avant d'être exporté au cytoplasme pour être traduit en protéines, l'ARN viral doit passer par une série de modifications post-transcriptionnelles avec la participation de Rev pour son épissage alternatif^{10,18,20}. Trois types différents d'ARN viral sont exportés au cytoplasme : 1) l'ARN génomique non-épissé servira à générer les précurseurs Gag et Pol; 2) l'ARN partiellement épissé sera traduit en Vif, Vpr et Env et finalement; 3) l'ARN épissé complètement ou à multiples reprises produira les protéines Tat, Rev et Nef. L'expression de Rev en première phase du cycle réplicatif favorise une exportation efficace des ARNm viraux au cytoplasme de la cellule¹⁰.

1.2.3 L'assemblage et le bourgeonnement des virions

Une fois au cytoplasme, les protéines de structure du VIH-1 sont synthétisées en tant que précurseurs polyprotéiques. Le précurseur de Gag Pr55^{Gag} polymérise et est transporté à la membrane de la cellule. Pr55^{Gag} contient les trois protéines de structure du virion : la matrice (MA), la capsid (CA) et la nucléocapsid (NC). C'est le domaine myristylé, dans la région MA, qui est responsable du ciblage de Gag à la membrane plasmique. Le précurseur Pr160^{Gag-Pol}, produit par un changement du cadre de lecture ribosomale durant la traduction du Pr55^{Gag}, est aussi ciblé à la membrane plasmique via son domaine myristylé. Ce changement de cadre de lecture est peu fréquent et permet de conserver un ratio Pr160^{Gag-Pol}/Pr55^{Gag} peu élevé dans la particule virale¹⁰. L'assemblage de Gag en oligomères à la membrane de la cellule, conduit par les régions CA et NC, mène à la formation d'une particule sphérique enrobée de membrane plasmique (Revu par²¹). L'encapsidation de l'ARN génomique, via l'interaction avec la région NC de Gag et le signal d'encapsidation de l'ARN viral, est aussi essentielle à la génération d'une particule virale infectieuse¹⁰. L'interaction entre MA et gp41 conduit au recrutement de la glycoprotéine de l'enveloppe Env sur la particule virale. La protéine Env est traduite par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique rugueux sous la forme d'un précurseur, le gp160, et est simultanément glycosylée. Après sa traduction, gp160 se trimérise et continue vers le Golgi, où il sera clivé par les enzymes cellulaires en gp120 et gp41. Ce clivage lui confère son activité fusogénique. Subséquemment, le trimère gp120-gp41 est transporté à la surface cellulaire. La faiblesse de l'interaction entre gp120 et gp41 permet le relargage d'une quantité importante de gp120 par la cellule infectée¹⁰.

À la suite de l'assemblage de la particule, le domaine p6 de Gag participe au recrutement du complexe ESCRT-I (« endosomal sorting complex required for transport »), normalement impliqué dans la formation de vésicules endosomales (Revu par^{19,21}). L'utilisation de la voie ESCRT mène à la fission entre la membrane virale et la membrane plasmique, relâchant la particule virale dans le milieu. Étant donné que le virus s'enveloppe de membrane plasmique, il incorpore dans sa particule des protéines de surface de l'hôte.

Durant le bourgeonnement de la particule, la protéase virale contenue dans Pr160^{Gag-Pol} se libère en se clivant de Pol et procède à la maturation du virion. Suivant son propre clivage, la protéase clive Gag en trois protéines de structure (MA, CA et NC). MA s'organise autour de la membrane alors que CA forme le cœur hélicoïdale de la particule virale. Enfin, NC s'organise autour du génome viral. Pol pour sa part est subséquentement clivé en intégrase et en transcriptase inverse¹⁰. La maturation du virus lui confère ses propriétés infectieuses, et la particule relâchée est en mesure d'infecter une nouvelle cible.

2. La pathogenèse du VIH-1

Suivant l'exposition des muqueuses orales, vaginales ou rectales au VIH-1 ou son inoculation intravasculaire, une réplication dynamique du virus s'installe dans les jours suivant et perdure tout au long de l'infection. La pathogenèse du VIH-1 se présente de la façon suivante.

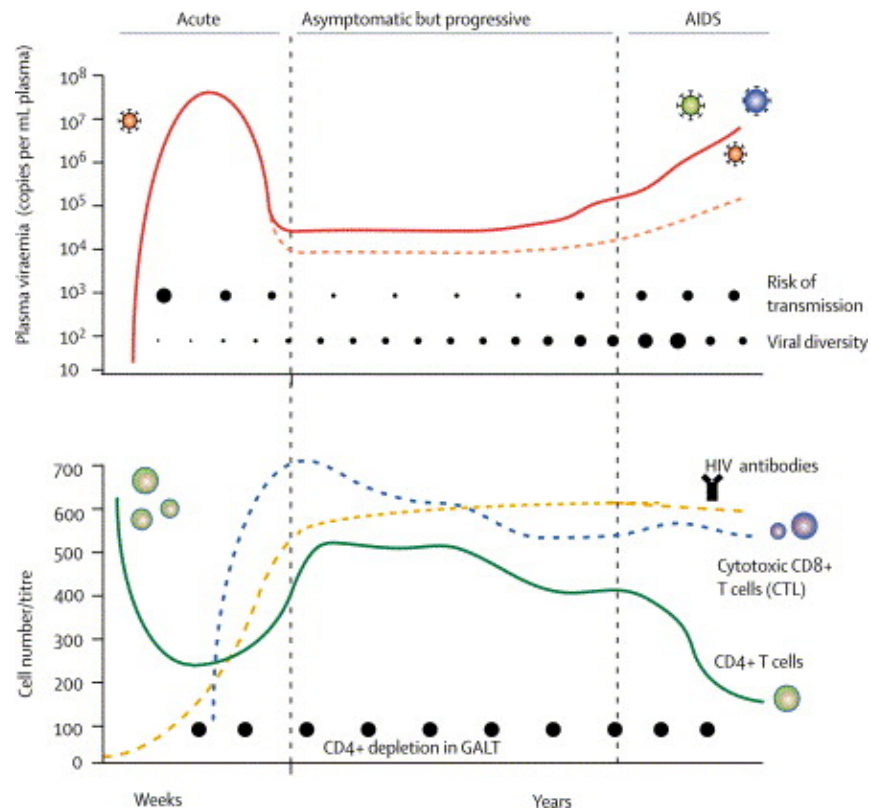


Figure 2: Évolution de la pathogenèse de l'infection au VIH-1.

L'infection débute à la phase éclipse où l'ARN viral plasmatique n'est pas encore détectable chez le patient. Durant les semaines qui suivent, la phase aiguë est marquée par une élévation importante de la charge virale plasmatique, un compte CD4⁺ bas et l'absence d'anticorps dirigés contre le VIH-1. La mise en place d'une réponse cytotoxique contre le virus permet de freiner la réplication virale et est suivie par l'apparition d'anticorps anti-VIH. À ce stade, c'est la phase chronique : la charge virale plasmatique et le compte CD4⁺ se stabilisent pour plusieurs années. Les souches virales continuent à se diversifier ce qui accompagne la destruction graduelle du compartiment T CD4⁺. Après plusieurs années, une dérégulation importante du système immunitaire conduit à une augmentation de la charge virale et à l'apparition d'infections opportunistes qui marquent la phase SIDA.

Tiré de Simon et coll., *The Lancet*, 2006, 368, p.489

Avec l'autorisation de Elsevier Limited

2.1 La phase éclipse, la phase aiguë, la phase chronique et la réponse immunitaire

D'abord, la phase éclipse marque le début de l'infection. Cette phase d'environ 10 jours représente le moment qui précède la détection de l'ARN virale dans le plasma. C'est la phase où le virus s'installe et commence sa réplication^{22,23}. S'ensuit la phase aiguë de l'infection qui se caractérise par une charge virale plasmatique élevée, un compte CD4 faible et une absence d'anticorps dirigés contre le VIH-1. Par la suite, durant la phase chronique, généralement asymptomatique, la charge virale diminue progressivement en raison de l'action des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques capables de contrôler partiellement la réplication virale, et une restauration incomplète du compte CD4 dans le compartiment plasmatique s'établit. L'apparition d'anticorps anti-VIH s'observe aussi à ce moment. Enfin, la destruction graduelle des lymphocytes T CD4⁺ naïves et mémoires, exacerbée par une activation immunitaire chronique et accompagnée du retour à une charge virale élevée dans le plasma, marquent la dernière phase de la maladie. Une dérégulation importante du système immunitaire est établie, et l'apparition d'infections opportunistes marque le début du syndrome de l'immunodéficience acquise : le SIDA^{10,19}.

Avant la transmission, un nombre élevé de quasi-espèces virales se retrouvent dans le sperme, les sécrétions vaginales ou le sang d'une personne en phase chronique²⁴. Malgré l'exposition à de multiples quasi-espèces virales, un seul virion est souvent responsable de l'infection productive chez l'individu nouvellement infecté²⁵⁻²⁷. La population, homogène au départ, se diversifie dans les différents compartiments biologiques à mesure que l'infection progresse¹⁹. L'étude génétique des souches virales présentes en début d'infection chez plusieurs patients montre une signature génétique de transmission dans la région V1/V2 de l'enveloppe¹⁷. La ressemblance entre les séquences de la région V1/V2 chez la majorité des souches transmises par différents patients soutient l'hypothèse d'un virus fondateur présentant des caractéristiques conservées. Ces caractéristiques comprennent l'usage du corécepteur CCR5, une conformation plus compacte de la région

V1/V2 de l'enveloppe avec une réduction du nombre de sites de glycosylation (« N-linked ») et un site conservé d'interaction avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ¹⁷. Cette intégrine est exprimée en surface des lymphocytes T CD4⁺ localisés aux muqueuses et permettrait la reconnaissance de cibles co-exprimant le CCR5 et capables de répliquer efficacement le virus¹⁷. Peu importe la voie de transmission utilisée par le virus, en quelques jours à peine, une répllication virale importante s'établit dans les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinale (GALT; « gut-associated lymphoid tissue ») où résident la majorité des CD4⁺, particulièrement dans la lamina propria, et mène à une déplétion importante des cellules T mémoires « resting » CD4⁺CCR5⁺ qui constituent majoritairement ce compartiment^{24,28,29}. Environ 20 % des cellules T CD4⁺ du GALT sont infectées par le VIH-1 durant la phase aiguë et 60 % de ces cellules sont activées puis meurent par apoptose en relarguant des microparticules apoptotiques anti-inflammatoires dans l'environnement³⁰. En définitive, environ 80 % des lymphocytes du GALT seront éliminés dans les trois premières semaines de l'infection²². Cette déplétion massive touche particulièrement les cellules T productrices d'interleukine 17 (T_H17) et exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ^{24,31,32}. La diminution rapide de ce compartiment s'expliquerait par une destruction directe des lymphocytes T CD4⁺ par l'infection au VIH-1³³, mais aussi par apoptose indirectement provoquée par l'infection²⁹. Chez les patients infectés, les cellules mémoires T CD4⁺ exprimant le CCR6 (marqueur du lignage T_H17 et permettant le recrutement aux muqueuses) présentent les plus hauts niveaux d'intégration d'ADN proviral³⁴. De plus, les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ exprimant CCR4 et CCR6, de lignage T_H17, et exprimant le CXCR3 et le CCR6, de lignage T_H1/T_H17, sont les plus permissives à l'infection au VIH-1 *in vitro*³⁴.

La destruction massive du GALT s'accompagne d'une inflammation importante qui encourage la répllication virale et provoque une perte d'intégrité de la barrière de la muqueuse intestinale^{35,36}. Durant la phase aiguë, la charge virale plasmatique atteint des niveaux entre 10⁶ et 10⁷ copies d'ARN viral par ml de sang¹⁹. Les lymphocytes T_H17 qui prédominent dans le tractus gastro-intestinal jouent un rôle de gardien contre les infections indésirables aux bactéries extracellulaires et aux champignons, et participent au maintien de

l'intégrité de la barrière épithéliale^{28,37} en favorisant la production de jonctions serrées entre les cellules épithéliales^{38,39}. La déplétion rapide du compartiment T_H17 dans les muqueuses du patient en phase aiguë provoque le passage de produits microbiens, tels que les lipopolysacharrides (LPS), les peptidoglycans, l'ADN bactérien CpG ou les flagelles dans la circulation sanguine³⁵. Ce phénomène de translocation microbienne conduirait à l'activation du système immunitaire inné via les récepteurs de la famille des Toll (TLR ou « Toll-like receptor »), qui reconnaissent des patrons moléculaires, et favoriseraient non seulement une inflammation locale mais aussi une activation systémique de la réponse immunitaire^{35,40}. La corrélation positive entre un niveau élevé de LPS dans le sang des patients en infection chronique et une forte activation immunitaire innée et adaptative appuie cette hypothèse⁴⁰. La perte d'intégrité de la barrière épithéliale se traduit aussi par l'augmentation plasmatique des niveaux d'E-cadherin solubles retrouvés chez les patients en phase chronique. E-cadherin, exprimée par les cellules épithéliales, forme les jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium intestinal et est largement redistribuée dans les muqueuses intestinales durant l'infection à VIH-1⁴¹. Un niveau d'activation immunitaire élevé est un indice de la progression vers le SIDA^{42,43}. De cette combinaison létale s'ensuivent une expansion rapide du VIH-1 et sa dissémination vers les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine. Une déplétion importante des lymphocytes T CD4⁺ mémoires⁴⁴ s'ajoute à l'établissement d'un réservoir de lymphocytes T CD4⁺^{18,45}. La fibrose qui se développe dans la zone T des ganglions lymphatiques ne permet plus de générer une réponse immunitaire efficace et de maintenir les populations T CD4⁺⁴⁶. À l'arrivée en phase chronique de la maladie, plusieurs mécanismes contribueront à la dépopulation des lymphocytes T CD4⁺. L'état constant d'activation immunitaire, la cytotoxicité induite par le virus, l'atteinte à la structure des compartiments des muqueuses et lymphatiques et la lymphopoïèse altérée⁴⁷ diminuent la survie des lymphocytes T CD4⁺ et leur capacité à repeupler les compartiments⁴⁶.

Les cellules « natural killer » (NK) qui répondent de façon non spécifique à l'infection sont les premières à initier le combat contre le VIH-1. Une expansion rapide des

populations de cellules NK se produit en phase aiguë⁴⁸. La capacité cytolytique des cellules NK permettrait de rapidement éliminer les cellules infectées^{49,50}. Cette capacité à lyser sa cible dépend de la balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs qu'elles reçoivent de la cellule infectée. Elle agit donc en première ligne de défense puisqu'elle reconnaît les cellules qui ont perdu l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou « human leucocyte antigen » (HLA) (signaux du soi) ou qui surexpriment les ligands d'activation des cellules NK (signaux de danger)⁵¹. Dans le cas de l'infection au VIH-1, le rôle des cellules NK n'a pas encore été totalement élucidé, mais leur activité durant la phase aiguë a été inversement corrélée avec la charge virale⁴⁸. Il semblerait que certaines combinaisons de génotypes particuliers d'un récepteur appartenant à la famille KIR (« killer cell immunoglobulin-like receptor ») (KIR3DS1, récepteur activateur et KIR3DL1, récepteur inhibiteur) et de son ligand HLA de classe I (HLA-Bw4-80I, contenant une isoleucine à la position 80 de son motif Bw4) soient associées avec un meilleur contrôle de la réplication virale^{52,53}. Quoiqu'il en soit, la réponse NK n'arrive pas à contrôler la réplication virale et décline avant de devenir dysfonctionnelle en phase chronique de l'infection^{48,50}.

La réponse adaptative se met en place au début de la phase aiguë, dans les premières et deuxièmes semaines suivant l'infection⁵¹ et permet aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) de contenir partiellement la réplication virale. La conservation d'une réponse T CD8⁺ polyfonctionnelle, c'est-à-dire une réponse effectrice caractérisée par la dégranulation de facteurs lytiques et la production de plusieurs cytokines incluant l'« interleukin-2 » (IL-2), l'« interféron- γ » (IFN- γ), le « tumor necrosis factor- α » (TNF- α) et le « macrophage inflammatory protein- β » (MIP-1 β), permet de retarder la progression, corrélant inversement avec la charge virale⁵⁴⁻⁵⁶. L'arrivée des CTL aux muqueuses et aux ganglions lymphatiques et leur persistance en phase chronique permettent la stabilisation de la charge virale et le maintien partiel du compartiment CD4⁵⁷. En phase chronique, la virémie atteint un plateau appelé « set point ». L'importance de la réponse CTL dans le contrôle de la charge virale est soulignée par le fait que la présence de certaines allèles du

HLA, responsables de présenter les épitopes aux CTL, tels que HLA-B57, -B58 et -B27, a été associée avec un meilleur contrôle de la réplication virale⁵⁸. Les peptides viraux présentés par ces HLA sont très conservés, et l'échappement à ce contrôle immunitaire n'est possible que par des souches dont la capacité répliquative est diminuée²⁴. Aussi, la réplication du virus entraîne une accumulation de lymphocytes T régulateurs (Treg) capables de supprimer la réponse antivirale dans les ganglions lymphatiques et les muqueuses intestinales chez le patient⁵⁹⁻⁶¹. Toutefois, l'émergence de cette population régulatrice contribue aussi à diminuer l'activation immunitaire^{62,63}.

Au même moment, la réponse adaptative humorale se met en place. Dans la première semaine suivant l'infection, les lymphocytes B, responsables de produire les anticorps, commencent à sécréter des immunoglobulines (Ig)M et IgG dirigés contre l'enveloppe du VIH-1⁶⁴. Ces premiers anticorps n'ont cependant aucun rôle à jouer dans le contrôle de la virémie, et ce n'est que trois mois plus tard que les premiers anticorps capables de neutraliser le virus ou de provoquer son opsonisation apparaissent^{24,65}. À ce moment, il est déjà trop tard, et la réponse humorale initiale n'est pas efficace^{24,65}.

La persistance de la réplication virale et la stimulation répétée du système immunitaire conduisent à une fatigue graduelle et globale de la réponse dirigée contre le VIH-1⁶⁶. Les CTL démontrent des signes d'épuisement immunitaire. Après un certain temps, l'expression de marqueurs d'épuisement cellulaire, comme « programmed-death 1 » (PD-1)^{67,68} et « T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molécule 3 » (Tim-3)⁶⁹ souligne la perte d'efficacité de cette réponse et la diminution graduelle des fonctions comme la sécrétion de cytokines, la prolifération et le potentiel cytotoxique⁷⁰. En plus d'une dysfonction des CTL, les patients en phase chronique de l'infection à VIH montrent une diminution du nombre de cellules dendritiques (DC), l'intermédiaire entre la réponse innée et adaptative, au niveau de la circulation sanguine et une apoptose augmentée de celles-ci⁵¹. Les lymphocytes T CD4⁺ démontrent aussi des signes d'épuisement en exprimant le « cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 » (CTLA-4)⁷¹ et PD-1⁷². L'augmentation de PD-1 a aussi été observée sur des monocytes, les précurseurs des

DC^{51,73}. L'altération des DC responsables de faire le pont entre l'inné et l'adaptatif contribue à la dérégulation de la réponse immunitaire et à l'impossibilité de mettre en place une réponse efficace. Les cellules B démontrent aussi des signes de fatigue et de dérégulation, marqués par l'hypergammaglobulinémie et la production d'anticorps autoimmuns⁶⁵.

La diversification importante de la population virale au fur et à mesure de l'évolution de l'infection permet la génération de mutants capables de fuir efficacement la réponse immunitaire de l'hôte. Échappant à la reconnaissance des cellules T cytotoxiques dès le début de l'infection, mais aussi aux anticorps neutralisants un peu plus tard, ces quasi-espèces sont archivées dans des réservoirs cellulaires et anatomiques¹⁹. De plus, la protéine accessoire du VIH-1, Nef, permet à la cellule infectée de passer inaperçue aux yeux de l'immunité innée et adaptative. Nef peut réguler sélectivement l'expression des molécules de HLA classiques et non classiques. En effet, l'action de Nef permet de diminuer l'expression de HLA-A et B favorisant l'échappement à la réponse CTL. De plus, en conservant HLA-C et E, la cellule infectée échappe à la lyse par les NK (Revu par⁷⁴).

L'inflammation incontrôlée qui perdure contribue à la pathologie associée à l'infection au VIH-1. Durant l'orchestration de la réponse immunitaire, les DC, suivies par d'autres types cellulaires (monocytes, macrophages, NK et T), sécrètent des cytokines pro-inflammatoires pour contrer l'infection au VIH-1. Cependant, cette tempête de cytokines contribuerait à l'hyperactivation immunitaire, à la dysfonction des DC et des B et à la déplétion des T CD4^{+24,65,75}. À la fin, la perte complète des cellules CD4⁺, la réactivation des réservoirs viraux suivie par un retour à une haute charge virale plasmatique et l'apparition d'infections opportunistes, provenant en partie des muqueuses intestinales qui n'arrivent plus à les contenir³⁵, favorisent la progression vers la phase SIDA qui aura ultimement raison de la vie du patient. Sans traitement, la progression vers la phase SIDA met de 7 à 10 ans⁷⁶ chez les patients qui progressent normalement.

2.2 L'avènement des antirétroviraux

L'arrivée de composés antirétroviraux sur le marché en 1987 fut la première lueur d'espoir dans la lutte au VIH/SIDA. L'arrivée de la zidovubine, un analogue nucléosidique destiné à inhiber la transcriptase inverse du VIH-1, a permis de mettre un frein à la réplication virale chez le patient⁷⁷. Rapidement, la communauté scientifique a dû admettre que la capacité du VIH-1 à se diversifier en cours d'infection résultait en une efficacité limitée et de courte durée de la monothérapie. Force était de constater que l'émergence rapide de résistances aux ARV venait jeter une nouvelle ombre au tableau. Au fur et à mesure que la communauté scientifique accumulait de nouvelles connaissances sur le virus du VIH-1, de nouvelles molécules capables d'inhiber la transcriptase inverse firent leur apparition. En 1995, une nouvelle cible, la protéase virale, permit de combiner le traitement pour en augmenter l'efficacité clinique⁷⁷. La trithérapie, ou HAART (« highly active antiretroviral therapy ») prouvait son efficacité à supprimer la charge virale et à réduire la mortalité chez le patient^{78,79}. En restaurant le compte des lymphocytes T CD4⁺ dans la circulation sanguine, HAART diminue la fréquence des infections opportunistes et permet le retour de fonctions immunitaires chez le patient⁸⁰. La restauration des CD4⁺ du GALT demeure cependant incomplète et se produit lentement^{81,82}. De nouvelles classes de médicaments, telles que les inhibiteurs de fusion, de l'intégrase et du corécepteur CCR5, ont fait leur apparition un peu plus tard, ajoutant au nombre de molécules possibles dans la combinaison de traitement⁷⁷.

Néanmoins, les effets adverses de la toxicité, bien que diminuant de beaucoup avec les nouvelles classes de médicaments, et le prix élevé de la thérapie ont rendu l'observance au traitement difficile pour le patient^{77,80}. L'émergence de résistances aux antirétroviraux est la conséquence d'une mauvaise observance et d'une suppression partielle de la réplication⁷⁷. L'utilisation de HAART dans les pays développés a transformé la maladie fatale qu'était le SIDA en maladie chronique, prolongeant la vie du patient de plusieurs années. Cependant, la guérison n'est pas encore envisageable. À ce jour, l'impossibilité de supprimer complètement la réplication virale par le traitement à HAART en raison des

réservoirs cellulaires⁷⁷ oblige le patient à continuer le traitement toute sa vie durant⁸³. La faible virémie qui persiste chez celui-ci contribue encore à activer des voies cellulaires participant au développement de maladies cardiovasculaires, de cancers ou encore de troubles neurologiques⁸³. Le coût des antirétroviraux a limité son accès dans des pays en voie de développement. En 2009, 5 millions de personnes recevaient des antirétroviraux dans le monde, représentant 35 % du nombre de gens qui en avaient besoin¹.

3. Les modes de transmission du VIH-1

Après la découverte du syndrome de l'immunodéficience acquise en 1981, il a fallu peu de temps à la communauté scientifique pour réaliser que ce nouveau syndrome, transmis par un virus isolé en 1983, n'était pas exclusif aux homosexuels, d'où sa première appellation (GRID ou « Gay-Related Immune Deficiency ») mais que les hémophiles, les utilisateurs de drogues injectables (UDI), les hétérosexuels, hommes et femmes, et certains enfants nés de mères infectées pouvaient tout aussi bien être les cibles de ce virus⁸⁴. Ainsi, le virus du VIH utilise trois routes de transmission différentes pour infecter son hôte. Ces trois routes sont la transmission sexuelle ou transmission par les muqueuses, la transmission parentérale et la transmission mère-enfant du VIH-1.

3.1 La transmission sexuelle

La transmission sexuelle est sans contredit la voie la plus répandue, elle qui compte pour plus de 80 % des nouvelles infections chaque année¹. La transmission sexuelle peut se produire à travers les muqueuses vaginale et rectale ou la muqueuse du prépuce du pénis. Déjà, dans les 7 à 21 jours suivant l'exposition des muqueuses, la détection d'ARN viral dans le sang est possible⁸⁵. Les événements qui précèdent l'infection à travers ces différentes muqueuses arrivent donc rapidement et ont particulièrement été étudiés chez le modèle de singe après l'inoculation vaginale ou rectale de celui-ci.

L'épithélium qui tapisse la muqueuse vaginale représente la première ligne de défense contre les infections. Le taux de transmission durant le contact hétérosexuel est

plutôt faible et varie entre 1/200 et 1/2 000 par exposition⁸⁵. Intacte, cette barrière est difficilement pénétrable. La sécrétion de mucus⁸⁶, le pH bas et la présence de peptides antimicrobiens limitent le passage du virus et favorisent son inactivation⁸⁷⁻⁸⁹. Le virus du VIH-1 exploite la zone de transformation, à la jonction entre l'endocervix et l'ectocervix du tractus génital féminin. À cet endroit, le renouvellement constant de la mince couche épithéliale lui permet plus facilement de trouver une brèche²³. L'inflammation du tractus génital féminin facilite aussi le passage du virus par l'amincissement ou la formation de brèche dans l'épithélium⁹⁰. L'épithélium rectal, pour sa part, est beaucoup plus mince et plus dommageable lors de relations sexuelles anales⁸⁷. Il a aussi été proposé que le virus traverse la barrière épithéliale, vaginale ou au niveau du prépuce, par transcytose ou via le contact direct avec les dendrites des DC intraépithéliales²². Le virus pourrait aussi se déplacer vers les espaces intercellulaires pour atteindre les T CD4⁺ sous-jacents ou les cellules de Langerhans^{22,91,92}, bien que leur rôle demeure encore incertain^{93,94}.

Le modèle de singe d'infection vaginale montre que c'est au point faible de l'épithélium qu'un petit foyer d'infection fait son apparition^{86,95}. Malgré l'exposition à une grande quantité de virus, l'infection dépend souvent d'un seul clone, le virus fondateur, qui infecte une population locale de cellules résidant dans les muqueuses, sous l'épithélium^{25-27,96}. Un seul virion est responsable de la transmission dans 80 % des cas de transmissions hétérosexuelles et dans 60 % des infections chez les hommes qui ont des relations sexuelles avec d'autres hommes^{25,97}. La population fondatrice est composée de lymphocytes T CD4⁺ « resting » et participe à l'expansion locale d'un foyer d'infection au VIH-1⁹⁶. La réponse initiée par les cellules épithéliales sert de combustible à l'expansion locale de la population infectée de CD4⁺. Les cellules épithéliales sécrètent MIP-3 α (CCL20) en réponse à l'exposition au virus, ce qui attire une population de DC plasmocytoïdes (pDC) vers le foyer d'infection de la muqueuse vaginale. L'expression de MIP-1 β par ces pDC appelle à son tour la migration de cellules T et de macrophages. Ces nouvelles cellules T alimenteront le foyer d'infection primaire et lui permettront d'atteindre une taille suffisante pour ensuite se disséminer aux ganglions lymphatiques drainants, puis aux GALT et aux

organes lymphoïdes secondaires^{23,95}. À ce stade, l'infection devient systémique, et la réponse immunitaire insuffisante ne peut contenir la réplication virale²³.

3.2 La transmission parentérale

La transmission parentérale se dit d'une transmission par inoculation intraveineuse. Les UDI représentaient 10 % des nouvelles infections au VIH en 2008¹. Une minorité des infections parentérales est causée par une exposition médicale (transfusion de produit sanguin contaminé) ou une injection accidentelle⁹⁸. En raison de l'absence de la barrière des muqueuses durant l'infection par inoculation intraveineuse, il a été proposé que la diversité des souches transmises soit plus importante que lors de la transmission sexuelle. Chez les UDI de Montréal, jusqu'à 16 virions différents peuvent causer une infection productive chez le patient⁹⁹. Toutefois, une étude menée sur les UDI de St-Petersburg en Russie apporte des preuves penchant plutôt vers la transmission d'un seul variant dans 70 % des cas de transmission¹⁰⁰. Il y aurait donc aussi un goulot d'étranglement génétique (« genetic bottleneck ») dans la transmission intraveineuse comme dans la transmission sexuelle. Suivant la transmission parentérale, l'évolution de l'infection de la phase aiguë vers la phase chronique demeure identique à celle chez le patient infecté par la voie des muqueuses¹⁰¹.

3.3 La transmission mère-enfant

La TME du VIH-1 peut se produire durant la grossesse (IU), durant l'accouchement (IP) ou durant l'allaitement (PP). Une des plus grandes réalisations dans la lutte au VIH est sans contredit la réduction importante du taux de transmission mère-enfant par des mesures de prévention efficaces et ce particulièrement dans les pays développés. L'utilisation d'ARV durant la grossesse et l'accouchement, la pratique de césarienne, l'évitement de l'allaitement et la prophylaxie néonatale ont permis de diminuer les taux de transmission de 14 à 42 % à 1 à 2 %². Une des premières études à donner le pas de la prévention de la TME est l'étude PACTG 076, menée dans une population qui n'allaitait pas. En donnant

oralement la zidovudine durant chaque jour de gestation, et ce, jusqu'à l'accouchement, puis par intraveineuse à l'accouchement et enfin, en prophylaxie orale au nouveau-né pour 6 semaines, l'étude a permis de réduire la transmission par 67 %, diminuant le taux de transmission de 25,5 % à 8,3 %¹⁰². Dans les années suivantes, un nouvel essai, HIVNET 012, offrant une solution plus simple par l'administration d'une seule dose de névirapine en début de travail suivi par une dose à l'enfant dans les 24 à 48 h suivant la naissance, prouvait aussi son efficacité en diminuant de 44 % le taux de TME¹⁰³. Adaptés pour d'autres études, ces premiers résultats ont contribué à déterminer à quel moment la TME s'accomplit. Dans une cohorte n'allaitant pas, environ 25 à 30 % des infections se produisent durant les dernières semaines de la grossesse. Chez les 65 à 70% d'enfants restants, l'infection arrive plutôt de façon IP. Cependant, chez les cohortes qui allaitent leur enfant pour une période prolongée (jusqu'à 2 ans), 15 % des cas de transmission se produisent IU, 40 à 50 % se produisent IP et 30 à 40 % des enfants sont infectés par le lait maternel^{3,104}. La capacité à différencier entre l'infection IU et IP est possible par la détection d'ADN viral dans le plasma de l'enfant à la naissance. La détection d'ADN viral par la méthode de « polymerase chain reaction » (PCR) lors de la naissance correspond à une infection IU. En revanche, si la détection est négative au moment de la naissance et positive dans les 7 à 90 jours suivant la naissance sans qu'il y ait eu d'allaitement, l'enfant est considéré infecté par voie IP⁴. L'enfant dont l'ADN viral plasmatique devient détectable subséquentement s'infecte par la voie PP, c'est-à-dire par l'allaitement. L'analyse du risque de transmission PP a permis de démontrer que le risque d'infection via le lait maternel est constant entre le premier mois de vie et le 18^e mois, atteignant 8,9 transmission par 100 enfants¹⁰⁵. Cette probabilité de s'infecter par l'allaitement est en fait similaire à la probabilité de s'infecter par relations sexuelles non protégées chez un adulte¹⁰⁶.

Encore aujourd'hui, la mise en place de programmes de prévention de la TME demeure difficile dans plusieurs pays à faibles ou moyens revenus. L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande la trithérapie contre la TME tout au long de la grossesse chez les femmes qui rencontrent les critères de traitement (compte CD4 \leq 350 cellules/mm³)

et l'initiation d'une thérapie prophylactique dès la 14^e semaine de grossesse chez la femme enceinte qui ne rencontre pas les critères de traitement. À cette prophylaxie maternelle s'ajoute l'administration d'un traitement à l'enfant pour les 4 à 6 premières semaines de sa vie ou pour la durée de l'allaitement¹⁰⁷. En 2009, une moitié seulement des femmes enceintes dans les pays à faibles revenus bénéficiaient du programme de prévention de la TME¹. Le suivi anténatal et postnatal difficile et le coût des ARV représentent un obstacle majeur à la mise en place d'un programme rejoignant une majorité des femmes enceintes. L'utilisation d'une seule dose de névirapine s'est avérée être une stratégie peu coûteuse mais favorisant l'émergence de souches résistantes aux ARV. Un échec du traitement causé par la présence de souches virales résistantes a été observé chez des mères qui initiaient la prise de thérapie incluant la névirapine dans les 6 mois suivant l'administration d'une seule dose de névirapine lors de leur accouchement¹⁰⁸.

Étant donné que la transmission par le lait maternel représente le tiers des infections chez les nouveaux-nés dans une population allaitante, le remplacement du lait maternel par le lait maternisé a contribué au succès des programmes de prévention de la TME dans les pays occidentaux. Cependant, de multiples études ont démontré que le remplacement du lait maternel dans les pays à faibles revenus était associé avec une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez les enfants. Le risque associé avec l'utilisation du lait maternisé dans des endroits où l'eau potable et l'hygiène sont limitées surpasse le risque de TME. Pour ajouter à cela, l'utilisation de stratégie mixte pour nourrir l'enfant s'est avérée être un échec cuisant. L'utilisation de lait maternisé, d'allaitement maternel et de nourriture solide pour l'enfant est associé à un risque de TME plus élevé que l'allaitement seul¹⁰⁹ (Revu par¹¹⁰).

L'évolution de la pathogénèse est plus rapide chez les enfants infectés par le VIH-1 en comparaison aux adultes infectés. La déplétion des lymphocytes T CD4⁺, la progression de la maladie et la mort surviennent plus rapidement chez les enfants provenant de pays en développement et s'accompagnent d'une charge virale élevée tout au long de la progression^{111,112}. Le tiers des enfants infectés meurent avant l'âge de 1 an dans les pays

africains et la moitié n'atteignent pas l'âge de 2 ans^{104,113}. De plus, les enfants qui ont acquis le VIH-1 après l'âge d'un mois présentent un meilleur contrôle de la réplication virale que les enfants ayant été infectés avant le premier mois de leur vie^{111,114}. L'exposition au VIH-1 chez les enfants qui demeurent non infectés n'est pas sans conséquences. En Afrique, le taux de mortalité chez les enfants nés de mères infectées, bien qu'ils demeurent non infectés eux-mêmes, s'avère plus important que celui des enfants qui ne sont pas exposés au VIH-1 (Revu par¹¹⁵). De plus, il semblerait que ces enfants exposés au virus naissent avec des capacités immunitaires anormales comparées à leurs homologues nés de mères négatives. En effet, plusieurs différences dans les proportions des populations de lymphocytes T sanguins ont été remarquées, et ce, particulièrement au niveau des lymphocytes T CD4⁺ totaux et naïfs qui sont diminués et de la mémoire immunitaire qui s'en trouve altérée¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Bien que plusieurs études se soient intéressées à l'important problème de santé publique que représente la TME du VIH-1, les mécanismes qui sous-tendent le passage du virus de la mère à l'enfant, que ce soit par le placenta ou par l'exposition des muqueuses, demeurent encore bien mystérieux. L'infection de macaques rhésus a servi de modèle pour l'étude de la transmission par voie orale chez les nouveaux-nés. Le nombre d'animal infecté nécessaire pour obtenir des résultats significatifs et le coût élevé qu'engendre une telle situation ont obligé l'utilisation de conditions menant à l'infection d'une majorité des nouveau-nés, favorisant donc l'inoculation orale au détriment de l'étude des mécanismes qui sous-tendent la transmission IU et IP¹¹⁹. Dans l'histoire naturelle de la transmission, plus de la moitié des enfants exposés au virus ne s'infectent pas. Pourquoi certains enfants sont-ils susceptibles à l'infection par le VIH-1 alors que d'autres demeurent protégés? Comment la barrière placentaire et les muqueuses de l'enfant peuvent-elles être traversées? Ces questions demeurent encore sans réponse, bien que de multiples éléments aient ajouté des pièces au casse-tête. Une meilleure compréhension globale des facteurs qui influencent la susceptibilité/protection de ces enfants exposés durant leur vie prénatale et postnatale et

des mécanismes impliqués dans les divers modes de TME est une prémisse au développement de nouvelles stratégies dans la lutte au VIH-1.

3.3.1 L'exposition par le placenta

La transmission IU qui a lieu durant la grossesse est susceptible de se produire par le passage de particules virales ou de cellules maternelles infectées à travers le placenta². Il a aussi été proposé que l'infection du liquide et des membranes amniotiques puissent jouer un rôle dans la TME^{2,120}, mais la rare présence de VIH-1 dans le liquide amniotique ne semble pas corrélérer avec l'infection fœtale¹²¹. C'est durant les deux derniers mois de grossesse que la plupart des infections IU se produisent^{3,104}. L'intégrité de la barrière placentaire semble importante pour contenir l'infection puisqu'il a été démontré que la perturbation de cette barrière par la chorioamnionitis, une inflammation des membranes fœtales causée par une infection bactérienne, est associée avec un risque augmenté de TME¹²²⁻¹²⁶.

La formation de la barrière placentaire débute dans les 6 à 7 jours suivant la conception. Les trophoblastes, couches de cellules en périphérie de l'embryon, s'attachent à l'épithélium de l'utérus. Dans les jours suivants, les trophoblastes se différencient en deux populations cellulaires. D'abord, les trophoblastes en première ligne de l'épithélium maternel fusionnent les uns avec les autres pour former un syncytium de cellules oligonuclées, les syncytiotrophoblastes, qui envahissent la paroi utérine. Ensuite, les cytotrophoblastes, au second plan, constituent une population de cellules mononuclées agissant à titre de cellules souches et leur fusion permet de renouveler la couche externe de syncytiotrophoblastes. C'est à ce moment que débute la formation de l'arborescence des vaisseaux sanguins, ou villosités, que représente le placenta. L'espace intervilloux se développe peu à peu dans la couche de syncytiotrophoblastes et se remplit d'un fluide clair composé de plasma maternel et de produit de sécrétions provenant des glandes utérines. La masse de syncytiotrophoblastes amorce alors la formation de projections digitiformes qui relieront la couche de cytotrophoblastes, le chorion, au tissu maternel, la caduque basale.

Ces projections digitiformes forment les villosités chorioniques et continuent de grandir jusqu'à leur arrivée aux artères spiralées dans la paroi utérine, où elles sont submergées par le sang maternel à la fin du premier trimestre de grossesse. L'arrivée du flux sanguin dans l'espace intervillieux permet l'apparition des membranes fœtales autour du chorion, et le placenta prend sa forme définitive. Le développement des vaisseaux sanguins de l'embryon se fait en parallèle avec les vaisseaux sanguins du placenta qui logent dans les villosités chorioniques. Après un certain temps, le cordon ombilical relie les deux types de vaisseaux et permet à l'embryon d'échanger de multiples substances, notamment des nutriments, de l'oxygène, des hormones, des anticorps et des déchets métaboliques avec la circulation maternelle. Les trophoblastes qui entourent les villosités baignent dans le sang maternel qui lui, n'entre jamais en contact direct avec la circulation sanguine fœtale. Sous la couche de trophoblastes composée de syncytiotrophoblastes et de cytotrophoblastes, les macrophages placentaires (cellules de Hofbauer), les fibroblastes et les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires sanguins fœtaux séparent la circulation maternelle de la circulation fœtale (Revu par¹²⁷). La figure 3 montre la structure d'un placenta humain à terme.

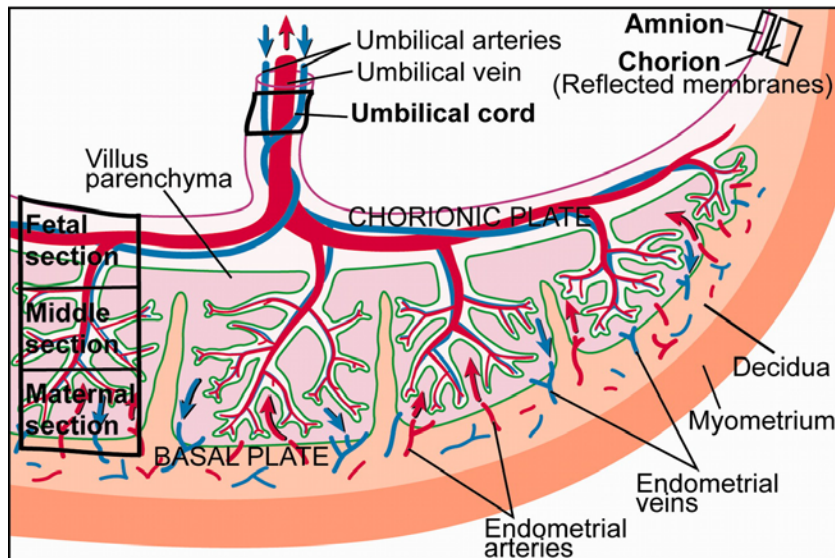


Figure 3: Représentation schématique d'un placenta humain à terme

Le placenta humain se compose d'une arborescence de villosités placentaires baignant dans le sang maternel. Ces villosités sont formées par les trophoblastes d'origine fœtale qui régissent les échanges entre la mère et l'enfant. Ils contiennent les capillaires placentaires responsables de fournir nutriments, oxygène et anticorps au fœtus et à déléster la circulation fœtale de ses déchets.

Tiré de Sood et coll. PNAS, 2006, 103(14), p. 5478-5483

Avec l'autorisation de la National Academy of Sciences, USA

Que l'enfant s'infecte ou non par le VIH-1, le matériel génétique viral est retrouvé au niveau du placenta. La présence de virus a été détectée chez les trophoblastes qui délimitent l'interface entre la mère et l'enfant, les cellules de Hofbauer et les cellules stromales qui, toutes les deux, juxtaposent les capillaires placentaires sous la couche de trophoblastes^{122,128-130}. Il semblerait même que 18 % des enfants non infectés nés de mères positives présentent des traces de génome viral partiellement rétrotranscrit dans les cellules du sang périphérique². Ellis et collaborateurs ont observé la présence d'ADN proviral intégré dans les cellules du sang de cordon chez 27 % des cas étudiés alors que la totalité des placentas correspondants contenaient des séquences virales et que, malgré cela, le taux de TME se situait sous la barre des 3 %¹³¹. Ceci laisse croire que le VIH-1 pourrait atteindre le fœtus, mais que l'absence de cibles adéquatement activées ne permettrait pas

l'établissement d'une infection productive². Chez le nouveau-né, les lymphocytes T CD4⁺ mémoires, qui représentent les cibles de choix pour le VIH-1 puisqu'ils expriment le CD4 et le CCR5, sont de 6 à 7 fois moins abondants que les lymphocytes CD4⁺ naïfs¹³². Chez l'enfant comme chez l'adulte, l'utilisation du CCR5 comme corécepteur est de loin le plus fréquent dans les cas de transmission¹³³⁻¹³⁶. Il y aurait donc une plus faible disponibilité de lymphocytes exprimant le CCR5 dans le sang de cordon pour nourrir l'infection, ce qui expliquerait que malgré l'exposition au virus, peu d'enfants développent une infection productive, ce qu'on observe chez le singe^{137,138}. Cependant, il semble que les niveaux de réplication du VIH-1 après infection *in vitro* soient plus élevés dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et mémoires et les macrophages dérivés de monocytes du sang de cordon que chez ceux du sang périphérique de l'adulte^{139,140}. Contrairement aux singes, cette différence de capacité répliquative du VIH-1 dans les lymphocytes du sang de cordon ne s'expliquerait pas par une diminution des niveaux d'expression du CCR5 sur ces cellules puisqu'ils sont similaires aux niveaux retrouvés sur une cellule d'adulte^{139,141}. De quelle façon le virus franchit-il la barrière placentaire pour rejoindre la circulation fœtale? Quelques mécanismes ont été proposés.

3.3.1.1 La transcytose du VIH-1 à travers les trophoblastes

D'abord, la barrière placentaire, avec les trophoblastes en première ligne, semble permettre le passage du VIH-1 par transcytose du virus du côté de la circulation maternelle vers la circulation fœtale. La transcytose est un procédé cellulaire qui permet au virus de transiter du côté apical de la cellule polarisée vers le côté basal en empruntant la machinerie endosomale¹⁴². L'utilisation de lignée trophoblastique provenant de choriocarcinomes (BeWo, JAR, ou JEG-3) a permis l'étude *in vitro* de l'interaction entre le VIH-1 et la couche de trophoblastes polarisés. À l'aide de ce modèle, il a été démontré qu'il était possible pour une particule virale de voyager du côté apical du trophoblaste, face à la circulation maternelle, au côté basolatéral de celui-ci, lui permettant de rejoindre les cellules stromales fœtales sous-jacentes^{142,143}. Cette particule peut cependant emprunter la

voie de recyclage et être rejetée dans la circulation maternelle, ce qui restreint du même coup le passage du virus vers l'enfant¹⁴⁴. Ce passage viral par transcytose semble être le fruit d'une interaction entre une cellule maternelle infectée et le trophoblaste plutôt que le résultat de l'entrée dans le trophoblaste d'une particule virale libre provenant du sang maternel^{143,145}.

3.3.1.2 *L'infection des cellules placentaires*

Par la suite, il a été proposé que l'infection des trophoblastes en soi, par contact cellule-cellule^{143,146} ou via l'endocytose du virus, pourrait jouer un rôle dans le passage du VIH-1 à travers la barrière placentaire^{142,147}. En plus de permettre le passage rapide de la particule virale par transcytose, le contact entre le trophoblaste et la cellule maternelle infectée favorise la fusion entre les deux cellules, provoquant la réplication des particules virales dans le trophoblaste et leur dissémination subséquente vers le côté basal du trophoblaste^{143,147}. Le processus de réplication virale dans cette cellule ne dépend pas de l'interaction entre l'enveloppe virale et le CD4, mais dépendrait plutôt de l'interaction avec les protéoglycans de sulfate d'héparane (« proteoglycans heparan sulfate ») exprimés à sa surface. Dans les lignées trophoblastiques, cette interaction entre les protéoglycans et le virus conduit à l'internalisation des particules virales^{148,149}. Après l'internalisation, le VIH-1 voyage des endosomes précoces aux endosomes tardifs et cause une infection de la cellule¹⁴⁴. Le niveau de relâche virale du trophoblaste demeure cependant très faible¹⁵⁰. L'endocytose du VIH-1 dirige une partie des virions vers la dégradation par le protéasome, mais aussi de façon indépendante du protéasome^{142,144,149}. Quelques auteurs ont rapporté une restriction de la réplication virale chez le trophoblaste, toujours dans des modèles de choriocarcinomes, et ce, malgré sa capacité à internaliser le VIH-1¹⁴⁹. Cette restriction prend place avant l'intégration du génome viral, même en présence du CD4, du CCR5 ou du CXCR4 artificiellement exprimé¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Cette restriction à l'infection par le VIH-1 du trophoblaste ne résiderait donc pas seulement dans l'absence du récepteur ou corécepteur sur la cellule mais, prendrait place après l'entrée dans celle-ci. L'infection directe des

trophoblastes *in vivo* demeurent cependant controversée. La faible expression du CD4 sur les trophoblastes, indétectable dans certain cas, et la variation de l'expression de CXCR4 et de CCR5 entre le premier et le troisième trimestre de grossesse soulèvent la question de la réelle capacité du VIH-1 à induire une infection productive chez ces cellules qui constituent la porte d'entrée pour le virus¹⁵²⁻¹⁵⁸.

L'infection des populations cellulaires sous-jacentes à la couche de trophoblastes a aussi été étudiée. Les macrophages placentaires ou cellules de Hofbauer expriment le CD4 et le CCR5. Il a été démontré qu'il était possible de les infecter *in vitro*¹⁵⁹⁻¹⁶³ de même que le matériel génétique du VIH-1 a été détecté dans les cellules de Hofbauer chez plusieurs placentas de femmes séropositives^{128-130,164}. Cependant, les cellules de Hofbauer auraient la capacité de produire beaucoup moins de virions que les macrophages dérivés de monocytes (MDM)^{159,160,163}. Cette différence de production virale s'expliquerait, d'une part, par la faible expression de CCR5 à leur surface¹⁶² et, d'autre part, par l'expression de facteurs de restriction capables d'empêcher la réplication productive du VIH-1¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Le groupe de Menledez a démontré que la faible expression de la cystasin B, un inhibiteur de la cystéine protéase, corrèle avec une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription STAT-1^{165,166}. Il en résulterait une diminution de la transcription du VIH-1 dans les macrophages placentaires¹⁶⁸.

Une seule étude s'est intéressée au rôle des fibroblastes dans le passage transplacentaire du VIH-1. Cette étude a rapporté que les fibroblastes du placenta, n'exprimant pas le CD4, pouvaient s'infecter de façon latente¹⁵⁶. Bien que le placenta ne semble pas être un haut lieu de production virale, la présence de matériel génétique viral et la capacité à stocker le VIH-1 de la plupart des populations cellulaires qui le constituent semblent en faire un réservoir viral de premier choix. Malgré cela, il n'en demeure pas moins que plus des deux tiers des enfants exposés durant leur vie intra-utérine ne s'infectent pas par le VIH-1³.

3.3.1.3 La perte d'intégrité de la barrière placentaire

Enfin, une perte d'intégrité de la barrière placentaire, via des brèches ou une interruption locale de la couche de trophoblastes, pourrait aussi être à la source du passage de cellules maternelles infectées ou de particules virales vers la circulation fœtale¹⁶⁹. *In vitro*, l'activation par le LPS ou l'IFN- γ des monocytes maternels circulants permet leur adhérence à la barrière de trophoblastes via LFA-1 (« lymphocyte function-associated antigen-1 »). L'expression de TNF- α par ces monocytes adhérents conduit à l'apoptose des trophoblastes, produisant des dommages à la barrière¹⁷⁰.

Ces dommages n'expliqueraient pas seulement la transmission IU du VIH-1, mais pourraient aussi expliquer une partie des cas de transmission survenant à l'accouchement dans les premiers stades du travail alors que les contractions utérines s'intensifient et que les membranes se rompent. Cette situation pourrait favoriser la perte d'intégrité de la barrière placentaire dans certains cas, laissant passer des cellules maternelles dans la circulation, phénomène appelé la microtransfusion^{171,172}. La présence d'ADN maternel a été rapportée dans les ganglions lymphatiques fœtaux, témoignant du passage de cellules immunitaires de la mère vers le fœtus¹⁷³. Le passage de cellules maternelles vers la circulation fœtale a été proposé comme voie possible de transmission pour d'autres pathogènes transmis verticalement comme les hépatites B, C et G^{172,174,175}. Le passage de la phosphatase alcaline placentaire (PLAP) vers le sang de cordon permet de mesurer les événements de microtransfusion entre la mère et l'enfant^{171,172}. En mesurant l'activité de PLAP dans le sang de cordon, l'équipe de Kwiek a associé la microtransfusion durant l'accouchement vaginal avec un risque augmenté de transmission IP dans une cohorte de TME du Malawi¹⁷⁶. Quelques années plus tard, la même équipe reconfirmait son association en quantifiant la présence d'ADN maternel dans le sang de cordon, par typage de HLA comparatif¹⁷⁷. Cette hypothèse demeure encore incertaine puisque ces résultats n'ont pu être confirmés dans d'autres cohortes du Malawi^{178,179}.

Quoiqu'il en soit, malgré qu'il soit possible de détecter la présence de virus dans le placenta, cela ne mène pas irrémédiablement à l'infection de l'enfant. Le passage du virus à travers la couche de trophoblastes et sa présence dans les populations sous-jacentes n'entraînent pas invariablement l'infection du fœtus. Une fois au placenta, le virus doit encore se disséminer chez l'enfant et causer une infection productive.

3.3.2 L'exposition par les muqueuses

Bien que le VIH-1 réussisse dans certains cas à traverser la barrière placentaire, il n'en demeure pas moins que la majorité des infections verticales se produisent par l'exposition de l'enfant par les muqueuses. En effet, l'infection par voie IP résulterait aussi du contact entre les muqueuses immatures de l'enfant et le sang ou les sécrétions vaginales infectés de la mère pendant son passage dans le canal utérin². En avalant les fluides maternels contenant des particules virales, le nouveau-né s'expose à l'infection par les muqueuses buccales ou intestinales. De l'ARN du VIH-1 d'origine maternelle a été détecté dans des prélèvements oropharyngés et gastriques chez près du tiers des enfants nés de mères séropositives¹⁸⁰. L'introduction systématique de l'accouchement par césarienne plutôt que par voie vaginale chez les mères VIH-1 positives dans les pays développés a permis de réduire considérablement le taux de transmission via l'exposition aux fluides maternels¹⁸¹. Il a été rapporté que l'exposition de l'enfant au VIH-1 dans le canal utérin jouait un rôle important dans la transmission. Pour soutenir cette hypothèse, deux études portant sur la susceptibilité à l'infection de couples de jumeaux ont montré que le risque d'infection était plus important chez le premier jumeau à naître^{182,183}. Cependant, l'utilisation d'agent virucide pour nettoyer le canal utérin avant l'accouchement n'ayant pas porté fruit et le fait que l'ordre de naissance des jumeaux n'affectent pas le risque d'infection dans une étude incluant beaucoup plus de couples de jumeaux remettent en doute le rôle majeur de l'exposition au canal utérin dans la transmission IP¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

De la même manière, durant l'allaitement, les muqueuses orales et gastro-intestinales de l'enfant sont en contact avec les virions contenus dans le lait maternel.

Chaque jour, le nouveau-né est exposé à une grande quantité de virions, libres ou associés aux cellules maternelles¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ (Revu par¹⁹⁰). L'exposition aux particules virales du lait maternel corrèle avec le niveau de risque d'infection PP chez les enfants exposés. Les nouveau-nés qui s'infectent par voie PP ingèrent 15 fois plus de particules virales que leurs homologues qui demeurent négatifs malgré qu'ils soient allaités par une mère infectée¹⁹¹. Les virions retrouvés dans le lait maternel peuvent être produits par une réplication locale dans les macrophages¹⁹² et dans les lymphocytes T CD4⁺ activés¹⁹³. Les cellules épithéliales des glandes mammaires, bien qu'elles ne supportent pas l'intégration du VIH-1, peuvent séquestrer les virions par endocytose pour ensuite les relâcher vers la lumière contenant le lait, contribuant au relargage de particules provenant du sang et favorisant l'infection des lymphocytes T CD4⁺ du lait maternel^{194,195}. Il a cependant été rapporté que les cellules épithéliales des glandes mammaires pouvaient être infectées de façon productive et participer à la génération des particules virales retrouvées dans le lait maternel^{196,197}. Toutefois, l'expression d'ABOPEC3B et 3G par les cellules épithéliales des glandes mammaires limiterait la production de particules virales infectieuses dans le lait¹⁹⁸.

L'intégrité des muqueuses gastro-intestinales de l'enfant demeure donc indispensable pour contenir le virus ingéré et l'empêcher de causer une infection¹⁹⁰. À ce titre, la présence de muguet (candidose) qui perturbe l'intégrité de la muqueuse buccale chez le nouveau-né est associée avec un plus haut taux de transmission postnatale dans une cohorte du Kenya¹⁹⁹. L'allaitement mixte augmente aussi le risque d'infection PP chez le nouveau-né en créant des dommages aux muqueuses gastro-intestinales encore immatures de l'enfant²⁰⁰. Le sevrage au lait maternel favorise l'activation immunitaire dans les muqueuses gastro-intestinales de l'enfant et augmente la charge virale dans le lait^{201,202}. C'est pourquoi, l'OMS recommande l'allaitement exclusif lorsque les conditions sanitaires ne sont pas optimales¹⁰⁷. L'allaitement exclusif dans les premiers mois de vie permettrait de limiter la translocation microbienne, de maintenir l'équilibre de la flore commensale, et d'induire la sécrétion de facteurs immunorégulateurs, comme TGF- β , pour conserver l'intégrité des muqueuses²⁰³⁻²⁰⁵ (Revu par¹⁹⁰). La perturbation de ce fragile équilibre

pourrait promouvoir le passage du VIH-1 à travers la barrière épithéliale et favoriser l'infection postnatale de l'enfant.

Malgré qu'il subsiste encore plusieurs interrogations quant aux mécanismes impliqués dans le passage du VIH-1 entre la mère et l'enfant, plusieurs facteurs obstétricaux, génétiques, virologiques et immunologiques ont déjà été identifiés et influencent le cours de l'infection. Ces facteurs seront décrits au prochain chapitre.

4. Les facteurs influençant la TME du VIH-1

Plusieurs facteurs ont montré avoir une influence sur le risque d'infection au VIH-1 de l'enfant né ou à naître. L'infection au VIH-1 est la résultante de l'interaction entre de multiples facteurs; des facteurs de l'hôte et du virus lui-même.

4.1 Les facteurs maternels obstétricaux et cliniques

L'état d'avancement de la maladie de la mère au moment de l'accouchement et durant l'allaitement et son taux de lymphocytes T CD4⁺ figurent parmi les facteurs qui influencent le risque de TME²⁰⁶. Plus une mère présente des signes d'avancement de la maladie et plus son compte CD4 est bas, plus elle aura des chances de transmettre le VIH-1 à son enfant. Le meilleur indicateur de la TME demeure la charge virale maternelle à l'accouchement. Bien qu'aucun seuil de transmission n'ait été établi, le risque de transmission augmente de pair avec l'augmentation de la charge virale²⁰⁷⁻²¹⁰. Chez les femmes dont l'ARN viral plasmatique est sous la barre des 1000 copies/ml, la TME survient dans moins de 1% des cas²¹¹, particulièrement lorsque celle-ci reçoit des ARV²¹². Au placenta, une charge virale équivalente ou supérieure à la charge virale maternelle est observée dans les cas de transmission IU et une charge virale placentaire inférieure à la charge maternelle est mesurée quand il n'y a pas de transmission²¹³. Dans le lait maternel par contre, les quelques études qui ont mesuré la charge virale n'ont pas réussi à démontrer une corrélation entre une charge virale élevée et un risque augmenté de TME par voie PP^{189,214}. Pourtant, l'inflammation des glandes mammaires et la séroconversion durant la période d'allaitement a été associée avec une charge virale plus élevée dans le lait maternel et un taux de transmission postnatal augmenté^{206,214-217}. La prise d'ARV par la mère contribue à diminuer transitoirement la charge virale du lait maternel et collabore de cette manière à la diminution de la transmission PP^{218,219}. L'état nutritionnel de la mère aurait aussi un rôle à jouer puisqu'une carence en vitamine A ou D ou une déficience en micronutriments augmentent la TME²²⁰⁻²²³. Malheureusement, la complémentation en vitamine A n'a pas eu l'effet escompté sur la réduction du taux de transmission²²⁴⁻²²⁸.

En plus des facteurs maternels cliniques qui influencent le risque de TME, le mode, le stade de la grossesse au moment de l'accouchement et la durée de rupture des membranes présentent des conséquences sur le risque de transmission. La césarienne électorale et la rupture des membranes amniotiques avant le début du travail réduisent considérablement le risque de TME en comparaison à l'accouchement vaginal. Combinée à la prise d'ARV, cette pratique prévient jusqu'à 87 % des infections mère-enfant²²⁹. Une étude a rapporté que chaque heure supplémentaire de rupture des membranes amniotiques jusqu'à concurrence de 24 h augmentait de 2 % le risque de TME²³⁰. Un accouchement prématuré et un faible poids à la naissance, deux facteurs en corrélation, sont aussi associés avec un risque augmenté de TME (Revu par^{2,104}).

4.2 Les facteurs virologiques

La transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant se fait selon un principe de sélection en goulot d'étranglement, comme dans les transmissions sexuelle et parentérale. L'infection chez l'enfant est généralement initiée par un seul ou un nombre limité de variants viraux provenant de la population hétérogène de la mère. Il semblerait que ce soit majoritairement un seul variant des sous-types moins abondants des quasi-espèces maternelles qui soit transmis²³¹⁻²³³. Toutefois, cela ne semble pas être vrai dans tous les cas puisque des études ont également rapporté qu'il pouvait y avoir transmission de multiples variants et du sous-type majeur²³⁴⁻²³⁷. Le virus transmis à l'enfant proviendrait de différents compartiments maternels. Les séquences retrouvées chez l'enfant sont généralement plus ressemblantes à celles des PBMC (« peripheral blood mononuclear cell ») maternels ou des sécrétions vaginales qu'aux particules libres du plasma²³⁸. Il y aurait aussi un cloisonnement de la réplication virale dans le placenta. Les souches virales observées dans des échantillons provenant du placenta divergent de celles du plasma maternel et montrent que le virus s'adapte aux cellules qui constituent le placenta²¹³. Dans le lait maternel, le cloisonnement de la réplication virale est rare et les virus retrouvés dans ce compartiment sont génétiquement semblables aux virus du plasma de la mère, indiquant un échange

continu entre les populations du lait maternel et celles du plasma chez la majorité des mères^{239,240}.

Après l'infection, le variant transmis se diversifie chez l'enfant pour devenir à nouveau une population hétérogène. Comme le virus fondateur qui initie la transmission sexuelle, le variant transmis à l'enfant utilise le CCR5¹³⁴ et présente un nombre restreint de site de N-glycosylation et une boucle variable plus courte dans l'enveloppe^{241,242}. Cependant, une étude conduite sur cinq paires mère-enfant d'Ouganda a répertorié certains cas de transmission de souches maternelles X4 ou R5X4²⁴³. Le sous-type viral influencerait aussi la TME puisqu'une étude conduite en Tanzanie a observé que le sous-type C, par opposition aux sous-types A ou D, est plus propice à être transmis par voie IU²⁴⁴. Au Kenya, le sous-type D s'est montré être plus commun dans les cas de TME que le sous-type A²⁴⁵ mais cette observation ne s'est pas confirmée dans une étude en Ouganda²⁴⁶.

L'étude des séquences virales entre les paires mère-enfant infectées au VIH-1 a permis d'identifier les caractéristiques du virus impliquées dans les cas de TME et d'étudier la dynamique évolutive des souches transmises. La pression de conservation exercée sur la souche virale conduit à la préservation de la structure du VIH-1. Très peu de diversité entre les séquences maternelles et de l'enfant ont été identifiées dans les régions structurelles ou régulatrices du VIH-1 comme Gag; la nucléocapside; le domaine p6; Rev; son domaine de liaison RRE (« Rev responsive element »); et Tat²⁴⁷⁻²⁵¹. La protéine Nef, impliquée dans la pathogenèse virale, est aussi très conservée entre la mère et son enfant, bien qu'elle diverge un peu plus que Gag et Pol, qui elles, demeurent très conservées^{248,252}. L'immunité de l'enfant exerce déjà une pression sur le virus puisqu'il continuerait à se diversifier de celui de sa mère²⁴⁸.

La diversification limitée du nombre de quasi-espèces virales chez la mère semble associée à une réduction de la TME²⁵³. Un haut degré de conservation des régions structurelles du VIH-1 a été rapporté chez les mères qui ne transmettent pas le VIH-1. Les séquences codantes de la protéine de la matrice p17 sont conservées chez les mères qui ne

transmettent pas le VIH-1 et certains motifs d'acides aminés dans p17 ont été identifiés uniquement chez ces mères^{254,255}. Peu de différences ont été observées dans les séquences de l'enveloppe et de la protéine Nef entre les mères qui transmettent le VIH-1 à leur enfant et celles qui ne le transmettent pas^{256,257}. En contrepartie, les protéines accessoires du VIH-1, Vif et Vpr, semblent plus conservées chez les mères qui transmettent le VIH-1 comparativement à celles qui ne le transmettent pas²⁵⁸⁻²⁶⁰. Vif et Vpr présentent même des codons de terminaison précoce et une fonction diminuée chez les mères qui ne transmettent pas le VIH-1²⁵⁸. En définitive, l'altération des protéines accessoires du VIH-1 semble plus fréquente chez les mères qui ne transmettent pas le virus que chez celles qui le transmettent à leur enfant.

4.3 Les facteurs génétiques

L'issue de l'infection ne dépend pas seulement des caractéristiques du bassin viral qui peuple la mère, mais dépend aussi de la réponse de l'enfant face à cette invasion. L'efficacité de cette réponse est façonnée par son bagage génétique. Des variations génétiques, ou polymorphismes, localisées au niveau des gènes impliqués dans l'interaction avec le virus ou dans la réponse immunitaire ont été identifiés chez différents groupes ethniques et influencent la TME.

Un des facteurs génétiques qui affectent le plus l'évolution de l'infection au VIH-1 est sans doute la présence de certains allèles du HLA de classe I. Les gènes de HLA sont parmi les plus polymorphiques et permettent de sculpter la réponse immunitaire adaptative. Certains allèles de HLA-A, -B et -C codent pour des acides aminés spécifiques dans leur poche peptidique et présentent des peptides viraux particuliers aux CTL. La présentation de ces antigènes particuliers engendre une réponse CTL capable de contrôler la réplication virale⁵⁸. La diversité des allèles de HLA, autant de classe I que de classe II, permet d'élargir le répertoire de présentation et de générer une plus grande diversité dans la réponse immunitaire. Les individus, adultes et enfants, porteurs des allèles HLA-B*57 et

HLA-B*27 progressent beaucoup moins rapidement vers le SIDA que ceux qui ne les portent pas^{58,261}.

La TME du VIH-1 présente un environnement de transmission exceptionnel. Une mère partage au moins la moitié de ces gènes du CMH avec son enfant, soit 3 sur 6. La possibilité devient donc beaucoup plus grande que la transmission d'une souche virale échappant à la réponse maternelle échappe aussi à la réponse de l'enfant. Ainsi, une forte concordance entre le nombre d'allèles de HLA partagés entre la mère et son enfant favoriserait la transmission de mutants d'échappement. Dans le même ordre d'idée, une plus grande discordance entre les allèles du HLA pourrait générer une réponse alloréactive chez l'enfant, se soldant par la lyse des cellules maternelles infectées et la protection contre la transmission verticale. Cette protection serait absente chez l'enfant présentant un grand nombre d'allèles concordants avec ceux de sa mère. Cependant, l'allostimulation des cellules maternelles par les cellules fœtales augmente aussi l'activation immunitaire, la prolifération et la réplication virale *in vitro*²⁶². C'est dans cette perspective que plusieurs études se sont intéressées aux allèles de HLA dans le TME. Dans une première cohorte du Kenya, McDonald et ses collaborateurs ont associé la concordance des allèles de HLA-A, -B et -C entre la mère et l'enfant avec un risque augmenté de 2 fois de transmission IU, IP et PP, et ce, de manière graduelle avec un risque de plus en plus important chez les paires mère-enfant qui partagent le plus grand nombre de loci, soit 6 sur 6²⁶³. Cette association s'est répétée chez les Kényans et les Américains^{264,265}. La concordance des HLA semble cependant n'avoir un effet que sur les CMH de classe I, et encore, certaines études n'ont pu reproduire cette association^{264,266,267}. Les mères homozygotes pour les loci de HLA n'ont pas la capacité de présenter un large répertoire d'épitopes, ce qui engendre une moins grande pression immunitaire sur le virus. Le fait de présenter un répertoire moins diversifié a été associé avec un risque augmenté de TME, autant IU que IP et PP²⁶⁸.

Certains allèles influencent la TME. Être porteuse de l'allèle HLA-A*2301, -B*1302, -B*3501, -B*3503, -B*4402 et -B*5001 favorise la transmission du VIH-1 à son enfant de façon précoce (IU) ou tardive (IP et PP) chez des mères d'origine africaine ou

hispanique^{266,268}. En contrepartie, une mère porteuse des allèles -B*5301 et -B*4909 et présentant une charge virale élevée est moins à risque de transmettre le VIH-1 à son enfant²⁶⁶.

Le polymorphisme de HLA de l'enfant peut aussi avoir une influence sur son risque d'acquérir le VIH-1 lorsqu'exposé durant sa vie intra- et post-utérine. Une étude menée au Kenya a montré que la présence de l'allèle HLA-B*18 chez l'enfant diminue de 74 % ses chances de s'infecter au VIH-1 avant le premier mois de sa vie, et ce, indépendamment des facteurs de la mère²⁶⁹. Encore au Kenya, l'enfant porteur de la famille d'allèle englobé dans les HLA-A2/6802 a 7 fois moins de chances de s'infecter par le VIH-1 avant ou durant la naissance²⁷⁰. Une étude dans la population américaine a démontré l'influence du CMH de classe II sur le risque d'acquisition du VIH-1. Les allèles de HLA classe II gouvernent la présentation des antigènes pour la génération de la réponse T auxiliaire. Les enfants d'origine africaine et hispanique porteurs de l'allèle HLA-DRB1*13 sont protégés contre l'acquisition du VIH-1²⁷¹. Chez les progressseurs lent à long terme, la présence de l'allèle DRB1*13 corrèle avec une aide efficace et soutenue des lymphocytes T CD4⁺ dirigés contre le VIH-1 et contribuerait à un meilleur contrôle de la réplication virale^{272,273}. Chez les enfants d'origine caucasienne, c'est l'allèle HLA-DRB1*1501 qui est responsable d'un effet de protection semblable²⁷¹.

Enfin, l'effet du polymorphisme du HLA non classique, HLA-G, a aussi été étudié dans le contexte de la TME. Contrairement aux HLA de classe I et II (à l'exception de HLA-C), HLA-G est exprimé par les trophoblastes, ce qui les protège de la lyse par les cellules NK maternelles. Il a été montré que la discordance entre la mère et l'enfant pour l'allèle de l'exon 2 au codon 57 de HLA-G, de la région exon 8-3'UTR (variants 3742T/C, 3743C/T et 3777G/C) ou de la région 5'UTR (variants 634C/G et insertion T/G en position 714) réduisait le risque de transmission périnatale dans une cohorte new yorkaise^{274,275}. De plus, au Brésil, les enfants porteurs de l'haplotype D comprenant une délétion de 14 paires de bases, seule ou en combinaison avec la mutation -3777C (haplotype DC) sont protégés

contre l'infection verticale^{276,277}. Cette association n'a cependant pas été reconfirmée dans une étude mère-enfant du Zimbabwe²⁷⁸.

La combinaison des allèles de HLA-C et des récepteurs inhibiteurs de cellules NK de la famille des KIR (KIR2DL2 et KIR2DL3) module aussi le risque de transmission périnatale du VIH-1 autant au niveau de la susceptibilité de l'enfant que de la transmissibilité de la mère. L'organisation génomique des KIR est complexe et varie d'un individu à l'autre. Les gènes KIR2DL2 et KIR2DL3 sont les allèles d'un même locus (Revue par²⁷⁹). L'homozygotie pour KIR2DL2 et l'allèle C1 de HLA-C ou de KIR2DL2 avec HLA-C1C2 sont augmentés chez les mères qui transmettent le VIH-1 en IP à leur enfant, alors que la combinaison de KIR2DL2/KIR2DL3 est diminuée chez ces mères. Chez l'enfant né de mère avec une faible charge virale, l'homozygotie de KIR2DL3 et de l'allèle C2 de HLA-C augmente la susceptibilité à l'infection IP alors que chez les enfants nées de mères ayant reçues la névirapine à l'accouchement, la combinaison de KIR2DL3 et de C1 est associée à une protection contre l'infection²⁶⁷. Ces résultats couplés aux différentes études sur HLA-G suggèrent que la réponse NK joue un rôle dans la TME du VIH-1.

Une seule étude a rapporté le rôle des variations génétiques du récepteur Fcγ de classe II (FcγRIIa) chez l'enfant. Un changement d'acide aminé dans le gène d'une arginine (Arg) pour une histidine (His) en position 131 permet de varier l'affinité du récepteur pour la classe d'IgG reconnue. L'allèle His131 présente une plus grande affinité pour l'IgG2 alors que l'Arg131 se lie à l'IgG1 et à l'IgG3 et très faiblement à l'IgG2. L'enfant homozygote pour His131 est 2 fois plus à risque de s'infecter par voie périnatale²⁸⁰.

Les mutations affectant le récepteur et les corécepteurs du VIH-1 sont aussi susceptibles d'influencer le risque de transmission périnatale du VIH-1. La présence de la mutation C868T du CD4 chez des enfants du Kenya augmente le risque d'acquisition du VIH-1²⁸¹. De multiples variations dans le gène du corécepteur CCR5 ont aussi été répertoriées. Un intérêt majeur a été porté sur la délétion de 32 paires de bases du CCR5

(CCR5Δ32). Cette mutation conduit à la production d'une protéine tronquée et non fonctionnelle, majoritairement présente dans la population caucasienne et quasi absente chez les Africains²⁸². Les résultats concernant l'implication de cette mutation dans la TME sont cependant demeurés discordants au fil des différentes études. Dans une méta-analyse reprenant les données de 16 études, Contopoulos-Ioannidis et ses collaborateurs n'ont trouvé aucune évidence que cette mutation chez l'enfant pouvait avoir un impact sur le taux d'infection²⁸³. En contrepartie, des mutations dans les régions régulatrices du CCR5 ont démontré leur effet. L'enfant homozygote pour l'allèle T en position 59356 ou porteur de l'allèle A en position 59029 ou de l'allèle T en position 59353 est plus à risque de s'infecter par le VIH-1, toutes voies d'infection confondues²⁸⁴⁻²⁸⁶. Il a été rapporté que l'allèle A du variant 59029 augmente l'expression de CCR5 et la propagation virale *in vitro*²⁸⁷. À l'inverse, l'allèle G associé avec une réduction de l'expression du corécepteur protège faiblement contre la TME²⁸⁶. Cet effet n'est cependant pas encore bien compris dans le contexte de la transmission périnatale. Dans une étude sur une cohorte du Malawi, un niveau d'expression élevé d'ARNm de CCR5 dans le placenta ne corrèle pas avec un risque augmenté de TME du VIH-1²⁸⁸. Behbahani et ses collaborateurs ont, pour leur part, démontré que l'expression de l'ARNm du CCR5 était augmentée dans les placentas de mères qui transmettaient le VIH à leur enfant comparativement aux mères qui ne le transmettaient pas²⁸⁹. Enfin, il semblerait que le polymorphisme maternel de CCR5 n'ait pas d'influence sur le risque de transmission périnatale²⁹⁰. Cependant, la variation génétique du CCR2 chez celle-ci semble jouer un rôle. CCR2 est un corécepteur de moindre importance du VIH-1 (Revu par²⁹¹) et la mutation CCR2-64I, codant pour le changement d'une valine pour une isoleucine en position 64, est transmise en *linkage disequilibrium* avec la région du promoteur de CCR5^{285,292}. La mutation CCR2-64I a été associée avec une charge virale maternelle diminuée pouvant protéger partiellement contre la TME du VIH-1²⁹³, bien que l'association directe avec la TME n'ait pas été confirmée²⁹⁴. Cette mutation n'a cependant montré aucun effet lorsque portée par l'enfant^{284,285,294}.

L'effet de la variation génétique sur l'expression des ligands du CCR5 et leur impact sur la TME a aussi fait l'objet de différentes études. L'observation que les cellules du sang de cordon des enfants exposés au VIH-1, mais qui demeurent non infectés, sécrètent plus de β -chimiokines CCL3, CCL4 et CCL5 (MIP-1 α ; MIP-1 β et RANTES respectivement) en réponse à une stimulation a mis en lumière l'importance que ces ligands de CCR5 pouvaient avoir sur la protection contre la TME du VIH-1^{295,296}. Ainsi, un plus grand nombre de copies du pseudogène de CCL3, CCL3-L1, chez l'enfant a été associé avec une susceptibilité réduite à l'infection au VIH-1 en raison de sa capacité augmentée à sécréter CCL3 et ainsi empêcher le virus d'interagir avec son corécepteur²⁹⁷. En revanche, les polymorphismes de l'enfant affectant le ligand de CXCR4, le « stromal cell-derived factor 1 » (SDF-1), n'ont montré aucun effet sur la TME^{284,298}. Chez la mère, une étude a rapporté que la présence de la mutation SDF1 3'A/wt en position 880 de la région régulatrice en 3' augmente la transmission par le lait maternel²⁹⁸, mais ces résultats n'ont pas été confirmés dans une seconde étude²⁹⁰.

Enfin, une étude récente dans une large cohorte du Malawi a utilisé une approche de séquençage du génome (« genome-wide approach ») afin d'évaluer l'association entre plus de 586 000 SNP (« single nucleotide polymorphism ») et la TME du VIH-1²⁹⁹. Bien que cette étude n'ait pas eu la puissance nécessaire pour détecter un effet statistique suffisant pour justifier une association « genome-wide », cette approche a permis d'identifier plusieurs SNP influençant la TME et localisés dans des gènes impliqués dans la grossesse et le développement, la réponse immunitaire, l'interaction avec le VIH-1, ainsi que des variants dans le gène de l'héparane sulfate, un facteur de liaison du VIH-1 responsable de l'internalisation du virus par les trophoblastes^{148,149}. Cette première identification d'un effet des variants géniques de l'héparane a donné lieu à une seconde étude qui a observé que l'expression des gènes de l'héparane sulfate HS3ST3A1 et HS3ST3B1 est augmentée de paire avec l'expression de CCR5 dans le placenta²⁸⁸. Cette étude ouvre la porte à un rôle possible de ce facteur d'internalisation du VIH-1 dans la TME.

L'immunité innée de l'enfant semble aussi jouer un rôle important dans la TME du VIH-1. Des variations au niveau des gènes impliqués dans la réponse innée aux micro-organismes se sont aussi avérées avoir un effet important sur le taux d'infection chez les enfants. Plusieurs SNP ont été identifiés dans le gène codant pour le « mannose binding lectin » (MBL2), une protéine de phase aiguë relarguée dans la circulation sanguine après sa synthèse par le foie. Cette protéine capable de lier des résidus de mannose en surface des micro-organismes active la voie du complément, favorise la production de la protéine C3b, l'opsonisation et la lyse du pathogène qu'elle reconnaît et permet l'activation des leucocytes³⁰⁰. La liaison de MBL au gp120, soit directement sur la particule virale ou encore sur la cellule infectée, mène à l'activation du complément et à la lyse de la cellule, inhibant par le fait même l'infection virale^{301,302}. Les niveaux d'expression de MBL sont régis par des mutations situées dans les régions codantes et non codantes du gène. Dans une étude en Argentine, les enfants homozygotes pour la mutation du promoteur en position -221, correspondant à l'allèle X, ont 8 fois plus de chance de s'infecter par transmission verticale que les enfants qui ne sont pas porteurs de cette mutation³⁰³. Dans une cohorte d'Italie, la présence de l'allèle L, portant une mutation du promoteur en position -550, a été associée à un risque augmenté de TME³⁰⁴. La présence des allèles X et L a été corrélée avec une concentration plasmatique diminuée de MBL³⁰⁵. Dans une étude sud-africaine, la présence de mutations codant pour des changements d'acides aminés dans l'exon 1 (substitution d'un acide aspartique pour une glycine au codon 54, d'un acide glutamique pour une glycine au codon 57 et d'une arginine pour une cystéine au codon 52) et désignée par l'allèle O a été associée avec un risque augmenté de 3 fois de TME³⁰⁶. L'effet de l'allèle O est cependant perdu avec la complémentation de la mère en vitamine A³⁰⁶ et n'a pas été associé dans une autre étude, plus petite³⁰⁷. Le fait qu'un niveau d'expression élevé de MBL protège contre l'infection verticale souligne le rôle de l'immunité innée chez l'enfant. Un autre facteur de l'immunité innée, TLR9, est impliqué dans la reconnaissance des patrons moléculaires des pathogènes et fait le pont entre la réponse innée et adaptative. La combinaison des mutations c.4-44G/A et c.1635A/G sous la forme des haplotypes A;A

ou G;G a été associée avec un risque augmenté de TME dans une cohorte d'enfants caucasiens³⁰⁸.

Enfin, les défensines sont d'autres facteurs de l'immunité innée à avoir montré un effet sur la TME du VIH-1. Les défensines sont des petits peptides cationiques sécrétés par les leucocytes et les cellules épithéliales et exercent une activité antimicrobienne en causant le bris de la membrane virale ou bactérienne. Ces peptides antimicrobiens présentent aussi des propriétés chimiotactiles et induisent l'expression de cytokines et chimiokines variées (Revu par³⁰⁹). Chez l'enfant, la présence du génotype -52GG et de l'haplotype -44G/-52G dans le gène de la β -defensin-1 ont montré un effet de protection contre l'infection au VIH-1. Chez la mère, les mêmes mutations corrèlent avec une charge virale plasmatique plus basse et un taux de transmission du VIH-1 moins élevé³¹⁰. Au Brésil, le nombre de copies du gène DEFB104, codant pour la défensine hBD4 dont la fonction est peu décrite, est plus élevé chez les enfants non infectés nés de mères VIH-positives que chez les enfants infectés³¹¹.

4.4 Les facteurs immunologiques

Ainsi, la réponse immunitaire, autant celle de la mère qui doit contrôler l'infection déjà établie que celle de l'enfant qui doit se défendre, joue un rôle essentiel dans l'issue de l'infection. Dès les premiers signes d'infection par le VIH-1, une réponse immunitaire se met en branle, et le contexte dans lequel elle prend place façonne l'efficacité de celle-ci.

Le contexte de la grossesse présente en lui-même un environnement immunitaire particulier. Originellement souligné par Medawar, la grossesse est un paradoxe immunologique. L'embryon d'origine allogénique, puisque la moitié du bagage génétique appartient au père, s'implante chez la mère pour s'y développer pendant neuf mois, et ce, sans attaque apparente du système immunitaire de celle-ci. La dynamique immunologique entre la mère et l'enfant qui doivent mutuellement tolérer les antigènes étrangers de l'un et de l'autre fait de la barrière placentaire un organe dont l'environnement immunitaire est bien particulier. Mais le placenta ne fait pas que tolérer les antigènes maternels, il empêche

aussi les pathogènes de traverser vers l'enfant et arrive à prévenir l'infection du fœtus dans la majorité des cas (Revu par³¹²). Cet environnement immunitaire distinct aussi bien que la réponse maternelle et fœtale sont susceptibles de moduler le passage des pathogènes de la mère à l'enfant, incluant le VIH-1.

4.4.1 L'environnement immunitaire et la réponse innée

L'environnement placentaire contient de multiples facteurs solubles. Cytokines, chimiokines et hormones sont impliquées dans le déroulement normal de la grossesse. Le maintien de l'équilibre entre un environnement T_H1 et T_H2 , avec une prédominance vers un environnement $T_H2/Treg$, participe au maintien d'une grossesse normale. Un débalancement vers une dominance T_H1/T_H17 est délétère pour la grossesse et peut s'accompagner de pré-éclampsie, d'accouchement prématuré causé par la chorioamnionitis ou d'avortement spontané (Revu par^{313,314}). La présence d'infection au niveau du placenta peut aussi moduler l'environnement immunitaire. Par exemple, la malaria induit un biais T_H1 au niveau du placenta (Revu par³¹⁵). L'infection au VIH-1 chez la mère est donc aussi susceptible de moduler cet environnement à l'interface mère-enfant, de sorte qu'on remarque une variation entre les profils d'expression des cytokines de placentas provenant de mères infectées au VIH-1 comparativement à celui des placentas de mères non infectées. La production *in vitro* de cytokines pro-inflammatoires, telles que $TNF-\alpha$, IL-6, IL-1 β , IL-8 et IFN- β , est plus importante chez les trophoblastes, les cellules mononucléées et les explants de placenta de mères VIH-1 positives que celle des mères VIH-1 négatives, et ce, même si elles sont pour la plupart traitées aux ARV³¹⁶⁻³¹⁹. La présence du VIH-1 chez la mère augmente LIF (« leukemia inhibitory factor ») au niveau du placenta³¹⁷. Aussi, un ratio augmenté d'ARNm de $TNF-\alpha/IL-10$ a été observé chez les mères VIH-1 positives³²⁰. Certains groupes n'ont cependant noté aucune différence entre la production de cytokines provenant d'explants de placenta de mères VIH-1 positives traitées aux ARV et de mères VIH-1 négatives^{321,322} ou ont même observé des taux d'IL-6, d'IL-8³²¹, d'IL-7 ou de LIF diminués³²⁰. L'expression de $TNF-\alpha$ est aussi augmentée chez les PBMC stimulés ou non

provenant de mères infectées au VIH-1 comparé aux mères négatives alors que l'IL-4 et l'IL-7 est diminué³²³. Concernant les chimiokines, l'expression de ces facteurs varie pour les ligands du CCR5 et de CXCR4. Les trophoblastes isolés de placentas de mères VIH-1 positives produisent moins de MIP-1 α , MIP-1 β ³²¹ et de RANTES³²⁰, ligands de CCR5, alors que l'ARNm de SDF-1, ligand du CXCR4, est augmenté³²⁰. Ces résultats n'ont toutefois pas été confirmés par un autre groupe³¹⁹. La présence de la malaria placentaire peut cependant masquer l'effet du VIH-1 chez les placentas de mères VIH-positives³²⁰. Par ailleurs, le traitement aux ARV affecterait en lui-même l'environnement immunitaire du placenta. Une durée prolongée de traitement à la zidovudine (plus de 72 jours) et un écart de temps de moins de 5 heures entre la prise de nevirapine et l'accouchement augmentent l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10³²². Cette augmentation a aussi été répertoriée dans le plasma de femmes enceintes traitées aux ARV³²⁴. Lorsque mis sur des explants de placenta en culture, la zidovudine n'affecte pas l'expression de l'ARNm de l'IL-10 ou de SDF-1, mais diminue l'expression de l'ARNm de TNF- α ³²⁵. En conséquence, il semble que l'infection au VIH-1, tout comme la présence de malaria placentaire, module l'environnement immunitaire du placenta vers une réponse pro-inflammatoire de type T_H1, alors que la prise d'ARV permet de rétablir cet équilibre³²².

L'utilisation d'ARV de façon systématique dans les différentes études sur la TME a contribué, fort heureusement, à diminuer de façon importante les taux de transmission du VIH-1. Cette pratique systématique a toutefois rendu l'étude de l'environnement placentaire difficile en raison du biais introduit par le traitement aux ARV et du faible taux d'enfants infectés. Quelques études plus anciennes ont cependant été en mesure de percevoir des différences dans l'environnement placentaire des mères qui transmettent le VIH-1 à leur enfant et celles qui ne le transmettent pas. Une conservation de l'environnement T_H2 du placenta, mise en lumière par une expression d'ARNm d'IL-4 et d'IL-10 normale, a été observée chez les mères qui ne transmettaient pas le VIH-1 à leur enfant. En contrepartie, les mères transmettant le VIH-1 expriment moins d'ARNm d'IL-4 et d'IL-10 et plus d'IL-2 placentaire que leurs congénères qui ne transmettent pas le

virus^{289,326}. De plus, l'expression de l'ARNm de LIF, un inhibiteur de la réplication du VIH-1, est augmentée chez les mères qui ne transmettent pas le VIH-1 à leur enfant³²⁶. Pour ajouter à cela, une prédominance de sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 a été observée dans le plasma et par les cellules T chez les femmes enceintes qui maintiennent un bon contrôle de leur charge virale. En comparaison, les femmes enceintes qui ne contrôlent pas leur charge virale produisent plus d'IL-1 β et de TNF- α . Dans cette étude, l'expression d'IL-10 élevée était en corrélation avec un taux de TME diminué et un meilleur contrôle de la réplication virale³²⁴. L'expression de ces différentes cytokines se trouve aussi perturbée chez l'enfant puisque les enfants exposés au VIH-1 et nés de mères qui ne contrôlent pas leur charge virale présentent une production plus importante de cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α et une expression diminuée d'IL-10. L'expression d'IL-10 chez l'enfant se trouve cependant augmentée lorsque la mère est traitée aux ARV³²⁷. Les CBMC (« cord blood mononuclear cell ») d'enfants exposés au VIH-1 durant leur vie intra-utérine expriment moins d'IL-4 et plus d'INF- γ que les enfants non exposés au VIH-1, ce qui témoigne d'un biais vers un environnement T_H1 chez ces enfants exposés³²³. L'IL-7 sérique se trouve aussi augmenté chez les enfants nés de mères VIH-1 positives¹¹⁷. Les résultats concernant l'aberrance du profil d'expression des cytokines par les CBMC des enfants exposés et non infectés au VIH-1 sont toutefois fort bigarrés puisque les différentes études mesurant l'expression de diverses cytokines par les CBMC stimulés ou non en sont venues à des observations contradictoires dans bien des cas (IL-2, IL-10, IFN- γ) (Revu par¹¹⁵).

La variation de l'environnement immunitaire du placenta peut avoir divers impacts sur la TME du VIH-1. Alors que LIF, IFN- α et β , RANTES et MIP-1 β inhibent la réplication du VIH-1 *in vitro* dans des explants de placenta, des trophoblastes primaires ou carcinogéniques^{326,328}, TNF- α , IL-8 et IL-1 β augmentent l'activité transcriptionnelle du LTR et la réplication du virus³²⁸⁻³³¹. De plus, TNF- α favorise la transcytose du VIH-1 à travers le placenta sans affecter la viabilité de ces cellules¹⁴⁵. L'expression de TNF- α est aussi en corrélation directe avec la quantité de transcrits de Gag dans les trophoblastes de

placenta provenant de mères VIH-positives³¹⁹. L'expression de progestérone, une hormone importante dans le maintien de la grossesse, affecte aussi la réplication du VIH-1. En diminuant l'expression de TNF- α au niveau des trophoblastes, la progestérone limite la réplication du VIH-1³³¹. Aussi, tel que rapporté précédemment, *in vitro*, l'expression de TNF- α par les monocytes adhérents à la barrière de trophoblastes conduit à l'apoptose de ceux-ci produisant des dommages à la barrière¹⁷⁰. Enfin, il a été rapporté que l'IL-10 pouvait augmenter l'expression de CXCR4 et de CCR5 sur les macrophages placentaires *in vitro*¹⁶².

En conséquence, l'environnement pro-inflammatoire mis en place au niveau du placenta par l'infection maternelle au VIH-1 semble avoir un impact sur l'immunité et le taux de transmission à l'enfant. Un meilleur contrôle de l'inflammation, par la mère ou par le placenta lui-même, pourrait favoriser l'intégrité de la barrière et limiter l'expression du VIH-1. La participation des ARV au maintien de l'équilibre de l'environnement immunitaire pourrait en partie expliquer son efficacité à prévenir la TME du VIH-1^{322,325}.

La présence de facteurs solubles dans le lait maternel peut aussi jouer un rôle dans l'acquisition PP du VIH-1. Chez les Zambiennes, l'expression d'IL-15 dans le lait maternel protège contre la transmission PP du VIH-1³³². En revanche, pour l'IL-7, c'est une faible expression, moins de 30 pg/ml, ou une expression indétectable dans le lait maternel qui a un effet protecteur contre la TME PP du VIH-1 (Revu par³³³). L'IL-15 stimule la réponse T CD8⁺ et la réponse NK alors que l'IL-7 est impliqué dans l'homéostasie des cellules T (Revu par³³⁴). La présence de chimiokines dans le lait maternel influence aussi la TME. L'expression de MIP-1 β et de SDF-1 dans des cohortes du Kenya est associée à une diminution de la transmission PP alors que l'expression de RANTES augmente la transmission^{335,336}. Chez une cohorte de Zambie, RANTES et SDF-1 n'ont pas été associées avec la transmission PP du VIH-1³³². La présence d'érythropoïétine dans le lait maternel a aussi montré un effet protecteur contre la transmission PP du VIH-1³³⁷. L'érythropoïétine est une hormone soluble sécrétée par les reins. Elle stimule la production

de globules rouges et présente aussi un effet protecteur sur les cellules, contribuant à la conservation de l'intégrité de l'épithélium mammaire et de la barrière intestinale de l'enfant^{337,338}. La protéine anti-microbienne de la salive SLP1 (« secretory leucocyte protease inhibitor 1 ») présente quant à elle une activité anti-VIH-1, et l'augmentation de sa concentration dans la salive des nouveau-nés nourris par le lait maternel augmente de pair avec une protection contre la transmission postnatale du VIH-1³³⁹.

4.4.2 La réponse adaptative

4.4.2.1 La réponse cellulaire

Le système immunitaire du nouveau-né, encore immature et en plein développement, présente une capacité réduite à induire une réponse immunitaire (Revu par³⁴⁰). Le biais T_H2 présent dans la première année de vie de l'enfant réduit ses capacités à produire une réponse cellulaire T_H1 efficace. L'activité des cellules présentatrices d'antigènes est aussi réduite en raison des capacités limitées de différenciation et de présentation, et de la diminution des niveaux d'expression des molécules de costimulation et des différentes cytokines et chimiokines (Revu par³⁴⁰).

L'exposition *in utero* au VIH-1 permet pourtant le développement d'une réponse cellulaire spécifique dirigée contre les antigènes viraux chez le tiers des enfants exposés et non infectés au VIH-1 (Revu par³⁴¹). Un certain groupe a même observé cette réponse spécifique chez tous les enfants exposés et non infectés à l'étude³⁴². L'exposition à ce pathogène avant la naissance n'est pas sans laisser de traces sur la réponse immunitaire de l'enfant. En plus d'affecter l'expression des différentes cytokines (Revu dans la section précédente), le VIH-1 laisse sa trace sur la réponse cellulaire. Les enfants nés de mères VIH-1 positives présentent un plus haut niveau d'activation immunitaire que ceux qui n'ont pas été exposés durant leur vie intra-utérine³⁴³⁻³⁴⁶. Un changement vers une plus grande proportion de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ avec un phénotype mémoire/effecteur plutôt que naïfs et une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ a été observé chez ces

enfants exposés^{117,323,343}. La maturation de la réponse lymphocytaire est aussi compromise et cette altération persiste plusieurs années chez l'enfant¹¹⁷.

Toutefois, il est possible que l'apparition d'une réponse spécifique contre les antigènes du VIH-1 ne soit pas le signe du développement d'une réponse protectrice contre l'infection, mais simplement le témoignage de la rencontre entre le VIH-1 et le système immunitaire de l'enfant³⁴¹. L'apparition d'une réponse spécifique dirigée contre le VIH-1 chez l'enfant exposé mais non infecté ne pourrait être en fait que la manifestation du passage de produits viraux à travers la barrière placentaire, et non le témoignage d'une réplication virale ayant pris place chez l'enfant^{117,323,344}. Aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à mesurer le passage des protéines du VIH-1 entre la mère et l'enfant. Toutefois, il a été établi que la protéine de la capsid virale (p24) pouvait traverser le placenta du côté maternel vers la circulation fœtale après perfusion *ex vivo*³⁴⁷.

Pour mieux comprendre le rôle de la réponse adaptative dirigée contre les antigènes du VIH-1 dans la TME, Kuhn et ses collaborateurs ont exploré l'association entre la réponse lymphocytaire T CD4⁺ spécifique contre l'enveloppe du VIH-1 et son effet sur la TME. Ils ont démontré une association significative entre la présence de cette réponse chez l'enfant et la protection contre l'acquisition *in utero* ou périnatal du VIH-1³⁴⁸. Précédemment, le même groupe avait observé que les enfants nés de mères dont la charge virale était basse étaient ceux qui développaient une réponse spécifique contre les antigènes de l'enveloppe, suggérant qu'une plus faible exposition au VIH-1 permettrait de développer une réponse protectrice³⁴⁴.

Une réponse CTL spécifique contre VIH-1 a aussi été observée à de multiples reprises chez les enfants infectés par le VIH-1. Cependant, beaucoup ont observé que la réponse T CD4⁺ dirigée contre Gag demeurait quant à elle quasi absente chez le nouveau-né pour n'apparaître que plus tard durant la petite enfance^{349,350}. Cette faible réponse auxiliaire chez l'enfant infecté pourrait être à l'origine de son incapacité à produire une réponse T CD8⁺ efficace³⁵¹. La réponse du nouveau-né diffère tout de même de celle de

l'adulte en ce sens qu'elle est moins fréquente et de plus faible amplitude^{351,352}. Un phénotype mémoire/effecteur des lymphocytes T CD8⁺ prédomine chez les nouveau-nés infectés par le VIH-1 avec une plus grande propension à la sénescence comparativement aux nouveau-nés exposés et non infectés qui présentent plus de CD8⁺ avec un phénotype naïf³⁵³. De plus, l'infection avant 1 mois d'âge résulte en un développement retardé de la réponse CD8⁺ spécifique capable de sécréter de l'IFN- γ ³⁵⁴.

Il a été suggéré que la réponse CTL chez l'enfant pourrait aussi participer au contrôle de la réplication virale après l'infection. Dans une étude menée avec des enfants s'étant infectés par voie IU, la présence d'une réponse CTL contre le VIH-1 plus importante et polyfonctionnelle (IFN- γ , CD107a, TNF- α , MIP-1 β), donc de meilleure qualité, a été observée chez les enfants qui progressent lentement vers le SIDA par rapport à ceux qui progressent rapidement³⁵⁵. Une forte réponse CTL chez l'enfant est aussi en corrélation avec une charge virale significativement plus basse³⁵¹. Cela ne semble cependant pas être vrai dans tous les cas puisque cette réponse peut aussi persister durant plusieurs années sans voir l'apparition de variants d'échappement, suggérant une certaine inefficacité de la réponse CTL à faire pression sur le virus³⁵⁶. Que la réponse apparaisse rapidement ou non, elle ne semble pas avoir une influence sur la charge virale chez les nouveau-nés. L'étude longitudinale d'une cohorte d'enfants kényans infectés par voie IU et PP n'a démontré aucune association entre l'avènement d'une telle réponse T CD8⁺ et le pic de la charge virale, la cinétique de son déclin ou la mortalité de l'enfant³⁵². Une étude récente a aussi observé un défaut de la réponse CTL de l'enfant à contenir la réplication virale. Bien que la fréquence des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques contre le VIH-1 et leur phénotype ne diffèrent pas entre les enfants infectés et les adultes en phase aiguë, en phase chronique la réponse CTL spécifique de l'enfant déclinait et demeurait activée de façon persistante présentant une vulnérabilité accrue à l'apoptose³⁵⁷. Une autre étude prospective cherchant à démontrer l'effet de la réponse CTL des nouveau-nés kényans exposés au VIH-1 par le lait maternel a observé que la présence d'une réponse CTL contre le VIH-1 chez l'enfant ne présentait pas d'effet protecteur contre l'acquisition du virus, mais qu'une

réponse de forte amplitude à l'âge d'un mois était associée avec une protection contre la transmission PP³⁵⁸.

La faible amplitude ou l'inefficacité de la réponse CTL s'expliquerait en fait par la présence d'une plus forte réponse Treg présentant une activité suppressive chez l'enfant. Legrand et ses collaborateurs ont observé une augmentation jusqu'à 3 fois des réponses T CD8⁺ et T CD4⁺ spécifiques contre les épitopes de Gag chez des enfants exposés et non infectés au VIH-1 après le retrait de la réponse Treg³⁴². Une fois délestés des lymphocytes Treg, les T CD8⁺ exhibaient des capacités fonctionnelles complètes, comme en témoignait la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-2. Cette réponse perdurait au moins jusqu'à deux ans³⁴². D'autant plus intéressant, cette même équipe a observé que la fréquence des Treg était significativement plus importante chez les enfants exposés *in utero* au VIH-1 et non infectés que chez les enfants infectés par voie IU. La présence plus importante de Treg s'accompagnait d'une diminution de l'activation immunitaire. Cette observation suggère que la réponse T régulatrice induite durant l'exposition IU chez l'enfant protège celui-ci en diminuant l'activation immunitaire, même si elle inhibe la réponse CD8⁺³⁴². L'immunité fœtale présente en elle-même un important biais vers une immunité régulatrice. Le potentiel de différenciation des cellules hématopoïétiques fœtales présente intrinsèquement une plus grande propension à se différencier vers le phénotype Treg³⁵⁹. L'environnement tolérogénique entre l'enfant et la mère nécessaire au maintien de la grossesse expliquerait ce biais vers le développement d'une réponse Treg dirigée contre les antigènes rencontrés avant la naissance. La forte réponse régulatrice induite par la malaria placentaire témoigne aussi de cela³⁶⁰.

Enfin, Tiemessen et ses collaborateurs ont identifié une réponse NK spécifique, inhabituelle et dirigée contre les antigènes du VIH-1 dans une cohorte sud-africaine. La présence d'une forte réponse NK cytotoxique dirigée contre les peptides de l'enveloppe et les protéines accessoires du VIH-1 chez le nouveau-né et chez la mère est associée avec une protection contre la TME du VIH-1³⁶¹. De plus, chez la mère, une forte réponse CTL

capable de supprimer la réplication virale *in vitro* a été associée avec un risque réduit de 3 fois de transmettre le VIH-1 à son enfant³⁶².

En définitive, l'implication de la réponse cellulaire chez l'enfant est encore à démystifier. Alors qu'une réponse CTL chez l'enfant peut être induite par l'exposition *in utero* au VIH-1, sa contribution au contrôle de la charge virale ou à la protection contre la TME mérite de plus amples investigations. L'identification de lymphocytes Treg capables de limiter la réponse CTL et l'activation immunitaire ainsi que de protéger l'enfant de la TME est aussi une piste intéressante qui demande à être explorée plus largement.

4.4.2.2 La réponse humorale

De concert avec la réponse adaptative cellulaire, une réponse humorale s'installe chez l'enfant, bien qu'elle arrive avec un délai et s'accompagne d'un titre diminué d'expression des anticorps, d'une diversité du répertoire et d'une affinité restreinte (Revu par³⁶³). L'enfant acquiert cependant des anticorps maternels de façon passive qui permettent de le protéger contre les infections. Les IgG maternels traversent le placenta au début de la 18^e semaine de grossesse pour atteindre leur concentration maximale à la naissance, et décline ensuite chez le nouveau-né jusqu'à l'âge de 18 mois. L'exposition *in utero* au VIH-1 conduit aussi à une dysfonction du compartiment cellulaire B. L'augmentation des cellules B immatures/transitionnels³²³ couplée à une hypergammaglobulinémie qui se traduit par une élévation d'IgG, d'IgA et d'IgM plasmatique³⁶⁴ similaire à celle de l'adulte en phase chronique a aussi été décrite chez l'enfant exposé au VIH-1. Une autre étude sur les enfants exposés et non infectés au VIH-1 n'a cependant pas observé d'altération de la réponse B¹¹⁷.

Le rôle de la réponse humorale maternelle demeure controversé puisque les différentes études s'étant intéressées à cette question présentent des résultats discordants. Dans le plasma maternel, un plus haut titre d'anticorps neutralisants, reconnaissant la loupe V3 de l'enveloppe ou présentant une avidité augmentée pour le peptide p24 a été associé avec une protection contre la transmission IP dans certains cas, et IU dans d'autres chez des

Nord-Américaines, des Thaïlandaises ou des Africaines³⁶⁵⁻³⁶⁹. En contrepartie, d'autres études explorant le rôle des anticorps maternels dans la TME du VIH-1 n'ont trouvé aucun corrélat de protection entre un haut titre d'anticorps neutralisants ou reconnaissant la loupe V3 de l'enveloppe et la TME dans des cohortes thaïlandaise, nord- et sud-américaine^{256,370-373}.

De plus, l'acquisition passive de ces mêmes anticorps ne semble pas non plus jouer un rôle protecteur contre la TME. Une étude caractérisant l'étendue du répertoire des anticorps neutralisants présents dans le plasma d'enfants exposés au VIH-1 via le lait maternel n'a montré aucune différence entre la présence de ces anticorps maternels acquis passivement et une protection contre la transmission PP du VIH-1³⁷⁴. La production d'IgA salivaire par le nouveau-né n'a pas non plus démontré d'effet sur la protection contre l'acquisition du VIH-1 par le lait maternel, bien que l'expression d'IgA spécifique contre le VIH-1 ait été rapporté chez 8% des enfants exposés au virus et qu'aucun d'eux n'ait acquis le virus durant la première année de l'enfance³⁷⁵.

À ce jour, l'implication de la réponse adaptative contre le VIH-1 mise en place chez la mère comme chez l'enfant dans la protection contre les différents modes de TME demeure encore bien incomprise. Des études plus approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre si l'avènement de la réponse adaptative joue un rôle dans la TME du VIH-1 ou si ce n'est simplement que le reflet de la rencontre entre le virus et l'enfant.

4.5 La présence de co-infections

La présence de co-infections qui affectent l'environnement immunitaire et le déroulement de la grossesse a aussi montré avoir une influence sur la TME du VIH-1. La co-infection maternelle à la syphilis, à l'herpès, à la tuberculose et aux helminthes favorise la transmission du VIH-1. Deux études, une se déroulant au Malawi et l'autre aux États-Unis, ont associé la présence de syphilis maternelle, active seulement dans l'un des cas, avec un risque augmenté de TME IU, IP/PP^{376,377} alors qu'une autre étude du Zimbabwe n'a identifié aucun impact de la syphilis maternelle sur la TME³⁷⁸. La présence d'une

infection à syphilis chez la mère est associée avec des changements pathologiques au niveau du placenta pouvant endommager la barrière placentaire à l'interface mère-enfant. De l'inflammation chronique, des atrophies villosités et de la nécrose locale au placenta sont visibles lors de l'infection à syphilis³⁷⁹. HSV-2, l'agent étiologique de l'herpès génital, serait responsable de 25 % des transmissions IP dans une cohorte du Zimbabwe³⁷⁸. L'infection virale à l'herpès simplex augmente la relâche de particules virales du VIH-1 au niveau génital (Revue par³⁸⁰). La présence d'helminthes dans une étude africaine et l'infection à *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent causant la tuberculose, dans une étude indienne augmentent les risques de TME, par le lait maternel seulement dans le cas de la tuberculose^{381,382}. La présence d'helminthes maternels se solde par une plus grande sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par les cellules de sang de cordon en réponse à une stimulation par des antigènes de l'helminthe³⁸¹.

En contrepartie, d'autres pathogènes présentent un effet bénéfique en diminuant la TME du VIH-1. *In vitro*, l'agent étiologique de la maladie de Chagas, le *Trypanosoma cruzi*, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-8, l'IP-10 et le MCP-1 et diminue la réplication du VIH-1 dans des explants de placenta³⁸³. Le GB virus C (GB-C), un flavivirus ressemblant à l'hépatite C, a des effets inhibiteurs sur l'infection au VIH-1 (Revu par³⁸⁴), et les enfants infectés à GB-C IU seraient moins à risque d'acquérir le VIH-1³⁸⁵.

En ce qui concerne la malaria, les résultats sont aussi plutôt discordants. Tandis que des études dans des cohortes africaines ont observé que la présence d'une co-infection à la malaria augmentait le risque de TME^{386,387}, à haute densité de parasitémie seulement (plus de 10 000 parasites/ μ l)³⁸⁸, d'autres études n'ont observé aucun impact^{381,389,390} ou même une diminution du risque de TME³⁹¹, mais à faible densité de parasitémie³⁸⁸. Pourtant, la présence d'une co-infection à *Plasmodium falciparum* augmente la concentration plasmatique et placentaire d'ARN du VIH-1^{392,393}, un facteur fortement associé avec la TME. De plus, la présence de malaria placentaire modifie les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires INF- γ et TNF- α , ce qui corrèle avec une augmentation d'IL-

10 au niveau du placenta³⁹⁴. Les leucocytes maternels sécrètent aussi plus de facteurs inflammatoires présentant des niveaux plus élevés de TNF- α , d'IL-10, de MCP-1, d'IP-10, de MIP-1 α et de MIP1- β , et participent potentiellement au recrutement de monocytes au niveau du placenta, caractéristique importante de la malaria placentaire³⁹⁴. Les adhésines de *Plasmodium falciparum* sur des lignées de trophoblastes humains favorisent la sécrétion de TNF- α par les trophoblastes, ce qui pourrait augmenter la réplication du VIH-1^{329,395}. Aussi, les cellules du sang de cordon d'enfants kenyans sensibilisées *in utero* à la malaria sont plus susceptibles à l'infection *in vitro* par le VIH-1 et présentent un phénotype plus actif³⁹⁶. L'activation immunitaire accrue chez le nouveau-né, couplée à une charge virale augmentée chez la mère et un accroissement de la réplication virale locale causée par l'environnement pro-inflammatoire, pourrait expliquer les effets adverses de la malaria sur la TME du VIH-1. Or, les données épidémiologiques réunies à ce jour sur l'impact de la malaria placentaire sur la TME du VIH-1 n'appuient pas avec certitude cet effet.

5. Les lectines de type C : DC-SIGN et DC-SIGNR

Plusieurs facteurs sont à même d'avoir une influence sur la susceptibilité de l'enfant à acquérir le VIH-1, et beaucoup d'entre eux dépendent de l'enfant. L'immunité innée gouverne la détection initiale des pathogènes et stimule la première ligne de défense. MBL, TLR9 et les défensines sont des facteurs de l'immunité innée dont le polymorphisme affecte la susceptibilité de l'enfant au VIH-1. La variation de l'environnement immunitaire a aussi démontré son influence sur le taux de TME. Ces observations témoignent de l'implication que pourrait jouer le système immunitaire inné dans la mise en place des conditions requises pour favoriser le passage du virus de la mère à l'enfant. DC-SIGN (« dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin » ou CD209) et son homologue DC-SIGNR (« DC-SIGN related », L-SIGN ou CD209L) sont des membres de la famille des lectines de type C. Ils sont capables de reconnaître des patrons d'expression moléculaires endogènes et exogènes et participent à l'induction de la réponse immunitaire. Capables d'interagir avec le VIH-1, ces récepteurs de surface seraient de bons candidats pour contenir ou favoriser la transmission de celui-ci et moduler l'environnement immunitaire affectant la TME. Le chapitre qui suit les décrira plus en détail.

5.1 La structure et l'expression

Les lectines de types C, tout comme les TLR, sont des récepteurs de surface impliqués dans la reconnaissance de patrons moléculaires. En l'occurrence, les lectines de type C reconnaissent des structures d'hydrates de carbone localisées en surface cellulaire, sur des protéines circulantes ou sur des pathogènes, ce qui leur permet de participer à l'adhésion entre cellules, au renouvellement des glycoprotéines plasmatiques et à la reconnaissance des pathogènes (Revu par³⁹⁷). Diverses protéines sont membres de cette famille dont DC-SIGN et DC-SIGNR.

Produit de la duplication d'un gène ancestral, les régions codantes de DC-SIGN et DC-SIGNR se situent sur le chromosome 19p13.2-3 dans un segment d'environ 26 Kb^{398,399}. Hautement homologues parce que partageant plus de 77 % de leur séquence protéique et 73 % de leur séquence nucléotidique⁴⁰⁰, DC-SIGN et DC-SIGNR ont été

conservés à travers les différentes espèces^{399,401}. Le peu de diversité retrouvée au niveau génétique chez DC-SIGN penche en faveur d'une forte contrainte de sélection sur ce gène alors que DC-SIGNR serait plutôt sous l'effet d'une sélection balancée présentant un avantage à conserver plusieurs allèles distincts dans une même population⁴⁰². La duplication génique serait une stratégie évolutive mise en place pour augmenter le potentiel de défense de l'immunité innée. En dupliquant un gène, une copie conserve sa fonction utile alors que la seconde copie est libre d'accumuler des mutations afin de potentiellement acquérir de nouvelles fonctions⁴⁰³. La singularité de l'histoire évolutive de DC-SIGN et DC-SIGNR laisse sous-entendre que ces deux lectines aient répondu à des pressions de sélection différentes, que ce soit pour la conservation de sa fonction dans le cas de DC-SIGN ou pour favoriser la diversité dans la reconnaissance des pathogènes dans le cas de DC-SIGNR⁴⁰².

Ces deux lectines sont des protéines trans-membranaire de type II codées par 7 exons et s'organisant de la même manière⁴⁰⁰. D'abord, l'extrémité C-terminale de la protéine contient un domaine de reconnaissance aux hydrates de carbone (CRD, « carbohydrates recognition domain ») codé par les exons 5 à 7 et dont l'activité de liaison est dépendante de la présence d'ions de calcium⁴⁰⁴. Sous le CRD, une structure enroulée compose le corps de la protéine. Cette région codée par l'exon 4 comprend 7 répétitions de 23 acides aminés. Elle est responsable de la tétramérisation du récepteur et influence les propriétés de liaison du CRD⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁷. Enfin, l'exon 3 se traduit en domaine trans-membranaire alors que les exons 1 et 2 représentent la queue cytoplasmique en N-terminal de la protéine. Le domaine cytoplasmique contient un motif di-leucine (LL), un motif à base de tyrosine (YSKL) et un groupe tri-acidique (EEE), et est impliqué dans le transport de la protéine vers la surface, la signalisation et l'internalisation du ligand vers les voies endosomales et lysosomales^{408,409}. Le motif à base de tyrosine est absent chez DC-SIGNR⁴¹⁰. La figure 4 montre une représentation schématique de ces protéines.

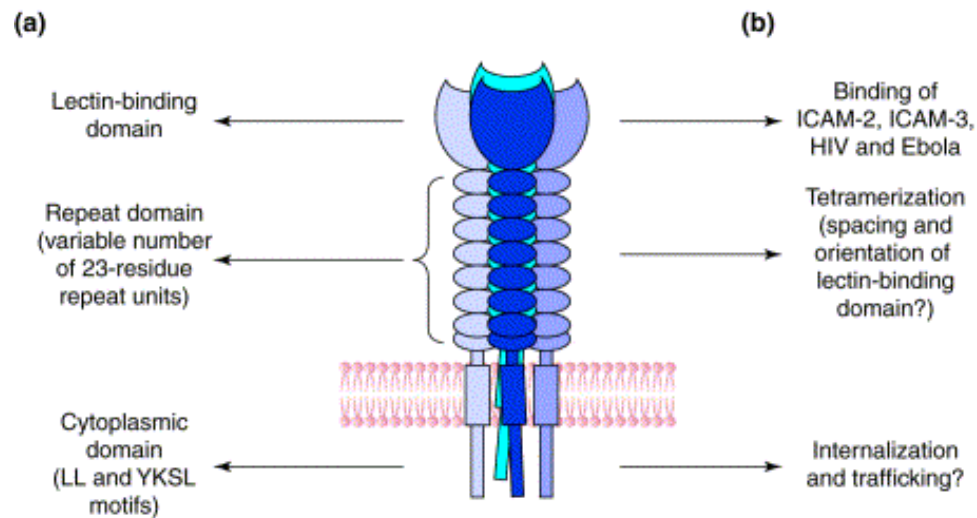


Figure 4: Représentation schématique de DC-SIGN et DC-SIGNR

DC-SIGN et DC-SIGNR sont des membres de la famille des lectines de type C. Le domaine de reconnaissance aux hydrates de carbone, codé par les exons 5 à 7, permet l'interaction avec ses ligands endogènes et exogènes. Le corps de la protéine, codé par l'exon 4, est composé de 7 répétitions de 23 acides aminés et permet la tétramérisation du récepteur. L'exon 3 code pour le domaine trans-membranaire alors que les exons 1 et 2 codent pour la queue cytoplasmique impliquée dans la signalisation via ces motifs (LL, EEE et YKSL).

Tiré de Pöhlmann et coll. 2001, *Trend Immunol* 22(12), p.643.

Avec l'autorisation de Elsevier Limited

Bien que l'expression de formes solubles de DC-SIGN et DC-SIGNR ait été rapportée⁴¹¹, c'est la forme membranaire qui a fait l'objet de la plus grande attention. L'expression de surface de ces deux lectines se distribue sur différents types cellulaires. DC-SIGN est exprimé par les DC localisées dans les muqueuses intestinales, rectales, vaginales et du prépuce, dans les ganglions lymphatiques et par certaines sous-populations de macrophages alvéolaires, du placenta et de l'utérus^{7,412-417}. Une étude a aussi rapporté son expression sur une sous-population de cellules B activées⁴¹⁸. L'expression de DC-SIGN est positivement régulée par la présence d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 chez les MDDC

(« monocyte derived dendritic cell ») et par M-CSF, IL-4, IL-10 et IL-6 chez les macrophages alternativement activés^{7,411,413,419-421}. En contrepartie, son niveau d'expression est négativement régulé en réponse aux signaux de maturation comme le TNF- α et le LPS ou par la présence d'IFN- α et - γ et de TGF- β ^{420,421}. L'IL-4 active la voie JAK/STAT (« Janus Kinase » / « Signal Transducer and Activator of Transcription ») et la phosphorylation de STAT6 qui s'ensuit conduirait directement à l'expression de DC-SIGN chez les MDDC et les lignées monocytaires^{420,421}. L'activation de la voie ERK (« extracellular signal-regulated kinase ») coopère à induire l'expression de DC-SIGN puisque que son inhibition empêche l'augmentation de celui-ci en présence d'IL-4. Cependant, la phosphorylation de STAT6 seule n'est pas suffisante pour induire l'expression de DC-SIGN et la présence du facteur de transcription PU.1, dont l'expression se restreint aux cellules myéloïdes et lymphoïdes B, est aussi nécessaire⁴²⁰⁻⁴²². PU.1, en collaboration avec les facteurs de transcription RUNX3 et c-Myb, contribue à l'activité basale et à l'activité tissu-spécifique du promoteur de DC-SIGN. À ce titre, le niveau d'expression de PU.1 dans les MDDC et dans les macrophages alternativement activés corrèle avec ceux de DC-SIGN et l'abolition de PU.1 par siRNA régule à la baisse l'expression de celui-ci⁴²². En plus de deux sites de liaisons à PU.1, le promoteur de DC-SIGN présente des sites de liaisons aux facteurs de transcription AP-1, Sp1, Ets-1 et NF- κ B qui tous, contribuent à l'activité du promoteur de DC-SIGN dans des lignées cellulaires⁴²³.

Les niveaux d'expression de DC-SIGN semblent donc dépendants des cytokines de l'environnement T_H2. De plus, sur les macrophages, DC-SIGN se retrouve sur le phénotype dit alternativement activé ou M2⁴¹⁹, qui se différencie en présence d'un environnement T_H2⁴¹³. Les M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires et sont impliqués dans la réparation des tissus⁴²⁴. À cet effet, l'expression du micro RNA-155 (miR-155) dont la présence favorise la réponse inflammatoire et le biais T_H1, réduit l'expression de DC-SIGN dans les DC et les macrophages M2 en diminuant l'activité de STAT6 et l'expression de PU.1^{425,426}.

Une seule étude s'est intéressée aux facteurs qui gouvernent l'expression de la forme soluble de DC-SIGN. Dérivée d'un événement d'épissage alternatif⁴¹¹, l'expression de la forme soluble de DC-SIGN corrèle avec celle des formes membranaires. Lors de la différenciation en MDDC, la présence d'IL-4 et d'IL-13 favorise la sécrétion des formes solubles de DC-SIGN indépendamment du clivage par les métalloprotéinases⁴²⁷. La présence de formes solubles de DC-SIGN est aussi augmentée durant l'inflammation chronique et contrairement à la forme membranaire, l'IFN- γ et l'IL-8 favorisent sa relâche dans l'environnement cellulaire. L'exposition des MDDC à l'IL-4 favorise non-seulement l'expression de la forme soluble de DC-SIGN, dont le domaine trans-membranaire est absent, mais conduit aussi à la génération d'une grande diversité d'isoformes d'ARNm. Ces isoformes présentent des formes tronquées de la région « neck » ou corps de la protéine, et codent parfois pour une nouvelle séquence d'acides aminés au CRD^{411,420}. L'inclusion ou l'exclusion différentielle des séquences exoniques dans l'ARNm par épissage alternatif permet d'augmenter considérablement le nombre de protéines codées par un même gène⁴²⁸. La reconnaissance des sites d'épissage par le complexe multi-protéiques qu'est le « spliceosome » détermine l'inclusion ou l'exclusion de certaines séquences exoniques de l'ARN pré-messager. L'épissage alternatif, en créant une importante diversité protéique, jouerait un rôle de premier plan dans le développement et l'expression spécifique à un tissu⁴²⁸. Les isoformes de DC-SIGN sont exprimés dans divers tissus et cellules tels que le placenta, les muqueuses rectales et vaginales, les DC et les lignées monocytaires^{411,429}. Aucune étude ne s'est encore intéressée aux mécanismes spécifiques qui gouvernent l'épissage alternatif de DC-SIGN ou son homologue DC-SIGNR.

DC-SIGNR pour sa part, est plutôt exprimé à la surface des cellules endothéliales du foie, des ganglions lymphatiques et des capillaires placentaires^{412,430,431}. Il présente aussi un large répertoire d'isoformes comprenant diverses formes solubles ou tronquées. D'ailleurs, la plupart des transcrits d'ARNm de DC-SIGNR exprimés au niveau des muqueuses rectales et vaginales sont le fruit d'un épissage alternatif⁴²⁹. Mais, les facteurs qui régissent son expression n'ont pas encore été étudiés.

5.2 Les ligands endogènes et exogènes

La spécificité du CRD de DC-SIGN et DC-SIGNR pour les résidus de mannose (« N-linked high-mannose oligosaccharides ») lui permet de reconnaître une variété de ligands endogènes et exogènes^{432,433}. En dehors des résidus de mannose, le CRD de DC-SIGN peut distinguer d'autres structures d'oligosaccharides, telles que des résidus fucosylés incluant des antigènes du sang comme les Lewis^x, Lewis^y, Lewis^a et Lewis^b retrouvés sur certaines glycoprotéines endogènes et aussi sur des pathogènes⁴⁰⁴. L'échange d'une valine pour une sérine entre le CRD de DC-SIGN et DC-SIGNR confère une activité de liaison différente à ces deux lectines. Le CRD de DC-SIGN présente une plus grande affinité pour les résidus de fucose que le CRD de DC-SIGNR⁴³³.

DC-SIGN a été découvert lors de travaux cherchant à identifier le ligand capable d'interagir avec ICAM-3 (« intracellular adhesion molecule 3 ») retrouvé à la surface des DC⁴³⁴. ICAM-3 est une molécule d'adhésion exprimée par les lymphocytes T « resting », et l'interaction entre DC-SIGN et ICAM-3 permet l'adhésion transitoire entre la DC et le lymphocyte T⁴³⁴. De plus, DC-SIGN peut reconnaître ICAM-2 exprimée en surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins afin de participer à l'adhésion de roulement^{435,436}. DC-SIGNR, son homologue, est seulement capable d'interagir avec ICAM-3^{430,437}. La reconnaissance de structure d'oligosaccharides par DC-SIGN lui permet aussi d'interagir avec d'autres ligands endogènes. L'interaction entre DC-SIGN et les résidus Lewis^x de Mac-1 et CEACAM1 (« carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 ») permet l'adhérence entre les DC et les neutrophiles qui expriment ces molécules d'adhésion^{438,439}. DC-SIGNR, quant à lui, ne peut pas interagir avec ces glycoprotéines⁴³⁸. CEACAM1 est aussi exprimée par les carcinomes humains et sa liaison à DC-SIGN contribue à maintenir un environnement immunosuppresseur dans les tumeurs^{419,440-442}. Dans le placenta, CEACAM1 exprime aussi des résidus Lewis^x qui pourraient lui permettre d'interagir avec les macrophages placentaires exprimant DC-SIGN et d'exercer une fonction immunorégulatrice sur ces cellules⁴⁴⁰. « Tumor-associated glycoprotein-72 » (TAG-72), produit par différentes lignées malignes et par les cellules

épithéliales de l'endomètre, se lie à DC-SIGN et MR (« mannose receptor », CD206) sur les DC de la décidue maternelle et participe aussi au maintien d'un environnement tolérogénique/immunorégulateur⁴⁴³.

Plusieurs pathogènes présentent aussi des structures hautement glycosylées reconnues par DC-SIGN et DC-SIGNR. En outre, DC-SIGN est capable de reconnaître et d'interagir avec une variété de virus dont le VIH-1, le « human T-cell leukemia virus » (HTLV), l'herpèsvirus 8, le cytomégalovirus (CMV), le SARS (« severe acute respiratory syndrome »)-coronavirus, le virus de l'herpès simplex, de l'influenza, de la rougeole, de l'Ébola, de dengue, du West Nile, de l'hépatite C, de Sindbis et de Marburg (Revu par⁴⁴⁴). En plus des virus, DC-SIGN peut reconnaître des bactéries, des champignons (fungi), des protozoaires et des parasites. À la liste de ces ligands s'ajoutent *Mycobacterium tuberculosis* et *leprea*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Leishmania* spp et *Schistosoma mansoni* (Revu par⁴⁴⁴). La liste des ligands de DC-SIGNR inclut le VIH-1, l'hépatite C, le virus de l'Ébola, le SARS-coronavirus, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania infantum* et le parasite *Shistosoma mansoni* (Revu par⁴⁴⁵). De multiples études se sont intéressées à comprendre les tenants et aboutissants de l'interaction entre DC-SIGN et le VIH-1, et à un niveau moindre, entre son homologue DC-SIGNR et le VIH-1.

5.3 L'interaction avec le VIH-1

La protéine de l'enveloppe du VIH-1, gp120, est hautement glycosylée, ce qui lui permet d'être reconnue par DC-SIGN et DC-SIGNR⁵. De multiples souches, R5 comme X4, sont d'ailleurs captées par ces deux lectines⁶. L'interaction entre DC-SIGN ou DC-SIGNR et le VIH-1 favorise l'attachement du virion à la surface de la cellule mais non son infection puisque qu'elle ne permet pas la fusion avec la membrane comme le fait le CD4 et les récepteurs de chimiokines⁵. DC-SIGN et DC-SIGNR présentent une plus grande affinité pour le gp120 du VIH-1 que pour la liaison aux ICAM, ce qui a mené Snyder et ses collaborateurs à proposer que la fonction principale de ces deux récepteurs était de capturer des pathogènes plutôt que de conduire à des interactions cellule-cellule⁴³⁷. Pour ajouter à

cela, DC-SIGN est exprimé principalement par les DC immatures dont la fonction principale est de capter les antigènes pour ensuite les présenter. Or, l'implication des DC d'origine myéloïde dans l'infection du VIH-1 a été établie par Cameron et ses collaborateurs en 1992 alors qu'ils rapportaient que ces cellules pouvaient transporter le virus aux cellules T adjacentes et favoriser leur infection sans qu'elles-mêmes soient infectées, un phénomène appelé *trans* infection⁴⁴⁶. C'est 8 ans plus tard, que Geijtenbeek et ses collaborateurs apportaient les premières bases moléculaires à ce phénomène en rapportant que DC-SIGN pouvait lier le VIH-1 et favoriser sa transmission aux cellules T, concept qu'on réfère au modèle du cheval de Troie⁵. Devant ces résultats, cette équipe proposait que le VIH-1 puisse détourner la fonction de DC-SIGN afin d'exploiter la DC. Capable de migrer de la périphérie vers les ganglions lymphatiques, la DC pourrait capturer le VIH-1 via DC-SIGN pour ensuite disséminer l'infection aux cellules T résidant dans les ganglions lymphatiques (Revu par⁴⁴⁴). Ce concept a séduit plus d'un groupe alors qu'un nombre important d'études sur ce sujet ont par la suite fait l'objet de publications.

Les travaux de Turville ont permis de comprendre que la transmission du VIH-1 par les MDDC était en fait un événement qui se produisait en 2 phases⁴⁴⁷. Dans un premier temps, la liaison aux lectines de type C exprimées par les MDDC pouvait conduire à un transfert du virus à court terme. Cette phase de transfert, qui dure quelques heures et qui pourrait impliquer la participation de DC-SIGN, est limitée par la dégradation du virus et diminue rapidement avec le temps. Dans un deuxième temps, le transfert à long terme qui prend place de 1 à 2 jours après la capture virale est plutôt dépendant de la production de virions *de novo* produits par l'infection des MDDC⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. Chez la DC immature, la liaison au gp120 est principalement due à la présence des lectines de type C, mais la maturation de la DC fait en sorte que l'interaction entre l'enveloppe et le CD4 devient celle qui domine⁴⁴⁷. Il semble aussi que le sous-type et le degré de maturation de la DC aient un impact important sur sa capacité d'infection et de transfert des virions. La DC immature présente une plus grande capacité à capturer et à supporter l'infection au VIH-1 alors que la DC mature, plutôt réfractaire à l'infection, présente une meilleure capacité à transférer le VIH-1 par des mécanismes indépendant des lectines de type C^{450,451}. En effet, d'autres voies

cellulaires peuvent mener au transfert du VIH-1 entre les DC et les cellules T. La formation d'un micro-domaine enrichi de tetrapepsin permet la connexion entre les corps multivésiculaires contenant des virions et la surface cellulaire de la DC. Les virions contenus dans ces structures multivésiculaires peuvent ainsi rejoindre la surface et être transférés aux cellules T (Revu par⁴⁵²). L'exocytose des particules virales préalablement internalisées dans la voie endosomale a aussi été observée. Des particules infectieuses s'associent à un exosome relâché dans le milieu extracellulaire pour ensuite disséminer le VIH-1 vers les cellules T adjacentes^{453,454}. De plus, l'infection de la DC permet la formation d'une synapse infectieuse avec les cellules T contiguës. La réorganisation du cytosquelette permet alors la concentration du récepteur et des corécepteurs du VIH-1 à la zone de contact et favorise l'infection de la T (Revu par⁴⁵²). Cependant DC-SIGN pourrait aussi jouer un rôle dans les autres mécanismes de *trans* infection via sa signalisation. L'engagement entre l'enveloppe virale et DC-SIGN contribue à la formation de protrusions membranaires capables de transporter le virus aux cellules T via l'activation de Cdc42⁴⁵⁵. De plus, Hodges et ses collaborateurs ont démontré qu'en plus d'inhiber la maturation de la DC, la signalisation via DC-SIGN augmente la formation de synapses infectieuses⁸, propos appuyés par une autre étude⁴⁵⁶.

Bien que la première étude concernant le sujet ait rapporté la nécessité de DC-SIGN pour le transfert du virion aux cellules T par les MDDC⁵, plusieurs travaux subséquents bloquant l'interaction entre DC-SIGN et le virus par des anticorps spécifiques, par d'autres hydrates de carbone (mannan) ou encore en diminuant son expression par siRNA (« small interfering RNA ») n'ont montré qu'une diminution partielle (de 20 à 50%) de la *trans* infection^{7,451,457-460}. D'autres études ont même observé que l'inhibition de l'interaction entre DC-SIGN et le VIH-1 sur des MDDC n'avait aucun effet sur la *trans* infection du virion^{448,461-463}. DC-SIGN n'est donc pas à lui seul entièrement responsable de ce phénomène. À cet égard, les DC expriment d'autres facteurs capables de lier le VIH-1 à leur surface. Parmi ces facteurs, le MR, le DC « Immunoreceptor » (DCIR) et le syndecan-3 peuvent capter les virions et favoriser la *trans* infection des cellules T^{462,464-466}. L'importance de DC-SIGN dans la *trans* infection *in vivo* reste donc encore à définir et

l'hétérogénéité des modèles cellulaires pourrait expliquer l'inconstance des résultats (Revu par⁴⁶⁷). À ce titre, diverses études conduites avec des DC *ex vivo* prêchent pour une implication de DC-SIGN, de modeste à importante, dans la capture⁴⁶⁸ et le transfert du VIH-1 aux cellules T^{7,469}.

Après sa capture par DC-SIGN, le VIH-1 est internalisé par endocytose dans des puits de clathrines et est conduit vers les voies endosomales et lysosomales où la majorité des virions sont dégradés et ensuite présentés sur le CMH II afin de générer une réponse T CD4⁺ spécifique^{408,470-472}. Les virions liés à DC-SIGN peuvent aussi prendre la voie de la dégradation par le protéasome via l'interaction entre la queue cytoplasmique de DC-SIGN et la « leucocyte-specific protein 1 » (LSP1) pour ensuite être présentés de façon croisée sur le CMH I^{473,474}. Une fois dans les compartiments lysosomiaux, l'acidification permet à DC-SIGN de relâcher son ligand destiné à la dégradation alors que lui-même est recyclé en surface^{433,437}. Il a été rapporté qu'une fraction des virions internalisés pouvaient échapper à la dégradation pour être redirigés vers des compartiments intracellulaires non-lysosomiaux^{5,6}. Protégés de la dégradation, ces virions peuvent par la suite retourner infecter les cellules T. Pour certains, l'internalisation du VIH-1 par DC-SIGN semble nécessaire pour lui permettre d'être transmis sous sa forme infectieuse⁶ alors que d'autres ont démontré que les virions de surface sont ceux qui sont transmis aux cellules T^{449,475} ou n'ont pas observé de stockage à long terme du virus^{447,448,451}. Le mécanisme par lequel le VIH-1 échappe à la dégradation suivant son internalisation par DC-SIGN demeure obscur encore à ce jour. L'interaction entre Nef et DC-SIGN pourrait en partie expliquer l'échappement à la dégradation. Nef, la protéine accessoire du VIH-1, interagit avec le motif LL de la queue cytoplasmique de DC-SIGN dans des lignées épithéliales et prévient son internalisation⁴⁷⁶. Les résultats sur l'implication de DC-SIGN dans la *trans* infection sont discordants, et les études ne s'entendent pas pour dire si le virus est retenu dans des compartiments intracellulaires pour plusieurs jours, s'il demeure en surface, s'il est recyclé en surface après son internalisation ou encore s'il est dégradé immédiatement suivant son internalisation. Le modèle cellulaire dans lequel ces différentes expériences sont conduites y joue pour beaucoup⁴⁵⁹ (Revu par⁴⁶⁷).

En plus de participer à la transmission du virus à d'autres types cellulaires, il a été rapporté que DC-SIGN pouvait jouer un rôle dans l'infection de la DC⁴⁴⁹. La coexpression de DC-SIGN, de CD4 et du corécepteur sur des lignées lymphocytaires facilite l'entrée du VIH-1 dans la cellule, et ce, particulièrement chez les lignées qui n'expriment pas des niveaux suffisants de CD4 et de corécepteurs pour s'infecter en temps normal^{477,478}. En concentrant le virus à la surface cellulaire, DC-SIGN pourrait faciliter la rencontre avec le récepteur et corécepteur du VIH-1 et favoriser l'infection dit en *cis*⁴⁷⁷. Le même mécanisme s'appliquerait à d'autres virus comme l'Ébola, l'influenza H5N1 et le virus de dengue⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹. Cependant, l'implication de DC-SIGN dans l'infection en *cis* de la DC a été mis en doute⁴⁶⁸, et certains groupes ont même rapporté que la coexpression de DC-SIGN et de CD4 favoriserait plutôt une compétition entre les deux récepteurs, ce qui permettrait de diminuer la fusion virale⁴⁷⁴ ou de réduire la transmission via DC-SIGN⁴⁸². De plus, DC-SIGN et DC-SIGNR empêcheraient la relâche des particules de VIH-1 nouvellement produites, d'une part, en les réinternalisant vers les voies de dégradation et, d'autre part, en retirant gp120 de la surface cellulaire, empêchant la relâche de particules virales complètes et infectieuses⁴⁸³.

L'implication de DC-SIGN dans l'infection en *trans* d'autres types cellulaires ne semble pas se limiter au VIH-1. D'autres pathogènes comme le virus de la rougeole⁴⁸⁴, l'Ébola⁴⁸⁰, l'influenza H5N1⁴⁸¹, l'hépatite C (VHC)⁴⁸⁵ et le CMV⁴⁸⁶ subissent le même sort suivant leur liaison à DC-SIGN ou DC-SIGNR. La forme soluble de DC-SIGN augmente la *cis* infection du CMV⁴²⁷ alors qu'elle empêche la *trans* infection du VIH-1⁶.

DC-SIGNR, quant à lui, a fait l'objet de beaucoup moins d'études. Capable de transférer le VIH-1 aux cellules T adjacentes, il ne semble pas avoir les propriétés d'un récepteur pouvant être recyclé en surface mais plutôt celles d'un récepteur d'adhésion⁴³³.

La fonction de DC-SIGN ne se limite pas à son activité de récepteur d'antigènes : la signalisation via DC-SIGN est aussi impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire.

5.4 La signalisation et l'implication dans la réponse immunitaire

En reconnaissant des antigènes du soi ou des pathogènes hautement glycosylés, les lectines de type C exprimées par les DC participent à maintenir la balance entre l'immunité et la tolérance dans les tissus (Revu par⁴⁸⁷). À la suite de la reconnaissance d'un pathogène, DC-SIGN affecte le profil d'expression de cytokines vers un environnement immunorégulateur. C'est pourquoi, d'après ces premières observations, il a été proposé que les pathogènes pirataient DC-SIGN afin d'échapper à la réponse immunitaire⁴⁸⁸.

Plusieurs voies de signalisation différentes sont induites suivant la reconnaissance de DC-SIGN. La stimulation de DC-SIGN par des anticorps conduit à la phosphorylation de ERK1/2, Akt et PI3K (« phosphatidylinositol-3-OH kinase ») et empêche la maturation de la DC⁴⁸⁹. La liaison du VIH-1 aux MDDC induit aussi une voie dépendante de ERK, stimule la production d'IL-10 et compromet la maturation⁴⁹⁰. Cette interaction dépend du niveau de glycosylation de l'enveloppe et impliquerait DC-SIGN⁴⁹⁰. ManLAM, un composé de la membrane de *M. tuberculosis*, active plutôt la sérine thréonine kinase Raf-1 de façon distincte de la voie ERK et conduit à l'acétylation de la sous-unité p65 de NF-κB. Après la translocation de NF-κB induite par la stimulation des TLR, l'acétylation de p65 prolonge l'activité transcriptionnelle de NF-κB et augmente la transcription du gène de l'IL-10⁹. Ainsi, DC-SIGN module l'activité des TLR car la présence d'un ligand de DC-SIGN augmente l'expression d'IL-10 en réponse à une stimulation au LPS^{488,489}. La nature du ligand qui engage DC-SIGN est aussi importante pour déterminer quelle voie de signalisation sera induite. Le complexe de signalisation de DC-SIGN comprend les protéines LSP1, KSR1 et CNK nécessaires au recrutement de Raf-1. Après l'engagement de DC-SIGN par un ligand contenant des résidus mannose (VIH-1, *M. tuberculosis*), le recrutement de LARG (« leukemia-associated Rho guanine nucleotide-exchange factor ») et de la protéine Rho-GTPase Rho-A favorise l'activation de Raf-1 et augmente l'expression d'IL-10, d'IL-6 et d'IL-12 induite par l'engagement du TLR4⁴⁹¹. En revanche, l'engagement de DC-SIGN par un pathogène exprimant des résidus fucose comme *H.*

pylori conduit à la dissociation du complexe de signalisation et augmente l'expression d'IL-10 en diminuant celle d'IL-12 et d'IL-6⁴⁹¹.

Ainsi, la signalisation via DC-SIGN coïncide avec un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire. De nombreux résultats sur diverses pathogènes argumentent en ce sens. La liaison de DC-SIGN par de faibles concentrations de bactéries de la flore commensale favorise l'induction d'IL-10 et la génération de Treg par les DC intestinales⁴⁹². Salp15, une protéine salivaire de la tique *Ixodes* causant la maladie de Lyme, mène aussi à l'activation de Raf-1 suivi de MEK (« mitogen-activated protein kinase kinase »). L'activation de cette voie de signalisation inhibe l'expression d'IL-12, d'IL-6 et de TNF- α induite par TLR2 et TLR4 et supprime aussi la capacité des DC à induire la prolifération des cellules T⁴⁹³. L'engagement de DC-SIGN par divers pathogènes (*H. pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *M. tuberculosis*, *bovis* BCG et *leprea*, *Enterobacter sakazakii*, *Candida Albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*, *Dermatophagoides pteronysinus*) module la réponse aux TLR et conduit à la sécrétion d'IL-10, et de TGF- β dans le cas de *E. sakazakii*, diminue la maturation de la DC, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des cellules T ou leur polarisation vers le phénotype T_H1^{9,488,494-497}. Ne se limitant pas aux pathogènes, l'interaction entre DC-SIGN et certains carcinomes qui expriment un profil anormal de glycanes favorise aussi l'expression d'IL-10 dans les tumeurs et diminue la réponse anti-tumorale^{419,441,442}. Toutefois, une étude a rapporté que la liaison de DC-SIGN au LPS de *Neisseria meningitidis* mutant orientait la réponse vers un phénotype T_H1⁴⁹⁸.

Dans le cas du VIH-1, en empêchant la maturation des DC, DC-SIGN module aussi la réponse pro-inflammatoire induite par les TLR, favorise l'expression d'IL-10, empêche l'expression de cytokines T_H1 et réduit la prolifération des T CD4^{+8,490}. La signalisation de DC-SIGN engagé par le VIH-1 participe aussi à la *cis* et à la *trans* infection de la DC. L'engagement de DC-SIGN par le VIH-1 ou un anticorps stimulant favorise le recrutement de LARG et accentue l'activité de Rho-A. L'activation de cette voie, qui empêche la maturation de la DC, favorise la formation d'une synapse infectieuse⁸. D'ailleurs,

l'activation de Cdc42 par DC-SIGN favorise la formation de protubérances membranaires capables de transférer le VIH-1⁴⁵⁵. Enfin, la signalisation via TLR8 couplée à la signalisation par DC-SIGN favorise la transcription du VIH-1. La phosphorylation de Raf-1 suivant la liaison entre gp120 et DC-SIGN induit la phosphorylation de NF-κB, transloqué au noyau par l'activation de TLR8, et induit le recrutement de pTEF-b impliqué dans la génération de transcrits du VIH-1. Ainsi, l'engagement simultané de DC-SIGN et du TLR8 renforce l'infection productive de la DC⁴⁹⁹.

L'implication de ces réponses *in vivo* reste cependant à définir. Peu d'études se sont intéressées à étudier la fonction de ces récepteurs dans des modèles animaux. L'expression de DC-SIGN humain dans un modèle murin transgénique suggère cependant que la capacité de DC-SIGN à contenir la réponse inflammatoire est plutôt bénéfique puisqu'elle limite les dommages tissulaires et prolonge la survie suivant l'infection à *M. tuberculosis*⁵⁰⁰. Son homologue murin, SIGNR1, est impliqué dans l'induction de la tolérance aux antigènes alimentaires. En induisant l'expression d'IL-10, SIGNR1 favorise une réponse Treg (Tr1) et réduit la réponse anaphylactique chez la souris⁵⁰¹. Dans un modèle d'infection à VIS, la présence de macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺ dans le myocarde est plus importante chez les singes qui ne développent pas de myocardite et corrèle inversement avec l'infiltration de lymphocytes T^{502,503}. Enfin, le même groupe a observé des niveaux d'expression élevés de DC-SIGN sur les macrophages de la rate durant l'infection non pathogénique alors que des niveaux réduits de DC-SIGN corrèlent avec la déplétion des cellules T CD4⁺ dans le modèle d'infection pathogénique. Par conséquent, une diminution de DC-SIGN aux différents sites lymphoïdes pourrait accentuer la progression vers le SIDA⁵⁰⁴.

5.5 Le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR

Or, étudier l'impact des mutations génétiques de DC-SIGN et DC-SIGNR pourrait contribuer à identifier leur participation dans la réponse aux pathogènes chez l'humain. Comprendre comment les mutations modifient leur fonction permettrait de mieux cerner de quelle manière DC-SIGN et DC-SIGNR participent aux diverses infections : 1) en

favorisant l'entrée et la transmission des pathogènes; 2) en contribuant à leur échappement de la réponse immunitaire; 3) en participant eux-mêmes à la mise en place de la réponse immunitaire ou encore; 4) en contenant l'inflammation pour prévenir les dommages tissulaires causés par l'inflammation incontrôlée.

Des variants génétiques de DC-SIGN ont été identifiés dans diverses populations et ont été associés avec l'évolution de l'infection à différents pathogènes. La mutation du promoteur qui présente un changement d'une thymine (T) pour une cytosine (C) en position -336 diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN en affectant un site de liaison du facteur de transcription Sp1^{505,506}. Sakuntabhai et ses collaborateurs ont observé dans une cohorte thaïlandaise que les porteurs de l'allèle C sont protégés contre l'infection au virus de dengue, mais parmi les patients infectés, les porteurs des génotypes CC/CT sont plus à risque de développer une fièvre hémorragique à la suite de l'infection⁵⁰⁵. Une étude chez les Taïwanais a tiré des conclusions opposées. Dans cette étude, c'est le génotype TT qui est associé avec une protection contre l'infection à la dengue. Encore une fois, les génotypes CC et CT augmentent la susceptibilité à la fièvre hémorragique, et les MDDC de ces patients présentent un pourcentage plus élevé de cellules exprimant DC-SIGN couplé à une production accrue de TNF- α , d'IL-12 et d'IP-10 en réponse à l'infection par le virus de dengue⁵⁰⁷. Dans le cas de l'hépatite C, la mutation p-336 n'a pas été associée avec la susceptibilité à l'infection dans une cohorte d'irlandais, mais chez les patients en infection chronique, les porteurs de l'allèle C présentent une forme plus sévère de la maladie du foie⁵⁰⁸. Chez les Cantonais, l'étude du polymorphisme du promoteur de DC-SIGN a montré que les porteurs des allèles sauvages en position p-139, p-336, p-871 et p-939 sont moins à risque de développer des carcinomes nasopharyngiens, dont l'agent étiologique est potentiellement le virus d'Epstein-Barr. De plus, les génotypes p-139CC et p-939TT sont significativement associés avec un risque augmenté de développer des carcinomes nasopharyngiens⁵⁰⁹. Toujours dans la population chinoise, les porteurs du génotype p-336TT présentent plus de chance d'avoir un mauvais pronostic clinique suivant l'infection au SARS-coronavirus⁵⁰⁶, alors qu'une autre étude n'a montré aucune association⁵¹⁰. Dans une étude brésilienne, l'allèle p-336C a été associée avec la protection contre l'infection au

HTLV-1⁵¹¹. Chez les Espagnols, le variant p-336C augmente la susceptibilité à la maladie de celiac chez les individus HLA-DQ2 négatifs. Les individus susceptibles à la maladie de celiac développent une réponse inflammatoire pathologique suivant l'exposition au gluten⁵¹².

Plusieurs études se sont intéressées à l'influence du polymorphisme de DC-SIGN dans l'infection à *M. tuberculosis*. Barreiro et son équipe ont observé que les allèles p-871T et p-336C augmentent le risque de développer la tuberculose dans une cohorte sud-africaine⁵¹³. À l'inverse, chez des populations d'Afrique sub-saharienne, le variant p-336C protège contre la tuberculose pulmonaire⁵¹⁴. Le génotype CC diminue le risque de développer des cavitations induites par la tuberculose chez les Africains, mais protège contre la fièvre et non contre la cavitation chez les Chinois^{514,515}. D'autres études n'ont observé aucune association entre le polymorphisme du promoteur de DC-SIGN et le risque de développer la tuberculose⁵¹⁵⁻⁵¹⁸ ou la lèpre causée par *M. leprea*⁵¹⁹.

Dans le cas du VIH-1, la mutation du promoteur p-336C a été associée avec un risque augmenté de s'infecter par voie parentérale, mais pas sexuelle chez des Américains de descendance européenne⁵²⁰. Une autre étude s'intéressant à la progression vers le SIDA a observé une association entre le variant p-139G du promoteur de DC-SIGN et une progression accélérée de la maladie chez des hémophiles japonais⁵²¹. Aucune association n'a été observé entre les mutations p-336C et p-139C et la susceptibilité à acquérir le VIH-1 par transmission hétérosexuelle chez les Thaïlandais⁵²².

Le nombre de régions répétées constituant le corps de la protéine, codé par l'exon 4, varie selon les populations⁴⁰². Le nombre de répétitions varie entre 2 et 10 entre les individus, 7 répétitions étant l'allèle le plus fréquent (Revu par⁴⁴⁵). La région répétée de DC-SIGNR est hautement polymorphique (54 % de la variabilité du gène) alors que celle de DC-SIGN l'est beaucoup moins (2 % de la variabilité). La pression de sélection plus forte sur DC-SIGN expliquerait cela⁴⁰². Cette région est impliquée dans la tétramérisation du récepteur et le support du CRD, responsable de liaison aux pathogènes. La variation de la longueur du corps de la protéine influence donc son affinité pour le ligand⁴⁰⁵. Le nombre

de répétitions dans l'exon 4 de DC-SIGN a été étudié en corrélation avec la susceptibilité à l'infection au VIH-1. Présenter un allèle codant moins de 5 répétitions ou être hétérozygote pour le nombre de répétitions diminue la susceptibilité au VIH-1 chez les exposés non infectés dans des populations chinoise et caucasienne^{523,524}, ce qui n'a pas été confirmé dans la population indienne^{525,526}. La variation du nombre de régions répétées chez DC-SIGN n'affecte pas la susceptibilité à la tuberculose^{516,517,527}.

La variation du nombre de répétitions est le polymorphisme le plus étudié en relation avec la susceptibilité/protection aux infections chez DC-SIGNR. Chez les Chinois, les individus homozygotes pour le nombre de régions répétées de l'exon 4 de DC-SIGNR sont moins susceptibles à l'infection au virus du SARS que les individus hétérozygotes⁵²⁸. *In vitro*, les cellules homozygotes pour le nombre de répétitions montrent une plus grande capacité à capturer le virus du SARS, à le conduire vers la dégradation par le protéasome résultant par une plus faible capacité à transmettre le virus à d'autres types cellulaires⁵²⁸. D'autres études n'ont cependant pu répéter l'association dans la même population^{510,529,530}. Exprimées sur des lignées fibroblastiques, les formes de DC-SIGNR portant 5 ou 6 répétitions n'ont montré aucune perte des capacités de liaison, de tétramérisation ou de transfert des pathogènes (SARS, Ebola et VIH-1) comparativement aux cellules exprimant la protéine contenant 7 répétitions⁵³¹. Dans l'infection au VHC, les allèles et génotypes du nombre de répétitions de DC-SIGNR se distribuent également entre les individus infectés et non infectés, mais parmi les patients VHC-positif, ceux présentant 5, 6 ou 7 répétitions ont une charge virale plus élevée que les individus avec des allèles contenant 4 ou 9 répétitions⁵³². Le polymorphisme de DC-SIGNR n'a pas montré d'effet sur la fièvre de dengue⁵⁰⁵. Durant l'infection au VIH-1 par contre, les porteurs d'un génotype hétérozygotes (7/5 ou 9/5) ou homozygotes pour 5 répétitions sont plus résistants à l'infection que les individus dont le génotype est 7/7^{522,533,534}. De plus, l'échange entre un aspartate pour une asparagine à l'exon 5 diminue aussi la susceptibilité à l'infection⁵²². Enfin, une dernière étude n'a observé aucun impact du polymorphisme de l'exon 4 sur la susceptibilité au VIH-1 ou la progression de l'infection⁵³⁵.

La figure 5 montre l'emplacement de ces différentes mutations sur la carte génomique de DC-SIGN et DC-SIGNR.

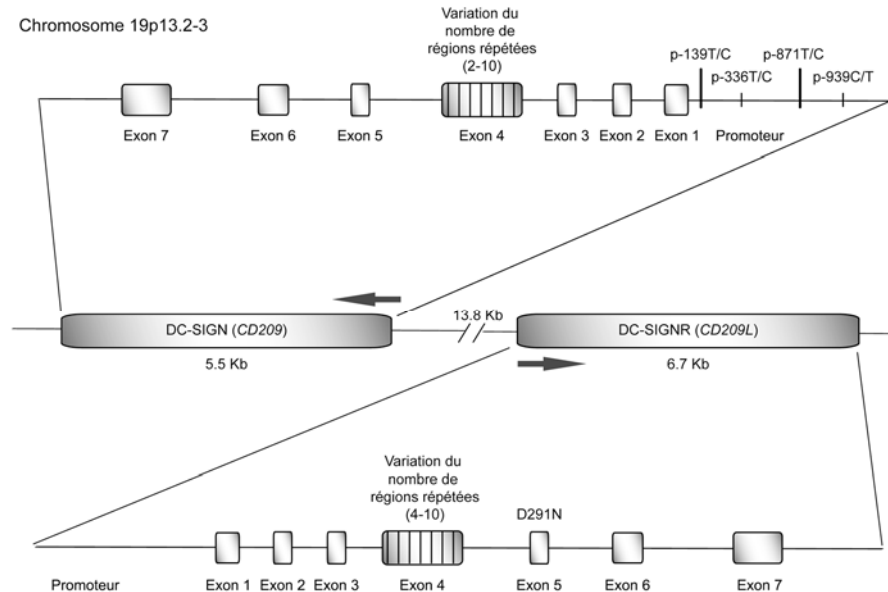


Figure 5: Représentation schématique de l'organisation génomique de DC-SIGN et DC-SIGNR.

Illustration du positionnement des différentes mutations de DC-SIGN et DC-SIGNR associées à l'infection à divers pathogènes.

Adapté de Barreiro et coll. 2005, *Am. J. Hum. Genet* 77, p.869

Globalement, plusieurs études dont les populations, le pathogène, le nombre d'individus à l'étude et la fréquence des mutations varient ont tiré des conclusions opposées sur l'impact des mutations de DC-SIGN et DC-SIGNR. La nature du pathogène, les stratégies qu'il a développées et le processus de pathogénèse qu'il engendre varient et peuvent expliquer les effets divers observés entre ces études. La compréhension de l'impact fonctionnel des différents mutants et l'influence de ceux-ci pour un pathogène donné sont des outils d'importance pour comprendre la fonction de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la susceptibilité à l'infection au VIH-1.

6. DC-SIGN et DC-SIGNR dans la TME du VIH-1

L'intérêt de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la TME du VIH-1 a commencé après que Geijtenbeek ait démontré l'implication de DC-SIGN dans la transmission du virus. Peu de temps après, Soilleux et ses collaborateurs démontraient l'expression de ces récepteurs au niveau du placenta et proposaient que leur capacité à *trans* infecter puisse être un mécanisme possible de passage transplacentaire du VIH-1⁵³⁶.

6.1 Le placenta

Au niveau du placenta, DC-SIGN est exprimé sur les cellules de Hofbauer. De phénotype CD14⁺, CD68⁺, CD163⁺, DC-SIGN⁺, HLA-DR⁺, MR⁺, les cellules de Hofbauer présentent un phénotype M2^{414,537,538}. Établis en présence d'un environnement T_H2, les macrophages de type M2 sont impliqués dans l'immunorégulation et la réparation des tissus (Revu par⁴²⁴). DC-SIGNR, quant à lui, est exprimé sur les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires placentaires⁴³⁰.

L'environnement placentaire représente un amalgame entre l'immunité maternelle et l'immunité fœtale qui se tolèrent mutuellement⁵³⁹. Après avoir traversé du côté fœtal par une brèche au niveau de la barrière placentaire, par transcytose à travers les trophoblastes ou associé à une cellule maternelle, le VIH-1 pourrait être capturé par une cellule de Hofbauer. Les cellules de Hofbauer peuvent être infectées par le VIH-1¹⁵⁹⁻¹⁶³, mais elles sont capables de restreindre la production virale¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. L'expression de DC-SIGN à la surface des cellules de Hofbauer pourrait favoriser l'infection de celles-ci en captant et en concentrant le virus à sa surface, ou encore, conduire à la *trans* infection de cellules T fœtales. Bien qu'ils soient plutôt rares dans le placenta et en minorité par rapport aux lymphocytes T CD8⁺, des lymphocytes T CD4⁺ fœtales y résident aussi^{414,540} et sont des cibles potentielles pour le virus. Du côté maternel, et séparés des macrophages placentaires par une couche de trophoblastes, les macrophages décidaux, aussi de phénotype M2, expriment DC-SIGN^{414,416,541} et peuvent être infectés par des souches virales R5⁵⁴². L'expression de DC-SIGN de chaque côté de la barrière fœtale et sa capacité à transférer le

VIH-1 aux autres cellules pourraient favoriser la transmission cellule-cellule du côté maternel vers le côté fœtal et disséminer l'infection⁵³⁶. DC-SIGNR, présent dans les capillaires placentaires pourrait adsorber les particules virales présentes dans le placenta pour ensuite favoriser leur rencontre avec les lymphocytes T circulants⁵³⁶.

Aussi, l'implication de DC-SIGN dans la réponse innée pourrait jouer un rôle dans la mise en place d'un environnement réfractaire au passage trans placentaire du virus et influencer l'infection IU au VIH-1.

6.2 Les muqueuses intestinales

L'infection par voie IP et PP dépend du passage du VIH-1 à travers la muqueuse intestinale de l'enfant. Quelques études ont montré la présence de cellules exprimant DC-SIGN dans les muqueuses intestinales^{543,544}, et DC-SIGN est capable de transporter le VIH-1 à travers ces muqueuses pour *trans* infecter les lymphocytes intestinaux⁵⁴⁵.

6.3 Le lait maternel

La présence de macrophages maternels exprimant DC-SIGN et capables de transférer le VIH-1 a aussi été observée dans le lait maternel⁵⁴⁶. Il a été proposé que la capture de virions via DC-SIGN exprimé par les macrophages du lait maternel pouvait être responsable de la transmission du VIH-1 dans l'épithélium intestinal de l'enfant, favorisant son infection PP⁵⁴⁶. En contrepartie, plusieurs facteurs, comme des lipases de sels biliaires (« bile-salt stimulated lipases »), des protéines conjuguées à des antigènes Lewis^X, des anticorps naturels contre le CRD de DC-SIGN, la mucine épithéliale MUC1 et des oligosaccharides sont présents dans le lait maternel et inhibent la *trans* infection via DC-SIGN⁵⁴⁷⁻⁵⁵¹.

Hypothèse

De multiples facteurs influencent la susceptibilité de l'enfant à acquérir le VIH-1. Exposé au virus durant tout son développement intra-utérin et durant les premiers mois de sa vie par le lait maternel, l'enfant doit répondre à l'infection virale et conserver l'intégrité de sa barrière placentaire et de sa muqueuse intestinale afin de se prémunir contre l'infection au VIH-1. L'environnement immunitaire du placenta, la réponse adaptative et la façon dont elle est induite par la réponse innée sont tous susceptibles d'influencer le cours de l'infection de l'enfant. La réponse maternelle aussi est importante puisqu'elle détermine la transmissibilité de celle-ci. Sa capacité à contrôler la charge virale et l'avancement de sa maladie sont des facteurs déterminants dans l'infection de l'enfant.

Puisque DC-SIGN et DC-SIGNR sont à la fois impliqués dans la transmission du VIH-1, qu'ils jouent un rôle dans l'immunité innée, et qu'ils sont exprimés à l'interface mère-enfant, dans les muqueuses intestinales et dans le lait maternel, ils pourraient moduler la susceptibilité de l'enfant et la transmissibilité de la mère. Ainsi, le polymorphisme qui affecte l'expression ou la structure de DC-SIGN et DC-SIGNR pourrait avoir une influence sur le taux de TME du VIH-1.

Objectifs

1. Définir le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population zimbabwéenne.

Le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR module l'infection à certains pathogènes dont le VIH-1. Puisque nous voulons étudier l'influence des mutations de DC-SIGN et DC-SIGNR sur le taux de TME du VIH-1, la première étape du présent travail a été de caractériser le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population zimbabwéenne, population à l'étude, et de reconstruire les haplotypes présents dans cette population.

2. Déterminer l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR et la TME du VIH-1.

À la suite de la caractérisation du polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR, l'association entre les haplotypes et le risque de TME du VIH-1 a été déterminée dans une cohorte recrutée à Harare, au Zimbabwe.

3. Définir l'impact fonctionnel des mutations de DC-SIGN et DC-SIGNR.

Enfin, nous avons défini l'impact fonctionnel des SNP associés à un risque augmenté de TME du VIH-1 afin de mieux cerner le rôle de DC-SIGN et DC-SIGNR.

Description des populations

1. Cohorte du Zimbabwe

Les études d'association entre le polymorphisme génétique de DC-SIGN et DC-SIGNR ont été conduites sur des échantillons de l'étude sur la vitamine A pour les mères et enfants du Zimbabwe (« Zimbabwe Vitamin A for Mothers and Babies trial » : ZVITAMBO). L'objectif premier de cette étude était de mesurer l'effet sur la transmission PP du VIH de la prise postpartum d'une dose importante de vitamine A donnée à des mères VIH-positives ou à leur enfant. Le second objectif de cette étude était de mesurer l'effet de cette dose de vitamine A sur la mortalité des enfants exposés au VIH²²⁴.

Le Zimbabwe est un pays d'Afrique australe enclavé entre l'Afrique du Sud, le Botswana, le Mozambique et la Zambie. Il se retrouve parmi les pays dont la prévalence du VIH est la plus élevée dans le monde¹, et celle-ci, au moment de l'étude, était 25,8 % de chez les adultes²²⁴. Conduite entre novembre 1997 et janvier 2000, l'étude ZVITAMBO a recruté 14 110 couples mères-enfants provenant de 14 cliniques et hôpitaux différents de Harare. L'étude se divisait en quatre groupes de traitement, dont un bras placebo, dans lequel ni la mère ni l'enfant ne recevaient de vitamine A, et d'où proviennent les échantillons des 197 couples mère-enfant de notre étude.

Les mères VIH-positives incluses dans cette étude étaient testées par ELISA et le résultat était confirmé par immunobuvardage. Au moment de cette étude, les ARV n'étaient pas encore disponibles à Harare. Suivant la naissance, des visites de suivi étaient réalisées à 6 semaines, à 3 mois et tous les 3 mois jusqu'à 12 à 24 mois. Les enfants étaient considérés non infectés au VIH s'ils obtenaient un résultat négatif au test ELISA à 18 mois ou plus et s'ils présentaient au moins deux résultats négatifs au test de PCR visant à détecter l'ADN viral dans le sang de celui-ci obtenu lors de visites antérieures. Un résultat PCR positif à la naissance définissait une infection IU, alors qu'un résultat négatif à la naissance mais positif à 6 semaines d'âge définissait une infection IP. Enfin, l'infection PP était déterminée

par des résultats de PCR négatifs à la naissance et à 6 semaines, mais positifs à une des visites subséquentes. Ainsi, dans la cohorte ZVITAMBO, pour tous les enfants nés de mères VIH-positives, le taux d'infection était de 8,6 % à la naissance, de 26,6 % à 6 semaines et de 37,5 % à 24 mois pour une proportion de 22,9 % d'infections par voie IU, de 48 % par voie IP et de 29,1 % par voie PP. Des données socio-démographiques, obstétriques et médicales étaient fournies pour chaque couple mère-enfant. Enfin, durant cette étude, la complémentation en vitamine A de la mère ou de l'enfant n'a montré aucun effet sur la TME PP du VIH ou la mortalité de l'enfant exposé²²⁴.

2. Cohorte du Bénin

Pour définir l'impact fonctionnel des mutations de DC-SIGN, nous avons recruté une petite cohorte de couples mère-enfant à Cotonou, au Bénin. Le Bénin est situé en Afrique de l'Ouest côtière. Selon les données du programme national de lutte contre le SIDA, la prévalence du VIH mesurée en consultation prénatale à Cotonou est de 3 à 4 % et le sous-type VIH-1 est retrouvé dans 98 % des cas. Entre avril 2010 et juillet 2010, nous avons obtenu des échantillons de placenta, de sang de cordon et de sang maternel provenant de 30 couples mère-enfant dont la mère était VIH-négative et de 11 couples mère-enfant dont la mère était VIH-positive. Aucun des enfants n'a été infecté. Les mères étaient recrutées lors des visites anténatales aux hôpitaux St-Luc et Bethesda de Cotonou, et des données socio-démographiques, sur l'historique de maternité et sur les conditions obstétriques ont été recueillies.

Le statut VIH de la mère était déterminé et reconfirmé par ELISA. Dans le cadre du programme national de lutte au SIDA, la mère était mise sous traitement antiviral durant la grossesse et l'accouchement, et l'enfant exposé recevait une combinaison d'ARV ou une seule dose de névirapine à la naissance.

Article 1

DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: Potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility

Geneviève Boily-Larouche, Lynn S. Zijenah, Mike Mbizvo, Brian J. Ward, Michel Roger

Publié dans : *Human Immunology* 2007; 68: 523-530

Contribution des co-auteurs :

Les personnes ci-mentionnées ont participé à la réalisation de cet article. Geneviève Boily-Larouche a participé au devis de l'étude et à la rédaction du manuscrit. De plus, elle a effectué l'amplification et le séquençage complet des gènes de DC-SIGN et DC-SIGNR. Elle a aussi effectué les analyses des séquences, les analyses bioinformatiques et statistiques. Lynn Zijenah, Mike Mbizvo et Brian Ward ont participé au recrutement et à la mise en place du projet ZVITAMBO et fourni les échantillons d'ADN nécessaires à ce projet. Michel Roger a coordonné et participé au devis de l'étude, à l'analyse statistique des résultats et à la rédaction du manuscrit.

DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility

Geneviève Boily-Larouche^{a,b}, Lynn S. Zijenah^c, Mike Mbizvo^d, Brian J. Ward^e, and Michel Roger,^{b,*}

^aLaboratoire d'Immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Montréal, Canada)

^bDépartement de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal (Montréal, Canada)

^cDepartment of immunology, University of Zimbabwe (Harare, Zimbabwe)

^dWorld Health Organization (Geneva, Switzerland)

^eResearch Institute of the McGill University Health Center (Montreal, Canada)

Total word count (excluding abstract): 3060

Abbreviated title: DC-SIGN and DC-SIGNR DNA sequence analysis in Zimbabweans

Keywords: African, antigen presentation, DC-SIGN, DC-SIGNR, polymorphism



Abbreviations: CDR, C-terminal carbohydrate recognition domain; DC, Dendritic cell; DC-SIGN, Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region;

Abstract

DC-SIGN and DC-SIGNR are C-type lectins that serve both as cell adhesion and pathogen recognition receptors. Because of the essential role of these molecules in the immune response, the implication of their alleles in human disease states, and the possible genetic variation at these loci among ethnically diverse populations, we undertook a study to analyse the full extent of DC-SIGN and DC-SIGNR polymorphisms in Caucasian Canadian and indigenous African populations. We report several novel nucleotide variants within regulatory 5'- and 3'-untranslated regions (UTR) of the genes that could affect their transcription and translation. There were significant differences in the distribution of DC-SIGN and DC-SIGNR alleles among African and non-African populations. Finally, our study clearly demonstrates that Africans show greater genetic diversity at these two closely-related immune loci than observed in other major population groups. The differences may reflect evolutionary pressures generated by environmental factors, such as prevalent pathogens in these geographically distinct regions. Further studies will be needed to determine the net impact of DC-SIGN and DC-SIGNR genetic variants on the expression, translation and function of the proteins and to understand how these functional polymorphisms may affect immune responses or immune escape.

Word count : 193

Introduction

Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN/CD209) and DC-SIGN related (DC-SIGNR/L-SIGN/CD209L) are C-type lectins involved in both innate and adaptive immunity. DC-SIGN is expressed on subsets of dendritic cells (DC) and macrophages [1, 2], whereas DC-SIGNR's expression is restricted to endothelial cells of the liver, lymph nodes and placenta [1, 3]. Despite their different expression profiles, DC-SIGN and DC-SIGNR have similar amino acid composition (77% homology) and share an identical intron-exon organisation. A C-terminal carbohydrate recognition domain (CRD) present in both receptors binds pathogens in a Ca^{2+} dependent manner. A neck region, made up of highly conserved 23 amino acid repeats, plays a crucial role in tetramerization and support of CRDs, thus influencing the pathogen-binding properties of these receptors. Finally, a short cytoplasmic tail at the N-terminus with LL and YKSL motifs, and a tri-acydic cluster (EEE) for DC-SIGN is responsible for internalisation and signal transduction [4] leading to cellular maturation, adhesion, migration and differentiation [5]. Both lectins are known to bind multiple pathogens of great public health concern such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, Dengue virus, Ebola virus, hepatitis C virus (HCV), human cytomegalovirus, human herpesvirus 8, HIV-1, HIV-2, measles virus, SARS coronavirus, *Leishmania pifanoi*, *Shistosoma mansoni*, and *Candida albicans* [6-15].

DC-SIGN and DC-SIGNR genes are located on chromosome 19 p13, in close physical proximity (~15 Kb) in head-to-head orientation, resulting from duplication of an ancestral gene [16]. Strikingly, these two genes behave as independent entities and are not in linkage disequilibrium [17]. These receptors appear to have undergone different evolutionary processes leading to considerable diversity in their recognition patterns. Characterisation of their genetic polymorphism may provide insight into the variability of pathogen-recognition patterns among individuals from different ethnic origins, and therefore on the susceptibility or resistance to significant pathogens. In recent years, DC-SIGN and DC-SIGNR polymorphisms have been associated with several infectious diseases. DC-SIGN

promoter variant at position -336G was associated with an increased risk for parenteral transmission of HIV-1 in Caucasian Americans [18] and for dengue hemorrhagic fever in the Thai population [19]. In contrast, the wild-type variant at this position (-336A), was associated with a protective effect against tuberculosis in the coloured South-African population [20] but not in Colombian individuals [21]. The neck regions of DC-SIGN and DC-SIGNR are formed by variable numbers of 69 bp tandem repeats in exon 4 that encode repeating units of 23 amino acids [16]. Heterozygosity for the number of DC-SIGN and DC-SIGNR tandem repeats has been associated with a reduced risk of sexual transmission of HIV-1 in Caucasian Americans [22, 23], but not in Caucasian Europeans [24]. Nattermann et al. [25], found that Caucasian European individuals with 5-, 6-, and 7- repeat alleles of DC-SIGNR had higher HCV-RNA levels when compared with carriers of 4- and 9- repeat alleles. Finally, Chinese individuals homozygous for the DC-SIGNR tandem repeat were less susceptible to SARS infection [26].

To date, little is known about DC-SIGN and DC-SIGNR polymorphisms among African populations in which the burden of health threatening pathogens such as those mentioned above is the greatest. The allelic distribution of DC-SIGN and DC-SIGNR genes in people living in developing countries may differ from those living in industrialized countries due to overdominant selection pressure exerted on specific alleles by prevalent pathogens in these geographic areas [27]. Because of the essential role of the DC-SIGN and DC-SIGNR molecules in the immune response, the implication of their alleles in human disease states, and the possible genetic variation at these loci among ethnically diverse populations, we undertook a study to analyse the full extent of DC-SIGN and DC-SIGNR polymorphisms in Caucasian Canadians and an indigenous African population. We now report the nucleotide sequence diversity of DC-SIGN and DC-SIGNR genes in Caucasian Canadians and in the Shona people of Zimbabwe, selected to represent a homogenous ancestral group.

Materials and methods

Sample Composition

Our samples consisted of stored DNA extracts from 100 unrelated Zimbabweans of the Shona ethnic group recruited in the ZVITAMBO project in Harare (Zimbabwe, Africa) and 100 unrelated Caucasians from Quebec, Canada. The use of these samples for the present study was approved by the research ethics committees.

DNA extraction and DNA sequence analysis

DNA was extracted from whole peripheral blood using standard phenol-chloroform extraction procedure. The nucleotide sequence variation of the entire promoter (5'-UTR), coding regions and part of 3'-UTR of DC-SIGN and DC-SIGNR genes were determined by PCR-amplified direct DNA sequencing method in 50 randomly selected samples of each population. The DNA sequencing procedures were done using the PCR conditions and specific primers as described previously [19]. The reaction products were run in an automated DNA sequencing ABI PRISM 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). All PCR products were sequenced in both directions. Sequences were analysed using Lasergene software (DNA Stars, Madison, WI) and polymorphisms were identified as compared with the reference sequence of human chromosome 19 contig (GenBank accession no NT_077812.2) for DC-SIGN and DC-SIGNR. DNA sequences of the promoter region were analysed with the TESS interface (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) for putative transcription factor binding sites using the TRANSFAC database.

Specific polymorphisms with the potential to affect the proteins' function and/or known to be associated with susceptibility/resistance to pathogens were typed in all study samples (Tables 1 and 2). DC-SIGN mutations in the promoter and in exon 4 were determined by direct DNA sequencing as described above. The number of DC-SIGN and DC-SIGNR exon 4 repeats was determined as described previously [22, 23].

Statistical analysis

Allelic frequencies in our populations were compared using the Chi-square test. Genotypic frequencies were compared with Hardy-Weinberg expectations using the Chi-square test. Haplotype reconstruction was performed by use of the Bayesian statistical method implemented in PHASE, version 2.1.1 [28, 29], using single nucleotide polymorphism (SNP) with a minimum allele frequency of 2%. We applied the algorithm five times, using different randomly generated seeds, and consistent results were obtained across runs.

Results

DC-SIGN polymorphism

We identified 40 SNPs with allelic frequencies >1% in the Canadian and Zimbabwean populations following direct sequencing of the entire DC-SIGN gene (Figure 1A). Among these SNPs, 19 (47.5%) were unique to the Zimbabweans when compared with the Canadians, whereas 4 (10%) were found only in the Canadian samples. Five novel DC-SIGN mutations were identified in the promoter region and in intron 6. In the Zimbabwean population, two novel SNPs were found in the 5'-UTR at positions -819 (A/G) and -332 (G/A) at allelic frequencies of 2%. In the Canadian population, one novel mutation in the promoter region at position -859 (A/G) was found in 2% of the individuals. One novel SNP in intron 6 +148 (G/A) was observed exclusively in 3% of Zimbabweans, while another single novel mutation in intron 6 -39 (insertion of G) shared by both populations was found in 2% of individuals in each population.

The allelic distribution of selected DC-SIGN polymorphisms with the potential to affect the proteins' function and/or known to be associated with susceptibility/resistance to pathogens were typed in all study samples and compared with that of other ethnic populations (Table 1). The genotypic distribution of DC-SIGN SNPs at each position was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.5$) for both populations analysed in the present study. There were significant differences in the distribution of DC-SIGN alleles between Zimbabweans and Canadians for most of the SNPs analysed. The mutations at position -745 (G/T) and -201 (G/T) in the promoter region were observed exclusively in the Zimbabwean population. Promoter variants at position -336 (A/G) was found more frequently in Zimbabweans (45%) than in Canadians (18%) whereas the -871 (A/G) variant was observed less frequently in Zimbabweans (5%) than in Canadians (42%). A cluster of 8 mutations in introns 5 and 6 in high LD, identified as cluster A (H32-H39) by Barreiro et al. [17], was found in 15% of the Zimbabwean population whereas it was almost absent in the Canadian population (1%) (Figure 1A). This cluster of mutations was found in association with the promoter variant at position -201 (G/T) and three exon 4 protein-modifying mutations

coding for the neck region of the protein (H33-H36, figure 1A): codons 198 (positive charged Arg→neutral Gln), 214 (negative charged Glu→negative charged Asp), and 221 (positive charged Arg→neutral Gln). A fourth nonsynonymous substitution in exon 4 at codon 242 (neutral Leu→neutral Val) was associated with the cluster B (H16-18) (Figure 1A). The Cluster A and exon 4 nonsynonymous mutations are observed almost exclusively in African populations (Figure 1A and Table 1) while the cluster B mutations (Figure 1A) are found in both Zimbabwean and Canadian populations as well as in all other major ethnic groups [17, 19, 20].

The allelic composition of DC-SIGN haplotypes and their frequency distribution in Zimbabweans and Canadians is illustrated in figure 1A. In total, we identified 39 different haplotypes. Two major haplotypes (H1, H25) accounted for 70% of the Canadian variability while the two major haplotypes (H1, H22) in the Zimbabwean population represented ~35% of the variability. There were 32 different haplotypes in Zimbabweans and 13 different haplotypes among Canadians. Of those, 26 were found exclusively among Zimbabweans while 7 were unique to the Canadian population. Thus, the Zimbabwean population showed a significant greater DC-SIGN genetic diversity (82%) than the Canadian population (33%) ($p < 0.03$).

DC-SIGNR polymorphism

We observed the presence of 29 DC-SIGNR SNPs with allelic frequencies >1% in the Canadian and Zimbabwean populations (Figure 1B). Of these, 8 were novel DC-SIGNR mutations. Two novel mutations in the 5'-UTR at positions -414 (G/A) and -133 (T/C) were detected exclusively in Canadians at frequencies of 9% and 3%, respectively. In the Zimbabwean population, there were two novel SNPs in exons 2 and 5 found in 3% and 5% of individuals, respectively. The mutation in exon 2 (C/G) is predicted to modify the amino acid composition of the protein at codon 28 (neutral Pro→neutral Leu) while the exon 5 (G/T) at codon 290 is a silent mutation (His→His). There were four novel mutations in the 3'-UTR of the Zimbabwean DC-SIGNR gene. The exon 7 + 223 (deletion of TCT) and exon 7 + 271 (C/G) were linked and found in 15% of individuals. The exon 7 + 333 (T/C)

was linked with exon 5 (G/T) mutation and observed in 5% of individuals. Finally, the exon 7 + 518 (C/T) was found at an allelic frequency of 4% in the Zimbabwean population. The genotypic distribution of DC-SIGNR SNPs at each positions was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.5$).

Haplotype reconstruction of DC-SIGNR showed a wider haplotype diversity (52 different haplotypes) than that found for DC-SIGN (Figure 1B). Interestingly, the haplotype corresponding to the wild-type sequence (H1) was found only in 5% of Canadians and in none of the Zimbabweans. The major haplotype (H15) in Zimbabweans (22%) was also relatively frequent in the Canadian population (19%). Haplotypes (H22, H43, H46) accounted for 27% of Zimbabweans variability and were absent in Canadians. In contrast, haplotypes (H13, H33, H36, H41) accounted for 53% of Canadian variability, whereas they were at very low frequency (H33 at 1%) or absent (H13, H36, H41) in Zimbabweans. Once again, the Zimbabweans showed a greater DC-SIGNR genetic diversity with 34/52 haplotypes (65%) than Canadians with 23/52 haplotypes (44%) although the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). In contrast, Zimbabweans were less likely to present polymorphic DC-SIGNR repeat-regions (Table 2). Genotypic distribution of repeat alleles in Zimbabweans was mostly represented by the wild-type 7/7-repeat form (42%). Moreover, the Zimbabweans were more likely to be homozygous (53%) for the repeat region than the Canadians (33%, $p < 0.01$) and other Caucasian populations (Table 2).

Discussion

Our exhaustive investigation of the nucleotide sequence of DC-SIGN and DC-SIGNR genes in Zimbabwean and Canadian populations revealed the presence of novel variants, mostly in the regulatory regions of these genes. There were two novel promoter (5'-UTR) variants that might influence gene transcription as suggested by a search in the TRANSFAC database. The DC-SIGN -332A variant found in Zimbabweans and the DC-SIGNR -414A variant observed in Caucasian Canadians create potential binding sites for TCF-1 α and E1A-F transcriptional factors, respectively. Four novel mutations in DC-SIGNR 3'-UTR were observed at frequencies ranging from 4% to 15% in the Zimbabwean population exclusively. There are now a number of studies suggesting that genetic variants in 3'-UTR affecting RNA expression can be implicated in human disease (reviewed in [32]). Using computer-based prediction tools (Lasergene software, DNA Stars, Madison, WI), we observed that these novel mutations are likely to modify the secondary structure of the DC-SIGNR 3'-UTR, which could in turn affect mRNA stability or production. Further *in vitro* studies will be needed to assess the possible effects of these novel 5'-UTR and 3'-UTR mutations on DC-SIGN and DC-SIGNR transcriptional and translational activities

They were significant differences in the distribution of DC-SIGN and DC-SIGNR alleles among African and non-African populations. Of interest, the DC-SIGN promoter variant -336G associated with susceptibility to HIV-1 infection [18] and dengue hemorrhagic fever [19] is found significantly more frequently in African than in Caucasian or Asian populations ($p < 0.001$) (Table 1). This observation is very interesting considering the high prevalence of at least the former infection in Africa. The -336G variant, located 214 bp upstream of the major transcription site, affects a Sp1 binding site and modulates *in vitro* DC-SIGN transcriptional activity by decreasing its expression [19]. The reduced DC and macrophage cell surface expression of DC-SIGN in individuals carrying the -336G variant might have deleterious effects on clearance of pathogens by diminishing the antigen-presenting capability of these cells. However, recent *in vitro* studies have shown that HIV-1 and other important pathogens target DC-SIGN to escape immune surveillance and to

promote their survival [33, 34]. Other relatively frequent promoter mutations, found exclusively in Africans, might also affect cell surface expression of DC-SIGN. Indeed, the TRANSFAC database search identified potential TBP and RSRFC4 binding sites in the presence of promoter variant -745A and a c-Myc binding site in presence of the variant -201T. At this point, it is not known whether or not these putative binding sites are biologically significant in the context of DC-SIGN transcription. More effort will be needed to determine the net impact of DC-SIGN promoter variants on its expression and to understand how the altered expression of DC-SIGN may affect immune response capacity or immune escape.

The neck region of DC-SIGN and DC-SIGNR region plays a crucial role in tetramerization of the receptor and support of CRDs, thus influencing the pathogen-binding properties of these receptors. The neck region of DC-SIGN consists of seven amino acid repeats with rare variations, whereas the number of DC-SIGNR repeats is highly variable and differs among different ethnic populations (Table 2). The Zimbabweans are more likely to be homozygous (53%) for the DC-SIGNR repeat region than the Canadians (33%, $p < 0.01$) and other Caucasian populations (Table 2). Genotypic distribution of repeat alleles in Zimbabweans was mostly represented by the wild-type homozygous 7/7-repeat form (42%). A recent study reported that the DC-SIGNR homozygous 7/7 wild-type genotype is associated with an increased risk of HIV-1 infection, whereas the heterozygous 7/5 genotype correlated with resistance to infection [23]. It has been suggested that heterozygous expression of polymorphic neck variants of DC-SIGNR may result in reduced ligand-binding affinity [16, 35, 36]. In fact, homozygous CHO cells transfected with DC-SIGNR containing seven tandem exon 4 repeats (7/7) had higher binding capacity than heterozygous 7/5 transfectants [26]. Whether homozygosity contributes to enhanced infection, immune escape or triggers effective immune responses remains to be established. Guo et al. [37] found that individual with homozygous or heterozygous 5-, 6-, or 7-repeat alleles would express functional DC-SIGNR, whereas shorter alleles would not oligomerize. Despite the fact that the heterozygous genotype did not affect tetramerization of the receptor, it is not excluded that shortening the neck region would significantly

change position of the CRDs relative to the cell surface, thus affecting interaction with pathogens. Accordingly, the high rate of homozygosity at the wild-type repeat allele in Zimbabweans may represent a better pathogen recognition capacity for DC-SIGNR or a better chance for pathogens to subvert DC-SIGNR for immune escape.

We and others [17] have identified four protein-modifying mutations in the neck domain of DC-SIGN that are relatively frequent in Africans but absent in other major population groups (Table 1). These variants are nonconservative substitutions with respect to amino acid composition (codons 198, 214, 221, 242) and polarity (codons 198 and 221) and might induce conformational changes in the protein's neck domain. This, in turn, could affect the oligomerization of the receptor resulting in altered binding capacity and specificity of the DC-SIGN protein. Haplotype reconstruction of the DC-SIGN gene (Figure 1A) in the Zimbabwean population has shown that haplotypes can contain either three (H33-H36), two (H32) or one (H16,H17,H18,H30,H31) of these amino acid changes, thus affecting the conformation of the protein in different manners and contributing to the variability of DC-SIGN at the protein level in this population. Variations in the neck domain of DC-SIGN gene, leading to different forms of the DC-SIGN receptor in Africans, may be the result of selective pressure exerted by prevalent pathogens in these geographically distinct regions.

In summary, we have conducted a thorough analysis of the nucleotide sequence of the DC-SIGN and DC-SIGNR genes in samples collected from Caucasian Canadians and indigenous Zimbabweans. Several novel nucleotide variants within the regulatory 5'- and 3'-untranslated regions of the genes that are important for transcription and translation were identified. The data from this study and others [17, 19, 20, 26, 31] show that the allelic distribution of DC-SIGN and DC-SIGNR genes differs widely in populations from industrialized and developing countries, presumably due to geographically-determined selection pressures. In fact, the prevalence of most of the polymorphisms that could potentially affect either the transcription, translation or function of these proteins was higher in African than in non-African populations. Moreover, haplotype reconstruction clearly demonstrates that Africans show greater genetic diversity at these two closely-

related immune loci than that observed in Caucasian Canadians. A broader spectrum of infectious pathogens including some that are known specifically to subvert DC-SIGN and DC-SIGNR function to escape the immune system might have played an important role in shaping the genetic repertoire of these genes among Africans. Further studies will be needed to determine the net impact of DC-SIGN and DC-SIGNR genetic variants on the expression, translation and function of the proteins and to understand how these functional polymorphisms may affect immune response capacity or immune escape.

Acknowledgement

This work was supported in part by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Réseau Sida et maladies infectieuses du Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). M. Roger is a scientific scholar receiving support from FRSQ. The ZVITAMBO project is supported by the Canadian International Development Agency (R/C Project 690/M3688), Cooperative Agreement DAN 0045-A-005094-00 between the U.S. Agency for International Development and The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and the Rockefeller Foundation. It is a collaborative project of The University of Zimbabwe, The Harare City Health Department, The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and the Montreal General Hospital Research Institute, McGill University.

The authors would like to thank all the participants in this study and the ZVITAMBO Study Group: H Chidawanyika, Jean Humphrey, P Iliff, A Mahomva, F Majo, L Malaba, L Moulton, K Mutasa, J Mutsambi, K Nathoo, M Ndhlovu, L Propper, A Ruff, N Tavengwa, C Zunguza, P Zvandasara . We thank Claudine Matte and Julie Lacaille for processing the specimen.

References

1. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585, 2000.
2. Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B: Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and *in vitro*. *J Leukoc Biol* 71:445-457, 2002.
3. Soilleux EJ, Morris LS, Rushbrook S, Lee B, Coleman N: Expression of human immunodeficiency virus (HIV)-binding lectin DC-SIGNR: Consequences for HIV infection and immunity. *Hum Pathol* 33:652-659, 2002.
4. Cambi A, Figdor CG: Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol* 15:539-546, 2003.
5. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, van Kooyk Y: DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1:353-357, 2000.
6. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y: DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100:587-597, 2000.
7. Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R: C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 76:6841-6844, 2002.
8. Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J: Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17:653-664, 2002.

9. Appelmelk BJ, Van D, I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y: Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170:1635-1639, 2003.
10. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix dL, Staropoli I, Foung S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R: DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278:20358-20366, 2003.
11. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O: DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197:121-127, 2003.
12. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA: DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197:823-829, 2003.
13. Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth HP, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CM, van Kooyk Y, Appelmelk BJ: *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* 200:979-990, 2004.
14. Marzi A, Gramberg T, Simmons G, Moller P, Rennekamp AJ, Krumbiegel M, Geier M, Eisemann J, Turza N, Saunier B, Steinkasserer A, Becker S, Bates P, Hofmann H, Pohlmann S: DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 78:12090-12095, 2004.
15. Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL, Rivas L: Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN,

CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* 277:36766-36769, 2002.

16. Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M: A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193:671-678, 2001.

17. Barreiro LB, Patin E, Neyrolles O, Cann HM, Gicquel B, Quintana-Murci L: The heritage of pathogen pressures and ancient demography in the human innate-immunity CD209/CD209L region. *Am J Hum Genet* 77:869-886, 2005.

18. Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, Goedert JJ, Nelson GW, van Kooyk Y, Detels R, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M: Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78:14053-14056, 2004.

19. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnaratchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Despres P, Julier C: A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37:507-513, 2005.

20. Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, Tailleux L, Quach H, McElreavey K, Helden PD, Hoal EG, Gicquel B, Quintana-Murci L: Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med* 3:e20, 2006.

21. Gomez LM, Anaya JM, Sierra-Filardi E, Cadena J, Corbi A, Martin J: Analysis of DC-SIGN (CD209) functional variants in patients with tuberculosis. *Hum Immunol* 67:808-811, 2006.

22. Liu H, Hwangbo Y, Holte S, Lee J, Wang C, Kaupp N, Zhu H, Celum C, Corey L, McElrath MJ, Zhu T: Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis* 190:1055-1058, 2004.
23. Liu H, Carrington M, Wang C, Holte S, Lee J, Greene B, Hladik F, Koelle DM, Wald A, Kurosawa K, Rinaldo CR, Celum C, Detels R, Corey L, McElrath MJ, Zhu T: Repeat-region polymorphisms in the gene for the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related molecule: effects on HIV-1 susceptibility. *J Infect Dis* 193:698-702, 2006.
24. Lichterfeld M, Nischalke HD, van Lunzen J, Sohne J, Schmeisser N, Woitas R, Sauerbruch T, Rockstroh JK, Spengler U: The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene does not affect the susceptibility to HIV infection and the progression to AIDS. *Clin Immunol* 107:55-59, 2003.
25. Nattermann J, Ahlenstiel G, Berg T, Feldmann G, Nischalke HD, Muller T, Rockstroh J, Woitas R, Sauerbruch T, Spengler U: The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene in HCV infection. *J Viral Hepat* 13:42-46, 2006.
26. Chan VS, Chan KY, Chen Y, Poon LL, Cheung AN, Zheng B, Chan KH, Mak W, Ngan HY, Xu X, Sreaton G, Tam PK, Austyn JM, Chan LC, Yip SP, Peiris M, Khoo US, Lin CL: Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat Genet* 38:38-46, 2006.
27. Parham P, Ohta T: Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67-74, 1996.
28. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-989, 2001.
29. Stephens M, Donnelly P: A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162-1169, 2003.

30. Barreiro LB, Quintana-Murci L: DC-SIGNR neck-region polymorphisms and HIV-1 susceptibility: From population stratification to a possible advantage of the 7/5 heterozygous genotype. *J Infect Dis* 194:1184-1185, 2006.
31. Kobayashi N, Nakamura HT, Goto M, Nakamura T, Nakamura K, Sugiura W, Iwamoto A, Kitamura Y: Polymorphisms and haplotypes of the CD209L gene and their association with the clinical courses of HIV-positive Japanese patients. *Jpn J Infect Dis* 55:131-133, 2002.
32. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL: Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28:91-98, 2003.
33. Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y: DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol* 3:279-283, 2006.
34. Lekkerkerker AN, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB: Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr HIV Res* 4:169-176, 2006.
35. Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J: DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol* 165:2937-2942, 2000.
36. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K: A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 276:28939-28945, 2001.
37. Guo Y, Atkinson CE, Taylor ME, Drickamer K: All but the shortest polymorphic forms of the viral receptor DC-SIGNR assemble into stable homo- and heterotetramers. *J Biol Chem* 281:16794-16798, 2006.

Article 1-Table 1 : Allelic frequency distribution of selected DC-SIGN SNPs in different populations

Selected SNPs					Population Allelic Frequencies (%)							P-value ^a
Polymorphism name DCSIGN	Position on cDNA	Nudeotide change	Amino acid change	Rare allele	Zimbabwean (n=200)	Sub-Saharan African (n=82)	South African coloured (n=1 422)	Cacasian Canadian (n=200)	Caucasian European (n=86)	Thai (n=80)	Asian (n=86)	
p-939	promoter	G/A		A	26.5	45.1	29.8	51.5	54.7	26.6	29.1	< 0.001
p-871	promoter	A/G		G	5.0	–	11.6	42.0	38.4	21.2	20.9	< 0.001
p-745	promoter	G/T		T	5.5	–	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
p-336	promoter	A/G		G	45.0	37.8	42.8	18.0	20.9	8.0	5.8	< 0.001
p-201	promoter	G/T		T	11.5	–	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
p-139	promoter	A/G		G	74.0	87.8	72.1	69.5	75.6	26.7	33.7	ns
ex4RPT	exon 4	7,5/6,5	del Y124-I146	6,5	1.5	–	–	2.0	–	0.6	–	ns
ex4+415	exon 4	C/T	R198Q	T	11.5	~ 15.0	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
ex4+465	exon 4	C/G	E214D	G	16.0	~ 15.0	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
ex4+485	exon 4	C/T	R221Q	T	16.0	~ 15.0	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
ex4+547	exon 4	G/C	L242V	C	7.5	6.0	–	0.0	–	0.0	–	< 0.001
Reference citation						[17]	[20]		[17]	[19]	[17]	

^a difference between Zimbabweans and Canadians determined by the Chi-square test

Abbreviations: n= number of alleles; ns= not significant; – = not determined; SNPs =single nucleotide polymorphisms

The amino residues are indicated by single-letter codes at each codon positions defined by three-digit numbers.

Article 1-Table 2 : Distribution of DC-SIGNR repeat-region genotypes among different populations

Genotypes	Populations (%)											P-value ^a	
	Zimbabwean	Caucasian Canadian	Sub-Saharan African	Middle-Easterner	Caucasian European	South Asian	East Asian	Chinese	Japanese	Oceanian	Native American		
4/4	0.6	
5/4	...	1.0	...	0.7	3.7	ns
5/5	...	8.0	0.8	6.1	13.0	7.5	2.0	2.6	4.3	2.6	29.6	...	0.01
6/4	...	3.0	3.7	ns
6/5	4.0	8.0	0.8	8.1	10.0	2.5	2.4	1.0	...	10.3	ns
6/6	11.0	3.0	11.0	2.0	2.5	0.5	...	0.5	...	5.3	ns
7/6	34.0	22.0	44.1	21.0	10.6	5.0	2.4	6.6	3.5	10.3	ns
7/4	...	3.0	4.4	ns
7/5	4.0	29.0	4.7	28.4	25.5	36.5	21.5	16.6	22.6	10.3	33.3	...	< 0.001
7/7	42.0	22.0	37.8	31.1	22.4	39.5	49.4	50.3	58.3	10.3	22.2	...	0.01
8/5	0.9	
8/6	2.0	...	0.8	0.7	ns
8/7	3.0	1.0	1.0	0.4	...	0.9	ns
8/8	0.5	
9/4	0.7	
9/5	0.7	1.9	1.5	3.2	3.9	1.7	7.7	1.9	...	
9/6	0.6	...	0.5	1.0	...	12.8	
9/7	0.7	1.3	5.5	16.8	15.8	7.8	12.8	10.2	...	
9/9	1.6	1.6	...	10.3	2.8	...	
10/7	7.7	
homozygotes	53.0	33.0	49.6	39.2	38.5	48.0	53.0	55.0	62.6	28.2	54.6	...	0.01
heterozygotes	47.0	67.0	50.4	60.8	61.5	52.0	47.0	45.0	37.4	71.8	45.4	...	
Reference citation			[30]	[30]	[30]	[30]	[30]	[26]	[31]	[30]	[30]		

^adifference between Zimbabweans and Canadians determined by the Chi-square test

Abbreviations: ns= not significant; ... = 0.0%

Figure legend

Figure 1: Inferred haplotypes of DC-SIGN (A) and DC-SIGNR (B). Dark boxes correspond to the mutations compared with the reference sequence of chromosome 19 (NCBI no NT_077812.2). n= alleles; SNPs: single nucleotide polymorphisms.

Article 2

Functional genetic variants of DC-SIGNR are associated with mother-to-child transmission of HIV-1

Geneviève Boily-Larouche, Anne-Laure Iscache, Lynn S. Zijenah, Jane Humphrey, Andrew J. Mouland, Brian J. Ward, Michel Roger.

Publié dans : *PLoS One*, 2009, 4 (10), e7211

Contribution des co-auteurs :

Les personnes ci-mentionnées ont participé à la réalisation de cet article. Geneviève Boily-Larouche a participé au devis de l'étude et à la rédaction du manuscrit. Elle a participé à l'amplification et au séquençage du gène de DC-SIGNR et réalisé les analyses statistiques. Elle a aussi effectué les expériences *in vitro*, le clonage et le PCR quantitatif. Anne-Laure Iscache a participé à l'amplification et au séquençage des SNP de DC-SIGNR dans les échantillons du Zimbabwe et à l'analyse des résultats. Lynn Zijenah, Jane Humphrey, Mike Mbizvo et Brian Ward ont participé au recrutement et à la mise en place du projet ZVITAMBO et fournis les échantillons d'ADN nécessaires à ce projet. Andrew Mouland a participé au devis et à l'analyse des résultats sur l'évaluation *in vitro* de l'activité transcriptionnelle du promoteur. Michel Roger a coordonné et participé au devis de l'étude, à l'analyse statistique des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Functional genetic variants in DC-SIGNR are associated with mother-to-child transmission of HIV-1

Geneviève Boily-Larouche^{1,2}, Anne-Laure Iscache¹, Lynn S. Zijenah³, Jean H. Humphrey⁴, Andrew J. Mouland⁵, Brian J. Ward⁶ and Michel Roger^{1,2*}

¹Laboratoire d'Immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada.

²Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada.

³Department of Immunology, College of Health Sciences, University of Zimbabwe, Harare, Zimbabwe.

⁴Department of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA.

⁵Department of Medicine, McGill University, The Lady Davis Institute for Medical Research and McGill AIDS Center, Montreal, Canada.

⁶Research Institute of the McGill University Hospital Complex, Montreal, Canada.

Word count (excluding abstract, acknowledgments, references, figure legends and tables):
4193

Key words: DC-SIGNR, genetic variant, HIV-1, mother-to-child transmission, placental expression



Abstract

Background

Mother-to-child transmission (MTCT) is the main cause of HIV-1 infection in children worldwide. Given that the C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin-related (DC-SIGNR, also known as CD209L or liver/lymph node-specific ICAM-grabbing non-integrin (L-SIGN)), can interact with pathogens including HIV-1 and is expressed at the maternal-fetal interface, we hypothesized that it could influence MTCT of HIV-1.

Methods and Findings

To investigate the potential role of DC-SIGNR in MTCT of HIV-1, we carried out a genetic association study of DC-SIGNR in a well-characterized cohort of 197 HIV-infected mothers and their infants recruited in Harare, Zimbabwe. Infants harbouring two copies of DC-SIGNR H1 and/or H3 haplotypes (H1-H1, H1-H3, H3-H3) had a 3.6-fold increased risk of in utero (IU) ($P = 0.013$) and 5.7-fold increased risk of intrapartum (IP) ($P = 0.025$) HIV-1 infection after adjusting for a number of maternal factors. The implicated H1 and H3 haplotypes share two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in promoter region (p-198A) and intron 2 (int2-180A) that were associated with increased risk of both IU ($P = 0.045$ and $P = 0.003$, respectively) and IP ($P = 0.025$, for int2-180A) HIV-1 infection. The promoter variant reduced transcriptional activity *in vitro*. In homozygous H1 infants bearing both the p-198A and int2-180A mutations, we observed a 4-fold decrease in the level of placental DC-SIGNR transcripts, disproportionately affecting the expression of membrane-bound isoforms compared to infant noncarriers ($P = 0.011$).

Conclusion

These results suggest that DC-SIGNR plays a crucial role in MTCT of HIV-1 and that impaired placental DC-SIGNR expression increases risk of transmission.

Word count: 255

Introduction

Without specific interventions, the rate of HIV-1 mother-to-child transmission (MTCT) is approximately 15-45% [1]. UNAIDS estimates that last year alone, more than 400,000 children were infected worldwide, mostly through MTCT and 90% of them lived in sub-Saharan Africa. In the most heavily-affected countries, such as Zimbabwe, HIV-1 is responsible for one third of all deaths among children under the age of five. MTCT of HIV-1 can occur during pregnancy (in utero, IU), delivery (intrapartum, IP) or breastfeeding (postpartum, PP). High maternal viral load, low CD4 cells count, vaginal delivery, low gestational age have all been identified as independent factors associated with MTCT of HIV-1 [1]. Although antiretrovirals can reduce MTCT to 2%, limited access to timely diagnostics and drugs in many developing world countries limits the potential impact of this strategy. A better understanding of the mechanisms acting at the maternal-fetal interface is crucial for the design of alternative interventions to antiretroviral therapy for transmission prevention.

Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin-related (DC-SIGNR, also known as CD209L or liver/lymph node-specific ICAM-grabbing non-integrin (L-SIGN)) can interact with a plethora of pathogens including HIV-1 and is expressed in placental capillary endothelial cells [2]. DC-SIGNR is organized in three distinct domains, an N-terminal cytoplasmic tail, a repeat region containing seven repeat of 23 amino acids and a C-terminal domain implicated in pathogen binding. Alternative splicing of DC-SIGNR gene leads to the production of a highly diversify isoforms repertoire which includes membrane-bound and soluble isoforms [3]. It has been proposed that interaction between DC-SIGNR and HIV-1 might enhance viral transfer to other susceptible cell types [2] but DC-SIGNR can also internalize and mediate proteasome-dependant degradation of viruses [4] that may differently affect the outcome of infection.

Given the presence of DC-SIGNR at the maternal-fetal interface and its interaction with HIV-1, we hypothesized that it could influence MTCT of HIV-1. To investigate the potential role of DC-SIGNR in MTCT of HIV-1, we carried out a genetic association study

of DC-SIGNR in a well-characterized cohort of HIV-infected mothers and their infants recruited in Zimbabwe, and identified specific DC-SIGNR variants associated with increased risks of HIV transmission. We further characterized the functional impact of these genetic variants on DC-SIGNR expression and show that they affect both the level and type of DC-SIGNR transcripts produced in the placenta.

Methods

Subjects. Samples consisted of stored DNA extracts obtained from 197 mother-child pairs co-enrolled immediately postpartum in the ZVITAMBO Vitamin A supplementation trial (Harare, Zimbabwe) and followed at 6 weeks, and 3-monthly intervals up to 24 months. The ZVITAMBO project was a randomized placebo-controlled clinical trial that enrolled 14,110 mother-child pairs, between November 1997 and January 2000, with the main objective of investigating the impact of immediate postpartum vitamin A supplementation on MTCT of HIV-1. The samples used in the present study were from mother-child pairs randomly assigned to the placebo group of the ZVITAMBO project. Antiretroviral prophylaxis for HIV-1-positive antenatal women was not available in the Harare public-sector during ZVITAMBO patient recruitment. The samples were consecutively drawn from two groups: 97 HIV-1-positive mother/HIV-1-positive child pairs and 100 HIV-1-positive mother/HIV-negative child pairs. Mother's serological status was determined by ELISA and confirmed by Western Blot. Infants were considered to be infected if they were HIV-1 seropositive at 18 months or older and had two or more positive HIV-1-DNA polymerase chain reaction (PCR) results at earlier ages. 100 infants were considered to be uninfected as they were ELISA negative at 18 months or older and had two DNA PCR negative results from samples collected at a younger age. Of the 97 HIV-1-infected infants, 57 were infected IU, 11 were infected IP, and 17 were infected PP as determined by PCR analyses of blood samples collected at birth, 6 weeks, 3 and 6 months of age and according to the following definitions adapted from Bryson and colleagues [5]. Briefly, infants who were DNA PCR positive at birth were infected IU. Infants with negative PCR results from sample obtained at birth but who become positive by 6 weeks of age were infected IP. Infants with negative PCR results at birth and 6 weeks of age but who subsequently became DNA PCR positive were considered to be infected during the PP period. In the analysis comparing the 3 different modes of MTCT, 12 HIV-1-infected infants were excluded because the PCR results were not available at 6 weeks of age. Full methods for recruitment, baseline characteristics collection, laboratory procedures have been described elsewhere [6].

DC-SIGNR haplotypes reconstruction, htSNPs selection and genotyping. The nucleotide sequence variation of the entire promoter, coding and part of 3'-UTR regions of DC-SIGNR gene in the study population was determined previously [7]. Haplotype reconstruction was performed using Bayesian statistical method implemented in PHASE [8], version 2.1.1, using single nucleotide polymorphism (SNP) with a minimum allele frequency (MAF) of 2%. We applied the algorithm five times, using different randomly generated seeds, and consistent results were obtained across runs (Figure 1). Fifteen haplotype-tagged SNPs (htSNPs) were identified by the HaploBlockFinder software [9] with a $MAF \geq 5\%$. These htSNPs were genotyped in the 197 infants by direct PCR sequencing analysis as we have described previously [7]. The DC-SIGNR exon 4 repeat region genotype was determined by PCR amplification followed by migration in 1.5% agarose gels [10]. DNA sequences in the promoter region were analysed with the TESS interface (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) for putative transcription factors binding sites using the TRANSFAC database.

Luciferase assays. Luciferase reporter assays using pGL2-Basic vector were performed in order to investigate the functional effect of mutations on DC-SIGNR promoter activity. Genomic DNA from subjects homozygous for the promoter variants and WT was amplified from nucleotide position -715 to -1 and cloned between the BglIII and HindIII multiple cloning sites in the pGL2-Basic vector which harbours a reporter firefly luciferase gene downstream (Invitrogen Canada inc, Burlington, Canada). All recombinants clones were verified by DNA sequencing. The firefly luciferase test reporter vector was co-transfected at a ratio of 10:1 with the constitutive expressor of Renilla luciferase, phRL-CMV (Promega, Madison, WI, USA). We cultured HeLa cells in 6 wells plates (2×10^5 cells) and transfected them the following day using lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer. Cells were lysed and luciferase assays were performed using 20 μ g of protein extract according to the manufacturer (Promega) at 44h post-transfection. Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity. 0 μ g, 0.5 μ g or 1 μ g CMV-Tat vector was transfected with LTR-Luc as a positive control in these experiments. We

carried out luciferase assays in triplicate in three independent experiments. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M).

DC-SIGNR isoforms repertoire. First-term placental tissues were obtained from abortions following voluntary interruption of pregnancy at CHUM Hôpital Saint-Luc (Montreal, Canada). Tissues from 3 H1 (associated with MTCT of HIV-1) and 3 H15 (wild-type) homozygous haplotypes were used to analyse possible differences in isoform expression. Total placental RNAs were extracted by MasterPure DNA and RNA Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) according to the manufacturer. Fragments corresponding to the DC-SIGNR coding region were reverse transcribed (RT) and then amplified by nested PCR with the following primers ; RT primers RR, first PCR RF and RR and second PCR RcF and RcR according to Liu and colleagues [11]. 1 μ g of total RNA was reverse transcribed with Expand RT (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer and were PCR-amplified with DNA Platinum Taq Polymerase (Invitrogen). Major PCR products from the second PCR reaction were gel extracted with the Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen Canada inc, Mississauga, ON, Canada) and cloned using the TOPO TA Cloning Kit for sequencing (Invitrogen). For each placenta, 15 different clones were randomly selected and amplified with M13 primers and sequenced with ABI PRISM 3100 capillary automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were analysed and aligned with GeneBank reference sequence NM_014257 using Lasergene software (DNA Stars, Madison, WI, USA).

Quantitative expression of DC-SIGNR isoforms. 1.5 μ g of placental RNA was reverse transcribed using 2.5 mM of Oligo dT20 and Expand RT in 20 μ l volume according to the manufacturer (Roche Applied Science). 15 ng of total cDNA in a final volume of 20 μ l was used to perform quantitative real-time PCR using Universal Express SYBR GreenER qPCR Supermix (Invitrogen) on a Rotor Gene Realtime Rotary Analyser (Corbett Life Science, Sydney, Australia). Samples from 2 subjects in each group were used because RNA quality of others was not suitable for a qRT-PCR analysis. Amplification of all DC-SIGNR isoforms was performed using an exon 5 specific primer pair (Table S1). Membrane-bound isoforms were amplified using primers specific for exon 3, corresponding to the common

trans-membrane domain of DC-SIGNR. Primers were targeted to the exon-exon junction and RNA extracts were treated with DNase (Fermantas International inc, Burlington, ON, Canada) to avoid amplification of contaminant DNA. Standard curves (50 - 500 000 copies per reaction) were generated using serial dilution of a full-length DC-SIGNR or commercial GAPDH (Invitrogen) plasmid DNA. All qPCR reactions had efficiencies ranging from 99% to 100%, even in the presence of 20 ng of non-specific nucleic acids, and therefore could be compared. The copy number of unknown samples was estimated by placing the measured PCR cycle number (crossing threshold) on the standard curve. To correct for differences in both RNA quality and quantity between samples, the expression levels of transcripts were normalised to the reference GAPDH gene transcripts. GAPDH primer sequences were kindly provided by A. Mes-Masson at the CHUM. The results are presented as target gene copy number per 10^5 copies of GAPDH. The ratio of membrane-bound isoforms was calculated as E3/E5. Soluble isoforms were calculated by subtracting membrane-bound from total isoforms. We carried out qPCR assays in triplicate in three independent experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the GraphPad PRISM 5.0 for Windows (GraphPad Software inc, San Diego, CA, USA). Differences in baseline characteristics and genotypic frequencies of haplotypes or htSNPs were compared between groups using the χ^2 analysis or Fisher's exact test. Logistic regression analysis was used to estimate odds ratios (OR) for each genotype and baseline risk factors. Multiple logistic regression was used to define independent predictors identified as significant in the crude analysis. ORs and 95% confidence interval were calculated with the exact method. Comparisons of continuous variables between groups were assessed with the unpaired two-tailed Student's t test when variables were normally distributed and with the Mann-Whitney U test when otherwise. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Ethics statement. Written informed consent was obtained from all mothers who participated in the study and the ZVITAMBO trial and the investigation reported in this paper were approved by The Medical Research Council of Zimbabwe, The Medicines Control Authority of Zimbabwe, The Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health

Committee on Human Research, and the CHUM and Montreal General Hospital Ethics Committees. First-term placental tissues were obtained from abortions following voluntary interruption of pregnancy at CHUM Hôpital Saint-Luc (Montreal, Canada) with written informed consent in accordance with the CHUM Research Ethics Committee.

Results

We carried out an association study of DC-SIGNR polymorphism in 197 infants born to untreated HIV-1-infected mothers recruited in Harare, Zimbabwe. Among them, 97 infants were HIV-1-infected and 100 infants remained uninfected. Of the 97 HIV-1-infected infants, 57 were infected IU, 11 were infected IP, and 17 were infected PP. Timing of infection was not determined for 12 HIV-1-infected infants. Baseline characteristics of mothers and infants are presented in Table 1. Maternal age and CD4 cell count, child sex, mode of delivery, duration of membrane rupture and gestational age were similar among all groups. However, maternal viral load $>29\ 000$ copies/ml was associated with increased risk in both IU and PP with odds ratios (OR) of 3.64 (95% CI = 1.82-7.31, $P = 0.0002$) and 4.45 (95% CI = 1.50-13.2, $P = 0.0045$) for HIV-1 transmission, respectively.

Fifteen haplotype-tagged SNPs (htSNPs) corresponding to the 15 major DC-SIGNR haplotypes (Figure 1) described among Zimbabweans [7] were genotyped in our study samples (Tables S2 and S3). H1 (31%) and H3 (11%) were the most frequent haplotypes observed (Figure 1). Being homozygous for the H1 haplotype was associated with increased risk of both IU (OR: 4.42, $P = 0.022$) and PP (OR: 7.31, $P = 0.016$) HIV-1 transmission (Table 2). Infants harbouring two copy combinations of H1 and/or H3 haplotypes (H1-H1, H1-H3 or H3-H3) had increased risk of IU (OR: 3.42, $P = 0.007$) and IP (OR: 5.71, $P = 0.025$) but not PP ($P = 0.098$) HIV-1 infection compared to infant noncarriers (Table 2). The latter associations remained significant after adjustment was made for the maternal viral load for both IU (OR: 3.57, 95% CI = 1.30-9.82, $P = 0.013$) and IP (OR: 5.71, 95% CI = 1.40-23.3, $P = 0.025$) HIV-1 transmission. The H1 and H3 haplotypes share a cluster of mutations (p-198A, int2-391C, int2-180A, ex4RPT, int5+7C) (Figure 1). Of these, the p-198A and int2-180A variants were significantly associated with MTCT of HIV-1 (Table S2). In the unadjusted regression analysis, homozygous infants for the p-198A and int2-180A variants had increased risk of IU (OR: 2.07 $P = 0.045$, OR: 3.78, $P = 0.003$, respectively) and IP (OR: 2.47, $P = 0.17$, O.R: 5.71, $P = 0.025$, respectively) HIV-1 infection compared to heterozygote infants or noncarriers (Table 3). When

adjustment was made for maternal factors, only the association with the int2-180A variant remained significant for IU (OR: 3.83, 95% CI = 1.42-10.4, P = 0.008) and IP (O.R: 5.71, 95% CI = 1.40-23.3, P = 0.025) HIV-1 transmission. Thus, infants homozygous for DC-SIGNR variant int2-180A contained in H1 and H3 haplotypes were 4-fold to 6-fold more likely to be infected by HIV-1 during pregnancy or at delivery, respectively.

Alternative splicing of the DC-SIGNR gene in the placenta produces both membrane-bound and soluble isoform repertoires [3]. The relative proportion of membrane bound and soluble DC-SIGNR could plausibly influence the susceptibility to HIV-1 infection [11]. We therefore hypothesized that the DC-SIGNR mutations associated with MTCT of HIV-1 would have an impact on both the level of DC-SIGNR expression and in the isoform repertoire produced. We investigated DC-SIGNR transcript expression in first-term placentas obtained after elective abortion. We cloned DC-SIGNR from placental tissues by RT-PCR from 3 homozygous H1 samples containing both the DC-SIGNR p-198AA and int2-180AA variants associated with HIV-1 transmission and 3 homozygous wild-type (WT) (p-198CC, int2-180GG) samples. Fifteen clones per sample were randomly selected for sequencing. As expected, we found an extensive repertoire of DC-SIGNR transcripts in all samples with 9 to 16 different isoforms per individual. A total of 65 distinct transcripts were identified (Figure S1), of which 3 were full-length transcripts. 64 of the sequenced clones contained a total of 69 amino acid substitutions with 3 new C termini and 2 premature stop codons. However, the diversity was mostly attributable to the entire deletion of exon 2 or exon 3 or to variations in the length of the neck region (exon 4) of DC-SIGNR. The deletion of exon 3 eliminates the trans-membrane domain of the protein and leads to the expression of soluble DC-SIGNR isoforms [3]. Interestingly, the abundance of membrane-bound isoforms in placental tissues of the H1 homozygotes appears to be lower than that observed in samples from WT individuals (Figure S1). The deletion of exon 3 was confirmed by sequencing and we hypothesize that the skipping of exon 3, could be due to the presence of the int2-180A mutation observed in infants with the H1 haplotype. In fact, this intron mutation is located 180 bp downstream from exon 3 and potentially modifies splicing events (Figure 2A). We confirmed that the variation in transcript proportions seen

between the two groups was also reflected at the level of mRNA expression in the placenta. To quantify membrane-bound vs soluble isoforms in placental samples from homozygous H1 and WT infants, we amplified the exon 5 (E5) sequence present in all DC-SIGNR isoforms (total transcripts). We then amplified exon 3 (E3) which is deleted in the soluble forms and then calculated the E3:E5 ratio. We found that placental tissues from homozygous H1 infants express a significantly lower proportion of membrane-bound DC-SIGNR (18%) compared to that in WT individuals (36%) ($P = 0.004$) (Figure 2B) suggesting that exon 3 skipping happens more frequently in presence of the DC-SIGNR int2-180A variant associated with MTCT of HIV-1.

The DC-SIGNR int2-180A variant is always transmitted with the promoter mutation p-198A (Figure 1). In the unadjusted regression analysis, the p-198A variant was significantly associated with IU but not with IP and PP HIV-1 transmission (Table 3). Computational transcription factor binding site analysis predicts that this mutation, located 198 bp upstream of the start codon would affect a C/EBPbeta transcription factor binding site (TESS web site). To test the effect of DC-SIGNR p-198A variant on transcription, we transiently transfected HeLa cells with a luciferase reporter gene under the control of DC-SIGNR promoter region -715 to -1 with either C (WT) or A at position -198 (Figure 3A). The luciferase activity of the p-198A variant construct was significantly lower than that of the WT p-198C promoter construct (p-198C/A ratio= 2, $P = 0.006$) (Figure 3B) suggesting that DC-SIGNR p-198A affects promoter activity. The other promoter mutants (p-577C and p-323A) observed in the Zimbabwean population did not affect DC-SIGNR transcription in this assay (Figure S2). To determine the net impact of the DC-SIGNR p-198A mutation on DC-SIGNR expression in the placenta, we quantitated the absolute number of total and membrane-bound DC-SIGNR transcripts in the H1 homozygote and wild-type placental samples as described earlier. The total number of DC-SIGNR transcripts was determined to be 685 ± 213 (DC-SIGNR copies \pm S.E.M per 10^5 GAPDH copies) in the placental samples from homozygous H1 infants and was 4-fold lower compared to that found in placentas from WT individuals (2781 ± 638 , $P = 0.011$) (Figure 3C). As suggested earlier, the int2-180A mutation might induce exon 3 skipping leading to a lower production of membrane-

bound DC-SIGNR. Although, the decrease in the total number of DC-SIGNR transcripts in H1 homozygous placental samples containing both the p-198AA and int2-180AA variants affected the proportion of membrane-bound and soluble isoforms, the effect of these mutations was more pronounced on the membrane-bound isoforms with an 8-fold decrease ($H1 = 117 \pm 36.2$ vs $WT = 990 \pm 220.6$, $P = 0.003$) compared to a 3-fold decrease in total soluble isoforms ($H1 = 568 \pm 181.9$ vs $WT = 1925 \pm 495.3$, $P = 0.03$) (Figure 3C). Therefore, DC-SIGNR p-198A and int2-180A mutations associated with MTCT of HIV-1 significantly decreased the level of total placental DC-SIGNR transcripts, disproportionately affecting the membrane-bound isoform production.

Discussion

Our genetic results, supported by expression assay in placenta, suggest the involvement of DC-SIGNR in MTCT of HIV-1. Homozygosity for the haplotype H1 was associated with IU transmission in the unadjusted regression analysis. However, the association disappeared after adjustment was made for the maternal factors presumably because of the small number of H1 homozygote infants analysed in each groups. H1 and H3 were the most frequent haplotypes observed in the study population and they share a cluster of mutations (Figure 1). Grouping haplotypes H1 and H3 increased the power of the study and permitted the identification of specific DC-SIGNR mutations associated with MTCT of HIV-1. Indeed, two mutations shared by haplotypes H1 and H3 were associated with vertical transmission of HIV-1. The int2-180A was associated with a 4-fold increased risk of IU and 6-fold increased risk of IP after adjustment for the maternal factors. Although the p-198A variant was associated with IU transmission, the association disappeared after adjustment was made for the maternal viral load. Nevertheless, we showed that this mutation reduces DC-SIGNR transcriptional activity *in vitro* and produces lower level of DC-SIGNR transcripts in placental tissues in combination with the int2-180A variant. Since int2-180A is always transmitted with p-198A on the MTCT associated combined haplotypes H1/H3, whereas p-198A is carried on other non-associated haplotypes (Figure 1), we can speculate that the p-198A mutation alone may have a minor effect *in vivo* whereas in combination with the int2-180A variant, they both act to reduce the level of placental DC-SIGNR expression resulting in an increased risk of MTCT of HIV-1.

The majority of IU transmission occurs during the last trimester of pregnancy (reviewed in [12]). Full-term placenta samples were not available for the current study and the expression assays were performed on first-term placental tissues. A previous study looking at DC-SIGNR placental isoforms repertoire in full-term placenta samples demonstrated similar diversity of DC-SIGNR transcripts as in the first-term placental tissues studied herein [3]. However, since levels of DC-SIGNR expression have never been compared between the different terms of pregnancy, it is not known whether DC-SIGNR expression varies during the course of pregnancy. Nevertheless, it is reasonable to assume that the

inter-individual differences in both DC-SIGNR isoform repertoire and transcript levels observed between the H1 and WT homozygous infants would be reflected throughout the pregnancy.

To date, most studies have focused on the potential role of DC-SIGNR in trans infection of HIV-1 *in vitro* [2,10]. However, the multiple mechanisms involved in trans infection and redundancy among C-type lectin functions make it difficult to determine the actual participation of DC-SIGNR in this mode of infection *in vivo* [13,14]. The strong correlation we observed between MTCT of HIV-1 and DC-SIGNR genetic variants producing low levels of DC-SIGNR in the placenta suggested that mechanisms other than DC-SIGNR-mediated *trans* infection might operate during vertical transmission of HIV-1. For example, DC-SIGNR has also been shown to function as a HIV-1 antigen-capturing receptor [15]. Chan and colleagues recently demonstrated that DC-SIGNR transfected CHO cells diminish SARS-CoV titers by enhanced capture and degradation of the virus in a proteasome-dependent manner [4]. Since endothelial cells express MHC-I and II, degraded viral antigens could then be presented to immune cells to elicit an adaptive immune response [16,17]. The HIV-1 co-receptor CCR5, but not CD4, is co-expressed with DC-SIGNR on placental and blood-brain barrier (BBB) endothelial cells [18,19]. HIV-1 gp120 binding to CCR5 receptor on endothelial cells compromises BBB integrity and enhances monocytes adhesion and transmigration across the BBB [20,21]. It is thus possible that reduced expression of DC-SIGNR, particularly the membrane-bound isoforms, on placental capillary endothelial cells might favour HIV-1 binding to CCR5 receptor, instead of DC-SIGNR receptor, facilitating the migration of maternal HIV-1-infected cells across the placental barrier resulting in IU transmission of HIV-1.

The int2-180A variant contained in the H1 and H3 haplotypes was associated with IP transmission suggesting that DC-SIGNR also affect transmission of HIV-1 during delivery. Little is known about the mechanisms underlying transmission of HIV-1 during delivery. Passage through the birth canal could potentially expose infants through a mucosal portal entry (presumably ophthalmic, skin, or gastrointestinal), whereas placental insult during delivery (physical or inflammatory) may enhance transplacental passage of maternal HIV-

1-infected cells into foetal circulation [22,23]. Such process called microtransfusion has been proposed in regards to the results obtain in a Malawian cohort. Kweik and colleagues found a significant association between levels of maternal DNA in umbilical cord blood and IP transmission of HIV-1 suggesting that passage of maternal infected cells through the placenta is likely to occur during delivery [22]. Thus, in a similar fashion as suggested earlier for IU transmission, the relatively lower level of DC-SIGNR in the placenta of homozygous infants harbouring the int2-180A variant could promote HIV-1 binding to CCR5 receptor on endothelial cells affecting the placental barrier integrity and facilitating the passage of maternal infected cells in foetal circulation during delivery.

Beside DC-SIGNR, other HIV-1 receptors are known to influence MTCT of HIV-1 (reviewed in [24]). Genetic variants in CCR5 have been shown to influence vertical transmission of HIV-1. CCR5 promoter variants resulting in higher expression of the receptor were associated with increased risk of MTCT of HIV-1 among sub-Saharan Africans [25,26]. The 32-pb deletion polymorphism in CCR5 has been shown to protect from vertical transmission of HIV-1 [27], but this variant is virtually absent among African populations [28]. High copy numbers of CCL3L1, a potent HIV-1 suppressive ligand for CCR5, are associated with higher chemokine production and lower risk of MTCT of HIV-1 among South African infants [29,30]. Mannose-binding lectin (MBL) is an innate immune receptor synthesised in the liver and secreted in the bloodstream in response to inflammation signal. MBL promotes pathogen elimination by opsonization and phagocytosis, and reduced expression of MBL resulting from polymorphism in coding and non-coding regions has been associated with an increased risk of MTCT of HIV-1 [31,32]. In this study, we demonstrate for the first time, the potential functional impact of DC-SIGNR mutations on its expression in the placenta and in vertical transmission of HIV-1. We believe that the presence of DC-SIGNR at the placental endothelial cell surface may protect infants from HIV-1 infection by capturing virus and promoting its degradation/presentation. However, in placenta containing low levels of DC-SIGNR, HIV-1 would preferentially binds CCR5 on endothelial cells resulting in a loss of placental barrier integrity and enhanced passage of maternal HIV-1-infected cells in foetal circulation

leading to MTCT of HIV-1. This mechanism may also apply to other vertically-transmitted pathogens known to interact with DC-SIGNR such as HIV-2, hepatitis C and dengue viruses and warrant further investigation.

Acknowledgments

The authors would like to thank to G Roy and F Léger of the CHUM for providing the placenta samples, M Milev and L Ajamian for technical assistance and all of the participants in this study and the ZVITAMBO Study Group: H Chidawanyika, P Iliff, A Mahomva, F Majo, L Malaba, M Mbizvo, L Moulton, K Mutasa, J Mutsambi, K Nathoo , M Ndhlovu, L Propper, A Ruff, N Tavengwa, C Zunguza, P Zvandasara.

References

1. Luzuriaga K (2007) Mother-to-child Transmission of HIV: A Global Perspective. *Curr Infect Dis Rep* 9: 511-517.
2. Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, et al. (2001) DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2670-2675.
3. Mummidi S, Catano G, Lam L, Hoefle A, Telles V, et al. (2001) Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem* 276: 33196-33212.
4. Chan VS, Chan KY, Chen Y, Poon LL, Cheung AN, et al. (2006) Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat Genet* 38: 38-46.
5. Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW (1992) Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *N Engl J Med* 327: 1246-1247.
6. Humphrey JH, Iliff PJ, Marinda ET, Mutasa K, Moulton LH, et al. (2006) Effects of a single large dose of vitamin A, given during the postpartum period to HIV-positive women and their infants, on child HIV infection, HIV-free survival, and mortality. *Journal of Infectious Diseases* 193: 960-971.
7. Boily-Larouche G, Zijenah LS, Mbizvo M, Ward BJ, Roger M (2007) DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: Potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility. *Human Immunology* 68: 523-530.
8. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989.
9. Zhang K, Jin L (2003) HaploBlockFinder: haplotype block analyses. *Bioinformatics* 19: 1300-1301.
10. Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, et al. (2001) A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin

(DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 193: 671-678.

11. Liu H, Hladik F, Andrus T, Sakchalathorn P, Lentz GM, et al. (2005) Most DC-SIGNR transcripts at mucosal HIV transmission sites are alternatively spliced isoforms. *Eur J Hum Genet* 13: 707-715.

12. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ, Bulterys M (2006) Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis* 6: 726-732.

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

14. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, et al. (2002) Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 3: 975-983.

15. Snyder GA, Ford J, Torabi-Parizi P, Arthos JA, Schuck P, et al. (2005) Characterization of DC-SIGN/R interaction with human immunodeficiency virus type 1 gp120 and ICAM molecules favors the receptor's role as an antigen-capturing rather than an adhesion receptor. *J Virol* 79: 4589-4598.

16. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, et al. (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6: 1348-1354.

17. Pober JS, Sessa WC (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 803-815.

18. Soilleux EJ, Morris LS, Rushbrook S, Lee B, Coleman N (2002) Expression of human immunodeficiency virus (HIV)-binding lectin DC-SIGNR: Consequences for HIV infection and immunity. *Hum Pathol* 33: 652-659.

19. Mukhtar M, Harley S, Chen P, Bouhamdan M, Patel C, et al. (2002) Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* 297: 78-88.

20. Kanmogne GD, Schall K, Leibhart J, Knipe B, Gendelman HE, et al. (2007) HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across

- blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 123-134.
21. Yang B, Akhter S, Chaudhuri A, Kanmogne GD (2009) HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc Res* 77: 212-219.
22. Kwiek JJ, Arney LA, Harawa V, Pedersen B, Mwapasa V, et al. (2008) Maternal-fetal DNA admixture is associated with intrapartum mother-to-child transmission of HIV-1 in Blantyre, Malawi. *J Infect Dis* 197: 1378-1381.
23. Kwiek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Jr., Alker AP, Miller WC, et al. (2006) Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med* 3: e10.
24. Singh KK, Spector SA (2009) Host Genetic Determinants of HIV Infection and Disease Progression in Children. *Pediatr Res*
25. Pedersen BR, Kamwendo D, Blood M, Mwapasa V, Molyneux M, et al. (2007) CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. *PLoS One* 2: e838.
26. Singh KK, Hughes MD, Chen J, Phiri K, Rousseau C, et al. (2008) Associations of chemokine receptor polymorphisms With HIV-1 mother-to-child transmission in sub-Saharan Africa: possible modulation of genetic effects by antiretrovirals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49: 259-265.
27. Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, Chen J, Raskino C, et al. (2003) Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 188: 1461-1472.
28. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16: 100-103.
29. Kuhn L, Schramm DB, Donninger S, Meddows-Taylor S, Coovadia AH, et al. (2007) African infants' CCL3 gene copies influence perinatal HIV transmission in the absence of maternal nevirapine. *Aids* 21: 1753-1761.

30. Meddows-Taylor S, Donninger SL, Paximadis M, Schramm DB, Anthony FS, et al. (2006) Reduced ability of newborns to produce CCL3 is associated with increased susceptibility to perinatal human immunodeficiency virus 1 transmission. *J Gen Virol* 87: 2055-2065.
31. Manganò A, Rocco C, Marino SM, Mecikovsky D, Genre F, et al. (2008) Detrimental effects of mannose-binding lectin (MBL2) promoter genotype XA/XA on HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *J Infect Dis* 198: 694-700.
32. Boniotto M, Crovella S, Pirulli D, Scarlatti G, Spano A, et al. (2000) Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes Immun* 1: 346-348.

Figure legends

Figure 1. DC-SIGNR haplotypes reconstruction with minor allele frequency > 5% (MAF) and selected htSNPs in Zimbabwean population.

Figure 2. Effect of the int2-180A variant on placental DC-SIGNR isoform expression (a) Schematic representation of the int2-180A variant location within the DC-SIGNR gene. (b) Proportion of DC-SIGNR membrane-bound and soluble isoforms in homozygous H1 (int2-180AA) and homozygous WT (int2-180GG) placental samples estimated by qRT-PCR assays in three independent experiments performed in triplicate. Data are presented as percentage of total transcripts. Differences between isoform proportions among the homozygous H1 and homozygous WT were calculated by the χ^2 test.

Figure 3. Transcriptional activity of DC-SIGNR promoter. (a, b) Effect of the p-198A variant on transcriptional activity in luciferase reporter assay *in vitro* in transfected HeLa cells. (a) Schematic representation of reporter gene constructs corresponding to the DC-SIGNR promoter region from -715 to -1, spanning with either C (WT) or A at position -198. (b) Relative luciferase expression from pGL2-Basic, the parental vector without the promoter. Expression of the DC-SIGNR promoter constructs were calculated relatively to this value. Data are presented in mean \pm S.E.M. values of three independent experiments performed in triplicate and difference in relative luciferase expression between the p-198 variants was examined with the Student's t test. (c) Total number of DC-SIGNR isoforms in homozygous H1 (p-198AA, int2-180AA) and homozygous WT (p-198CC, int2-180GG) placental samples measured by qRT-PCR assays in three independent experiments performed in triplicate. Data are shown in mean \pm S.E.M. copies number normalized by 10^5 copies number of GAPDH. Student's t test was used to calculate differences in the number of isoforms between the H1 and WT groups.

Article 2-Table 1 : Baseline characteristics of mother and infants risk factors for intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.

Variables	HIV -		IU		IP		PP	
	% (N)	% (N)	OR (95% CI)	% (N)	OR (95% CI)	% (N)	OR (95% CI)	
			P value		P value		P value	
Maternal age, mean								
years	26	26		24		28		
(SD)	(25-27)	(24-27)	0.53 ^a	(22-28)	0.40 ^a	(25-31)	0.26 ^a	
Child's sex								
F	43 (42)	55 (31)	0.62 (0.32-1.20)	70 (7)	0.33 (0.08-1.34)	53 (8)	0.67 (0.22-1.99)	
M	57 (55)	45 (25)	0.15 ^c	30 (3)	0.18 ^b	47 (7)	0.47 ^c	
Gestational age								
(weeks)								
≥ 37	95 (94)	98 (55)	0.34 (0.04-3.00)	80 (8)	4.70 (0.78-28.2)	94 (16)	1.18 (0.13-10.7)	
<37	5 (5)	2 (1)	0.42 ^b	20 (2)	0.12 ^b	6 (1)	1.00 ^b	
Membrane rupture								
(hours)								
0 – 3	57 (56)	49 (26)	1.39 (0.71-2.71)	50 (5)	1.33 (0.36-4.91)	50 (8)	1.33 (0.46-3.84)	
> 3	43 (42)	51 (27)	0.34 ^c	50 (5)	0.74 ^b	50 (8)	0.60 ^b	
Mode of delivery								
Vaginal	87 (87)	93 (52)	0.52 (0.16-1.66)	90 (9)	0.74 (0.09-6.37)	82 (14)	1.43 (0.36-5.68)	
Caesarean	13 (13)	7 (4)	0.30 ^b	10 (1)	1.00 ^b	18 (3)	0.70 ^b	
Maternal CD4 cell counts (cells/mm³)								
≥ 500	41 (35)	42 (20)	0.98 (0.48-2.01)	22 (2)	2.45 (0.48-12.5)	18 (3)	3.27 (0.87-12.2)	
< 500	59 (50)	58 (28)	0.96 ^c	78 (7)	0.47 ^b	82 (14)	0.098 ^b	
Maternal CD4/CD8 cells ratio								
≥ 0.5	51 (43)	52 (25)	0.94 (0.46-1.91)	56 (5)	0.82 (0.21-3.26)	35 (6)	1.88 (0.64-5.54)	
< 0.5	49 (42)	48 (23)	0.87 ^c	44 (4)	1.00 ^b	65 (11)	0.25 ^c	
Mothers' viral loads								
(copies/ml)								
≤ 29,000	71 (68)	40 (22)	3.64 (1.82-7.31)	64 (7)	1.39 (0.37-5.12)	35 (6)	4.45 (1.50-13.2)	
> 29,000	29 (28)	60 (33)	0.0002 ^c	36 (4)	0.73 ^b	65 (11)	0.005 ^c	

^a P value as determined by Mann-Whitney U test.

^b P value as determined by the Fisher's exact test.

^c P value as determined by the χ^2 test.

Article 2-Table 2 : Associations between infant DC-SIGNR haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.

Child DC-SIGNR haplotype genotypes	HIV -		IU		IP		PP	
	% (N)	% (N)	OR (95% CI)	% (N)	OR (95% CI)	% (N)	OR (95% CI)	
			P value		P value		P value	
Haplotype H1								
H1-other /other-other	96 (95)	84 (43)	4.42 (1.26-15.5)	82 (9)	5.28 (0.85-32.9)	76 (13)	7.31 (1.63-32.8)	
H1-H1	4 (4)	16 (8)	0.022 ^a	18 (2)	0.11 ^a	24 (4)	0.016 ^a	
Haplotype H3								
H3-other/other-other	99 (98)	98 (50)	1.96 (0.12-32.0)	100 (11)	NA	100 (17)	NA	
H3-H3	1 (1)	2 (1)	1.00 ^a	0	1.00 ^a	0	1.00 ^a	
Haplotype H1-H3								
H1-other/H3-other/ other-other	91 (90)	74.5 (38)	3.42 (1.35-8.68)	64 (7)	5.71 (1.40-23.3)	76 (13)	3.08 (0.83-11.5)	
H1-H1/H1-H3/H3-H3	9 (9)	25.5 (13)	0.007 ^b	36 (4)	0.025 ^a	24 (4)	0.098 ^a	

CI, Confidence interval; N, number; NA, not applicable; OR, odds ratio

^a P value as determined by the Fisher's exact test.

^b P value as determined by the χ^2 test.

Article 2-Table 3 : Associations between infant DC-SIGNR promoter p-198 and intron 2 (int2)-180 variants and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.

Child DC-SIGNR Mutations	HIV -		IU		IP		PP	
	% (N)	% (N)	OR (95% CI) P value	% (N)	OR (95% CI) P value	% (N)	OR (95% CI) P value	
p-198								
CC/CA	75 (74)	59 (30)	2.07 (1.01-4.25)	54.5 (6)	2.47 (0.69-8.79)	59 (10)	2.07 (0.71-6.02)	
AA	25 (25)	41 (21)	0.045 ^b	45.5 (5)	0.17 ^a	41 (7)	0.24 ^a	
int2-180								
GG/GA	91 (90)	72.5 (37)	3.78 (1.51-9.50)	64 (7)	5.71 (1.40-23.3)	76 (13)	3.08 (0.83-11.5)	
AA	9 (9)	27.5 (14)	0.003 ^b	36 (4)	0.025 ^a	24 (4)	0.098 ^a	

CI, Confidence interval; N, number; OR, odds ratio

^aP value as determined by the Fisher's exact test.

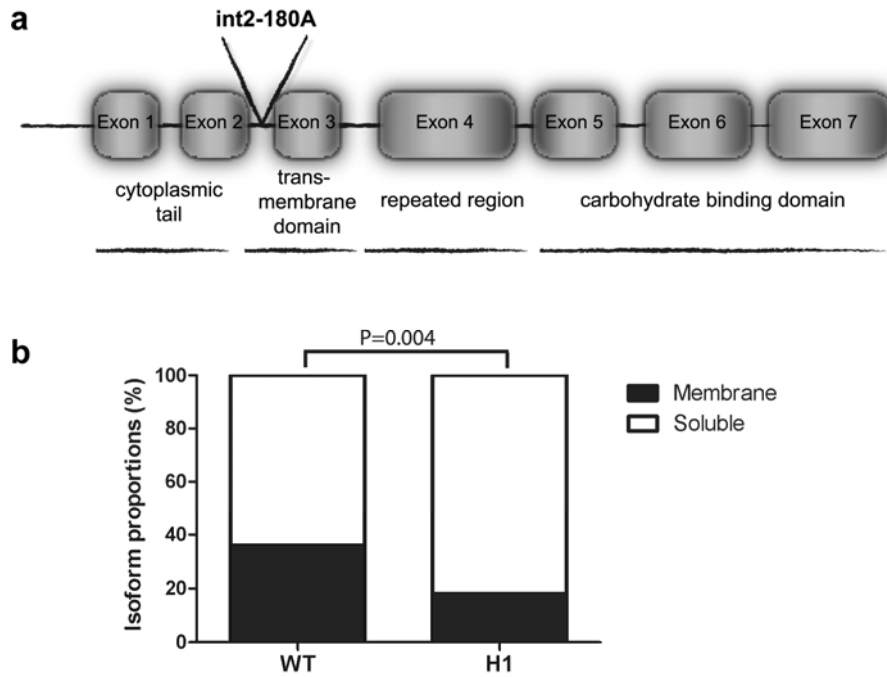
^bP value as determined by the χ^2 test.

Article 2-Figure 1 : DC-SIGNR haplotypes reconstruction in Zimbabwean population.

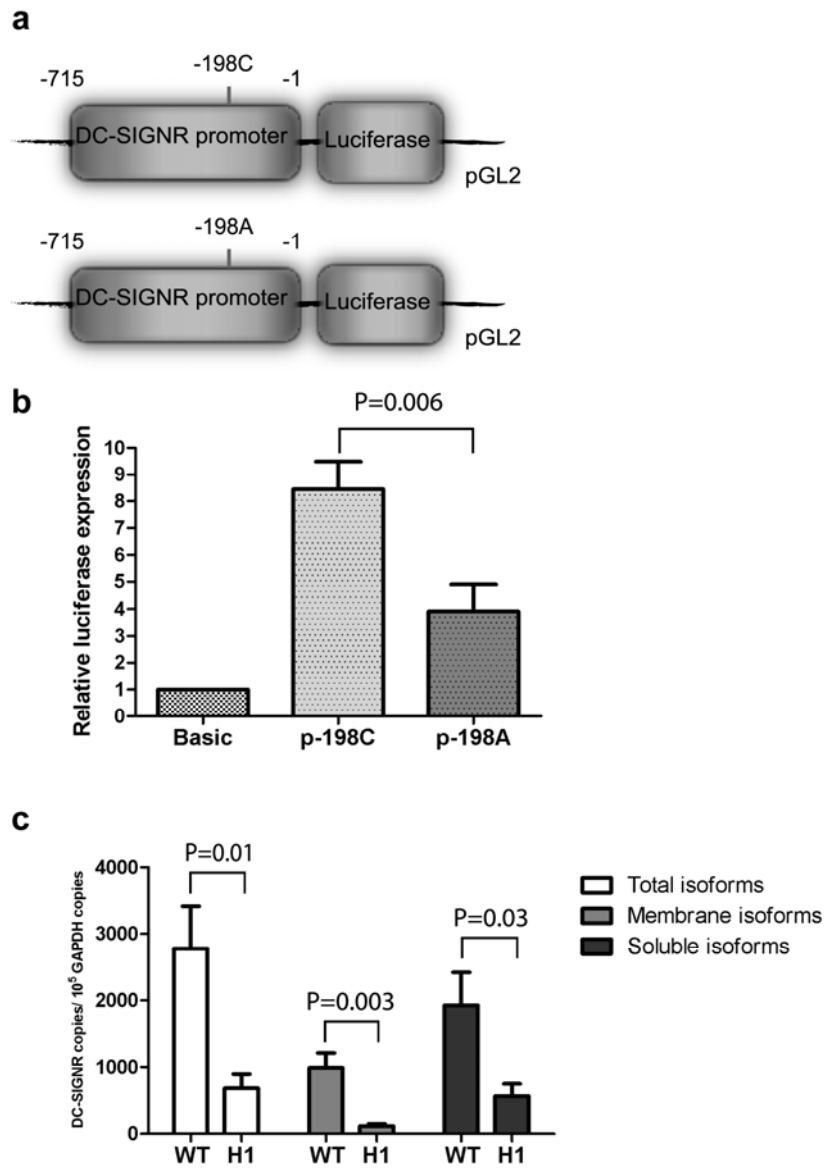
SNPs	p-577	p-323	p-198	int2-391	int2-180	int2-125	ex4RPT	int4+336	int5+7	int5+260	int5-116	int5-63	int6-34	delex7+223	ex7+259	Frequency
NT_077812 (ref)	T	G	C	A	G	G	7	C	G	G	C	G	G	0	C	
MAF \geq 5%	0,05	0,35	0,55	0,45	0,42	0,36	0,30	0,22	0,91	0,19	0,23	0,12	0,13	0,11	0,05	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
H1	.	.	A	C	A	.	7	.	C	30.8
H2	.	A	.	.	.	T	6	G	C	T	G	.	.	1	T	9.5
H3	.	.	A	C	A	.	7	.	C	.	.	A	.	.	.	11.0
H4	.	.	A	C	.	T	6	.	C	9.7
H5	.	A	.	.	.	T	6	G	C	T	G	3.2
H6	.	.	A	.	.	T	7	.	C	4.2
H7	.	A	7	.	C	4.2
H8	.	A	.	.	.	T	6	G	C	T	G	.	T	.	.	5.0
H9	7	.	C	.	G	.	T	.	.	4.5
H10	T	7	G	.	.	G	1.6
H11	.	A	7	4.2
H12	.	A	.	.	T	7	.	C	1.3
H13	C	.	.	C	.	.	7	0.3
H14	.	.	A	C	A	.	5	.	C	.	.	A	.	.	.	0
H15	7	1.6
OTHER																8.9

htSNPs, haplotype tagged single nucleotide polymorphisms; MAF, minor allele frequency

Article 2-Figure 2 : Effect of the int2-180A variant on placental DC-SIGNR isoform expression.



Article 2-Figure 3 : Transcriptional activity of DC-SIGNR promoter.



Article 2-Supplementary Table 1 : Associations between child DC-SIGNR htSNPs and mother-to-child HIV-1 transmission

Child DC-SIGNR htSNPs genotypes	HIV - % (N)	HIV+ % (N)	OR (95% CI) P value ^a
p-577 TT CT	94.9 (94) 0.05 (5)	100 (91) 0	NA
p-323 GG/AG AA	85.9 (85) 14.1 (14)	89.0 (81) 11.0 (10)	0.75 (0.32-1.78) 0.514
p-198 CC/CA AA	74.7 (74) 25.2 (25)	60.4 (55) 39.6 (36)	1.94 (1.04-3.60) 0.035
int2-391 AA/CA CC	75.8 (75) 24.2 (24)	65.9 (60) 31.3 (31)	1.62 (0.86-3.04) 0.136
Int2-180 GG /GA AA	90.9 (90) 9.1 (9)	73.6 (67) 26.4 (24)	3.58 (1.56-8.21) 0.002
int2-125 GG/GT TT	85.8 (85) 15.4 (14)	87.9 (80) 12.1 (11)	0.84 (0.36-1.95) 0.676
int4+336 CC/CG GG	96.0 (95) 4.0 (4)	96.7 (88) 3.3 (3)	0.81 (0.18-3.72) 0.786
int5+7 GG/CG CC	24.2 (24) 75.8 (75)	19.8 (18) 80.2 (73)	1.3 (0.65-2.59) 0.459
int5+260 GG/GT TT	96 (95) 4 (4)	98.9 (90) 1.1 (1)	0.26 (0.03-2.41) 0.206
int5-116 CC/CG GG	90.9 (90) 9.1 (9)	93.4 (85) 6.6 (6)	0.71 (0.24-2.07) 0.524
int5-63 GG/GA AA	98.0 (97) 2.0 (2)	98.9 (90) 1.1 (1)	0.54 (0.05-6.05) 0.611
int6-34 GG/GT TT	97 (96) 3 (3)	98.9 (89) 1.1 (1)	0.36 (0.04-3.52) 0.360
ex7del+223 TCT/ Del/TCT Del/Del	100 (99) 0	100 (91) 0	NA
ex7+259 CC/CT TT	100 (99) 0	100 (91) 0	NA

Article 2-Supplementary Table 2 : Associations between child DC-SIGNR exon 4 repeated region genotypes and mother-to-child HIV-1 transmission

Child DC-SIGNR ex4RPT genotypes	HIV -	HIV+	OR (95% CI) P value ^a
	% (N)	% (N)	
8/7 ^b	3.0 (3)	3.3 (3)	1.09 (0.21-5.55) 1.00
8/6 ^b	1.0 (1)	1.1 (1)	1.09 (0.07-17.68) 1.00
7/7 ^b	44.4 (44)	50.5 (46)	0.78 (0.44-1.39) 0.400
7/6 ^b	36.4 (36)	34.1 (31)	0.92 (0.50-1.69) 0.192
7/5 ^b	0	1.1 (1)	NA
6/6 ^b	15.2 (15)	6.6 (6)	0.39 (0.14-1.07) 0.060
6/5 ^b	0	3.3 (3)	NA
homozygote	59.6 (59)	57.1 (52)	1.11 (0.62-1.97)
heterozygote	40.4 (40)	42.9 (39)	0.732

Article 2-Supplementary Table 3 : Primer pairs and qRT-PCR conditions for DC-SIGNR expression assays

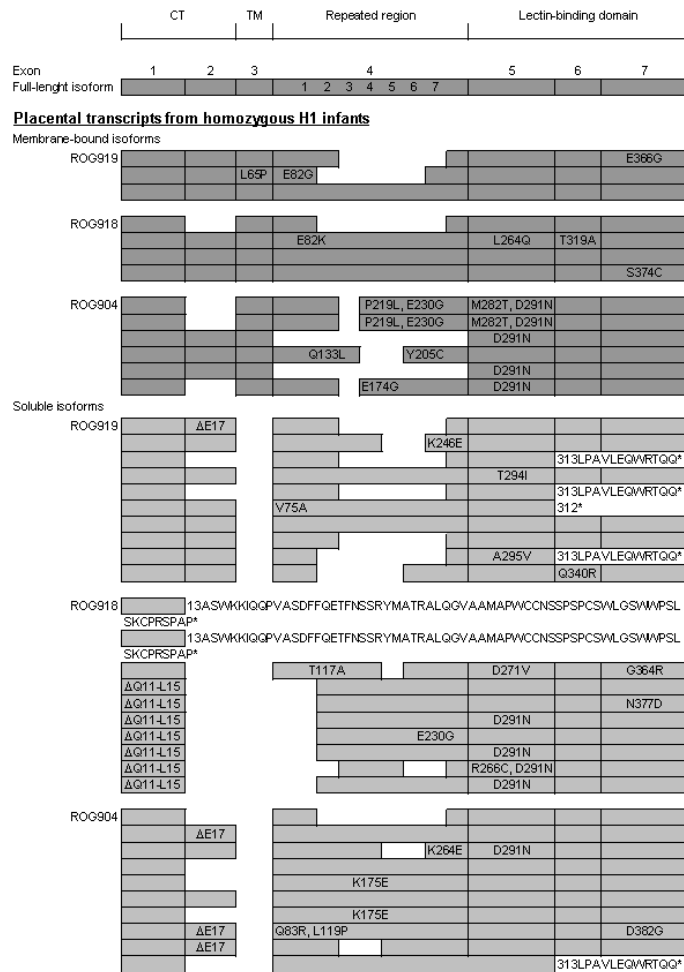
Gene		Primer pair	Annealing T°	Product size
DC-SIGNR-Exon 5 ^a	Total isoforms	SRE4/5F : 5'-CTGCATTTGGAACGCCTGTGC-3' SR5R : 5'-GCTCCTCAGCAGTTTTGATTACG-3'	63°C	151 bp
DC-SIGNR-Exon 3 ^a	Membrane-bound isoforms	SR3F : 5'-CCCTGGTGCAACTCCTCTC-3' SRE3/4R : 5'-GACCTTGGACACTTGGACAAGGATG-3'	63°C	67 bp
GAPDH ^b	Reference	GAPDHF : 5'-CGGGAAGCTCACTGGCATGGC-3' GAPDHR : 5'-GGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT-3'	60°C	208 bp

^a Accession number NM_014257

^b Accession number NM_002046

Article 2-Supplementary Figure 1 : DC-SIGNR transcripts repertoire in placenta.

Supplementary Figure 1. DC-SIGNR transcripts repertoire in placenta. Major RT-PCR products from RNA extract from 3 homozygous H1 and 3 homozygous WT placenta samples were purified, cloned and sequenced. Sequenced were analysed according to NCBI reference sequence NM_014257. CT ; cytoplasmic tail, TM ; trans-membrane domain; WT; wild-type



Placental transcripts from homozygous WT infants

Membrane-bound isoforms

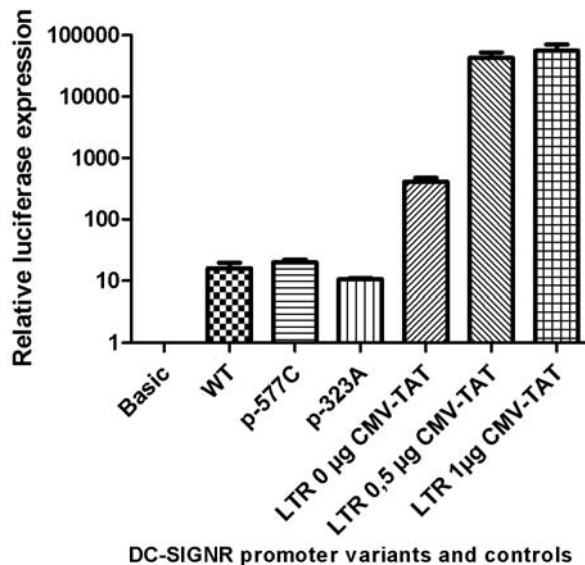
ROG903			Q133R	E210K			
	K5R			Q233E, D243A			313LPA.VLEQWRTQQ*
	ΔE17		Q179R, R187E				313LPA.VLEQWRTQQ*
			Q118E, R141Q				
							G277*
ROG896			P127S				
	V9A						
			L96F, G118R, R141Q, K177E				
			Q233R, E240K				
ROG891			V73A				W341*
	S42P						
	ΔE17						
			L46P, S56P				
	ΔE17						
	S2G		V169A			D291N	

Soluble isoforms

ROG903							313LPA.VLEQWRTQQ*
	T21A						D367G
			E115G		E298G		
			L103P				V342A
ROG896			R187E, E210Q				N379S
	Q10R	H37R					313LPA.VLEQWRTQQ*
					L231P		
ROG891					S285P	Q316R	337A.R.G.N.G.W
							TAHLCHPASSGTGTVENPTIAGMKTVRNLVAVAGTTIDVTLTITGSAKSPOPASETNSCFPASQQRIRLNLQD*
					Q312R		A369V
			R118Q	E210R			
			K120E				
	L14P	R29S			D255G		

Article 2-Supplementary Figure 2: Effect of DC-SIGNR promoter variant on transcriptional activity in luciferase reporter assay *in vitro* in transfected HeLa cells.

Supplementary Figure 2. Effect of DC-SIGNR promoter variant on transcriptional activity in luciferase reporter assay *in vitro* in transfected HeLa cells. Relative luciferase expression from pGL2-Basic, parental vector without promoter. Expression DC-SIGNR promoter constructs, spanning p-577C variant or p-323A variant were calculated relatively to this value. Data are presented in mean values \pm S.E.M of three independent experiments performed in triplicate. One-way ANOVA test followed by the Dunnett's test for multiple comparison was used to compare the relative luciferase expression of the p-557C and p-323A variant reporters against the wild-type (WT) construct (not significant). 0 μ g, 0.5 μ g or 1 μ g CMV-Tat vector was transfected with LTR-Luc as a positive control in these experiments.



Article 3

Naturally-occurring genetic variants in human DC-SIGN increase HIV-1 capture, cell-transfer and risk of mother-to-child transmission

Geneviève Boily-Larouche, Miroslav P Milev, Lynn S Zijenah, Annie-Claude Labbé, Marcel D Zannou, Jean H Humphrey, Brian J Ward, Johanne Poudrier, Andrew J Mouland, Éric A Cohen, Michel Roger

Soumis à : PLoS Biology, Novembre 2011

Contribution des co-auteurs :

Les personnes ci-mentionnées ont participé à la réalisation de cet article. Geneviève Boily-Larouche a participé au devis de l'étude et à la rédaction du manuscrit. Elle a exécuté les analyses génétiques de DC-SIGN, réalisé le typage des SNP et les analyses statistiques. Elle a effectué les expériences *in vitro* sur l'activité du promoteur, sur la capture et la transmission du VIH et a participé au devis de l'étude Placenta pour l'obtention des échantillons de placenta, en a isolé les cellules à Cotonou, au Bénin. Elle a réalisé les expériences et analyses de cytométrie en flux. Miroslav Milev a participé au devis et à l'exécution des expériences sur l'activité transcriptionnelle du promoteur, alors qu'Andrew Mouland a participé au devis et à l'analyse des résultats. Éric Cohen a participé au devis et à l'analyse des expériences de capture et de transmission du VIH. Lynn Zijenah, Mike Mbizvo et Brian Ward ont participé au recrutement et à la mise en place du projet ZVITAMBO et fourni les échantillons d'ADN pour l'étude d'association. Annie-Claude Labbé et Djimon Zannou ont participé à la mise en place et au recrutement de la cohorte du projet Placenta provenant de Cotonou, au Bénin. Johanne Poudrier a participé au devis et à l'analyse des expériences de cytométrie en flux. Michel Roger a coordonné et participé au devis de l'étude, à la mise en place du projet Placenta, aux analyses statistiques et à la rédaction du manuscrit.

Naturally-occurring genetic variants in human DC-SIGN increase HIV-1 capture, cell-transfer and risk of mother-to-child transmission

Geneviève Boily-Larouche^{1,2}, Miroslav P Milev³, Lynn S Zijenah⁴, Annie-Claude Labbé^{2,5}, Djimon M Zannou⁶, Jean H Humphrey⁷, Brian J Ward⁸, Johanne Poudrier^{1,2}, Andrew J Mouland³, Éric A Cohen^{2,9}, Michel Roger^{1,2*}

¹Laboratoire d'Immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada.

²Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada.

³Department of Medicine, McGill University, The Lady Davis Institute for Medical Research and McGill AIDS Center, Montreal, Canada.

⁴Department of Immunology, University of Zimbabwe College of Health Sciences, Harare, Zimbabwe.

⁵Département de Microbiologie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada

⁶Centre National Hospitalier Universitaire, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Bénin.

⁷Department of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA.

⁸Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Canada.

⁹Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada.

Word count: 4518

Running title: DC-SIGN contributes to HIV-1 vertical transmission

Foot note page

1) Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

2) Acknowledgments

G.B.L. holds a Doctoral Research Award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), M.R. and A.J.M are supported by careers award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and a Fraser Monat and MacPherson Scholarship, respectively, while E.A.C. is recipient of the Canada research chair in human retrovirology. This work was supported by a grant from Réseau SIDA FRSQ to M.R. and grants from the CIHR to A.J.M (MOP-38111) and E.A.C. The ZVITAMBO project was supported by the Canadian International Development Agency (CIDA) (R/C Project 690/M3688), United States Agency for International Development (USAID) (cooperative agreement number HRN-A-00-97-00015-00 between Johns Hopkins University and the Office of Health and Nutrition - USAID) and a grant from the Bill and Melinda Gates Foundation, Seattle WA. Additional funding was received from the Rockefeller Foundation (NY, NY) and BASF (Ludwigshafen Germany). It is a collaborative project of The University of Zimbabwe, The Harare City Health Department, The Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health and the Research Institute of McGill University Health Centres. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors would like to thank the members of the Benin (M Dovonou, H Onibon, RK Keke, M Alary) and ZVITAMBO (H Chidawanyika, P Iliff, A Mahomva, F Majo, L Malaba, M Mbizvo, L Moulton, K Mutasa, J Mutsambi, K Nathoo, M Ndhlovu, L Propper, A Ruff, N Tavengwa, C Zunguza, P Zvandasara) Study Groups. We also thank J Richard for isolation and activation of T lymphocytes provided for trans-infection experiments, J Mercier and M Dubé for technical assistance and expertise.

3) Meeting

Parts of these results have been presented in AIDS International Conference July 2010 in Vienna (Austria) and World Immune regulation meeting, March 2011 in Davos (Switzerland).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Major article

Abstract

Mother-to-child transmission (MTCT) is the main cause of HIV-1 infection in children worldwide. Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin (DC-SIGN, encoded by CD209), an attachment receptor for HIV-1, is expressed on placental macrophages and has been implicated in virus transmission to T cells. To investigate the potential role of DC-SIGN in MTCT of HIV-1, we carried out a genetic association study of DC-SIGN in a well-characterized cohort of 197 HIV-1-infected mothers and their infants recruited in Harare, Zimbabwe. Infants carrying H4 and H6 haplotypes were more likely to be HIV-1-infected during pregnancy (odd ratio (OR): 5.27, 95% confidence interval (CI):1.61-17.3, $P=0.0064$ and OR: 2.44, 95% CI:1.23-4.86, $P=0.0095$, respectively). These haplotypes contain promoter variants (p-336T/C and p-201C/A) and exon 4 variants (R198Q, E214D, R221Q and L242V) that were all significantly associated with increased risk of MTCT of HIV-1. Compared with wild-type sequence, the promoter variants reduced both the DC-SIGN transcription *in vitro* 3-fold ($P=0.0039$) and expression (1.9-fold ($P=0.0091$)) in placental CD163⁺ macrophages (Hofbauer cells) of HIV-1-unexposed infants. However, in HIV-1-exposed infants, the level of DC-SIGN expression in Hofbauer cells was similar in infants carrying either the promoter wild-type or variant sequences. In contrast, exon 4 variants increased HIV-1 capture and transmission to T cells *in vitro*. This is the first study to suggest the functional impact of DC-SIGN natural polymorphisms on HIV-1 transmission and provides compelling evidence to support an important role of DC-SIGN in MTCT of HIV-1.

Key words: DC-SIGN, genetic variant, HIV-1 capture, HIV-1 cell-to-cell transfer, mother-to-child transmission,

Word count: 236

Author Summary

In 2009, there were 33.3 million people living with HIV/AIDS worldwide. In sub-Saharan Africa, 52% of the cases are women. The large majority of children living with HIV-1 have been infected by mother-to-child transmission and 90% of these infants live in sub-Saharan Africa where the access to timely diagnostics and drugs is limited. A better understanding of the mechanisms acting at the maternal-fetal interface is crucial for the design of interventions other than antiretrovirals for transmission prevention. In addition, such understanding may provide new insights on the correlates of protection/susceptibility to HIV-1 infection. We studied the implication of DC-SIGN, an HIV-1 attachment receptor found in the placenta. Here, we report for the first time, DC-SIGN genetic variations among Zimbabwean infants that are associated with 4 to 21-fold increased risk of acquiring HIV-1 not only through the placenta and also during delivery and via breastfeeding. These genetic variants modulate DC-SIGN expression in placental macrophages leading to increased HIV-1 capture and transmission to target cells. This study provides compelling evidence for an important role of DC-SIGN in mother-to-child transmission of HIV-1. These findings may also apply to other pathogens transmitted from mother to child perinatally such as hepatitis B and C viruses, cytomegalovirus, *Trypanosoma cruzi*.

Word count: 204

Blurb

Functional genetic variants of an HIV-1 attachment factor expressed in the placenta and at mucosal sites increase the risk that infants will acquire HIV-1 during pregnancy, delivery and breast-feeding.

Introduction

UNAIDS estimates that each year more than 400,000 children acquire HIV-1-infection worldwide mostly through mother-to-child transmission (MTCT). At least 90% of these children live in sub-Saharan Africa. In the most heavily-affected countries, such as Zimbabwe, HIV-1 is responsible for one third of all deaths among children under the age of five. MTCT of HIV-1 can occur during pregnancy (*in utero*, IU), at delivery (*intrapartum*, IP) and via breastfeeding (*postpartum*, PP). Overall transmission rates in the absence of any intervention vary from 15 to 45%. Although antiretroviral therapy (ART) can reduce MTCT to as low as 2%, limited access to timely diagnostics and drugs in resource-poor settings blunts the potential impact of this strategy. A better understanding of the mechanisms acting at the maternal-fetal interface is crucial for the design of interventions other than ART for transmission prevention.

HIV-1 can cross the placental barrier *in utero* either by microtransfusion or by transcytosis across the trophoblast cell layer [1]. IP transmission may occur through direct contact between infant mucosa and HIV-1 infected maternal blood and/or cervico-vaginal secretions [1]. In addition, it has been proposed that stress induced by labor contractions may result in breakdown of the maternal-fetal barrier followed by placental microtransfusion [2]. Finally, HIV-1 in breast milk may result in PP infection of the newborn through mucosal exposure [1]. High maternal viral loads in serum and breast milk and low CD4 cell count as well as obstetric factors such as preterm delivery, vaginal delivery, and prolonged membrane rupture have been correlated with increased risk of MTCT of HIV-1 [1,3,4].

However, MTCT of HIV-1 still remains a relatively rare event. Even in the absence of therapy, more than half of the HIV-1-exposed infants remain uninfected. Identifying the factors that contribute to breaching the protective barrier between mother and child may provide new insights into the correlates of protection/susceptibility to HIV-1 infection. Genetic variations in HIV-1 co-receptors and determinants of immunity have been shown to influence the outcome of MTCT of HIV-1 [1,5]. Variants that result in either increased

CCR5 expression or a non-functional receptor (32 base-pair deletion variant) are associated with increased risk of vertical transmission [6,7]. The CCR5 32 base-pair deletion is absent in African populations [8]. Higher copy number of the CCL3L1 gene that encode for CCL3, the natural ligand for CCR5, decreases the risk of MTCT of HIV-1 [9]. Discordance at the human leucocyte antigen (HLA) class I loci between mother and child or specific HLA alleles also protect against MTCT [10–12]. However, this last effect accounts for only 20% of the observed variability among HIV-controllers of European origin while mechanisms of control seem to differ in Africans. In this context, it is a priority to identify other genetic determinants involved in MTCT of HIV-1 among African populations, which are the most affected by this pandemic.

Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing-nonintegrin (DC-SIGN, encoded by CD209) is a C-type lectin that binds to many pathogens including HIV-1 [13]. This interaction with HIV-1 leads to viral capture and subsequent transmission to adjacent T cells [14,15]. DC-SIGN is expressed on the cell surface of myeloid dendritic cells and some macrophages subsets including Hofbauer cells present in the placenta [13,16]. DC-SIGN is organised in four distinct domains. The cytoplasmic tail contains motifs involved in receptor internalization and signalling and is followed by a trans-membrane domain. The neck region facilitates the tetramerization of the receptor required for high-affinity ligand binding [17]. The lectin domain binds to various sugar structures on pathogens [18]. In the context of HIV-1, DC-SIGN may not only promote trans-infection of T cells but signalling initiated by HIV-1 binding may also influence immune responses and enhance productive infection of the dendritic cells themselves [19–21].

Given the presence of DC-SIGN in the placenta and its known interaction with HIV-1, we hypothesized that polymorphism affecting its expression or structure might influence the risk of MTCT of HIV-1. Here, we report significant associations between DC-SIGN H4 and H6 haplotypes and increased risks of MTCT among Zimbabwean infants. These haplotypes contain genetic variants that modulate DC-SIGN expression in placental macrophages and increase HIV-1 capture and transmission to T cells.

Results

DC-SIGN genetic variants increase the risk of MTCT of HIV-1

We carried out an association study of DC-SIGN polymorphism in 197 infants born to untreated HIV-1-infected mothers recruited in Harare, Zimbabwe [22]. Among them, 97 were HIV-1-infected and 100 were uninfected. Of the 97 HIV-1-infected infants, 57 were infected IU, 11 IP, and 17 PP. Timing of infection could not be determined for 12 HIV-1-infected infants as specimens were not available at some time points. Baseline characteristics of mothers and infants were reported previously [23]. Briefly, maternal age and CD4⁺ T cell count, child sex, mode of delivery, duration of membrane rupture and gestational age were similar among all groups. Maternal viral load >29 000 copies/ml was associated with increased risk of both IU and PP HIV-1 transmission, odd ratio (OR): 3.64, 95% confidence interval (CI): 1.82-7.31, P = 0.0002 and OR: 4.45, 95% CI: 1.50-13.2, P = 0.0045, respectively.

Ten haplotype-tagged single nucleotide polymorphisms (htSNPs) corresponding to the 10 major DC-SIGN haplotypes (Figure 1B), previously described among Zimbabweans [24], were genotyped in the study samples. Infants carrying H4 and H6 haplotypes were more likely to be HIV-1-infected during pregnancy (OR: 5.27, P=0.0064 and OR: 2.44, P=0.0095, respectively), whereas infants bearing the H2 haplotype were protected from IU transmission (OR: 0.34, P=0.0001) (Table 1). In the H4 and H6 haplotypes, two promoter and four exon 4 protein-modifying variants were independently associated with increased risk of MTCT of HIV-1 after adjustment for maternal viral load (Table 2). Infants carrying the promoter variants p-336C (rs4804803) or p-201A (rs11465366) had increased risks of IU (OR: 4.86, P=0.0008, OR: 6.47, P=0.0007, respectively), IP (OR: 7.37, P=0.048, OR: 8.84, P=0.046, respectively) and PP (OR: 4.15, P=0.039, OR: 5.81, P=0.030, respectively) HIV-1 infection compared to controls. The control group included all individuals without risk-associated variants. Infants harbouring the H6 exon 4 variant R198Q (rs41374747) had increased risks of IU (OR: 7.08, P=0.0003), IP (OR: 11.1, P=0.020) and PP (OR: 5.81,

P=0.030) HIV-1 infection compared to control group. Two other linked H6 exon 4 variants E214D (rs11465377) and R221Q (rs41335247), which are often transmitted with the R198Q variant (Figure 1B), were associated with an increased risk of IU transmission (OR: 5.09; P=0.0015). Infants carrying the H4 exon 4 variant L242V (rs11465380) had increased risks of IU (OR: 12.0, P=0.0008), IP (OR: 21.0, P=0.036), and PP (OR: 11.6, P=0.019) HIV-1 infection compared to control group. Maternal DC-SIGN haplotypes were not associated with MTCT of HIV-1 (Table S1).

We have previously investigated the association between DC-SIGN-related (DC-SIGNR, encoded by CD209L) genetic variants and MTCT of HIV-1 in the same subset of infants [23]. DC-SIGNR is a DC-SIGN homologue expressed at the cell-surface of endothelial cells of placental capillaries [16]. Two DC-SIGNR variants, located in the promoter region and intron 2, were significantly associated with increased risk of MTCT. When adjustment was made for the significant DC-SIGN and DC-SIGNR associations in logistic regression analysis, all DC-SIGN variants remained significantly associated with increased risk of HIV-1 vertical transmission (data not shown), suggesting that DC-SIGN and DC-SIGNR are independent predictors of MTCT of HIV-1 among Zimbabweans.

Promoter variants reduce transcriptional activity in vitro and DC-SIGN expression in placental macrophages

We next investigated the impact of the HIV-1 associated promoter variants on both DC-SIGN transcriptional activity in vitro and expression in placental cells. It has been reported that the p-336C variant decreased the transcriptional activity of Sp1 binding site [25,26]. Transcription factor binding site analysis predicted that variant p-201A would create a c-myc binding site. To test the effect of these promoter variants on transcription, we transiently transfected HeLa cells with a luciferase reporter gene under the control of DC-SIGN promoter region -507 to -1 containing AP-1, Sp1, Ets-1 and NF- κ B transcription factors that are essential for promoter activity [27] and harbouring promoter wild-type (p-336T/p-201C) or variant (p-336C/p-201A) sequences (Figure 2A). As previously reported

[25,26], the luciferase activity of the p-336C/p-201C variant construct was lower than that of p-336T/p-201C, although the difference observed was not significant (Figure 2B). The p-201A variant either alone or in combination with p-336C significantly reduced DC-SIGN transcriptional activity in vitro (Ratio p-336T/p-201C/p-336C/p-201A =3.13, P=0.0039). H1 and H2 haplotypes protect against IU acquisition reaching significance only for H2 (Table 1). H2 carries two promoter variants, p-939T and p-139C, that differ from H1, the wild-type haplotype (Figure 1B). We also investigated the impact of p-939T and p-139C variants on transcriptional activity of the promoter in a luciferase assay. These promoter variants did not show any influence on DC-SIGN transcriptional activity in vitro (Figure S1).

To further determine the net impact of promoter mutations on DC-SIGN expression in placental cells, we measured total DC-SIGN protein expression in fetal macrophages (Hofbauer cells). These cells are found within the chorionic villi and, together with fibroblasts and endothelial cells, form a collar-like ring beneath the syncytiotrophoblast layer at the maternal-fetal interface [28]. Term placentas contain a distinct population of Hofbauer cells that co-express DC-SIGN, CD163, CD14, CD68 and HLA-DR, a phenotype similar to alternatively activated macrophages (M2) known for their immunosuppressive properties [16,28,29]. Hofbauer cells were analysed by flow cytometry after isolation of mononuclear cells from term placentas of wild-type (p-336T/p-201C) and homozygotes or heterozygotes (p-336C/p-201A) infants for the promoter variants. CD14⁺ cells of high granularity that were negative for T, B and NK cell markers (CD3, CD19 and CD56) were identified as placental macrophages (CD14⁺ population) and two subsets of DC-SIGN⁺ cells were observed (CD163⁺ and CD163⁻, Figure 2C). CD163⁺ cells expressed significantly higher levels of DC-SIGN, HLA-DR and CD68 compared to CD163⁻ cells (Figure 2C). We then compared levels of DC-SIGN expression in CD163⁺ and CD163⁻ cells between infants carrying or not carrying promoter variants and born from HIV-1 negative or HIV-1 positive mothers (Figure 2D). In infants born to HIV-1 negative mothers, levels of DC-SIGN expression were reduced 1.9-fold (P=0.0091) in CD163⁺ cells and 1.8-fold (P=0.0305) in CD163⁻ cells from infants carrying the promoter variants

compared to infants harbouring the wild-type promoter sequence. Interestingly, DC-SIGN expression varied according to the mothers' HIV-1 status. In infants harbouring the wild-type sequence, levels of DC-SIGN expression were reduced 3.2-fold ($P=0.0402$) by CD163⁺ cells and 2.2-fold ($P=0.0378$) by CD163⁻ cells in infants born from HIV-1 positive mothers compared to infants born from HIV-1 negative mothers. However, levels of DC-SIGN expression by CD163⁺ and CD163⁻ cells from infants carrying the promoter variants did not differ according to the mothers' HIV-1 status. Levels of HLA-DR and CD68 expression on CD163⁺ and CD163⁻ cells did not differ according to DC-SIGN polymorphism or the mothers' HIV-1 status.

Protein-modifying variants increase viral capture and transfer to T cells

DC-SIGN molecules on the cell surface enhance HIV-1 infection by capturing virions and transmitting them to CD4⁺ T-lymphocytes [13–15]. The neck region, encoded by exon 4, contains a tandem of 23 amino acids repeats, important for efficient binding to HIV-1 [17,30]. We hypothesized that the exon 4 protein-modifying variants associated with MTCT of HIV-1 could affect the interaction between DC-SIGN and HIV-1. To assess viral capture, exon 4 from the DC-SIGN expression vector was replaced by exon 4 from infants carrying homozygous H1 (wild-type), H4 (L242V) or H6 (R198Q, E214D and R221Q) haplotypes (Figure 3A). Raji cells (Figure 3B) were stably transfected and cell lines grown from a single clone. Since viral capture is influenced by cell-surface expression of DC-SIGN [17], we selected cell lines with similar baseline DC-SIGN surface expression (Figure 3B). Given the fact that protein-modifying variants are always transmitted with promoter variants that modulate DC-SIGN expression, we used Raji cells that do not express endogenous DC-SIGN to investigate the net impact of exon 4 mutations on DC-SIGN affinity for HIV-1. The stable Raji transfectants were pulsed with equal amount of R5 tropic HIV-1_{HXB_{RU}-ADA} strain (50 ng of p24-equivalent) for 2h at 37°C, extensively washed to remove the unbound virus, and then lysed. The parental Raji cells were used as controls. Cell-associated p24-gag was measured by ELISA. The number of virions used

was not saturating since capture increased in a dose-dependent manner (Figure S2A). Interestingly, DC-SIGN H4 and H6 variants were more efficient at capturing viral particles than H1 (Figure 3C). HIV-1 capture on the Raji transfectants was stable over time (Figure S2B) and dependent on DC-SIGN interaction since the capture was reduced to background levels following incubation with DC-SIGN antibody (AZN-D1) or mannan (Figure 3C). Similar results were obtained when cells were pulsed with HIV-1_{JRCSF} strain (Figure S2C). To investigate whether DC-SIGN exon 4 mutations could also enhance cell transmission of HIV-1, we co-cultivated activated primary human CD4⁺ T lymphocytes with HIV-1 pulsed Raji transfectants. Transmission was quantified by measuring HIV-1 p24 in the supernatants after 5 days. The DC-SIGN variants significantly increased viral transmission to CD4⁺ T-lymphocytes (Figure 3D). Transmission was dependent on DC-SIGN expression since Raji cells or transfectants pre-incubated with DC-SIGN antibody failed to transmit HIV-1 to CD4⁺ T lymphocytes. Moreover, cell infection was not due to viral particles shed into the supernatant since virus was undetectable in the absence of CD4⁺ T lymphocytes (Figure 3D). Thus, the DC-SIGN neck region variants associated with MTCT of HIV-1 enhanced both the capture of HIV-1 by DC-SIGN and its subsequent transmission to the CD4⁺ T lymphocytes.

Discussion

To date, relatively few studies have assessed the potential impact of DC-SIGN polymorphism in adult HIV-1 infection and the findings have not been consistent. While some studies [31–33] have found a significant association, others have not [34–36]. The present study provides new observations to support an important role for DC-SIGN in the various modes of MTCT of HIV-1. Natural polymorphisms in DC-SIGN were shown to affect both expression in placental macrophages and affinity for HIV-1 resulting in more efficient HIV-1 capture and transmission to T lymphocytes with increased risk of IU, IP and PP HIV-1 transmission among Africans.

In vitro studies have shown that the interaction between DC-SIGN and HIV-1 can enhance short-term viral transfer to other susceptible cell types such as T lymphocytes [14,15,37]. Based on these findings, a Trojan horse model has been proposed whereby HIV-1 may subvert DC-SIGN-expressing submucosal dendritic cells to promote dissemination from the periphery to the lymphoid tissues [13]. Little is currently known about the mechanisms underlying HIV-1 passage across the placenta. We and others [16] have shown that DC-SIGN is expressed by Hofbauer cells in the placenta. Our demonstration of functional DC-SIGN genetic variants associated with altered risk of IU infection are consistent with a role for DC-SIGN in HIV-1 dissemination across the placenta. The DC-SIGN H2 haplotype was associated with protection from IU acquisition of HIV-1. H2 differs from the wild-type H1 haplotype by only two promoter variants that did not affect promoter activity *in vitro* (Figure S1). H1 was also protective against IU transmission although the effect did not reach statistical significance. H2 is present in 34% of Zimbabwean infants while H1 is found in 17%. As a result, the relatively small number of infants may have reduced the power of the present study to detect a significant association with the H1 haplotype. DC-SIGN H4 and H6 haplotypes were associated with increased risk of IU transmission of HIV-1. These haplotypes contain promoter variants that reduced DC-SIGN expression in Hofbauer cells and exon 4 protein-modifying mutations that enhanced capture and transmission of HIV-1 to CD4⁺ T lymphocytes. Compensatory mutations frequently evolve

to dampen the effect of other mutations. Since the DC-SIGN gene has been under strong evolutionary pressure to conserve its function [38], it is not surprising that mutations increasing the affinity of DC-SIGN for pathogens have appeared that can compensate for mutations that reduce its expression. Interestingly, DC-SIGN expression levels in Hofbauer cells were also affected by HIV-1 exposure. In infants harbouring the wild-type sequence, levels of DC-SIGN expression were lower in infants born from HIV-1 positive mothers than those born from HIV-1 negative mothers (Figure 2D). HIV- or antibody-stimulated DC-SIGN signalling in MDDCs reduces DC-SIGN expression and prevents cell maturation [21,39]. However, the impact of HIV-1 was not seen in infants carrying the promoter variants. In these infants, baseline DC-SIGN expression levels were low and HIV-1 exposure may not further downregulate its expression. All of the infants participating in the present study were born from untreated HIV-1 positive mothers. As a result, the positive association observed between IU infection of HIV-1 and DC-SIGN H4 and H6 haplotypes may have been caused by exon 4 protein-modifying mutations found in these haplotypes that enhanced capture of HIV-1 by Hofbauer cells within the chorionic villi in close proximity to maternal infected cells and facilitate short-term transfer of the virus to the infant's T lymphocytes. However, in uncomplicated pregnancy, T lymphocytes are scarce in the placenta and viral integration in fetal cells does not necessarily lead to fetal infection [16,40].

In addition to enhancing HIV-1 capture and transmission to target cells, DC-SIGN genetic variants may also contribute to a local immunological environment that promotes viral replication and dissemination of HIV-1 across the placenta [19,21]. HIV-1 or HIV-1-derived products activate fetal macrophages and T lymphocytes and could promote the establishment of a productive infection within the placenta [41–44]. In response to dengue infection, monocyte-derived dendritic cells from DC-SIGN p-336CT heterozygous individuals produce higher levels of pro-inflammatory factors such as TNF- α , IL-12 and IP-10 than those from wild-type p-336TT homozygous individuals [45]. Interestingly, TNF- α enhances HIV-1 replication and transcytosis within the placenta and TNF- α level correlates with the amount of HIV-1 transcripts [46–48]. Finally, we cannot rule out the

possibility that DC-SIGN variants may enhance HIV-1 infection of Hofbauer cells and subsequently MTCT of HIV-1. Hofbauer cells express both the HIV-1 CD4 receptor and the CCR5 co-receptor [16,49] and HIV-1 genomic materials have been detected in placental macrophages [50]. However, the net impact of this phenomenon on MTCT of HIV-1 remains to be determined since it has also been shown that placental macrophages can restrict HIV-1 replication [51].

Interestingly, we observed that DC-SIGN variants also increase the risk of IP and PP transmission of HIV-1. IP likely occurs through placental microtransfusion or by swallowing infected fluids during delivery. PP transmission occurs during breastfeeding when the virus crosses the child's intestinal barrier. Thus, DC-SIGN may not only contribute to HIV-1 transmission across the placenta but also at mucosal sites. Indeed, DC-SIGN positive cells are present in the intestinal lamina propria [52] and have the capacity to capture, translocate and transmit HIV-1 to local lamina propria lymphocytes [52]. Although DC-SIGN-positive cells have been detected in maternal decidua [16] and in breast-milk [53], we did not find any association between maternal DC-SIGN haplotypes and the risk of MTCT of HIV-1 (Table S1). Breast milk contains natural antibodies and other factors that may inhibit the interaction between maternal DC-SIGN expressing cells and HIV-1 as well as subsequent transmission to T cells [54,55].

Viral factors can also influence MTCT of HIV-1. Exposure to a high viral titres during IU life, delivery or breastfeeding increases the risk of HIV-1 transmission [56]. As such, high maternal viral load was associated with increased risk on MTCT of HIV-1 in our cohort. Clade C virus is the most prevalent subtype found in Zimbabwe and is preferentially transmitted IU compared to clade A or D viruses [57]. Most transmitted viruses are CCR5 tropic [58–60]. Kumar et al. studied the variation in HIV-1 envelope V1 loop lengths and observed compartmentalized HIV-1 replication within the placenta during IU transmission [42]. They proposed that viral selection during IU transmission could be the manifestation of HIV-1 placental adaptation to the unique repertoire of cellular targets and increased

adherence to C-type lectins which support the implication of DC-SIGN in IU transmission of HIV-1.

In this study, we demonstrate for the first time, the impact of DC-SIGN natural polymorphisms on its expression in placental cells and interaction with HIV-1 and provide compelling evidence to support an important role of DC-SIGN in various modes of MTCT of HIV-1. These findings raise the possibility that similar mechanisms may operate with other human pathogens known to interact with DC-SIGN and warrant further investigation.

Methods

Ethics statement. Written informed consent was obtained from all mothers who participated in the study. The study was approved by The Medical Research Council of Zimbabwe, The Medicines Control Authority of Zimbabwe, The Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Committee on Human Research, and the CHUM and Montreal General Hospital Ethics Committees. Full-term placental tissues were obtained following written informed consent in accordance with the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou (Benin) and the CHUM Research Ethics Committee. Peripheral blood samples were obtained from healthy, HIV-1-seronegative adult donors who gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki under research protocols approved by the research ethics review board of the Institut de Recherches Cliniques de Montréal.

Subjects. We investigated the impact of DC-SIGN polymorphism in MTCT of HIV-1 in a subgroup of 197 infants born to antiretroviral therapy naive HIV-1-infected mothers recruited in the ZVITAMBO study which enrolled 14,000 mother-baby pairs in Harare (Zimbabwe) between November 1997 and January 2000 prior to availability of HIV testing and ARV prophylaxis in the public sector health care system [22]. The samples were consecutively drawn from two groups: 97 HIV-1-positive mother/HIV-1-positive child pairs and 100 HIV-1-positive mother/HIV-1-negative child pairs. Modes of infant HIV-1 transmission were determined using definitions adapted from Bryson and colleagues [61] and were described elsewhere [23]. Full methods for recruitment, baseline characteristics collection, laboratory procedures have been described elsewhere [22].

DC-SIGN haplotypes reconstruction, htSNPs selection and genotyping. Haplotype reconstruction was performed as previously described [24]. Haplotype-tagged SNPs (htSNPs) were determined using the HaploBlockFinder software with a minor allele frequency (MAF) over 5% [62] and numbers were redefined compared to our previous publication [24] for their frequency in the present study population. Ten htSNPs were selected corresponding to the 10 major haplotypes from the 20 SNPs found in the

Zimbabwean population as we previously described [24]. These htSNPs along with the exon 4 mutations were genotyped in the 197 infants by direct PCR sequencing analysis as previously described [24]. Putative transcription factors binding sites in promoter region were analysed with TESS interface (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) using the TRANSFAC database.

Luciferase Assay. Genomic DNA from homozygous patients with or without mutation was amplified in the promoter region from nucleotide -507 to -1 and cloned between the Bgl II and Hind III multiple cloning sites in the pGL2-Basic vectors (Invitrogen, Canada inc, Burlington, Canada). All recombinants clones were verified by DNA sequencing. Luciferase assay was performed as previously described [23,25]. Firefly luciferase reporter vector was co-transfected with constitutive expressor of Renilla luciferase, phRL-CMV (Promega, Madison, WI, USA). Firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity.

Generation of DC-SIGN constructs and transfectants. Site-directed mutagenesis was carried out using pcDNA3-DC-SIGN vectors obtained from Drs. S. Pöhlmann, F. Baribaud, F. Kirchhoff and R.W. Doms [63] through the AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH: pcDNA3-DC-SIGN exon 4 was amplified from genomic DNA of homozygous H1, H4, and H6 infants and replaced between PspI and EspI (Fermantas, Burlington, Canada) restriction sites. All recombinants clones were verified by DNA sequencing for the presence of mutations of interest and conservation of the coding frame. Stably transfected cell lines were generated from Raji cells (ATCC, Manassas, USA). The pcDNA3-DC-SIGN-H1, -H4, -H6 vectors were nucleofected (Cell line Nucleofector Kit V, Amaxa, Walkersville, USA) and stable transfectants were selected and maintained in RPMI 1640 10% FBS containing 1 mg/ml of G418 (Invitrogen). DC-SIGN-expressing cells were sorted (sorter BD ARIA, BD Biosciences, Mississauga, Canada) and limiting dilutions were performed. Cell lines were grown from a single clone.

Flow cytometry. DC-SIGN expression was monitored by flow cytometry analysis using FITC-labelled anti-DC-SIGN antibodies clones DCN46 (BD Biosciences, Mississauga,

Canada) and 5D7 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). The cells were also incubated with isotype-matched control antibodies. Flow cytometry was performed using a BD FACS-Scan (BD Biosciences). Full-term placentas were obtained following non-complicated pregnancies and deliveries at Hopital St-Luc and Hopital Bethesda in Cotonou, Benin. All infants were delivered vaginally except for two who were delivered by caesarean section and none of the mothers presented with signs of sexually transmitted infections or placental malaria infection. A small piece of each placenta was collected and processed within 3 hours following the delivery and washed extensively with PBS to remove maternal cells. Mononuclear cells were mechanically isolated from placental tissue using a Medimachine (BD Biosciences) and purified on Histopaque gradient (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). Placental mononuclear cells were cryopreserved until flow cytometry analysis. Placental cells from 4 wild-type (p-336T/p-201C) and 11 homozygotes or heterozygotes (p-336C/p-201A) infants for the promoter variants born from HIV-1 negative were analysed. Placental cells from 3 wild-type and 6 homozygotes or heterozygotes infants born from HIV-1 positive mothers were also analysed. Placentas with signs of inflammation (chorioamnionitis) were excluded. These HIV-1-infected mothers received a combination of three antiviral drugs (full regimen) during pregnancy and delivery. Infants received a full regimen or a single dose nevirapine at delivery. Dead cells were excluded for staining with Live/Death Aqua (Invitrogen) and lineage cells were stained with CD3-, CD19- (eBiosciences, San Diego, USA), and CD56-PerCPCy5.5 (BD Biosciences) antibodies. CD14-Alexa700 (BioLegend, San Diego, USA), CD163-APC (R&D System, Minneapolis, USA), DC-SIGN-FITC, CD68-PE and HLA-DR-PECy5 (BD Biosciences) antibodies and isotype-matched controls were used. Placental macrophages were initially gated on Live/Lin- cells and selected for CD14 expression and high granularity. Geometric mean fluorescence intensity (MFI) was calculated in DC-SIGN⁺CD163⁺ and DC-SIGN⁺CD163⁻ subsets to assess the level of DC-SIGN expression and their level of maturation. Δ Geometric MFI represents the difference between specific marker expression and its FMO (fluorescence minus one).

Virus stocks, capture and transmission assay. HIV-1 stocks (HIV-1_{HxBru-ADA}) were generated by transient transfection of HEK293T cells with HxBRU-ADA proviral construct encoding the R5-tropic HIV-1_{ADA} Env [64] using the standard calcium-phosphate method. Viral stock was titrated using ELISA p24 Ag (BioChain, Hayward, USA). 3×10^5 cells/well of each Raji transfectants were plated in 96-well plates and pre-incubated with mannan (200 μ g/ml, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA), DC-SIGN blocking antibody (clone AZN-D1, R&D systems, Minneapolis, USA) (20 μ g/ml), matching isotype control or medium for 30 minutes at 4°C before adding 50 ng of p24 equivalent of virus (HIV-1_{HxBru-ADA}). Cells were incubated 2h at 37°C and washed with PBS (Invitrogen). Cells were lysed and assayed for p24 Ag using ELISA. In co-culture experiment, Raji transfectants were pulsed as above and 3×10^5 phytohemagglutinin-L activated human primary CD4⁺ T-lymphocytes (ratio 1:1) isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were added. Cells were cultivated in RPMI 10% FBS 100U/ml rIL-2 for 5 days. Supernatants were collected and p24 was measured using ELISA. CD4⁺ T-lymphocytes were isolated from healthy donors and activated as previously described [65].

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad PRISM 5.0 for Windows (GraphPad Software inc. San Diego, CA). Differences in frequencies of haplotypes and htSNPs were compared between groups using χ^2 analysis or Fisher's exact test. Logistic regression was used to estimate the odds ratio (OR) and multiple logistic regression to define independent predictors identified as significant in the crude analysis. For luciferase, DC-SIGN/HLA-DR/CD68 expression, capture and transmission assays comparisons between wild-type and variants were assessed with the unpaired two-tailed Student's t test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

References

1. Kourtis AP, Bulterys M (2010) Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clin Perinatol* 37: 721-37.
2. Kweek JJ, Mwapasa V, Milner DA, Jr., Alker AP, Miller WC, et al. (2006) Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS Med* 3: e10.
3. Humphrey JH, Marinda E, Mutasa K, Moulton LH, Iliff PJ, et al. (2010) Mother to child transmission of HIV among Zimbabwean women who seroconverted postnatally: prospective cohort study. *BMJ* 341: c6580.
4. Luzuriaga K (2007) Mother-to-child Transmission of HIV: A Global Perspective. *Curr Infect Dis Rep* 9: 511-517.
5. Singh KK, Spector SA (2009) Host Genetic Determinants of HIV Infection and Disease Progression in Children. *Pediatr Res* 49: 259-265
6. Pedersen BR, Kamwendo D, Blood M, Mwapasa V, Molyneux M, et al. (2007) CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. *PLoS One* 2: e838.
7. Singh KK, Hughes MD, Chen J, Phiri K, Rousseau C, et al. (2008) Associations of chemokine receptor polymorphisms With HIV-1 mother-to-child transmission in sub-Saharan Africa: possible modulation of genetic effects by antiretrovirals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49: 259-265.
8. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16: 100-103.
9. Meddows-Taylor S, Donninger SL, Paximadis M, Schramm DB, Anthony FS, et al. (2006) Reduced ability of newborns to produce CCL3 is associated with increased susceptibility to perinatal human immunodeficiency virus 1 transmission. *J Gen Virol* 87: 2055-2065.

10. Mackelprang RD, John-Stewart G, Carrington M, Richardson B, Rowland-Jones S, et al. (2008) Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 197: 1156-1161.
11. MacDonald KS, Embree JE, Nagelkerke NJ, Castillo J, Ramhadin S, et al. (2001) The HLA A2/6802 supertype is associated with reduced risk of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 183: 503-506.
12. Farquhar C, Rowland-Jones S, Mbori-Ngacha D, Redman M, Lohman B, et al. (2004) Human leukocyte antigen (HLA) B*18 and protection against mother-to-child HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 692-697.
13. Tsegaye TS, Pohlmann S (2010) The multiple facets of HIV attachment to dendritic cell lectins. *Cell Microbiol* 12: 1553-1561.
14. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, et al. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597.
15. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16: 135-144.
16. Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, Pohlmann S, Trowsdale J, et al. (2001) Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 195: 586-592.
17. Serrano-Gomez D, Sierra-Filardi E, Martinez-Nunez RT, Caparros E, Delgado R, et al. (2008) Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem* 283: 3889-3903.
18. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, et al. (2004) Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* 11: 591-598.

19. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van d, V, Geijtenbeek TB (2009) Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat Immunol* 10: 1081-1088.
20. Gringhuis SI, van d, V, van den Berg LM, den Dunnen J, Litjens M, et al. (2010) HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat Immunol* 11: 419-426.
21. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, et al. (2007) Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 8: 569-577.
22. Humphrey JH, Iliff PJ, Marinda ET, Mutasa K, Moulton LH, et al. (2006) Effects of a single large dose of vitamin A, given during the postpartum period to HIV-positive women and their infants, on child HIV infection, HIV-free survival, and mortality. *Journal of Infectious Diseases* 193: 960-971.
23. Boily-Larouche G, Iscache AL, Zijenah LS, Humphrey JH, Moulant AJ, et al. (2009) Functional genetic variants in DC-SIGNR are associated with mother-to-child transmission of HIV-1. *PLoS One* 4: e7211.
24. Boily-Larouche G, Zijenah LS, Mbizvo M, Ward BJ, Roger M (2007) DC-SIGN and DC-SIGNR genetic diversity among different ethnic populations: Potential implications for pathogen recognition and disease susceptibility. *Human Immunology* 68: 523-530.
25. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, et al. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37: 507-513.
26. Chan KY, Xu MS, Ching JC, So TM, Lai ST, et al. (2010) CD209 (DC-SIGN) - 336A>G promoter polymorphism and severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Chinese. *Hum Immunol* 71: 702-707.
27. Liu H, Yu W, Liou LY, Rice AP (2003) Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene* 313: 149-159.

28. Bockle BC, Solder E, Kind S, Romani N, Sepp NT (2008) DC-sign+ CD163+ macrophages expressing hyaluronan receptor LYVE-1 are located within chorion villi of the placenta. *Placenta* 29: 187-192.
29. Joerink M, Rindsjo E, van Riel B, Alm J, Papadogiannakis N (2011) Placental macrophage (Hofbauer cell) polarization is independent of maternal allergen-sensitization and presence of chorioamnionitis. *Placenta* 32: 380-385.
30. Bernhard OK, Lai J, Wilkinson J, Sheil MM, Cunningham AL (2004) Proteomic analysis of DC-SIGN on dendritic cells detects tetramers required for ligand binding but no association with CD4. *J Biol Chem* 279: 51828-51835.
31. Liu H, Hwangbo Y, Holte S, Lee J, Wang C, et al. (2004) Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis* 190: 1055-1058.
32. Zhang J, Zhang X, Fu J, Bi Z, Arheart KL, et al. (2008) Protective role of DC-SIGN (CD209) neck-region alleles with <5 repeat units in HIV-1 transmission. *J Infect Dis* 198: 68-71.
33. Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, Goedert JJ, Nelson GW, et al. (2004) Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78: 14053-14056.
34. Rathore A, Chatterjee A, Sood V, Khan SZ, Banerjee AC, et al. (2008) Risk for HIV-1 infection is not associated with repeat-region polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC-SIGN variants among North Indians. *Clin Chim Acta* 391: 1-5.
35. Chaudhary O, Rajsekar K, Ahmed I, Verma R, Bala M, et al. (2008) Polymorphic variants in DC-SIGN, DC-SIGNR and SDF-1 in high risk seronegative and HIV-1 patients in Northern Asian Indians. *J Clin Virol* 43: 196-201.

36. Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, Raghavan S, Narendran G, et al. (2009) CCR2, MCP-1, SDF-1a & DC-SIGN gene polymorphisms in HIV-1 infected patients with & without tuberculosis. *Indian J Med Res* 130: 444-450.
37. Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, et al. (2004) Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103: 2170-2179.
38. Barreiro LB, Patin E, Neyrolles O, Cann HM, Gicquel B, et al. (2005) The heritage of pathogen pressures and ancient demography in the human innate-immunity CD209/CD209L region. *Am J Hum Genet* 77: 869-886.
39. Shan M, Klasse PJ, Banerjee K, Dey AK, Iyer SP, et al. (2007) HIV-1 gp120 mannoses induce immunosuppressive responses from dendritic cells. *PLoS Pathog* 3: e169.
40. Ellis JE, Hair GA, Lindsay MK, Ansari AA, Sundstrom JB (2007) Fetal cord blood mononuclear cells that are collected at term from HIV-1 infected women harbor transcriptionally active integrated proviral DNA. *Am J Obstet Gynecol* 197: 371-376.
41. Reuben JM, Turpin JA, Lee BN, Doyle M, Gonik B, et al. (1996) Induction of inflammatory cytokines in placental monocytes of gravaidae infected with the human immunodeficiency virus type 1. *J Interferon Cytokine Res* 16: 963-971.
42. Kumar SB, Handelman SK, Voronkin I, Mwapasa V, Janies D, et al. (2011) Different Regions of HIV-1 Subtype C env Are Associated with Placental Localization and In Utero Mother-to-Child Transmission. *J Virol* 85: 7142-7152.
43. Schramm DB, Kuhn L, Gray GE, Tiemessen CT (2006) In vivo effects of HIV-1 exposure in the presence and absence of single-dose nevirapine on cellular plasma activation markers of infants born to HIV-1-seropositive mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42: 545-553.
44. McGann KA, Collman R, Kolson DL, Gonzalez-Scarano F, Coukos G, et al. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 causes productive infection of macrophages in primary placental cell cultures. *J Infect Dis* 169: 746-753.

45. Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, et al. (2011) DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e934.
46. Kfutwah AK, Mary JY, Nicola MA, Blaise-Boisseau S, Barre-Sinoussi F, et al. (2006) Tumour necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependent manner. *Retrovirology* 3: 36.
47. Lee BN, Ordonez N, Popek EJ, Lu JG, Helfgott A, et al. (1997) Inflammatory cytokine expression is correlated with the level of human immunodeficiency virus (HIV) transcripts in HIV-infected placental trophoblastic cells. *J Virol* 71: 3628-3635.
48. Parry S, Zhang J, Koi H, Arechavaleta-Velasco F, Elovitz MA (2006) Transcytosis of Human immunodeficiency virus 1 across the placenta is enhanced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *J Gen Virol* 87: 2269-2278.
49. Lairmore MD, Cuthbert PS, Utley LL, Morgan CJ, Dezzutti CS, et al. (1993) Cellular localization of CD4 in the human placenta. Implications for maternal-to-fetal transmission of HIV. *J Immunol* 151: 1673-1681.
50. Sheikh AU, Polliotti BM, Miller RK (2000) Human immunodeficiency virus infection: in situ polymerase chain reaction localization in human placentas after in utero and in vitro infection. *Am J Obstet Gynecol* 182: 207-213.
51. Luciano-Montalvo C, Ciborowski P, Duan F, Gendelman HE, Melendez LM (2008) Proteomic analyses associate cystatin B with restricted HIV-1 replication in placental macrophages. *Placenta* 29: 1016-1023.
52. Shen R, Smythies LE, Clements RH, Novak L, Smith PD (2010) Dendritic cells transmit HIV-1 through human small intestinal mucosa. *J Leukoc Biol* 87: 663-670.
53. Satomi M, Shimizu M, Shinya E, Watari E, Owaki A, et al. (2005) Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast-milk macrophages via DC-SIGN. *J Infect Dis* 191: 174-181.

54. Requena M, Bouhlal H, Nasreddine N, Saidi H, Gody JC, et al. (2008) Inhibition of HIV-1 transmission in trans from dendritic cells to CD4⁺ T lymphocytes by natural antibodies to the CRD domain of DC-SIGN purified from breast milk and intravenous immunoglobulins. *Immunology* 123: 508-518.
55. Saeland E, de Jong MA, Nabatov AA, Kalay H, Geijtenbeek TB, et al. (2009) MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol Immunol* 46: 2309-2316.
56. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, et al. (1999) Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 341: 394-402.
57. Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, et al. (2004) Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *Aids* 18: 1629-1636.
58. Zhang H, Hoffmann F, He J, He X, Kankasa C, et al. (2006) Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. *Retrovirology* 3: 73.
59. Zhang H, Tully DC, Hoffmann FG, He J, Kankasa C, et al. (2010) Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS One* 5: e9294.
60. Russell ES, Kwiek JJ, Keys J, Barton K, Mwapasa V, et al. (2011) The Genetic Bottleneck in Vertical Transmission of Subtype C HIV-1 Is Not Driven by Selection of Especially Neutralization Resistant Virus from the Maternal Viral Population. *J Virol*
61. Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW (1992) Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *N Engl J Med* 327: 1246-1247.
62. Zhang K, Jin L (2003) HaploBlockFinder: haplotype block analyses. *Bioinformatics* 19: 1300-1301.

63. Pohlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, et al. (2001) DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 75: 4664-4672.
64. Subbramanian RA, Kessous-Elbaz A, Lodge R, Forget J, Yao XJ, et al. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *J Exp Med* 187: 1103-1111.
65. Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile JP, Cohen EA (2010) HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115: 1354-1363.

Figure legends

Figure 1 DC-SIGN major haplotypes in Zimbabwean population. (A) Schematic representation of the location of the 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) selected in the DC-SIGN gene. (B) DC-SIGN haplotypes reconstruction with minor allele frequency (MAF) >5%. The 10 haplotype-tagged SNPs are shaded.

Figure 2 DC-SIGN promoter variants reduced transcriptional activity *in vitro* and reduced DC-SIGN expression in placental macrophages. (A, B) Transcriptional activity *in vitro* (A) Schematic representation of reporter gene constructs corresponding to the DC-SIGN promoter region from positions -507 to -1 with or without promoter variants -336C and -201A. (B) Relative luciferase expression from pGL2-Basic, the parental vector without a promoter. Expression of the DC-SIGN promoter constructs was calculated relative to this value. Results are mean \pm S.E.M. values of three independent experiments performed in triplicates and differences in relative luciferase expression between variants and wild-type were examined with Student's t test. (C) Hofbauer-like cells were analysed by flow cytometry to measure DC-SIGN expression in infants bearing or not promoter variants. Dead cells and Lin⁺ (CD3; CD19; CD56) cells were excluded and subsets were identified for their side scatter (SSC-A) properties and their level of CD14 expression. Placental macrophages were selected for high granularity and CD14 expression (CD14⁺ subset). DC-SIGN was expressed on CD163⁺ and CD163⁻ subsets. Dot plots and flow cytometry histograms are representative experiments of all patients. Δ Mean fluorescence intensity (MFI) of DC-SIGN, HLA-DR and CD68 was compared between both subsets for infants bearing or not promoter variants and born from HIV-1 negative mothers (p-336T/p-201C group n=4; p-336C or p-336C/p-201A group n=11). (D) DC-SIGN, HLA-DR and CD68 expression was compared in CD163⁺ and CD163⁻ subsets from infants bearing or not promoter variants and born from HIV-1 negative mothers (HIV-1 Unexposed; p-336T/p-201C group n=4; p-336C or p-336C/p-201A group n=11) or from HIV-1 positive mothers (HIV-1 Exposed; p-336T/p-201C group n=3; p-336C or p-336C/p-201A group n=6).

Results in C and D are mean \pm S.E.M. values of Δ MFI and difference between subsets or variants was calculated with Student's t test.

Figure 3 DC-SIGN neck variants enhance HIV-1 capture and transmission. (A) Schematic representation of DC-SIGN constructs representing H1, H4 and H6 haplotypes stably expressed in the Raji cell line. (TM; transmembrane domain, Cyt; cytoplasmic domain). (B) Raji-transfectants were selected for similar DC-SIGN cell-surface expression by flow cytometry. Cells stained with anti-DC-SIGN (DCN46) (filled grey histogram) or isotypic control (dashed grey line) are shown. Parental Raji cells are represented by the black line. Antibody titration was achieved at the same dilution for all cell lines using two DC-SIGN monoclonal antibodies (clones DCN46 and 5D7) that recognized different epitopes. (C) HIV-1 capture by DC-SIGN variants. Raji-transfectants were incubated with HIV-1_{HXBru-ADA} (ADA) for 2 h at 37°C, extensively washed and lysed. Cell-associated p24 Ag was measured by ELISA. Where indicated, cells were pre-incubated with anti-DC-SIGN (AZN-D1) or with mannan to inhibit DC-SIGN interaction with HIV-1. HIV-1 capture is shown relative to H1 (wild-type) (H1=100%). (D) HIV-1 transfer to T lymphocytes by DC-SIGN variants. Raji-transfectants were pulsed as in (C) and subsequently co-cultivated with activated human primary CD4⁺T lymphocytes from two donors for 5 days. Virus release into the supernatant was measured by ELISA p24. Where indicated, cells were pre-incubated with AZN-D1. HIV-1 transmission is shown relative to H1 (H1=100%). Results are mean \pm SD of duplicates for each donor (D) or three independent experiments (C). Student's t test was used to calculate differences in % capture and transmission among Raji DC-SIGN transfectants H4, H6 and H1.

Article 3-Table 1 : Associations between child DC-SIGN haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) HIV-1 transmission.

Child DC-SIGN haplotype alleles	HIV -		IU infection		IP infection		PP infection	
	% (n)	% (n)	OR (95% CI) P value	% (n)	OR (ICI 95%) P value	% (n)	OR (ICI 95%) P value	
H1	20 (39)	16 (16)	0.76 (0.40-1.44)	14 (3)	0.64 (0.18-2.29)	6 (2)	0.25 (0.06-1.11)	
	80 (159)	84 (86)	0.40 ^a	86 (19)	0.77 ^b	94 (32)	0.053 ^b	
H2	40 (80)	19 (19)	0.34 (0.19-0.60)	18 (4)	0.33 (0.11-1.01)	65 (22)	0.80 (0.38-1.72)	
	60 (118)	81 (83)	0.0001 ^a	82 (18)	0.062 ^b	35 (12)	0.70 ^b	
H3	10 (19)	12 (12)	1.26 (0.58-2.70)	18 (4)	2.10 (0.64-6.83)	15 (5)	1.62 (0.56-4.69)	
	90 (179)	88 (90)	0.56 ^a	82 (18)	0.26 ^b	85 (29)	0.37 ^b	
H4	2 (4)	10 (10)	5.27 (1.61-17.3)	9 (2)	4.85 (0.84-28.2)	9 (3)	4.69 (1.00-22)	
	98 (190)	90 (92)	0.0064 ^a	91 (20)	0.11 ^b	91 (31)	0.067 ^b	
H5	6 (11)	12 (12)	2.27 (0.96-5.33)	5 (1)	0.81 (0.09-6.59)	12 (4)	2.27 (0.68-7.59)	
	94 (187)	88 (90)	0.056 ^a	95 (21)	1.00 ^b	88 (30)	0.25 ^b	
H6	9 (18)	20 (20)	2.44 (1.23-4.86)	18 (4)	2.22 (0.68-7.28)	21 (7)	2.59 (0.99-6.79)	
	91 (180)	80 (82)	0.0095 ^a	82 (18)	0.25 ^b	79 (27)	0.07 ^b	
H7	7(13)	5 (5)	0.73 (0.25-2.12)	5 (1)	0.67 (0.08-5.45)	0	NA	
	93 (185)	95 (97)	0.57 ^a	95 (21)	1.00 ^b	100 (34)		
H8	3 (6)	1 (1)	0.32 (0.04-2.67)	5 (1)	1.52 (0.17-13.3)	0	NA	
	97 (192)	99 (101)	0.43 ^b	95 (21)	0.53 ^b	100 (34)		
H9	0	1 (1)	NA	0	NA	0	NA	
	100 (198)	99 (101)		100 (22)		100 (34)		
H10	2 (4)	3 (3)	1.47 (0.32-6.70)	9 (2)	4.85 (0.84-28.2)	3 (1)	1.47 (0.16-13.6)	
	98 (194)	97 (99)	0.69 ^b	91 (20)	0.11 ^b	97 (33)	0.55 ^b	

CI, Confidence interval; n, number; NA, non applicable, OR, odds ratio.

^a P value as determined by the χ^2 test.

^b P value as determined by the Fisher's exact test.

Article 3-Table 2 : Associations between child DC-SIGN promoter or exon 4 mutations and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) HIV-1 transmission.

Child DC-SIGN mutations	IU infection		IP infection	PP infection	
	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI) ^d	OR (95% CI)	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR (95% CI) ^d
	P value	P value	P value	P value	P value
p-336 CT/CC ^a	4.63 (1.90-11.3) 0.0004 ^b	4.86 (1.91-12.4) 0.0008	7.37 (0.91-59.8) 0.048 ^c	3.44 (0.93-12.7) 0.063 ^c	4.15 (1.06-16.3) 0.039
p-201 CA/AA ^a	6.00 (2.16-16.7) 0.0003 ^b	6.47 (2.17-19.3) 0.0007	8.84 (0.92-84.6) 0.046 ^c	4.42 (0.99-19.6) 0.060 ^c	5.81 (1.15-29.3) 0.030
R198Q GA/AA ^a	6.63 (2.41-18.3) 0.0001 ^b	7.08 (2.39-21.0) 0.0003	11.1 (1.21-101) 0.020 ^c	4.42 (0.99-19.6) 0.060 ^c	5.81 (1.16-29.3) 0.030
E214D and R221Q GC/CC and GAAA ^a	4.97 (1.89-13.1) 0.0007 ^b	5.09 (1.84-14.0) 0.0015	7.24 (0.80-65.3) 0.082 ^c	2.90 (0.67-12.5) 0.17 ^c	3.35 (0.72-15.6) 0.12
L242V CG/GG ^a	12.0 (2.84-50.8) 0.0006 ^c	12.0 (2.71-53.4) 0.0008	21.0 (1.54-286) 0.036 ^c	10.5 (1.57-70.3) 0.026 ^c	11.6 (1.43-94.4) 0.019

CI, Confidence interval; n, number; OR, odds ratio;

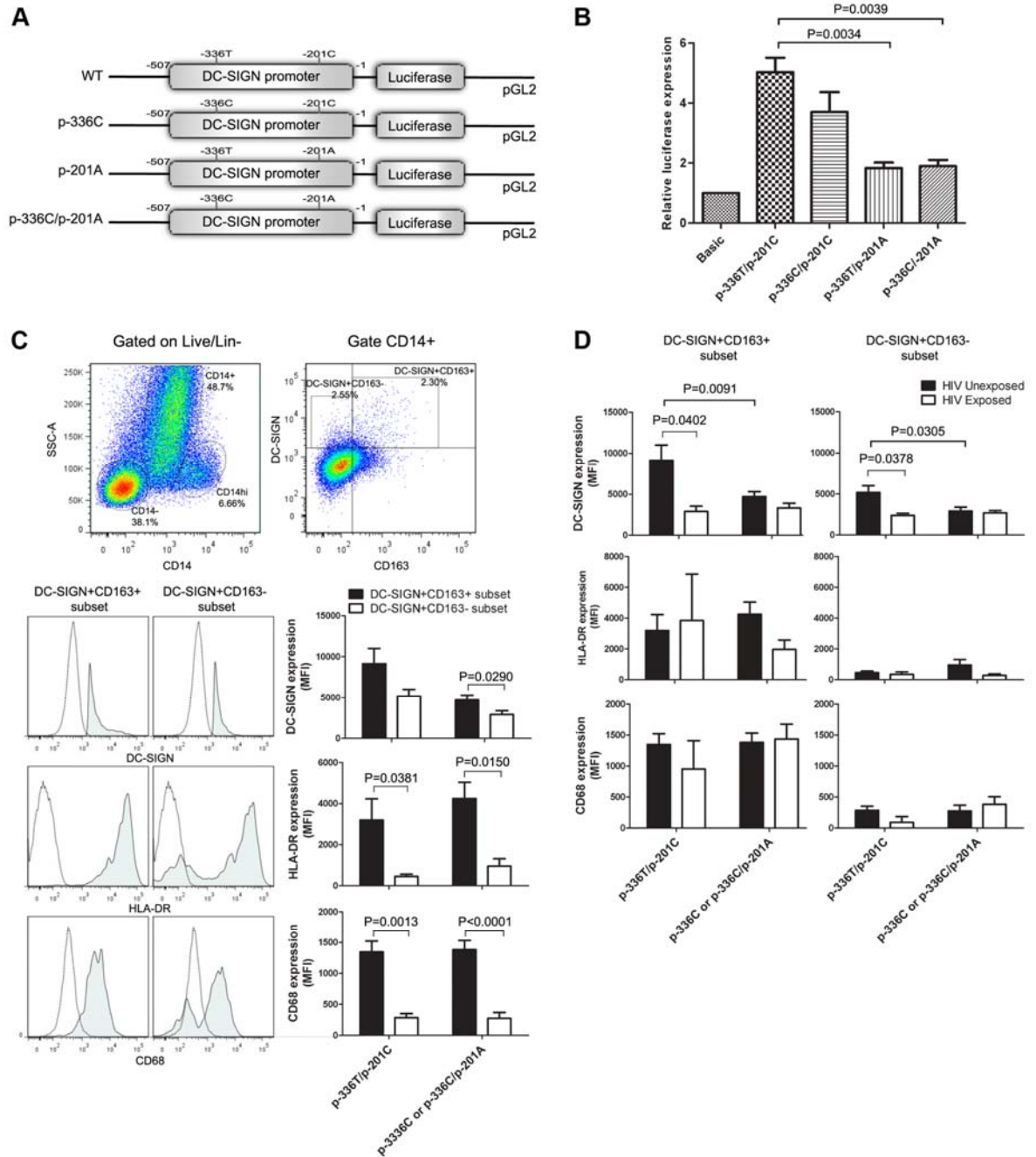
^aCompared to the control group defined as all subjects without any mutations associated with increased risk of transmission (H1, H2, H10)

^bP-value as determined by the χ^2 test.

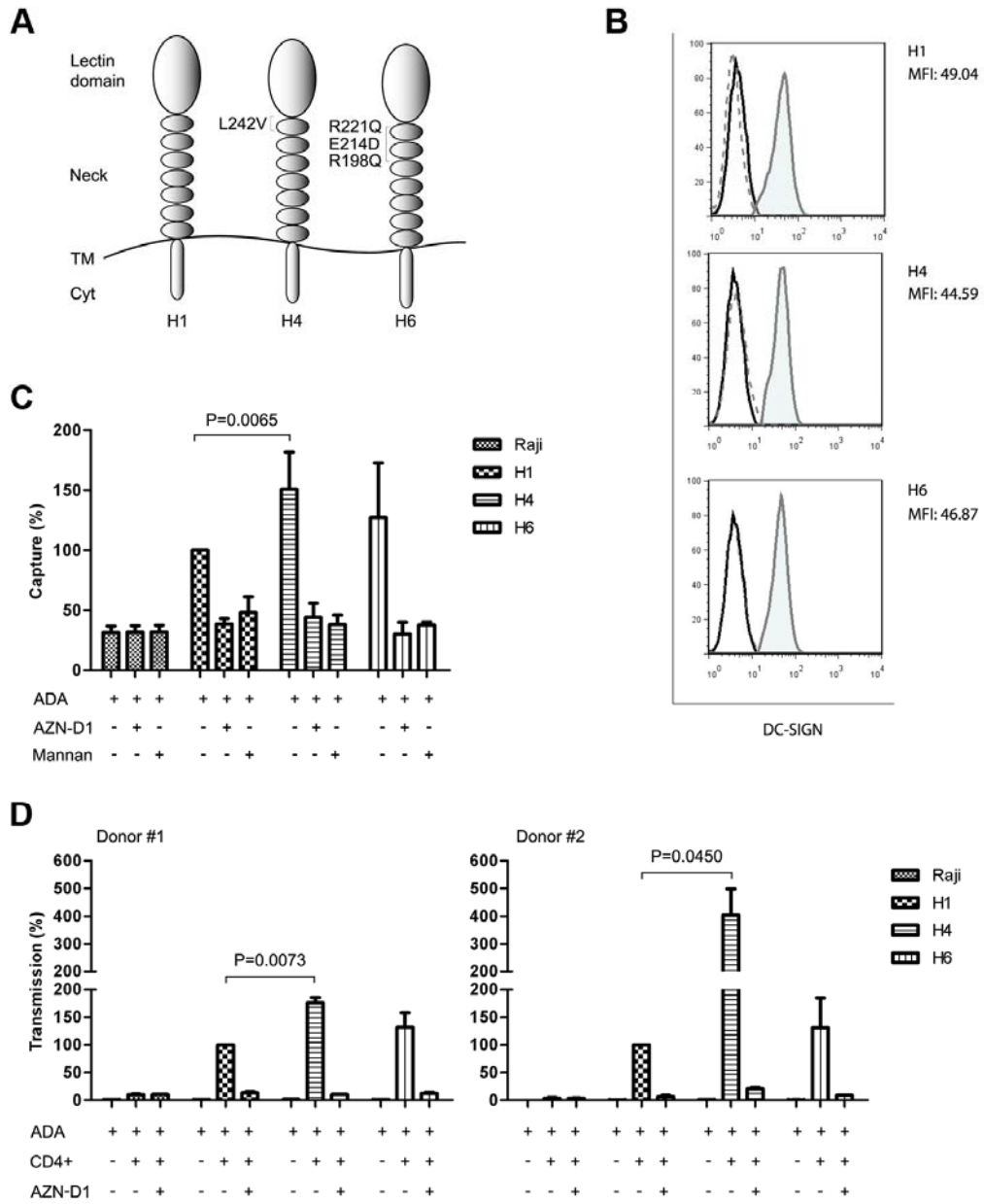
^cP-value as determined by Fisher's exact test.

^dAdjusted for the maternal viral load in logistic regression analysis

Article 3-Figure 2 : DC-SIGN promoter variants reduced transcriptional activity *in vitro* and reduced DC-SIGN expression in placental macrophages.



Article 3-Figure 3 : DC-SIGN neck variants enhance HIV-1 capture and transmission.



Article 3-Supplementary Table 1 : Associations between maternal DC-SIGN haplotypes and intrauterine (IU), intrapartum (IP) and postpartum (PP) mother-to-child HIV-1 transmission.

Maternal DC-SIGN haplotype alleles	No Transmission	IU transmission	IP transmission		PP transmission		
	% (n)	% (n)	OR (95% CI) P value	%(n)	OR (95% CI) P value	% (n)	OR (95% CI) P value
H1	22 (43) 78 (154)	19 (19) 81 (83)	1.22 (0.67-2.23) 0.52 ^a	18 (4) 82 (22)	1.26 (0.40-3.91) 1.0 ^b	9 (3) 91 (31)	2.89 (0.84-9.90) 0.10 ^b
H2	34 (67) 66 (130)	32 (33) 68 (69)	1.08 (0.65-1.79) 0.77 ^a	23 (5) 77 (17)	1.75 (0.62-4.96) 0.29 ^a	44 (15) 56 (19)	0.65 (0.31-1.37) 0.26 ^a
H3	10 (19) 90 (178)	10 (10) 90 (92)	0.98 (0.44-2.20) 0.96 ^a	18 (4) 82 (18)	0.48 (0.15-1.57) 0.26 ^b	15 (5) 85 (29)	0.62 (0.21-1.79) 0.37 ^a
H4	5 (9) 95 (188)	7 (7) 93 (95)	0.65 (0.23-1.80) 0.40 ^a	9 (2) 91 (20)	0.48 (0.10-2.37) 0.30 ^b	12 (4) 88 (30)	0.36 (0.10-1.24) 0.11 ^b
H5	5 (9) 95 (188)	8 (8) 92 (94)	0.56 (0.21-1.51) 0.25 ^a	5 (1) 95 (21)	1.01 (0.12-8.34) 1.0 ^b	0 100 (34)	3.48 (0.20-61.2) 0.36 ^b
H6	13 (25) 87 (172)	16 (16) 84 (86)	0.78 (0.40-1.54) 0.48 ^a	14 (3) 86 (19)	0.92 (0.25-3.34) 1.0 ^b	15 (5) 85 (29)	0.84 (0.30-2.38) 0.75 ^a
H7	6 (11) 94 (186)	4 (4) 96 (98)	1.45 (0.45-4.67) 0.78 ^b	0 100 (22)	2.78 (0.16-48.7) 0.61 ^b	0 100 (34)	4.26 (0.24-74) 0.37 ^b
H8	4 (7) 96 (190)	1 (1) 99 (101)	3.72 (0.45-30.7) 0.27 ^b	5 (1) 95 (21)	0.77 (0.09-6.61) 0.58 ^b	0 100 (34)	2.72 (0.15-48.7) 0.60 ^b
H9	0 100 (97)	1 (1) 99 (101)	NA	0 100 (22)	NA	0 100 (34)	NA
H10	2 (3) 98 (194)	1 (2) 98 (100)	0.77 (0.13-4.71) 1.0 ^b	9 (2) 91(20)	0.15 (0.02-0.98) 0.08 ^b	3 (1) 97 (33)	0.51 (0.05-5.06) 0.47 ^b

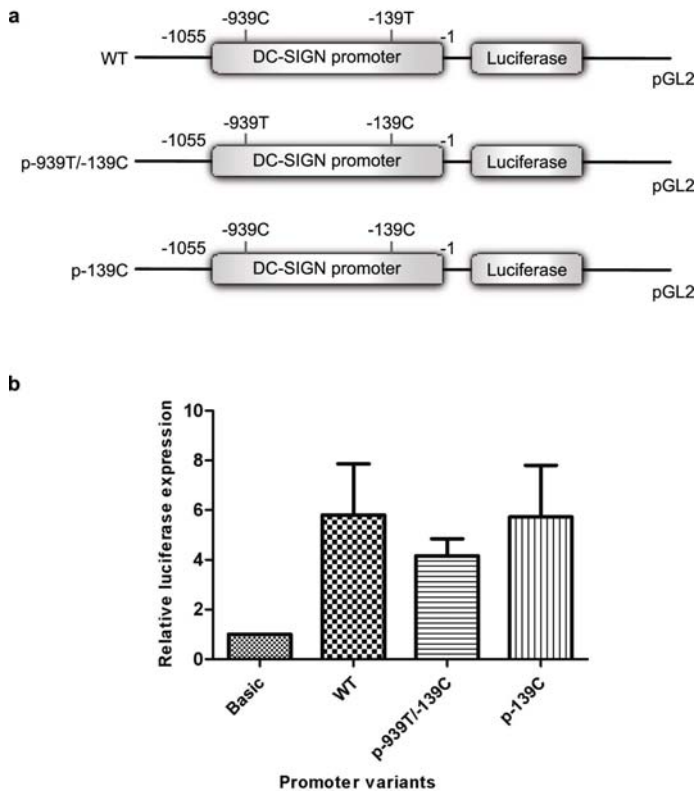
CI, Confidence interval; n, number; OR, odds ratio, NA; not applicable

^a P value as determined by the χ^2 test.

^bP value as determined by the Fisher's exact test.

Article 3-Supplementary Figure 1 : Effect of DC-SIGN promoter variants on transcriptional activity.

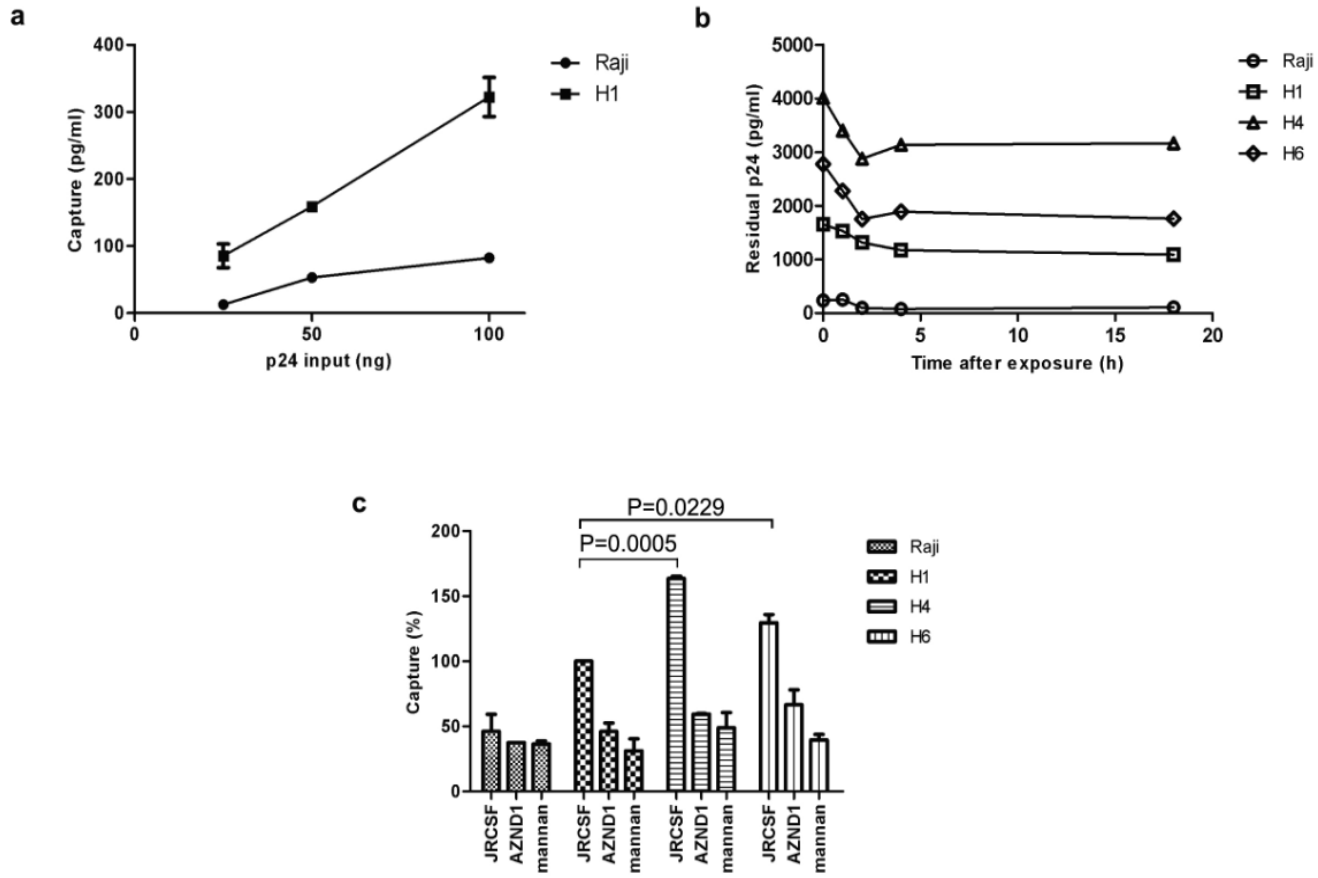
Supplementary Figure 1. Effect of DC-SIGN promoter variants on transcriptional activity. **(a)** Schematic representation of reporter gene constructs corresponding to the DC-SIGN promoter region from positions -1055 to -1 with or without promoter variants -939 and -139. **(b)** Relative luciferase expression from pGL2-Basic, the parental vector without a promoter. Expression of the DC-SIGN promoter constructs was calculated relative to the value of pGL2-Basic, which was arbitrarily set as 1. Data are mean \pm SD values of 3 independent experiments performed in triplicates and there were no significant differences in the relative expression between variants and WT as determined with Student's *t* test.



Article 3-Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2. HIV-1 capture by Raji transfectants. **(a)** Dose-dependent HIV-1 capture by Raji transfectants. Raji and Raji-H1 transfectants were incubated with 25, 50 and 100 ng of p24-equivalent of HIV-1_{HXBru-ADA} for 2 h at 37°C, washed with cold PBS 1X and lysed in 0,5% Triton X-100. Cell-associated p24 contents were measured by ELISA. **(b)** Residual cell-associated HIV-1 over time. 3×10^5 Raji-transfectants were exposed to 150 ng of p24-equivalent of HIV-1_{HXBru-ADA} for 2 h at 37°C, washed and incubated in fresh medium at 37°C for different time points (0, 1h, 2h, 4h and 18h). Cell-associated p24-contents were measured by ELISA after lysis in 0,5% Triton X-100. **(c)** Capture assay with HIV-1_{JR-CSF}. 3×10^5 cells were incubated with 50 ng of p24-equivalent of HIV-1_{JR-CSF} for 2 h at 37°C, washed extensively with cold PBS 1X and lysed in 0,5% Triton X-100. Cell-associated p24 contents were measured by ELISA. Where indicated, cells were pre-incubated 30 min at 4°C with 20 µg/ml of anti-DC-SIGN (AZND1) or with mannan (200µg/ml) to inhibit DC-SIGN interaction with HIV-1 before pulsing with HIV-1_{JR-CSF}. HIV-1 capture is shown relative to H1 (WT) (H1=100%). Data are mean ± SD of 2 independent experiments performed in duplicates. Student's *t* test was used to calculate differences in % capture between the Raji DC-SIGN transfectants H4, H6 and H1 (WT).

Article 3-Supplementary Figure 2 : HIV-1 capture by Raji transfectants.



Discussion

L'objectif de cette étude était de déterminer l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et DC-SIGNR et la TME du VIH-1 pour ensuite définir l'effet fonctionnel des mutations associées afin de mieux comprendre leur implication dans la TME. Mais avant de s'intéresser à cette question, nous devions d'abord décrire l'étendue de la variation génétique de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population à l'étude. Dans le premier article, nous avons exploré la diversité génétique chez deux populations d'origine ethnique distincte : zimbabwéenne d'ethnie Shona et canadienne d'origine française. Nous avons observé que la population d'origine africaine présente une plus grande variabilité dans les séquences des gènes de DC-SIGN et DC-SIGNR que la population caucasienne d'origine canadienne française. Dans le gène de DC-SIGN, 82 % des haplotypes identifiés ne se retrouvaient que dans la population du Zimbabwe alors que 33 % de ceux-ci étaient uniques aux Canadiens ($P < 0,03$). Chez DC-SIGNR, les Africains offraient 65 % de la diversité génétique, alors que 44 % de cette diversité était imputable à la population canadienne. DC-SIGNR est sous une moins forte pression de conservation que son homologue DC-SIGN⁴⁰² et à ce titre, nous avons observé qu'il présente un plus grand nombre d'haplotypes que DC-SIGN dans ces populations (53 haplotypes pour DC-SIGNR et 39 haplotypes pour DC-SIGN). Néanmoins, malgré l'importante pression de conservation exercée sur DC-SIGN, la population du Zimbabwe présente une grande diversité génétique. Observées chez les Zimbabwéens, plusieurs mutations, dont certaines codent pour un changement d'acide aminé, n'ont été décrites que chez les Africains alors qu'elles sont totalement absentes des autres grands groupes ethniques⁴⁰² (Article 1). Les pathogènes qui prévalent en Afrique diffèrent de ceux retrouvés en Amérique du Nord, et la pression de sélection qu'ils exercent sur ces populations pourrait expliquer cette différence géographique de distribution allélique entre le Zimbabwe et le Canada. Puisque DC-SIGN et DC-SIGNR jouent un rôle dans la capture et la dégradation de certains pathogènes et dans la mise en place de la réponse immunitaire^{433,474,491}, la distribution géographique de ces divers pathogènes capables d'interagir avec ces lectines a pu conduire à la sélection de mutations qui ont

modifié l'immunité à travers l'évolution et les continents. Ces mutations fonctionnelles pourraient, dans le cas de pathogènes plus anciens, favoriser une meilleure reconnaissance par le système immunitaire, ou encore dans le cas de pathogènes plus récents, être utilisées pour échapper à cette réponse immunitaire.

La suite de nos travaux nous a permis de déterminer l'association entre ces haplotypes décrits dans la population du Zimbabwe et la TME du VIH-1. Enfin, nous avons exploré l'impact fonctionnel des mutations associées à un risque augmenté de TME sur l'expression de ces récepteurs et l'interaction avec le VIH-1.

1. DC-SIGNR et la TME du VIH-1

1.1 Association entre le polymorphisme génétique de DC-SIGNR dans la population du Zimbabwe et la TME du VIH-1

DC-SIGNR est exprimé par les cellules endothéliales des capillaires placentaires et est capable de capturer et de transmettre le VIH-1 aux cellules adjacentes⁴³¹. Les variations génétiques affectant ses fonctions pourraient donc avoir une influence sur la TME du VIH-1. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons, dans le second article, étudié l'association entre le polymorphisme du gène de DC-SIGNR et la TME du VIH-1.

Parmi les 15 haplotypes les plus fréquents de la population zimbabwéenne, nous avons identifié deux haplotypes associés avec un risque augmenté de TME du VIH-1. Les enfants homozygotes pour les haplotypes H1 et H3 (H1-H1, H1-H3 ou H3-H3) sont plus à risque de contracter le VIH-1 par voie IU (OR : 3,57 P=0,013) et IP (OR : 5,71 P=0,025) que les enfants qui ne portent pas ces haplotypes. H1 et H3 sont les haplotypes les plus fréquents de la cohorte (31 % et 11 % respectivement) et présentent un groupe de mutations qu'on ne retrouve pas dans les autres haplotypes. En explorant l'association entre les mutations portées par ces haplotypes et la TME, nous avons observé deux mutations qui augmentent le risque de TME du VIH-1. Les facteurs cliniques de la mère, et particulièrement la charge virale, jouent un rôle important dans la TME du VIH-1²⁰⁷⁻²¹⁰ et de ce fait, une charge virale maternelle élevée (>29 000 copies/ml) est associée à un risque augmenté de transmission IU et PP dans la cohorte zimbabwéenne. Nos analyses subséquentes ont donc été ajustées pour ce facteur en l'intégrant dans un modèle statistique d'analyses multivariées. La substitution d'un C pour un A dans le promoteur localisée à 198 paires de bases en aval du codon d'initiation (p-198A) est associée à un risque augmenté de transmission IU et IP du VIH-1, effet perdu après l'ajustement pour la charge virale maternelle. Une autre mutation de ce groupe, cette fois substituant un G pour un A dans l'intron 2, 180 paires de bases en aval de l'exon 3 (int2-180A), est aussi associée avec un risque augmenté de TME IU (OR : 3,83 P=0,008) et IP (OR : 5,71 P=0,025) du VIH-1,

et ce, indépendamment de la charge virale maternelle. Ainsi, les enfants portant les haplotypes H1 et H3 contenant une mutation du promoteur, p-198A, et une mutation de l'intron 2, int2-180A, sont de 4 à 6 fois plus à risque de contracter le VIH-1 durant la grossesse et à l'accouchement. DC-SIGNR joue donc un rôle important dans la TME du VIH-1, mais comment?

1.2 Impact fonctionnel des mutations associées avec un risque augmenté de TME du VIH-1

Afin de mieux définir l'implication de DC-SIGNR dans la transmission IU et IP du VIH-1, nous avons caractérisé l'impact fonctionnel des mutations associées à un risque augmenté de TME. Nous avons d'abord exploré l'impact de la mutation de l'intron 2. Mummidi et ses collaborateurs ont démontré qu'un vaste répertoire d'isoformes de DC-SIGNR est exprimé dans le placenta⁴¹¹. L'épissage alternatif de l'exon 3, codant pour le domaine trans-membranaire de la protéine, permet la génération d'isoformes solubles⁴¹¹. Bien que la fonction de ces isoformes n'ait jamais été décrite, il n'en demeure pas moins qu'ils représentent une part importante des isoformes exprimés au niveau du placenta⁴¹¹ (Article 2). Étant donné que la mutation de l'intron 2 est localisée 180 paires de bases en aval de l'exon 3, nous avons émis l'hypothèse que cette mutation pourrait modifier les événements d'épissage alternatif générant ce vaste répertoire d'isoformes de DC-SIGNR. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons cloné et séquencé les transcrits d'ARNm de DC-SINGR dans des placentas de premier trimestre chez des enfants homozygotes pour l'haplotype H1 ou les allèles sauvages. L'étude des différents clones de DC-SIGNR nous a permis de constater qu'un vaste répertoire d'isoformes est produit au niveau du placenta et qu'en effet, il semble y avoir des différences entre le répertoire exprimé dans le placenta des individus H1 comparativement au répertoire des individus qui ne portent pas ces mutations. À l'aide d'un PCR quantitatif, nous avons démontré que les individus H1, homozygotes pour la mutation int2-180A, expriment significativement ($P=0,004$) une plus grande proportion d'isoformes solubles de DC-SIGNR au niveau du placenta que les individus portant l'allèle sauvage. Ces résultats suggèrent que la mutation int2-180A

favorise l'exclusion de l'exon 3 lors de l'épissage alternatif, ce qui conduit à la génération d'une plus grande proportion d'isoformes solubles de DC-SIGNR.

L'utilisation d'une stratégie de typage génétique par haplotype nous a permis de constater que la mutation int2-180A était toujours transmise avec la mutation du promoteur p-198A. Cette mutation est aussi associée à un risque augmenté de transmission IU du VIH-1, bien qu'elle ne le demeure pas après l'ajustement pour la charge virale maternelle. Nous ne pouvions donc pas exclure qu'elle ait un impact fonctionnel sur l'expression de DC-SIGNR. Certains haplotypes portent uniquement la mutation p-198A, et il est possible que l'impact fonctionnel de cette mutation ne soit pas assez important pour influencer à elle seule la TME. Cependant, il est raisonnable de croire que la combinaison de ces deux mutations présente un effet assez important pour que le cours de la TME en soit modifié. Ainsi, nous avons étudié l'impact de la mutation du promoteur p-198A sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *in vitro*. Nous avons démontré par un essai luciférase que la modification d'un C pour un A en position p-198 du promoteur de DC-SIGNR mène à une diminution de 2 fois de l'activité transcriptionnelle de celui-ci ($P=0,006$). Ainsi, en plus d'une mutation modifiant le répertoire d'isoformes de DC-SIGNR, l'haplotype H1 porte aussi une mutation qui diminue l'activité transcriptionnelle du promoteur dans un essai *in vitro*.

Combinées, ces deux mutations peuvent donc présenter un impact important sur l'expression du répertoire d'isoformes de DC-SIGNR. L'expression absolue du nombre d'isoformes totales, solubles et membranaires de DC-SIGNR au niveau du placenta a été comparée entre les individus portant ou non la combinaison de ces deux mutations. Ainsi, les individus homozygotes H1 présentent une diminution de 4 fois du nombre total des isoformes de DC-SIGNR ($P=0,011$). En regardant de plus près chaque isoforme, nous avons constaté que les enfants homozygotes H1 présentent en fait 3 fois moins d'isoformes solubles ($P=0,003$), mais 8 fois moins d'isoformes membranaires ($P=0,03$) de DC-SIGNR que les porteurs des allèles sauvages. Ainsi, les enfants porteurs des mutations p-198A et int2-180A associées avec une risque augmenté de contracter le VIH-1 par voie IU et IP

corrèlent avec une diminution de l'expression de l'ARNm de DC-SIGNR au niveau du placenta qui affecte de façon disproportionnelle les isoformes membranaires.

1.3 Rôle de DC-SIGNR dans la TME du VIH-1

Contre toute attente, la diminution de l'expression des isoformes solubles et particulièrement membranaires augmente le risque de transmission IU et IP du VIH-1. À ce jour, la majorité des études portant sur DC-SIGNR et le VIH-1 se sont plutôt intéressées à sa fonction dans la *trans* infection dans des modèles *in vitro* et au polymorphisme portant sur la variation du nombre de répétitions de l'exon 4^{431,522,533,534,552,553}. Nous n'avons observé aucune association entre la TME du VIH-1 et la variation du nombre de répétitions de l'exon 4. Chez les Africains, la variabilité du nombre de répétitions de l'exon 4 est beaucoup moins importante que chez les Caucasiens ou les Asiatiques (Article 1), et cette faible fréquence pourrait expliquer que nous n'ayons observé aucune association dans notre étude. Notre observation qu'un niveau d'expression diminué de DC-SIGNR, soluble et particulièrement membranaire, au niveau du placenta corrèle avec un risque augmenté d'infection IU et IP ne cadre donc pas avec un rôle de DC-SIGNR dans la *trans* infection. D'autres mécanismes impliquant DC-SIGNR doivent être considérés pour expliquer son rôle dans le passage trans placentaire du VIH-1.

Bien qu'aucun groupe ne se soit encore intéressé à la fonction de la forme soluble de DC-SIGNR, Plazolles et ses collaborateurs ont démontré que la forme soluble de DC-SIGN, son homologue, est retrouvée dans la circulation sanguine de patients sains et que son expression est augmentée durant l'inflammation⁴²⁷. Durant l'infection à CMV, la forme soluble de DC-SIGN favorise la capture du virus ainsi que son arrimage à la DC et promeut l'infection de celle-ci via l'internalisation du complexe⁴²⁷. MBL, une lectine capable de lier le VIH-1, est une protéine de phase aiguë relarguée dans la circulation sanguine, et les mutations associées avec une diminution plasmatique de cette protéine corrèlent avec un risque augmenté de TME du VIH-1^{303,304}. Comme MBL, DC-SIGNR pourrait être sécrété durant l'infection au VIH-1 et permettre l'opsonisation des particules virales dans le

placenta. Les porteurs des mutations diminuant l'expression de DC-SIGNR s'en trouveraient désavantagés.

Néanmoins, la diminution des niveaux d'expression totaux de DC-SIGNR dans le placenta ne semble pas, à elle seule, suffisante pour influencer le risque de TME. P-198A perd son association avec la TME du VIH-1 lorsque les analyses sont ajustées pour les facteurs de la mère, et l'effet statistique de la combinaison de p-198A et int2-180A est plus fort. La mutation diminuant l'expression de DC-SIGNR doit donc être transmise avec celle affectant le répertoire d'isoformes pour que le cours de la TME soit influencé. L'isoforme membranaire de DC-SIGNR pourrait donc jouer un rôle plus important que l'isoforme soluble. L'expression de DC-SIGNR à la surface des cellules permissives à l'infection au SARS réduit le titre viral dans le surnageant en captant les particules pour les conduire à la dégradation par le protéasome⁵²⁸. LSP1, qui interagit avec la queue cytoplasmique de DC-SIGN pour diriger le VIH-1 vers la dégradation par le protéasome, peut aussi interagir avec la queue cytoplasmique de DC-SIGNR⁴⁷³. La présence de DC-SIGNR sur les cellules endothéliales des capillaires placentaires pourrait ainsi capturer le VIH-1 et le conduire vers la dégradation. L'expression de CMH I par les cellules endothéliales permet la présentation des peptides dégradés, et la dégradation du VIH-1 par DC-SIGNR pourrait participer à la mise en place d'une réponse immunitaire cytotoxique spécifique contre le virus^{554,555}. Cette réponse est d'ailleurs mise en place chez beaucoup d'enfants exposés *in utero* au VIH-1, bien que son efficacité à protéger l'enfant de l'infection fasse encore l'objet de controverse^{341,342,348-350}. Aussi, les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique co-expriment DC-SIGNR, CCR5 et CXCR4⁵⁵⁶. La diminution de la présence de DC-SIGNR en surface de la cellule endothéliale pourrait favoriser la liaison du VIH-1 à ses corécepteurs. L'interaction entre CCR5 ou CXCR4 et gp120 à la barrière hémato-encéphalique mène à un relâchement des jonctions serrées entre les cellules et augmente la migration des monocytes à travers la barrière^{557,558}. Cette infiltration est d'autant favorisée par l'augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) en réponse à l'exposition des cellules endothéliales à la protéine de l'enveloppe⁵⁵⁹. Aucune étude ne s'est à ce jour intéressée à la signalisation de DC-SIGNR. Comme pour son homologue

DC-SIGN exprimé par les DC^{8,9,491}, l'engagement de DC-SIGNR par gp120 pourrait aussi conduire à la modulation de la réponse immune par les cellules endothéliales. Suivant l'exposition IU au VIH-1 ou à ses produits, une diminution importante de la présence de DC-SIGNR dans les capillaires placentaires pourrait empêcher la dégradation du virus et favoriser l'interaction avec CCR5. Une perte d'intégrité de la barrière placentaire s'ensuivrait, et puisque durant la grossesse, des leucocytes maternels sont adhérents à la barrière placentaire⁵³⁹, le bris de celle-ci favoriserait le passage de cellules maternelles infectées du côté fœtal, propageant ainsi l'infection de la mère à l'enfant.

La figure 6 illustre schématiquement l'implication possible de DC-SIGNR dans la TME du VIH-1.

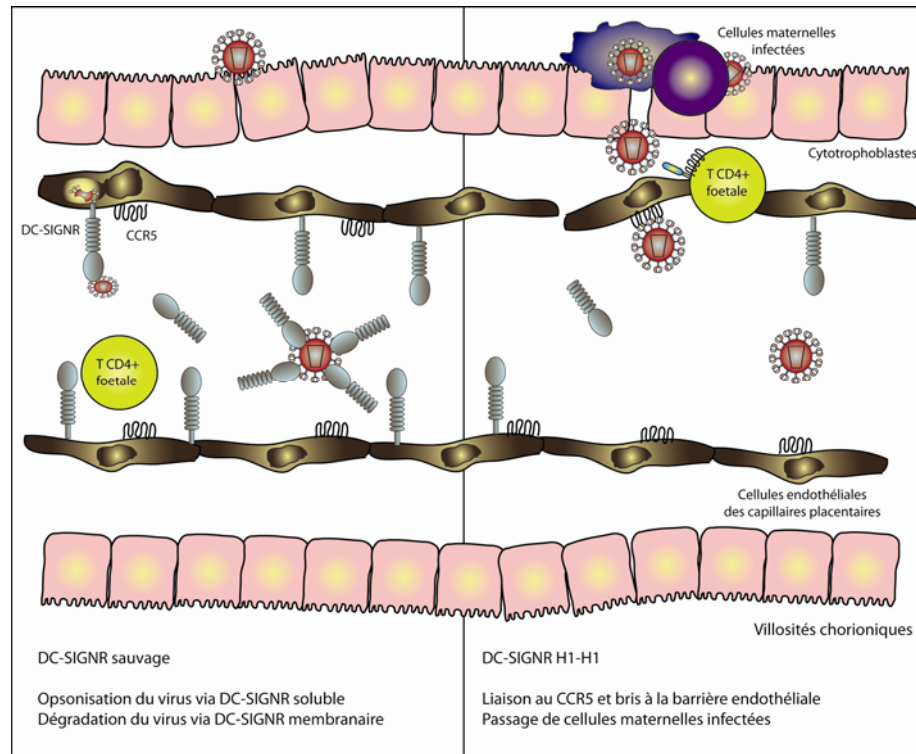


Figure 6: Implication de DC-SIGNR dans la TME du VIH-1.

Les enfants porteurs homozygotes de l'haplotype H1 de DC-SIGNR sont plus à risque de contracter le VIH-1 durant la grossesse et l'accouchement. La présence de la mutation du promoteur p-198AA et de la mutation de l'intron 2, Int2-180AA, conduit à une diminution totale de l'expression de DC-SIGNR et particulièrement des isoformes membranaires par les cellules endothéliales des capillaires placentaires. Cette diminution d'expression de DC-SIGNR pourrait favoriser la liaison entre gp120 et le CCR5 ce qui conduirait à la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale et au passage de cellules maternelles infectées et/ou à une diminution de l'opsonisation des particules virales par l'isoforme soluble et leur dégradation par l'isoforme membranaire.

Fait intéressant, les associations que nous avons observées entre la variation génétique de DC-SIGNR et la TME du VIH-1 ne se restreignent pas à la transmission IU. H1 et H3 sont aussi associés avec un risque augmenté de transmission IP, transmission qui se produit durant l'accouchement. Durant le passage dans le canal utérin, les muqueuses de l'enfant sont exposées aux fluides maternels contenant des particules virales². Or, l'expression de DC-SIGNR n'a été démontrée que sur les capillaires placentaires, et aucune

évidence ne montre sa présence dans les muqueuses intestinales⁴³¹. Il est donc envisageable que l'influence de DC-SIGNR sur la TME du VIH-1 se limite au placenta et que l'association observée entre la TME IP et la diminution de DC-SIGNR résulte de l'augmentation de la microtransfusion de cellules maternelles au niveau placentaire durant l'accouchement^{176,560}.

2. DC-SIGN et la TME du VIH-1

2.1 Association entre le polymorphisme génétique de DC-SIGN dans la population du Zimbabwe et la TME du VIH-1

Par la suite, dans le troisième article, nous nous sommes intéressés à décrire l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et la TME du VIH-1. Aussi retrouvé au niveau du placenta, cette fois sur les cellules de Hofbauer^{414,537,538}, DC-SIGN capte et transmet le VIH-1 aux cellules adjacentes⁵, et le polymorphisme qui affecte ses fonctions pourrait modifier le risque de TME IU du VIH-1. L'analyse génétique des variants de DC-SIGN dans la cohorte ZVITAMBO nous a permis d'explorer cette hypothèse.

Encore une fois, nous avons appliqué la stratégie par haplotypes. Présentant une moins grande diversité génétique que son homologue DC-SIGNR, le gène de DC-SIGN se distribue en 10 haplotypes majeurs dans la population du Zimbabwe. Parmi ces 10 haplotypes, les enfants porteurs de H4 et H6 sont plus à risque d'être infectés par voie de transmission IU du VIH-1 (OR : 5,27 P=0,0064 et OR : 2,44 P=0,0095) alors que H2 protège contre ce mode de transmission (OR : 0,34 P=0,0001). Les mutations uniques aux haplotypes H4 et H6 ne sont présentes que dans la population africaine (Article 1). H4 comprend la substitution d'une leucine pour une valine au codon 242 (L242V), et cette mutation est associée de façon indépendante de la charge virale maternelle à un risque augmenté de TME IU (OR: 12,0 P=0,0008), IP (OR: 21,0 P=0,036) et PP (OR: 11,6 P=0,019) du VIH-1. H6, pour sa part, contient trois changements d'acide aminé au niveau de l'exon 4 (une arginine au codon 198 pour une glutamine; R198Q, un acide glutamique au codon 214 pour un acide aspartique; E214D et une arginine au codon 221 pour une glutamine; R221Q). R198Q ne se retrouve que sur H6 et est transmis de pair avec une mutation substituant un C pour un A en position -201 du promoteur. Indépendamment de la charge virale maternelle, p-201A et R198Q augmentent aussi les chances de l'enfant d'acquérir le VIH-1 durant la grossesse (OR : 6,47 P=0,0007; OR : 7,08 P=0,0003), l'accouchement (OR : 8,84 P=0,046; OR : 11,1 P=0,020) et l'allaitement (OR : 5,81

P=0,030). H4 et H6 partagent une mutation du promoteur en position -336 substituant un T pour un C (p-336C). Présente chez 45 % des Zimbabwéens, cette mutation est connue pour affecter diverses infections dont le VIH-1, le virus de dengue et l'infection à *M. tuberculosis*^{505,507,513,520}. Chez l'enfant, cette mutation du promoteur augmente le risque d'acquérir le VIH-1 par voie IU (OR : 4,86 P=0,008), IP (OR : 7,37 P=0,048) et PP (OR : 4,15 P=0,039). Ainsi, non seulement le polymorphisme de DC-SIGN influence la transmission trans placentaire du VIH-1, mais il affecte aussi la transmission par les muqueuses. En définissant l'impact de ces mutations sur l'expression de DC-SIGN et son interaction avec le VIH-1, nous espérons mieux cerner son rôle dans la TME.

2.2 Impact fonctionnel des mutations de DC-SIGN associées à la TME du VIH-1

La mutation p-336C était déjà connue pour diminuer l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN *in vitro* en affectant un site de liaison du facteur de transcription Sp1^{505,506}. En répétant ces essais luciférase, nous avons observé que la mutation p-336C diminue bien l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN, mais de manière non significative dans notre essai. La mutation p-201A, dont l'analyse informatique prévoit qu'elle crée un site de liaison du facteur de transcription c-myc, affecte aussi à la baisse l'activité du promoteur de DC-SIGN. Lorsque transmise seule ou en combinaison avec p-336C, cette mutation diminue significativement par 3 fois l'activité du promoteur (P=0,0034). H2, associé à la protection contre l'infection, ne diffère de l'allèle sauvage, H1, que par deux mutations localisées dans le promoteur, p-939T et p-139C. En vérifiant si ces mutations affectent aussi l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN, nous avons constaté qu'aucun de ces variants n'avaient d'influence sur l'activité du promoteur. H1 présente aussi un effet protecteur sur la TME, mais sa fréquence dans la population zimbabwéenne est de moitié inférieure à celle de H2. Or, il est fort possible que notre étude, somme toute restreinte en nombre, n'ait pas eu la puissance nécessaire pour atteindre une protection significative pour H1 à l'instar de H2. Notons qu'en groupant ces haplotypes

pour l'analyse statistique, la puissance de l'effet de protection contre la transmission IU et IP s'en trouve augmentée ($P < 0,0001$ en IU et $P = 0,0129$ en IP).

Ainsi, p-336C et p-201A affectent bien à la baisse l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN mais qu'en est-il de son expression dans les cellules de Hofbauer? Pour répondre à cette question, nous avons procédé à l'isolation des cellules mononucléées à partir de placentas de troisième trimestre provenant d'enfants porteurs ou non de ces mutations. Tel que décrit précédemment, les cellules de Hofbauer DC-SIGN⁺ sont des macrophages placentaires qui expriment CD14, CD68, CD163, et HLA-DR, ce qui correspond au phénotype des macrophages alternativement activés, ou M2^{414,537,538}. Mieux décrits dans la décidue maternelle que dans le placenta, ces macrophages de type M2 se différencient en présence d'un environnement T_H2 et présentent des fonctions immunosuppressives leur permettant de participer à la tolérance materno-fœtale et à l'angiogénèse (Revu par^{424,561}). Les cellules de Hofbauer pourraient exercer des fonctions similaires au niveau du placenta^{537,538}. Pour comprendre l'effet des mutations du promoteur dans des cellules primaires, nous avons évalué l'expression de DC-SIGN sur les cellules de Hofbauer par cytométrie en flux. Deux sous-populations de macrophages CD14⁺ exprimant DC-SIGN ont été identifiées : une sous-population CD163⁺ et une sous-population CD163⁻. CD163 est un récepteur éboueur (« scavenger ») impliqué dans la résolution de l'inflammation et marque les macrophages tissulaires (Revu par⁵⁶²). La sous-population CD163⁻ exprime de plus faibles niveaux de DC-SIGN et de CD68 et présente un phénotype qui semble être moins mature avec des niveaux plus bas de HLA-DR que la sous-population CD163⁺, et ce, indépendamment de la présence des mutations du promoteur de DC-SIGN. En comparant l'expression totale de DC-SIGN dans ces deux sous-populations de macrophages placentaires, nous avons observé que la présence de la mutation du promoteur p-336C avec ou sans p-201A diminue l'expression de celui-ci par deux fois (CD163⁺ $P = 0,0091$ et CD163⁻ $P = 0,0305$). Ainsi, indépendamment du degré de maturation des sous-populations de macrophages placentaires, la présence de modifications génétiques dans le promoteur de DC-SIGN diminue l'activité transcriptionnelle *in vitro* et l'expression de la protéine dans ces sous-populations DC-SIGN⁺.

Toutefois, on remarque que chez les enfants nés de mères VIH-positives, donc exposés au VIH-1 ou à ses produits durant la grossesse, les mutations du promoteur préviennent la modulation de DC-SIGN, et les niveaux d'expression entre les porteurs des allèles sauvages et des allèles mutants deviennent similaires. Les macrophages placentaires de porteurs d'allèles sauvages exposés au VIH-1 ont des niveaux d'expression de DC-SIGN inférieurs à ceux des non exposés (population CD163⁺ (P=0,0402) et population CD163⁻ (P=0,0378). En contrepartie, chez les enfants porteurs des mutations du promoteur, l'exposition au VIH-1 n'a pas d'effet sur les niveaux d'expression de DC-SIGN. Bref, l'exposition IU des macrophages placentaires au VIH-1 module à la baisse l'expression de la protéine sauvage de DC-SIGN, alors que chez les macrophages dont l'expression de DC-SIGN est sous le contrôle d'un promoteur muté, le niveau d'expression, déjà faible, demeure inchangé. L'exposition IU de l'enfant au VIH-1 module de façon importante l'environnement immunitaire et la réponse adaptative de celui-ci, et ces altérations ont déjà été décrites dans la première partie de cet ouvrage (4. Les facteurs influençant la TME du VIH-1). Ainsi, l'exposition des macrophages placentaires au VIH-1 est susceptible de réguler l'expression de plusieurs facteurs cellulaires, dont DC-SIGN. Cette régulation pourrait même être induite directement via la signalisation de DC-SIGN puisque la stimulation de MDDC immatures via gp120 ou un anticorps mimant son effet conduit à la diminution des niveaux d'expression de DC-SIGN, empêche la maturation de la cellule et module l'environnement immunitaire^{8,490,491,563}. Une autre possibilité serait que l'interaction entre DC-SIGN et gp120 favorise l'internalisation du complexe DC-SIGN-VIH-1 pour conduire le virus vers les voies de dégradation et de présentation^{408,473,474}. Néanmoins, suivant la relâche de la particule virale dans les compartiments de bas pH, DC-SIGN est normalement recyclé en surface^{433,437}, ce qui atténue l'hypothèse de l'internalisation de DC-SIGN comme mécanisme expliquant la diminution de son expression suivant l'exposition au VIH-1.

Dans les haplotypes H4 et H6 associés au risque augmenté de TME du VIH-1, les mutations du promoteur p-336C et p-201A qui diminuent l'expression de DC-SIGN dans les macrophages placentaires sont aussi transmises avec des mutations codant pour un

changement d'acide aminé au niveau de l'exon 4. L'exon 4 code pour le corps de la protéine, est impliqué dans la tétramérisation du récepteur et coopère avec le CRD afin de conférer l'affinité pour son ligand⁴⁰⁵. Nous avons donc exploré l'impact des mutations de l'exon 4 sur l'affinité de liaison entre DC-SIGN et le VIH-1. Pour ce faire, nous avons procédé à un essai de capture virale en utilisant un modèle *in vitro* de lignées lymphoblastiques B Raji exprimant stablement DC-SIGN sous sa forme sauvage (H1), portant la mutation L242V (H4) ou les mutations R198Q, E214D et R221Q (H6). Ces expériences nous ont permis de démontrer que, à niveau d'expression comparable de DC-SIGN, les lignées exprimant les mutants de DC-SIGN présentent une meilleure capacité à capturer et à transmettre le VIH-1 aux lymphocytes T CD4⁺ activés que la lignée exprimant la protéine sauvage. Par conséquent, H4 et H6 portent des mutations qui, d'une part, diminuent l'expression de DC-SIGN dans les macrophages placentaires, et qui, d'autre part, augmentent l'affinité pour le VIH-1. Puisque DC-SIGN subit une forte pression de conservation⁴⁰², il n'est pas surprenant de voir apparaître au niveau génétique des mutations qui augmentent l'affinité de liaison aux pathogènes pour compenser l'effet des mutations qui diminuent l'expression. Or, durant l'exposition au VIH-1, l'expression de DC-SIGN est régulée à la baisse chez les porteurs de l'haplotype sauvage et rejoint les niveaux exprimés par les porteurs des haplotypes H4 et H6, contenant les mutations du promoteur et les changements d'acides aminés. Ainsi, l'effet des mutations de l'exon 4 n'est plus compensé par une diminution des niveaux d'expression, et la meilleure capacité à capturer et à transmettre le VIH-1 aux cellules adjacentes pourrait contribuer à disséminer le VIH-1 à travers le placenta, favorisant ainsi l'infection de l'enfant.

2.3 Rôle de DC-SIGN dans la TME du VIH-1

En somme, les haplotypes associés avec un risque augmenté de TME du VIH-1 conduisent à la diminution de l'expression de DC-SIGN par les macrophages placentaires et permettent de capturer et de transmettre le virus plus aisément que l'allèle sauvage de DC-SIGN, qui elle, rappelons-le, protège contre l'infection. Mais encore faut-il que la table soit mise pour favoriser ce phénomène. Peu de cellules T résident dans le placenta⁴¹⁴. Les

lymphocytes T CD8⁺ y sont apparemment plus fréquents que les T CD4⁺⁵⁴⁰ et la proximité entre les macrophages DC-SIGN⁺ et ces cibles potentielles n'a pas encore été démontrée dans le placenta. Toutefois, on retrouve bien des lymphocytes et des DC plasmacytoïdes et myéloïdes dans le placenta⁵⁶⁴, et ces populations, permissives au VIH-1 ou capables de capturer le virus, pourraient aussi contribuer à alimenter un foyer d'infection et à disséminer le VIH-1 chez l'enfant. Bref, trois questions concernant le rôle de DC-SIGN dans la transmission du VIH-1 demeurent : 1) Comment les cellules de Hofbauer DC-SIGN⁺ résidant dans le placenta arrivent-elles à rencontrer les cibles capables de répliquer le virus ou de propager l'infection chez l'enfant? 2) Pourquoi les allèles sauvages protègent-ils contre la TME si leur rôle se limite à *trans* infecter moins efficacement? 3) pourquoi H4 et H6 de l'enfant sont associés à la TME alors que chez la mère, ils ne le sont pas, et que la décidue maternelle contient une importante population de cellules DC-SIGN⁺ capables de transmettre plus efficacement le VIH-1 aux trophoblastes fœtales qui, eux, sont plus susceptibles à la transmission cellule-cellule^{143,146,147}? Ces réflexions nous mènent donc à envisager un rôle plus complexe de DC-SIGN dans la TME du VIH-1, agissant au-delà de sa capacité à *trans* infecter les cellules adjacentes.

Le placenta semble plutôt agir à titre d'organe réservoir, et la présence de séquences virales chez celui-ci a souvent été observée sans que cela ne résulte en une infection de l'enfant¹²⁸⁻¹³⁰. Les cellules de Hofbauer intègrent le génome du VIH-1^{128-130,164}, mais sont capables de restreindre la production de particules virales^{159-162,165}, et les trophoblastes, dont l'infection demeure sujet de controverse¹⁵²⁻¹⁵⁶, empêchent aussi la réplication du virus *in vitro*¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Cependant, on observe un cloisonnement de la réplication virale au niveau du placenta, et une charge virale placentaire élevée, similaire à celle de la mère, est associée à la transmission IU alors qu'une charge virale basse du placenta, jusqu'à 10 fois moins élevée que la charge virale maternelle, est observée dans les cas de non transmission²¹³. Alors comment expliquer que l'environnement placentaire devienne un bassin de réplication virale assez important pour que le VIH-1 infecte le fœtus?

La présence de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , IL-8 et IL-1 β exacerbe la réplication virale *in vitro* dans des explants de placenta et dans des trophoblastes primaires ou carcinogéniques³²⁸⁻³³¹. De même, TNF- α favorise la transcytose du VIH-1 à travers les trophoblastes, et son expression est en corrélation avec la quantité de transcrits viraux contenu dans le placenta^{145,316,319}. Ainsi, la présence de facteurs capables d'empêcher l'inflammation au niveau placentaire serait bénéfique. DC-SIGN est exprimé par des macrophages placentaires de phénotype M2^{537,538} normalement impliqués dans la résolution de l'inflammation et la tolérance (Revu par⁴²⁴) et pourrait s'avérer être un acteur considérable dans la fonction de ces cellules. D'ailleurs, la reconnaissance de molécules endogènes via DC-SIGN exprimé par les macrophages de tumeurs, du placenta et de la décidue maternelle permet l'induction d'un environnement immunorégulateur souligné par la sécrétion d'IL-10^{419,440-443} et suggère une implication de DC-SIGN dans la tolérance materno-fœtale. L'interaction entre divers pathogènes, dont le VIH-1, et DC-SIGN prévient la maturation des DC ainsi que la prolifération des lymphocytes T et favorise la génération de lymphocytes Treg^{8,9,488,490,492-497}. Or, l'expression d'IL-10 et la présence de Treg placentaires protègent contre la TME^{289,324,326,342}. DC-SIGN pourrait donc contribuer au maintien de l'environnement local de façon à prévenir l'infection productive des cellules du placenta, et par le fait même, l'infection de l'enfant.

Certains de nos résultats, encore fort préliminaires, appuient cette théorie. En caractérisant le phénotype des macrophages placentaires par cytométrie en flux, nous avons observé une différence dans les proportions des sous-populations de macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺ exprimant de hauts ou de faibles niveaux de CD16 entre les porteurs des mutations et les porteurs des allèles sauvages. La forte expression de CD16 sur les populations de monocytes du sang et les macrophages et DC des tissus se combine à un potentiel inflammatoire supérieur. Sources importantes de TNF- α , ces cellules présentent une capacité limitée à produire de l'IL-10, et leur expansion est observée dans des conditions d'inflammation chronique comme l'infection au VIH-1 (Revu par⁵⁶⁵). Nous avons observé que les enfants portant les mutations du promoteur de DC-SIGN voient la

fréquence de la sous-population de macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺ exprimant de hauts niveaux de CD16 (CD16^{hi}) augmenter significativement (P=0,0285) à l'exposition au VIH-1 alors que la sous-population exprimant de faibles niveaux de CD16 (CD16^{lo}) diminue (P=0,0315) (Figure annexe 1A). Chez les macrophages placentaires d'enfants portant les allèles sauvages de DC-SIGN, cette augmentation n'est pas significative et hautement dépendante d'un patient dont l'expression est largement supérieure aux autres (Figure annexe 1A). Fischer-Smith et ses collaborateurs ont aussi noté une relation inverse entre l'expansion des monocytes CD163⁺CD16⁺ et la diminution des CD163⁺CD16⁻, et cette expansion des cellules CD163⁺CD16⁺ corrèle avec la perte des lymphocytes T CD4⁺ et l'augmentation de la charge virale chez les patients infectés au VIH-1⁵⁶⁶. Pendant la différenciation des monocytes en DC, l'engagement de DC-SIGN favorise le développement de DC avec un potentiel tolérogénique, exprimant plus d'IL-10 et présentant une faible capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺⁵⁶³. L'altération du niveau d'expression de DC-SIGN causé par la présence de variation génétique pourrait contribuer à la modification du potentiel tolérogénique vers un potentiel plus inflammatoire chez ces sous-populations et jouer un rôle dans l'infection au VIH-1. D'ailleurs, durant l'infection *in vitro* au virus de dengue, les MDDC de patients porteurs de la mutation p-336C du promoteur de DC-SIGN expriment plus d'IL-12, d'IP-10 et de TNF- α que les cellules de patients porteurs de l'allèle sauvage⁵⁰⁷. Chez les macrophages placentaires, cette modification vers un environnement local pro-inflammatoire causée par des modifications génétiques de DC-SIGN pourrait se traduire par une augmentation de la transcytose et de la réplication virale au niveau du placenta^{145,319,328-331}.

Autre fait intéressant, Yearley et ses collaborateurs ont observé dans un modèle d'infection au VIS que la présence de macrophages CD163⁺ est augmentée dans les myocardiocytes exempts d'inflammation alors qu'elle diminue dans les cas de myocardite⁵⁰². La sous-population CD163⁺DC-SIGN⁺ demeure quant à elle en dehors des foyers d'inflammation, non infectée par le VIS, et son nombre élevé dans le myocarde corrèle inversement avec l'infiltration de lymphocytes T CD3⁺. Ces résultats suggèrent que la population de macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺ protège contre l'inflammation causée par la

présence du VIS au cœur⁵⁰³. Ainsi, en présence d'une population CD163⁺DC-SIGN⁺ dont l'expression de DC-SIGN est altérée par des mutations génétiques, la modification de l'environnement local pourrait aussi contribuer à l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau du placenta.

Nous avons observé la présence d'un pool de cellules CD14⁻CD3⁻CD56⁻CD19⁻DC-SIGN⁻CD68⁻ (CD14⁻) dont la fréquence diffère entre les enfants porteurs des mutations du promoteur et les enfants porteurs des allèles sauvages à l'exposition au VIH-1 (Figure annexe 1B). Lorsque nés de mères VIH-positives, les enfants porteurs des mutations du promoteur montrent une tendance vers une proportion plus élevée de ce pool CD14⁻ que les enfants porteurs des allèles sauvages (P=0,0997) (Figure annexe 1B). De plus, les populations qui la constituent diffèrent sur la base de l'expression de CD16 entre les porteurs des allèles sauvages et les porteurs des mutations du promoteur. Les enfants porteurs de mutations présentent une proportion plus importante de cellules CD16^{hi} (P=0,0659) alors que chez les enfants porteurs des allèles sauvages, c'est la population CD16⁻ qui domine (P=0,0031) (Figure annexe 1C). On remarque que les porteurs de l'allèle sauvage arrivent à moduler la fréquence des populations CD16^{hi} durant l'exposition IU au VIH-1, ce que les porteurs des allèles mutés n'arrivent pas à faire (Figure annexe 1C). Les porteurs de l'allèle sauvage augmentent leur proportion de cellules CD16⁻ (P=0,0555) tout en diminuant celle de CD16^{hi} (P=0,0117) à l'exposition au VIH-1 (WT; HIV Unexposed vs. HIV Exposed) tandis que les proportions demeurent inchangées chez les porteurs de mutations. Encore une fois, la plus forte présence de CD16 sur ces populations du placenta chez les porteurs de mutations suggère un environnement local plus inflammatoire. Par conséquent, il semble que les porteurs des allèles sauvages de DC-SIGN arrivent à réguler les proportions des populations à potentiel inflammatoire dans le placenta alors que les porteurs des variations génétiques n'y arrivent pas.

La caractérisation des ces populations du placenta demeure impératif afin de comprendre les tenants et aboutissants de ces bouleversements immunitaires. Dans les tumeurs colorectales, l'infiltration de cellules d'origine myéloïde CD16⁺CD45⁺CD11b⁺

CD11c⁺CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ corrèle avec l'infiltration de lymphocytes CD3⁺ et pourrait correspondre à une population de DC immatures pro-inflammatoires⁵⁶⁷. Il est possible que l'augmentation de la proportion des populations CD16^{hi} chez les porteurs de mutations coïncide à un infiltrat de ce genre dans le placenta des enfants. Les neutrophiles et les cellules NK expriment aussi CD16 et pourraient composer ces populations CD16^{hi}^{74,568}. Cependant, le fait qu'elles soient négatives pour CD56 exclut les sous-populations de NK les plus communes (CD56^{bright} et CD56^{dim}), mais comme l'infection au VIH-1 favorise l'émergence d'une sous-population dysfonctionnelle CD16⁺CD56⁻ chez l'adulte, les NK ne peuvent être complètement discriminées (Revu par⁷⁴). Ces résultats, bien qu'encore fort préliminaires, suggèrent que le potentiel tolérogénique des macrophages placentaires CD163⁺DC-SIGN⁺ est altéré par un défaut génétique d'expression de DC-SIGN, et se reflète dans une plus forte expression de CD16. Comme dans d'autres contextes, cette modification du potentiel inflammatoire pourrait corrélérer avec le recrutement de populations cibles du VIH-1 dans le placenta, d'origine myéloïde et lymphoïde. D'ailleurs, des expériences *in vitro* ont démontré que les monocytes/macrophages CD16⁺ favorisent de beaucoup la réplication virale dans les lymphocytes T comparativement aux monocytes/macrophages CD16⁻^{569,570}. L'interaction entre les macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺CD16^{hi} et ces cibles inflammatoires pourrait contribuer à l'augmentation de la réplication virale dans le compartiment placentaire.

De surcroît, nous avons observé que l'augmentation de la fréquence de la sous-population CD163⁺DC-SIGN⁺CD16^{hi} chez les porteurs des mutations de DC-SIGN ne dépend pas d'une présence accrue de monocytes du sang de cordon exprimant CD16 chez l'enfant. En explorant de façon préliminaire le potentiel de différenciation en macrophages chez deux enfants homozygotes, l'un pour l'allèle sauvage de DC-SIGN (p-336TT) et l'autre pour l'allèle mutant (p-336CC), nous avons remarqué que malgré que ce soit le patient p-336TT qui présente deux fois plus de monocytes CD14⁺CD16⁺ dans le sang de cordon (15,5 % pour p-336TT contre 6,88 % pour p-336CC), ce sont les macrophages placentaires du patient p-336CC qui exhibent la plus forte expression de CD16 (4 % p-336TT contre 7 % p-336CC, ΔMFI : 1790 contre 2787 respectivement) (Figure annexe 2A

et B). Aussi, après la génération *in vitro* de MDM à partir de ces mêmes populations monocytaires, le pool de monocytes du patient p-336TT engendre une proportion plus grande de macrophages CD163⁺DC-SIGN⁺ et CD163⁻DC-SIGN⁺ avec des niveaux d'expression deux fois plus importants de DC-SIGN que son homologue p-336CC (Figure annexe 2C). Ainsi, les différences notées au niveau des proportions des sous-populations de MDM DC-SIGN⁺ ou des cellules de Hofbauer CD16^{hi} ne dépendent pas de la dynamique des populations de monocytes peuplant le sang de cordon au départ, mais plutôt de leur capacité à se différencier qui n'est pas pareille entre le porteur de l'allèle sauvage et le porteur de l'allèle muté. La façon dont cette divergence de potentiel de différenciation se répercute dans la capacité des macrophages porteurs de l'allèle sauvage ou muté à répondre aux pathogènes reste à déterminer.

La figure 7 illustre le modèle proposé de l'implication de DC-SIGN dans la TME du VIH-1.

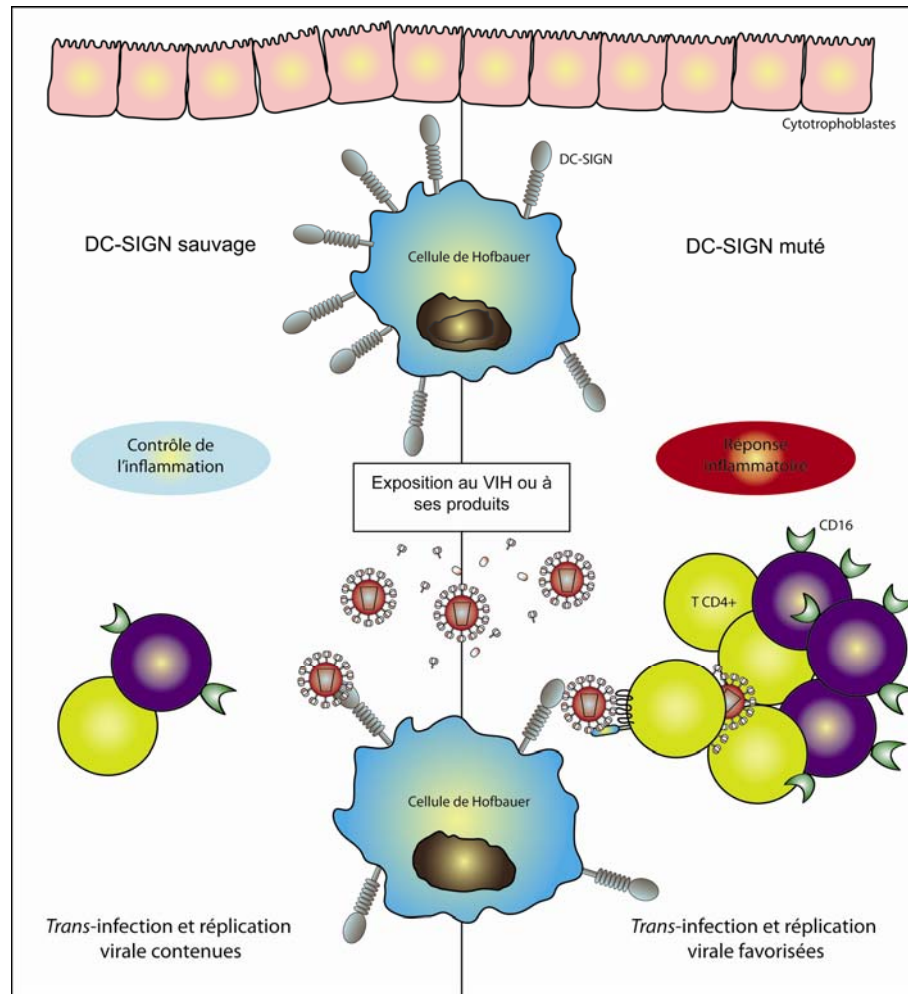


Figure 7: Implication de DC-SIGN dans la TME IU du VIH-1.

Dans les placentas d'enfants porteurs des allèles sauvages de DC-SIGN, un haut niveau d'expression de la protéine pourrait contribuer à contrôler l'inflammation engendrée par l'exposition au VIH-1 ou à ses produits. En revanche, chez les enfants porteurs des mutations associées avec un risque augmenté de TME du VIH-1 (p-336C, p-201A, R198Q et L242V), la faible expression de DC-SIGN, couplée à une meilleure capacité à *trans*-infecter les cibles du VIH-1 pourrait promouvoir un environnement pro-inflammatoire, marqué par l'infiltration de cibles et de cellules CD16⁺, propice à la réplication et à la dissémination du VIH-1 à travers le placenta et le fœtus.

Ceci dit, ces considérations apportent une clarification quant au rôle de DC-SIGN dans la transmission IU du VIH-1. Or, les mutations du promoteur (p-336C et p-201A) et

les changements d'acides aminés de l'exon 4 (R198Q et L242V) sont aussi associés de façon indépendante aux transmissions IP et PP du VIH-1. Alors que la transmission IP peut se faire via le placenta ou les muqueuses intestinales, la transmission PP ne dépend que des muqueuses de l'enfant³. Des populations de DC résident dans les muqueuses intestinales, expriment DC-SIGN^{543,544}, et sont capables de capturer et de transmettre le VIH-1 aux cellules T adjacentes⁵⁴⁵. Les variations génétiques de DC-SIGN pourraient donc affecter la barrière des muqueuses de la même manière que la barrière placentaire, d'une part, en favorisant la dissémination du VIH-1 dans les muqueuses de l'enfant et, d'autre part, en modifiant l'environnement tolérogénique vers un milieu inflammatoire propice à l'expansion d'un foyer de réplication virale.

3. La TME chez l'hôte naturel et les autres facteurs impliqués

L'infection naturelle au VIS, l'ancêtre du VIH, chez les primates non-humains est chose commune dans les régions Africaines. Plus de 40 espèces sont infectés par le VIS dans la nature et cette infection ne semble pas évoluer vers une immunodéficience mortelle comme chez l'humain⁵⁷¹. L'infection au VIS chez l'hôte naturelle résulte plutôt en une infection chronique, s'étendant sur la durée de vie du singe et dont la période d'incubation dépasse la vie de son hôte (Revu par⁷⁶). La transmission mère-enfant chez l'hôte naturel du VIS est quasi-absente. Malgré une charge virale plasmatique élevée chez la femelle, le virus ne semble pas traverser la barrière entre la mère et l'enfant, et l'infection via le lait maternel est très rare^{119,138,572,573}. S'ajoutant à cela, la charge virale chez les rares jeunes infectées demeurent jusqu'à 2 log plus basse que celle d'un adulte, n'altérant en rien, tout comme chez l'adulte, les fonctions immunitaires du jeune singe⁵⁷².

L'étude de la transmission mère-enfant du VIS s'est surtout limitée à la transmission PP pour des raisons de faisabilité expérimentale et peu d'études ont pu mettre en lumière les différences entre le modèle simien où la TME est fréquente et l'hôte naturel, comme le singe vert d'Afrique (AGM « African green monkey »), où la TME est virtuellement absente. Pandrea et ses collaborateurs ont observé que les lymphocytes T CD4⁺ des jeunes singes exprimaient des niveaux beaucoup plus faibles de CCR5 que les adultes, diminuant ainsi le nombre de cibles du virus chez le jeune¹³⁸. Néanmoins, la rareté des lymphocytes CD4⁺CCR5⁺ ne peut pas tout expliquer puisqu'il a été rapporté que ces jeunes singes pouvaient tout de même s'infecter via des morsures⁵⁷³. Chez l'humain, la variation de l'expression du corécepteur ne semble cependant pas avoir un impact majeur sur la TME. Bien que certains groupes aient associé des variations génétiques augmentant l'expression de CCR5 à un risque augmenté de TME^{286,289}, d'autres n'ont vu aucun effet^{283,288}. L'exposition à une plus forte quantité de particules virales libres par le lait maternel n'explique pas non plus que la TME PP du VIS soit rare chez l'hôte naturel puisque les charges virales du lait sont similaires entre les mères AGM et macaques rhesus ainsi que le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺ qu'il contient⁵⁷⁴. Une forte réponse

maternelle cellulaire dirigée contre le VIS dans le lait ne semble pas non plus conférer une protection puisqu'elle est d'amplitude similaire entre le modèle simien qui transmet et celui qui ne transmet pas⁵⁷⁴. En revanche, les IgG produit localement dans le lait maternel des AGM semblent être plus efficaces à neutraliser le virus que ceux des macaques⁵⁷⁴.

La longue coévolution entre le VIS et son hôte naturel a laissé des traces génétiques sur celui-ci. Chez l'adulte, on remarque aussi une diminution de la présence du récepteur et corécepteurs du VIS (Revu par⁷⁶). Une délétion empêchant la transcription du CCR5 a été retrouvé chez une majorité des individus de la population de red-capped mangabeys⁵⁷⁵, alors que les populations du sang périphérique et du lait maternel de l'hôte naturel présentent une large proportion de lymphocytes CD3⁺ n'exprimant ni le CD4 ni le CD8 et ayant conservé des fonctions de cellules mémoires^{76,574,576,577}. De plus, des niveaux réduits d'expression du CCR5 sur les CD4⁺ ont été remarqués chez l'hôte naturel^{138,141,578}. D'autres études ont rapporté des différences de fonctionnalité chez les pDC entre l'hôte naturel et l'hôte qui progresse. L'hôte naturel présente une diminution de sécrétion de l'INF- α par les pDC en réponse aux stimuli des TLR7 et TLR9, une réduction du recrutement de ceux-ci aux ganglions lymphatiques et une réponse inflammatoire moins importante⁵⁷⁹⁻⁵⁸¹. Le fait que les pDC sécrètent des taux d'IFN- α diminués en réponse à une stimulation chronique par le VIS permettrait d'éviter de nourrir l'activation chronique et la dysfonction du système immunitaire qui contribue à la progression vers le SIDA (Revu par⁷⁶). Le maintien de l'intégrité des muqueuses intestinales chez l'hôte naturel semble être un facteur important dans la conservation de l'équilibre immunitaire^{40,582}. Les niveaux normaux d'activation immunitaire, d'apoptose et de prolifération cellulaire, et l'établissement d'un milieu anti-inflammatoire permettraient la restauration des CD4⁺ et la préservation des fonctions immunitaires⁵⁸³. L'équilibre entre les populations de Treg et T_H17 semble jouer un rôle important dans la pathogénèse. La perte de cet équilibre a été associée avec une activation systémique soutenue^{584,585}. De plus, chez l'AGM, l'émergence rapide des Treg a été observée durant la phase aiguë de l'infection alors que cette réponse se présente avec un délai chez le macaque, l'hôte progressant vers la maladie⁵⁸³. L'avènement immédiat de ce

milieu immunorégulateur, marqué par une augmentation d'IL-10 et de TGF- β , contribuerait à atténuer l'activation immunitaire durant l'infection au VIS^{583,586}.

Il semble donc que l'hôte naturel du VIS, contrairement à l'humain, soit capable de contenir l'activation immunitaire qui autrement, contribue au dysfonctionnement du système immunitaire, conduisant à la progression vers la maladie. Cet état de contrôle immunitaire et la proportion diminuée de cibles exprimant le récepteur et le corécepteur du VIS se solde en une absence de TME chez le singe, et ce malgré une charge virale élevée. Or, chez l'humain, les paramètres cliniques associés avec une perte d'intégrité de la barrière des muqueuses et une progression vers le SIDA, c'est-à-dire une charge virale élevée, un compte CD4⁺ bas et l'avancement de la maladie chez la mère, sont tous des facteurs qui favorisent la TME du VIH-1 (Revu par²). Il est donc raisonnable de croire qu'un bon contrôle maternel de l'activation immunitaire puisse aussi contribuer à maintenir l'intégrité de la barrière placentaire. Mais dans les cas où la mère peine à contrôler son dysfonctionnement immunitaire et sa charge virale, le salut de l'enfant repose sur sa capacité à éviter les assauts virologiques et immunologiques en provenance du côté maternel de la barrière materno-fœtale ou du lait maternel. L'exposition placentaire à VHC conduit au recrutement de cellules NK, NKT et T $\gamma\delta$ susceptibles de participer à la réponse antivirale au placenta⁵⁶⁴. Différentes populations lymphocytaires et monocytaires, comme les mDC et les pDC, se retrouvent au niveau du placenta⁵⁶⁴ et sont à même d'influencer l'environnement immunitaire de celui-ci. Les cellules de Hofbauer DC-SIGN⁺ ne sont donc pas les seules candidates pour médier cet effet. D'ailleurs, la réponse NK spécifique chez l'enfant et certaines combinaison d'allèles de KIR et HLA ont été associées avec une protection contre la TME du VIH-1^{267,361}. D'autres récepteurs de l'immunité inné, tel que TLR9, sont aussi susceptibles de moduler la réponse placentaire face à la présence du VIH-1³⁰⁸. La mise en place efficace d'une réponse antivirale à la barrière materno-fœtale pourrait aussi contribuer à l'émergence d'une immunité adaptative chez l'enfant. Le fait que certains allèles du CMH de classe I et II protègent l'enfant contre l'acquisition du VIH-1 témoigne de l'importance de la mise en place d'une réponse antivirale spécifique²⁶⁹⁻²⁷¹. De même, le jeu immunitaire entre la mère et l'enfant à la barrière materno-fœtale permet

de minimiser l'assaut virologique. HLA-G, qui influence la lyse des cellules fœtales par les NK maternelles, ou la discordance des HLA entre la mère et l'enfant permet d'éviter le passage transplacentaire de cellules maternelles infectées ou de variants d'échappement^{263-265,274-277}.

Non seulement la réponse immunitaire peut avoir une influence sur la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant, mais les facteurs impliqués dans l'attachement ou l'internalisation du virus modulent également le risque d'infection. DC-SIGN et DC-SIGNR ne sont donc pas les seuls facteurs capables de médier cet effet. Les protéoglycans de sulfate d'héparane sont exprimés par les trophoblastes et interagissent avec les particules virales à l'interface mère-enfant pour conduire à l'internalisation et possiblement à l'infection des trophoblastes¹⁴⁸. Une étude d'association du génome complet dans une cohorte du Malawi à identifier des SNP dans les gènes de l'héparane sulfate HS3ST3A1 et HS3ST3B1²⁹⁹. La présence d'un grand nombre de facteurs d'attachement du VIH-1 à la barrière placentaire pourrait permettre de séquestrer les particules virales au placenta et de limiter par le fait même l'infection des cibles. Le maintien de l'équilibre placentaire et le contrôle de la réplication virale à l'interface entre la mère et l'enfant fait donc appel à un grand nombre de facteurs de l'immunité innée et adaptative de l'enfant, tous susceptibles d'avoir une influence sur l'issue de l'infection.

Conclusion

L'objectif de cette étude était de déterminer l'association entre le polymorphisme de DC-SIGN et son homologue DC-SIGNR et la TME IU, IP et PP du VIH-1 dans la population du Zimbabwe.

Par une approche visant à reconstruire les haplotypes de DC-SIGN et DC-SIGNR dans la population du Zimbabwe, nous avons d'abord démontré que, chez l'enfant, les haplotypes H1 et H3 de DC-SIGNR sont associés à un risque augmenté de TME IU et IP du VIH-1. Ces haplotypes portent la mutation du promoteur, p-198A, ainsi que la mutation de l'intron 2, int2-180A. La combinaison de ces deux mutations diminue les niveaux d'expression des transcrits d'ARNm de DC-SIGNR dans le placenta et modifie le répertoire d'isoformes vers une plus faible proportion d'isoformes membranaires.

Par la suite, deux haplotypes de DC-SIGN, H4 et H6, sont aussi associés à un risque augmenté de TME IU du VIH-1. Ces haplotypes contiennent des mutations du promoteur, p-336C et p-201A, qui diminuent l'activité transcriptionnelle du promoteur de DC-SIGN *in vitro* et altèrent l'expression de la protéine dans les macrophages placentaires. De plus, ces mutations sont transmises avec des mutations codant pour un changement d'acides aminés au niveau de l'exon 4 qui modifient l'affinité de liaison pour le VIH-1 et augmentent la capacité à capturer et à transmettre le virus aux lymphocytes T. Exposés au VIH-1 durant la grossesse, les macrophages placentaires d'enfants portant les allèles sauvages de DC-SIGN modulent l'expression de celui-ci à la baisse alors que, déjà basse, elle demeure inchangée chez les porteurs des allèles mutés. À expression égale durant l'exposition au VIH-1, la meilleure capacité à capturer et à transmettre le VIH-1 de H4 et H6 pourrait favoriser la dissémination du virus au niveau placentaire. Ces mutations n'ont pas seulement un impact au niveau du placenta, mais jouent aussi un rôle dans les muqueuses intestinales de l'enfant puisqu'elles influencent la transmission IP et PP du VIH-1.

En définitive, nous avons démontré pour la première fois que les mutations altérant l'expression de DC-SIGN et DC-SIGNR dans le placenta ou l'interaction avec le VIH-1 jouent un rôle important dans la susceptibilité de l'enfant à acquérir le virus durant sa vie intra-utérine, mais aussi au moment de l'accouchement, et ce, de façon indépendante de

l'un et l'autre. Nous proposons de nouveaux mécanismes impliquant ces lectines dans la TME du VIH-1. Nos résultats suggèrent que DC-SIGN et DC-SIGNR jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière placentaire. En favorisant la dégradation du virus et en empêchant l'interaction avec CCR5, DC-SIGNR permettrait de maintenir l'intégrité de la barrière endothéliale. DC-SIGN, quant à lui, serait impliqué de deux manières dans la TME du VIH-1. D'une part, les mutations de l'exon 4 qui augmentent la capture et la transmission du VIH-1 pourraient participer à la dissémination du virus à travers le placenta, et, d'autre part, les mutations du promoteur altérant les niveaux d'expression de DC-SIGN pourraient contribuer à diminuer le potentiel tolérogénique des macrophages placentaires de façon à favoriser un environnement inflammatoire amplifiant la réplication virale au placenta. De plus, les mutations de DC-SIGN influencent aussi l'acquisition du VIH-1 par l'allaitement, et donc à travers les muqueuses intestinales de l'enfant. Notre étude a permis de mettre en lumière de nouveaux acteurs impliqués dans la TME du VIH-1 et d'identifier des mécanismes qui pourraient aussi opérer pour d'autres pathogènes capables d'interagir avec DC-SIGN et DC-SIGNR et transmis entre la mère et l'enfant.

Perspectives

Pour la suite de ce projet, il serait évidemment fort intéressant de caractériser le rôle de DC-SIGN dans le maintien de l'environnement immunitaire au niveau du placenta et de comprendre comment les mutations qui modifient son expression peuvent briser cet équilibre et favoriser l'infiltration de cellules inflammatoires.

Pour ce faire, il faudrait d'abord étudier de quelle manière les mutations de DC-SIGN modulent l'environnement immunitaire placentaire. L'utilisation du modèle de macrophages dérivés des monocytes du sang de cordon et stimulés par gp120, le ligand de DC-SIGN, permettrait de voir s'il y a une différence d'expression de cytokines pro- ou anti-inflammatoires entre les MDM d'enfants porteurs ou non des allèles mutés. Par cytométrie en flux, nous pourrions procéder à la détection intracellulaire de TNF- α et d'IL-10 dans les macrophages DC-SIGN⁺CD163⁺. Aussi, l'utilisation de kits commerciaux permettant de quantifier plusieurs cytokines et chimiokines à la fois dans le surnageant de culture conduirait à l'identification du profil pro- ou anti-inflammatoire sécrété par les cellules portant ou non les variations génétiques de DC-SIGN. Enfin, nous pourrions définir si cet environnement favorise la production virale dans les macrophages placentaires ou dans une co-culture avec les lymphocytes T CD4⁺ activés d'un même donneur. Un ELISA p24 commercial nous permettrait de quantifier le nombre de particules virales dans le surnageant entre ces différentes conditions.

Par la suite, mieux caractériser les sous-populations du placenta dans la cohorte d'échantillons du Bénin serait tout à propos. Deux approches complémentaires doivent être envisagées. D'abord, par cytométrie en flux, il faudrait définir la fréquence des populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs afin de déterminer comment l'équilibre entre les cibles potentielles du VIH-1 et les populations de lymphocytes protégeant de la TME est maintenu chez les individus porteurs ou non des allèles mutés et exposés au VIH-1 durant la grossesse. Aussi, un autre cocktail d'anticorps pourrait permettre de caractériser les populations CD14⁻CD16⁺ afin de définir si elles sont d'origine myéloïde ou si elles sont

composées en majorité de neutrophiles ou de cellules NK. Par la suite, l'infiltration placentaire pourrait être confirmée par immunohistochimie du tissu de placenta et le nombre de cellules infiltrantes, et la nature des ces populations pourrait être comparée entre les porteurs des allèles sauvages de DC-SIGN et les porteurs des allèles mutés. De plus, l'étude des populations infiltrantes dans le tissu lui-même permettrait de nous assurer que les macrophages DC-SIGN⁺ peuvent bien se localiser à proximité de lymphocytes dans le placenta, soutenant l'hypothèse du transfert viral aux lymphocytes dans cet organe.

Pour identifier par quels mécanismes ces mutations affectent les fonctions de DC-SIGN, il serait intéressant de réaliser une étude plus approfondie portant sur l'impact de ces mutations sur l'interaction avec les facteurs de transcription, le trafic intracellulaire, la structure et la signalisation de la protéine. L'analyse bioinformatique prévoit que la mutation du promoteur p-201A crée un site de liaison c-myc (Article 1 et 3). Des expériences de « electrophoretic mobility shift assays » ou EMSA permettraient de vérifier cette prédiction. L'incubation de courts fragments d'ADN contenant la séquence sauvage et la séquence mutée p-201 du promoteur de DC-SIGN avec des extraits nucléaires de cellules (MDM ou lignées cellulaires telles que THP1 ou HeLa), en compétition avec des sondes liant c-Myc, permettrait d'identifier si cette mutation affecte bien un site de liaison de ce facteur de transcription⁵⁰⁵. L'exon 4 de DC-SIGN, où nous avons identifié 4 mutations résultant en un changement d'acide aminé, est impliqué dans la tétramérisation du récepteur et participe à conférer l'affinité pour son ligand⁴⁰⁵. Par l'immunobuvardage de DC-SIGN sur un gel de protéines non-dénaturant, nous avons déjà étudié l'impact des mutations de l'exon 4 sur les capacités de DC-SIGN à tétramériser et à multimériser⁴⁰⁵. La migration des lysats cellulaires des lignées Raji, dont l'expression de surface de DC-SIGN est équivalente entre le transfectant sauvage et les transfectants portant les mutations de l'exon 4, nous a permis de constater que les mutants exhibant une plus grande affinité de liaison pour le VIH-1 présentent aussi une meilleure capacité à former des multimères et une capacité moindre ou équivalente à former des tétramères (Figure Annexe 3A). Cette différence de capacité à multimériser pourrait expliquer que l'affinité pour le VIH-1 diffère entre les mutants et la protéine sauvage. Il serait intéressant de vérifier l'effet des mutations de

l'exon 4 sur la capacité à multimériser par une technique plus sensible, soit l'ultracentrifugation par équilibre de sédimentation (« sedimentation equilibrium »)⁵⁸⁷. Il est aussi intéressant de constater que pour générer une expression de surface équivalente, H4 et H6 doivent exprimer 2 fois plus de protéines totales (Figure annexe 3A, Conditions réduites). Il semble donc qu'il y ait une rétention intracellulaire des protéines mutantes ce qui suggère une différence de trafic intracellulaire. Pour ajouter à cela, le profil de glycosylation de la protéine sauvage diffère de celui de H4 et H6 (Figure annexe 3B). La glycosylation des protéines est une modification post-traductionnelle qui influence la fonction de celle-ci. La glycosylation alternative permet de générer diverses glycoprotéines présentant des fonctions différentes (Revu par⁵⁸⁸). Bien qu'encore fort préliminaires, ces résultats laissent penser que les mutations de DC-SIGN, associées à un risque augmenté de TME, puissent non seulement influencer l'expression de cette protéine en modifiant l'activité du promoteur, mais aussi sa capacité à former des multimères, son trafic intracellulaire et possiblement, sa fonction. Cependant, ces résultats sont loin d'être des plus convaincants et il est impératif qu'ils soient contre-vérifiés dans d'autres modèles cellulaires, de lignées monocytaires comme THP1 et de cellules primaires (MDM), puisque le modèle Raji demeure controversé⁴⁶³ et que la fonction de DC-SIGN peut varier d'un modèle cellulaire à l'autre⁴⁵⁹.

Ces diverses expériences favoriseraient une meilleure compréhension globale de l'implication de DC-SIGN dans la TME du VIH-1 et nous permettraient de concevoir comment les variations génétiques de cette molécule augmentent le risque de TME alors que les allèles sauvages protègent l'enfant. Elles nous permettraient aussi de confirmer par quels mécanismes ces mutations altèrent l'équilibre immunitaire au niveau du placenta et encouragent l'infiltration de cibles du VIH-1 ou de cellules causant des dommages à la barrière tout en exacerbant la réplication et la dissémination du virus.

En ce qui concerne DC-SIGNR, nous proposons que la diminution de sa forme membranaire puisse altérer l'intégrité de la barrière placentaire en favorisant la liaison au CCR5. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait utiliser un modèle *in vitro* de cellules

endothéliales exprimant DC-SIGNR et CCR5 afin de vérifier comment l'interaction entre le VIH-1 et CCR5 ou le VIH-1 et DC-SIGNR influence la perméabilité des cellules endothéliales. En bloquant DC-SIGNR avec un anticorps, nous pourrions évaluer si l'absence de sa forme membranaire modifie l'interaction entre le VIH-1 et CCR5 et conduit à un relâchement des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. En comparant la modification de la résistance électrique transendothéliale entre les différentes conditions, nous pourrions vérifier si la présence de DC-SIGNR modifie la perte d'intégrité de l'endothélium engendrée par l'interaction entre CCR5 et le VIH-1. L'impact sur la migration de monocytes pourrait aussi être évalué en co-cultivant des lignées de cellules endothéliales en monocouche et des monocytes isolés de donneurs sains dans un système de culture à deux chambres. La migration des monocytes à travers la couche de cellules endothéliales en présence ou non d'un anticorps bloquant de DC-SIGNR pourrait être mesurée en comptant le nombre de monocytes ayant migré dans la chambre supérieure après l'activation des cellules par gp120. Ces diverses expériences pourraient être conduites à partir de lignées de cellules endothéliales provenant du cordon ombilical comme les HUVEC (« human umbilical vein endothelial cells »), modèle largement utilisé pour étudier les fonctions des cellules endothéliales du placenta. L'utilisation de cellules primaires dans ce cas risque fort d'être difficile, et les échantillons rapportés du Bénin ne nous permettraient pas de mettre les cellules endothéliales en culture. Cependant, nous pourrions vérifier comment l'exposition de l'enfant au VIH-1 influence l'expression des transcrits d'ARNm des isoformes solubles et membranaires de DC-SIGNR dans les placentas d'enfants porteurs ou non des haplotypes H1, et ensuite vérifier par immunobuvardage si une différence au niveau de l'ARNm se traduit bien en différence d'expression de la protéine.

Bien sûr, d'autres facteurs, encore insoupçonnés à ce jour, sont à même d'avoir une influence importante sur la TME du VIH-1 et leur identification permettrait de mieux comprendre les corrélats de susceptibilité/protection de l'infection au VIH-1. Quels facteurs régissent le recrutement de cibles potentielles du VIH-1 au niveau du placenta? Comment une réponse innée efficace arrive-t-elle à contenir la réplication du virus et quelles

populations cellulaires sont impliquées? Ces diverses questions méritent plus amples considérations. Toutefois, l'étude de ces aspects mécanistiques de la TME du VIH-1 demeure limitée. L'utilisation systématique d'un protocole de traitement aux ARV pour prévenir la TME du VIH-1 a raréfié les cas d'infections IU, IP et PP, et a rendu l'accès à des cohortes de nouveau-nés infectés et à des échantillons de nouveau-nés non-exposés au ARV quasi impossible. De plus, le modèle de singe, fort coûteux, ne permet pas de rassembler assez d'individus pour permettre l'étude des mécanismes de transmission IU et IP, et seule l'exposition orale à de forte dose de virus pour mimer l'infection PP se pratique¹¹⁹. Le macaque rhésus peut servir de modèle pour étudier la dissémination virale aux organes lymphoïdes chez le nouveau-né après l'exposition des muqueuses buccales et intestinales au VIS^{589,590}, mais il ne se prête pas à l'étude de la transmission IU et IP. Étudier l'histoire naturelle de la TME du VIH-1 est donc devenu fort difficile et le recrutement de cohortes comme ZVITAMBO n'est plus envisageable à ce jour pour des considérations éthiques. Certes, l'étude des enfants exposés et non-exposés au VIH-1 permet de constater l'effet du VIH-1 sur le système immunitaire de l'enfant mais ne permet pas d'identifier les corrélats de protection avec certitude, puisqu'il devient impossible de discriminer les enfants protégés de façon naturelle de ceux protégés par les ARV.

Mais encore beaucoup reste à faire pour comprendre l'immunité à l'interface mère-enfant, et mieux cerner comment l'exposition placentaire aux pathogènes comme le VIH-1 module la réponse de l'enfant serait un acquis dans la compréhension des mécanismes de TME. À ce jour, seulement deux études, incluant la nôtre, ont tenté de caractériser les populations cellulaires présentes dans le placenta et l'impact d'une exposition aux pathogènes dans cet organe précis⁵⁶⁴. Beaucoup d'études se sont intéressées au sang de cordon, beaucoup plus accessible que le placenta lui-même, mais les environnements fœtaux et placentaires en sont deux distincts²¹³. Il serait donc important, dans l'avenir, de se concentrer à mieux comprendre les facteurs impliqués dans le maintien de l'équilibre immunitaire à l'exposition aux pathogènes dans le placenta. Une approche expérimentale, permettant de comparer le transcriptome par microarray entre les placentas exposés au VIH-1 et ceux non-exposés, pourrait nous mettre sur la piste des populations cellulaires

responsables de répondre en première ligne dans le placenta et potentiellement importantes dans le maintien de l'équilibre immunitaire. Par la suite, mieux caractériser leur phénotype par cytométrie en flux et leur fonction par diverses approches de stimulation *in vitro* aideront à remplir le trou des connaissances dans ce domaine.

À ce jour, une seule étude a procédé à l'utilisation d'une méthode à large déploiement pour identifier des nouveaux facteurs impliqués dans la TME IU et IP du VIH-1 dans une cohorte du Malawi²⁹⁹. Cependant, l'accès limité à un grand nombre de patients n'a pu offrir la puissance nécessaire pour obtenir une association «genome wide». Le nombre restreint d'échantillons de la cohorte ZVITAMBO nous conduirait probablement au même échec. Mais étudier l'association génétique avec d'autres facteurs dans cette même cohorte pourrait être fort utile. En étudiant l'association entre la TME IU, IP et PP du VIH-1 et le polymorphisme de TLR9, MBL2, HS3ST3A1, KIR, IL-8, IP-10 et CCR5, des facteurs déjà associés à la TME où d'intérêts selon l'étude au Malawi, nous aurions la possibilité de comparer l'implication relative de chacun de ces facteurs dans une même cohorte de TME, déjà bien caractérisée, et dont nous avons l'histoire naturelle de la transmission. Enfin, ces futures études, visant à mieux caractériser les facteurs susceptibles de médier une forte résistance innée à l'interface mère-enfant en relation avec la capacité du fœtus à répondre à l'exposition au VIH-1, permettront fort certainement de mieux cerner ce qui protège certains enfants de l'infection au VIH-1 alors que d'autres n'ont pas la même chance.

Bibliographie

1. UNAIDS. Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. *WHO/UNAIDS* (2010).
2. Kourtis, A. P. & Bulterys, M. Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clin Perinatol.* 37, 721-37 (2010).
3. Kourtis, A. P., Lee, F. K., Abrams, E. J., Jamieson, D. J., & Bulterys, M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect.Dis.* 6, 726-732 (2006).
4. Bryson, Y. J., Luzuriaga, K., Sullivan, J. L., & Wara, D. W. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1. *N.Engl.J Med.* 327, 1246-1247 (1992).
5. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597 (2000).
6. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., & Littman, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* 16, 135-144 (2002).
7. Gurney, K. B. *et al.* Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN⁺ cells in human rectal mucosa. *J Virol.* 79, 5762-5773 (2005).
8. Hodges, A. *et al.* Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat.Immunol.* 8, 569-577 (2007).
9. Gringhuis, S. I. *et al.* C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 26, 605-616 (2007).
10. Freed, E. O. & Maritn, M. A. HIVs and their replication in *Filed's Virology*, 4 ed. Lippincott Williams and Wilkins, (2001).
11. Tebit, D. M. & Arts, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect.Dis.* 11, 45-56 (2011).
12. Keele, B. F. *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313, 523-526 (2006).

13. Lemey, P. *et al.* Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6588-6592 (2003).
14. Mariani, S. A., Vicenzi, E., & Poli, G. Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4(+) T lymphocytes. *J Transl.Med.* 9 Suppl 1, S8 (2011).
15. Gomez, C. & Hope, T. J. The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol.* 7, 621-626 (2005).
16. Gorry, P. R. & Ancuta, P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr.HIV./AIDS Rep.* 8, 45-53 (2011).
17. Cicala, C., Arthos, J., & Fauci, A. S. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *J Transl.Med.* 9 Suppl 1, S2 (2011).
18. Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Perez-Olmeda, M., & Alcami, J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat.Rev Microbiol.* 7, 798-812 (2009).
19. Simon, V., Ho, D. D., & Abdool, K. Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 368, 489-504 (2006).
20. Coiras, M., Lopez-Huertas, M. R., Sanchez, d. C., Mateos, E., & Alcami, J. Dual role of host cell factors in HIV-1 replication: restriction and enhancement of the viral cycle. *AIDS Rev* 12, 103-112 (2010).
21. Bieniasz, P. D. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host.Microbe* 5, 550-558 (2009).
22. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat.Rev Immunol.* 10, 11-23 (2010).
23. Haase, A. T. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu.Rev Med.* 62, 127-139 (2011).
24. Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J., & Haynes, B. F. Acute HIV-1 Infection. *N.Engl.J Med.* 364, 1943-1954 (2011).
25. Keele, B. F. *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7552-7557 (2008).
26. Haaland, R. E. *et al.* Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS.Pathog.* 5, e1000274 (2009).
27. Sagar, M. *et al.* Selection of HIV variants with signature genotypic characteristics during heterosexual transmission. *J Infect.Dis.* 199, 580-589 (2009).

28. Klatt, N. R. & Brenchley, J. M. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 5, 135-140 (2010).
29. Li, Q. *et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 434, 1148-1152 (2005).
30. Gasper-Smith, N. *et al.* Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J Virol.* 82, 7700-7710 (2008).
31. Ancuta, P., Monteiro, P., & Sekaly, R. P. Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 5, 158-165 (2010).
32. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp.Med.* 200, 749-759 (2004).
33. Arthos, J. *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat.Immunol.* 9, 301-309 (2008).
34. Gosselin, A. *et al.* Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol.* 184, 1604-1616 (2010).
35. Brenchley, J. M. & Douek, D. C. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 3, 356-361 (2008).
36. McGowan, I. *et al.* Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 37, 1228-1236 (2004).
37. De Luca, A. *et al.* IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal.Immunol.* 3, 361-373 (2010).
38. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., & Reinecker, H. C. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 118, 1001-1011 (2000).
39. Smith, A. J., Schacker, T. W., Reilly, C. S., & Haase, A. T. A role for syndecan-1 and claudin-2 in microbial translocation during HIV-1 infection. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 55, 306-315 (2010).
40. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat.Med.* 12, 1365-1371 (2006).
41. Streeck, H. *et al.* Epithelial adhesion molecules can inhibit HIV-1-specific CD8+ T-cell functions. *Blood* 117, 5112-5122 (2011).

42. Hazenberg, M. D. *et al.* Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *Aids* 17, 1881-1888 (2003).
43. Ganesan, A. *et al.* Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. *J Infect.Dis.* 201, 272-284 (2010).
44. Mattapallil, J. J. *et al.* Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434, 1093-1097 (2005).
45. Chun, T. W. *et al.* Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8869-8873 (1998).
46. Schacker, T. The role of secondary lymphatic tissue in immune deficiency of HIV infection. *Aids* 22 Suppl 3, S13-S18 (2008).
47. Sauce, D. *et al.* HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* 117, 5142-5151 (2011).
48. Alter, G. *et al.* Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J Infect.Dis.* 195, 1452-1460 (2007).
49. Bonaparte, M. I. & Barker, E. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood* 104, 2087-2094 (2004).
50. Chang, J. J. & Altfeld, M. Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *J Infect.Dis.* 202 Suppl 2, S297-S301 (2010).
51. Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., & Bhardwaj, N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat.Rev Immunol.* 11, 176-186 (2011).
52. Martin, M. P. *et al.* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat.Genet.* 31, 429-434 (2002).
53. Martin, M. P. *et al.* Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat.Genet.* 39, 733-740 (2007).
54. O'Connell, K. A., Bailey, J. R., & Blankson, J. N. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci* 30, 631-637 (2009).
55. Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 107, 4781-4789 (2006).

56. Hersperger, A. R. *et al.* Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS.Pathog.* 6, e1000917 (2010).
57. Haase, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464, 217-223 (2010).
58. Pereyra, F. *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330, 1551-1557 (2010).
59. Ford, E. S., Puroenen, C. E., & Sereti, I. Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 4, 206-214 (2009).
60. Andersson, J. *et al.* The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol.* 174, 3143-3147 (2005).
61. Nilsson, J. *et al.* HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108, 3808-3817 (2006).
62. Eggena, M. P. *et al.* Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol.* 174, 4407-4414 (2005).
63. Oswald-Richter, K. *et al.* HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS.Biol* 2, E198 (2004).
64. Tomaras, G. D. *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.* 82, 12449-12463 (2008).
65. Haynes, B. F., Moody, M. A., Liao, H. X., Verkoczy, L., & Tomaras, G. D. B cell responses to HIV-1 infection and vaccination: pathways to preventing infection. *Trends Mol.Med.* 17, 108-116 (2011).
66. Appay, V. & Sauce, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 214, 231-241 (2008).
67. Trautmann, L. *et al.* Programmed death 1: a critical regulator of T-cell function and a strong target for immunotherapies for chronic viral infections. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 2, 219-227 (2007).
68. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354 (2006).

69. Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp.Med.* 205, 2763-2779 (2008).
70. Khaitan, A. & Unutmaz, D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr.HIV./AIDS Rep.* 8, 4-11 (2011).
71. Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat.Immunol.* 8, 1246-1254 (2007).
72. D'Souza, M. *et al.* Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol.* 179, 1979-1987 (2007).
73. Said, E. A. *et al.* Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat.Med.* 16, 452-459 (2010).
74. Ward, J. & Barker, E. Role of natural killer cells in HIV pathogenesis. *Curr.HIV./AIDS Rep.* 5, 44-50 (2008).
75. Stacey, A. R. *et al.* Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol.* 83, 3719-3733 (2009).
76. Pandrea, I. & Apetrei, C. Where the wild things are: pathogenesis of SIV infection in African nonhuman primate hosts. *Curr.HIV./AIDS Rep.* 7, 28-36 (2010).
77. Pomerantz, R. J. & Horn, D. L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat.Med.* 9, 867-873 (2003).
78. Hirsch, M. *et al.* A randomized, controlled trial of indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with advanced human immunodeficiency virus type 1 infection and prior antiretroviral therapy. *J Infect.Dis.* 180, 659-665 (1999).
79. Hammer, S. M. *et al.* A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N.Engl.J Med.* 337, 725-733 (1997).
80. Battegay, M., Nuesch, R., Hirschel, B., & Kaufmann, G. R. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect.Dis.* 6, 280-287 (2006).
81. Tincati, C. *et al.* Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir.Ther.* 14, 321-330 (2009).

82. Guadalupe, M. *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 77, 11708-11717 (2003).
83. Richman, D. D. *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323, 1304-1307 (2009).
84. Grmek, M. D. *Histoire du sida* Paris (1989).
85. Broliden, K., Haase, A. T., Ahuja, S. K., Shearer, G. M., & Andersson, J. Introduction: Back to basics: mucosal immunity and novel HIV vaccine concepts. *J Intern.Med.* 265, 5-17 (2009).
86. Miller, C. J. *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 79, 9217-9227 (2005).
87. Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P., & Robbiani, M. Current concepts of HIV transmission. *Curr.HIV./AIDS Rep.* 4, 29-35 (2007).
88. Sun, L. *et al.* Human beta-defensins suppress human immunodeficiency virus infection: potential role in mucosal protection. *J Virol.* 79, 14318-14329 (2005).
89. Furci, L., Sironi, F., Tolazzi, M., Vassena, L., & Lusso, P. Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4. *Blood* 109, 2928-2935 (2007).
90. Keele, B. F. & Estes, J. D. Barriers to mucosal transmission of immunodeficiency viruses. *Blood* (2011).
91. Bomsel, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat.Med.* 3, 42-47 (1997).
92. Ganor, Y. *et al.* Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. *Mucosal.Immunol.* 3, 506-522 (2010).
93. Bouschbacher, M. *et al.* Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. *Aids* 22, 1257-1266 (2008).
94. de Witte, L. *et al.* Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat.Med.* 13, 367-371 (2007).
95. Li, Q. *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* 458, 1034-1038 (2009).
96. Zhang, Z. *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* 286, 1353-1357 (1999).

97. Li, H. *et al.* High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS.Pathog.* 6, e1000890 (2010).
98. Baggaley, R. F., Boily, M. C., White, R. G., & Alary, M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. *Aids* 20, 805-812 (2006).
99. Bar, K. J. *et al.* Wide variation in the multiplicity of HIV-1 infection among injection drug users. *J Virol.* 84, 6241-6247 (2010).
100. Masharsky, A. E. *et al.* A substantial transmission bottleneck among newly and recently HIV-1-infected injection drug users in St Petersburg, Russia. *J Infect.Dis.* 201, 1697-1702 (2010).
101. Routy, J. P. *et al.* Comparison of clinical features of acute HIV-1 infection in patients infected sexually or through injection drug use. The Investigators of the Quebec Primary HIV Infection Study. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 24, 425-432 (2000).
102. Connor, E. M. *et al.* Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N.Engl.J Med.* 331, 1173-1180 (1994).
103. Guay, L. A. *et al.* Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet* 354, 795-802 (1999).
104. Luzuriaga, K. Mother-to-child Transmission of HIV: A Global Perspective. *Curr.Infect.Dis.Rep.* 9, 511-517 (2007).
105. Coutsooudis, A. *et al.* Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis. *J Infect.Dis.* 189, 2154-2166 (2004).
106. Bulterys, M., Fowler, M. G., Van Rompay, K. K., & Kourtis, A. P. Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breast-feeding: past, present, and future. *J Infect.Dis.* 189, 2149-2153 (2004).
107. World Health Organization. RAPID ADVICE: USE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS FOR TREATING PREGNANT WOMEN AND PREVENTING HIV INFECTION IN INFANTS. *WHO Library* (2010).
108. Lockman, S. *et al.* Response to antiretroviral therapy after a single, peripartum dose of nevirapine. *N.Engl.J Med.* 356, 135-147 (2007).
109. Coovadia, H. M. *et al.* Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding in the first 6 months of life: an intervention cohort study. *Lancet* 369, 1107-1116 (2007).

110. Kuhn, L., Reitz, C., & Abrams, E. J. Breastfeeding and AIDS in the developing world. *Curr.Opin.Pediatr.* 21, 83-93 (2009).
111. Richardson, B. A. *et al.* Comparison of human immunodeficiency virus type 1 viral loads in Kenyan women, men, and infants during primary and early infection. *J Virol.* 77, 7120-7123 (2003).
112. Mphatswe, W. *et al.* High frequency of rapid immunological progression in African infants infected in the era of perinatal HIV prophylaxis. *Aids* 21, 1253-1261 (2007).
113. Newell, M. L. *et al.* Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet* 364, 1236-1243 (2004).
114. Obimbo, E. M. *et al.* Pediatric HIV-1 in Kenya: pattern and correlates of viral load and association with mortality. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 51, 209-215 (2009).
115. Filteau, S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop.Med.Int Health* 14, 276-287 (2009).
116. Nielsen, S. D. *et al.* Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood* 98, 398-404 (2001).
117. Clerici, M. *et al.* T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* 96, 3866-3871 (2000).
118. Embree, J. *et al.* Lymphocyte subsets in human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected children in Nairobi. *Pediatr.Infect.Dis.J* 20, 397-403 (2001).
119. Abel, K. The rhesus macaque pediatric SIV infection model - a valuable tool in understanding infant HIV-1 pathogenesis and for designing pediatric HIV-1 prevention strategies. *Curr.HIV.Res* 7, 2-11 (2009).
120. Mundy, D. C., Schinazi, R. F., Gerber, A. R., Nahmias, A. J., & Randall, H. W., Jr. Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. *Lancet* 2, 459-460 (1987).
121. Lobato, A. C. *et al.* HIV-1 RNA detection in the amniotic fluid of HIV-infected pregnant women. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 105, 720-721 (2010).
122. Bhoopat, L. *et al.* Chorioamnionitis is associated with placental transmission of human immunodeficiency virus-1 subtype E in the early gestational period. *Mod.Pathol.* 18, 1357-1364 (2005).

123. Wabwire-Mangen, F. *et al.* Placental membrane inflammation and risks of maternal-to-child transmission of HIV-1 in Uganda. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 22, 379-385 (1999).
124. Mwanyumba, F. *et al.* Placental inflammation and perinatal transmission of HIV-1. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 29, 262-269 (2002).
125. St Louis, M. E. *et al.* Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors. *JAMA* 269, 2853-2859 (1993).
126. Goldenberg, R. L., Hauth, J. C., & Andrews, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. *N.Engl.J Med.* 342, 1500-1507 (2000).
127. Huppertz, B. The feto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin.Immunopathol.* 29, 83-94 (2007).
128. Sheikh, A. U., Polliotti, B. M., & Miller, R. K. Human immunodeficiency virus infection: in situ polymerase chain reaction localization in human placentas after in utero and in vitro infection. *Am J Obstet.Gynecol.* 182, 207-213 (2000).
129. Menu, E. *et al.* Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Infect.Dis.* 179, 44-51 (1999).
130. Lewis, S. H., Reynolds-Kohler, C., Fox, H. E., & Nelson, J. A. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 335, 565-568 (1990).
131. Ellis, J. E., Hair, G. A., Lindsay, M. K., Ansari, A. A., & Sundstrom, J. B. Fetal cord blood mononuclear cells that are collected at term from HIV-1 infected women harbor transcriptionally active integrated proviral DNA. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 197, 371-376 (2007).
132. Tuttle, D. L. *et al.* Effects of human immunodeficiency virus type 1 infection on CCR5 and CXCR4 coreceptor expression on CD4 T lymphocyte subsets in infants and adolescents. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 20, 305-313 (2004).
133. Gray, L., Fiscus, S., & Shugars, D. HIV-1 variants from a perinatal transmission pair demonstrate similar genetic and replicative properties in tonsillar tissues and peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 23, 1095-1104 (2007).
134. Zhang, H. *et al.* Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. *Retrovirology.* 3, 73 (2006).

135. Lathey, J. L. *et al.* Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *J Infect.Dis.* 180, 344-350 (1999).
136. Scarlatti, G. *et al.* Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 197, 624-629 (1993).
137. Mo, H. *et al.* Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 14, 607-617 (1998).
138. Pandrea, I. *et al.* Paucity of CD4+ CCR5+ T cells may prevent transmission of simian immunodeficiency virus in natural nonhuman primate hosts by breast-feeding. *J Virol.* 82, 5501-5509 (2008).
139. Ahmad, N., Mehta, R., & Harris, D. T. HIV-1 replication and gene expression occur at higher levels in neonatal blood naive and memory T-lymphocytes compared with adult blood cells. *Virology* 413, 39-46 (2011).
140. Sundaravaradan, V. *et al.* Differential HIV-1 replication in neonatal and adult blood mononuclear cells is influenced at the level of HIV-1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11701-11706 (2006).
141. Paiardini, M. *et al.* Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD4(+) T cells are associated with limited CCR5 expression. *Nat.Med.* (2011).
142. Vidricaire, G., Imbeault, M., & Tremblay, M. J. Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol.* 78, 11904-11915 (2004).
143. Lagaye, S. *et al.* Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol.* 75, 4780-4791 (2001).
144. Vidricaire, G. & Tremblay, M. J. Rab5 and Rab7, but not ARF6, govern the early events of HIV-1 infection in polarized human placental cells. *J Immunol.* 175, 6517-6530 (2005).
145. Parry, S., Zhang, J., Koi, H., Arechavaleta-Velasco, F., & Elovitz, M. A. Transcytosis of Human immunodeficiency virus 1 across the placenta is enhanced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *J Gen.Virol.* 87, 2269-2278 (2006).
146. Arias, R. A., Munoz, L. D., & Munoz-Fernandez, M. A. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 307, 266-277 (2003).

147. Douglas, G. C. *et al.* Cell-mediated infection of human placental trophoblast with HIV in vitro. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 7, 735-740 (1991).
148. Vidricaire, G., Gauthier, S., & Tremblay, M. J. HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 Interactions but relies on heparan sulfate proteoglycans. *J Infect.Dis.* 195, 1461-1471 (2007).
149. Ross, A. L., Cannou, C., Barre-Sinoussi, F., & Menu, E. Proteasome-independent degradation of HIV-1 in naturally non-permissive human placental trophoblast cells. *Retrovirology.* 6, 46 (2009).
150. Vidricaire, G., Tardif, M. R., & Tremblay, M. J. The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Biol Chem.* 278, 15832-15841 (2003).
151. Dolcini, G., Derrien, M., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., & Menu, E. Cell-free HIV type 1 infection is restricted in the human trophoblast choriocarcinoma BeWo cell line, even with expression of CD4, CXCR4 and CCR5. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 19, 857-864 (2003).
152. Mano, H. & Chermann, J. C. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells. *Res Virol.* 142, 95-104 (1991).
153. Kilani, R. T. *et al.* Placental trophoblasts resist infection by multiple human immunodeficiency virus (HIV) type 1 variants even with cytomegalovirus coinfection but support HIV replication after provirus transfection. *J Virol.* 71, 6359-6372 (1997).
154. Al Harthi, L., Guilbert, L. J., Hoxie, J. A., & Landay, A. Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 18, 13-17 (2002).
155. David, F. J. *et al.* Human trophoblast cells express CD4 and are permissive for productive infection with HIV-1. *Clin Exp.Immunol.* 88, 10-16 (1992).
156. Fazeley, F., Hu, J., Thirkill, T. L., & Douglas, G. C. Infection of primary human placental fibroblasts with HIV-1, HIV-2, and SIV. *Arch.Virol.* 142, 2237-2248 (1997).
157. Kumar, A., Kumar, S., Dinda, A. K., & Luthra, K. Differential expression of CXCR4 receptor in early and term human placenta. *Placenta* 25, 347-351 (2004).
158. Ishii, M. *et al.* Expression of functional chemokine receptors of human placental cells. *Am J Reprod.Immunol.* 44, 365-373 (2000).
159. Kesson, A. M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 infection of human placental macrophages in vitro. *J Infect.Dis.* 168, 571-579 (1993).

160. Kesson, A. M. *et al.* HIV infection of placental macrophages: their potential role in vertical transmission. *J Leukoc.Biol* 56, 241-246 (1994).
161. Melendez-Guerrero, L. M. *et al.* In Vitro Infection of Hofbauer Cells with a Monocyte-tropic Strain of HIV-1. *Trophoblast Research* 8, 33-45 (1994).
162. Torres, G. *et al.* Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression. *Placenta* 22 Suppl A, S29-S33 (2001).
163. McGann, K. A. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 causes productive infection of macrophages in primary placental cell cultures. *J Infect.Dis.* 169, 746-753 (1994).
164. Backe, E. *et al.* Demonstration of HIV-1 infected cells in human placenta by in situ hybridisation and immunostaining. *J Clin Pathol.* 45, 871-874 (1992).
165. Luciano-Montalvo, C., Ciborowski, P., Duan, F., Gendelman, H. E., & Melendez, L. M. Proteomic analyses associate cystatin B with restricted HIV-1 replication in placental macrophages. *Placenta* 29, 1016-1023 (2008).
166. Luciano-Montalvo, C. & Melendez, L. M. Cystatin B Associates with Signal Transducer and Activator of Transcription 1 in Monocyte-Derived and Placental Macrophages. *Placenta* (2009).
167. Garcia, K., Garcia, V., Perez, L. J., Duan, F., & Melendez, L. M. Characterization of the placental macrophage secretome: implications for antiviral activity. *Placenta* 30, 149-155 (2009).
168. Garcia-Crespo, K., Cadilla, C., Skolasky, R., & Melendez, L. M. Restricted HIV-1 replication in placental macrophages is caused by inefficient viral transcription. *J Leukoc.Biol* 87, 633-636 (2010).
169. Burton, G. J. *et al.* Significance of placental damage in vertical transmission of human immunodeficiency virus. *J Med.Virol.* 50, 237-243 (1996).
170. Garcia-Lloret, M. I., Winkler-Lowen, B., & Guilbert, L. J. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J Leukoc.Biol* 68, 903-908 (2000).
171. Kaneda, T., Shiraki, K., Hirano, K., & Nagata, I. Detection of maternofetal transfusion by placental alkaline phosphatase levels. *J Pediatr.* 130, 730-735 (1997).
172. Lin, H. H. *et al.* Least microtransfusion from mother to fetus in elective cesarean delivery. *Obstet.Gynecol.* 87, 244-248 (1996).
173. Mold, J. E. *et al.* Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322, 1562-1565 (2008).

174. Lin, H. H. *et al.* Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr.* 111, 877-881 (1987).
175. Lin, H. H., Kao, J. H., & Chen, D. S. Mother-to-child HCV transmission. *Lancet* 357, 142-143 (2001).
176. Kweek, J. J. *et al.* Maternal-fetal microtransfusions and HIV-1 mother-to-child transmission in Malawi. *PLoS.Med.* 3, e10 (2006).
177. Kweek, J. J. *et al.* Maternal-fetal DNA admixture is associated with intrapartum mother-to-child transmission of HIV-1 in Blantyre, Malawi. *J Infect.Dis.* 197, 1378-1381 (2008).
178. Biggar, R. J. *et al.* The role of transplacental microtransfusions of maternal lymphocytes in HIV transmission to newborns. *Aids* 22, 2251-2256 (2008).
179. Lee, T. H., Chafets, D. M., Biggar, R. J., McCune, J. M., & Busch, M. P. The role of transplacental microtransfusions of maternal lymphocytes in in utero HIV transmission. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 55, 143-147 (2010).
180. Mandelbrot, L. *et al.* Frequent detection of HIV-1 in the gastric aspirates of neonates born to HIV-infected mothers. *Aids* 13, 2143-2149 (1999).
181. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: a randomised clinical trial. *Lancet* 353, 1035-1039 (1999).
182. Duliege, A. M., Amos, C. I., Felton, S., Biggar, R. J., & Goedert, J. J. Birth order, delivery route, and concordance in the transmission of human immunodeficiency virus type 1 from mothers to twins. International Registry of HIV-Exposed Twins. *J Pediatr.* 126, 625-632 (1995).
183. Goedert, J. J., Duliege, A. M., Amos, C. I., Felton, S., & Biggar, R. J. High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins. *Lancet* 338, 1471-1475 (1991).
184. Biggar, R. J. *et al.* Perinatal intervention trial in Africa: effect of a birth canal cleansing intervention to prevent HIV transmission. *Lancet* 347, 1647-1650 (1996).
185. Biggar, R. J. *et al.* The risk of human immunodeficiency virus-1 infection in twin pairs born to infected mothers in Africa. *J Infect.Dis.* 188, 850-855 (2003).
186. Gaillard, P. *et al.* Vaginal lavage with chlorhexidine during labour to reduce mother-to-child HIV transmission: clinical trial in Mombasa, Kenya. *Aids* 15, 389-396 (2001).
187. Lewis, P. *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *J Infect.Dis.* 177, 34-39 (1998).

188. Nduati, R. W. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *J Infect.Dis.* 172, 1461-1468 (1995).
189. Rousseau, C. M. *et al.* Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *J Infect.Dis.* 190, 1880-1888 (2004).
190. Kourtis, A. P., Butera, S., Ibegbu, C., Beled, L., & Duerr, A. Breast milk and HIV-1: vector of transmission or vehicle of protection? *Lancet Infect.Dis.* 3, 786-793 (2003).
191. Neveu, D. *et al.* Cumulative exposure to cell-free HIV in breast milk, rather than feeding pattern per se, identifies postnatally infected infants. *Clin Infect.Dis.* 52, 819-825 (2011).
192. Southern, S. O. Milk-borne transmission of HIV. Characterization of productively infected cells in breast milk and interactions between milk and saliva. *J Hum.Virol.* 1, 328-337 (1998).
193. Valea, D. *et al.* CD4+ T Cells Spontaneously Producing Human Immunodeficiency Virus Type I in Breast Milk from Women with or without Antiretroviral Drugs. *Retrovirology.* 8, 34 (2011).
194. Dorosko, S. M. & Connor, R. I. Primary human mammary epithelial cells endocytose HIV-1 and facilitate viral infection of CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 84, 10533-10542 (2010).
195. Bulterys, M., Ellington, S., & Kourtis, A. P. HIV-1 and breastfeeding: biology of transmission and advances in prevention. *Clin Perinatol.* 37, 807-80x (2010).
196. LeVasseur, R. J., Southern, S. O., & Southern, P. J. Mammary epithelial cells support and transfer productive human T-cell lymphotropic virus infections. *J Hum.Virol.* 1, 214-223 (1998).
197. Toniolo, A. *et al.* Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells. *Aids* 9, 859-866 (1995).
198. Okeoma, C. M., Huegel, A. L., Lingappa, J., Feldman, M. D., & Ross, S. R. APOBEC3 proteins expressed in mammary epithelial cells are packaged into retroviruses and can restrict transmission of milk-borne virions. *Cell Host.Microbe* 8, 534-543 (2010).
199. Embree, J. E. *et al.* Risk factors for postnatal mother-child transmission of HIV-1. *Aids* 14, 2535-2541 (2000).
200. Smith, M. M. & Kuhn, L. Exclusive breast-feeding: does it have the potential to reduce breast-feeding transmission of HIV-1? *Nutr.Rev* 58, 333-340 (2000).

201. Thea, D. M. *et al.* Post-weaning breast milk HIV-1 viral load, blood prolactin levels and breast milk volume. *Aids* 20, 1539-1547 (2006).
202. Onyango-Makumbi, C. *et al.* Early Weaning of HIV-Exposed Uninfected Infants and Risk of Serious Gastroenteritis: Findings from Two Perinatal HIV Prevention Trials in Kampala, Uganda. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* (2009).
203. Go, L. L. *et al.* Quantitative and morphologic analysis of bacterial translocation in neonates. *Arch.Surg.* 129, 1184-1190 (1994).
204. Rautava, S. *et al.* Breast milk-transforming growth factor-beta specifically attenuates IL-1beta-induced inflammatory responses in the immature human intestine via an S. *Neonatology.* 99, 192-201 (2011).
205. Planchon, S. M., Martins, C. A., Guerrant, R. L., & Roche, J. K. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J Immunol.* 153, 5730-5739 (1994).
206. Richardson, B. A. *et al.* Breast-milk infectivity in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *J Infect.Dis.* 187, 736-740 (2003).
207. Garcia, P. M. *et al.* Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N.Engl.J Med.* 341, 394-402 (1999).
208. Mayaux, M. J. *et al.* Maternal virus load during pregnancy and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohort studies. SEROGEST Cohort Group. *J Infect.Dis.* 175, 172-175 (1997).
209. Maternal viral load and vertical transmission of HIV-1: an important factor but not the only one. The European Collaborative Study. *Aids* 13, 1377-1385 (1999).
210. Mofenson, L. M. *et al.* Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N.Engl.J Med.* 341, 385-393 (1999).
211. Shearer, W. T. *et al.* Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N.Engl.J Med.* 336, 1337-1342 (1997).
212. Ioannidis, J. P. *et al.* Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads <1000 copies/ml. *J Infect.Dis.* 183, 539-545 (2001).
213. Kumar, S. B. *et al.* Different Regions of HIV-1 Subtype C env Are Associated with Placental Localization and In Utero Mother-to-Child Transmission. *J.Virol.* 85, 7142-7152 (2011).

214. Semba, R. D. *et al.* Human immunodeficiency virus load in breast milk, mastitis, and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect.Dis.* 180, 93-98 (1999).
215. Walter, J., Kuhn, L., & Aldrovandi, G. M. Advances in basic science understanding of mother-to-child HIV-1 transmission. *Curr.Opin.HIV.AIDS* 3, 146-150 (2008).
216. Humphrey, J. H. *et al.* Mother to child transmission of HIV among Zimbabwean women who seroconverted postnatally: prospective cohort study. *BMJ* 341, c6580 (2010).
217. Willumsen, J. F. *et al.* Breastmilk RNA viral load in HIV-infected South African women: effects of subclinical mastitis and infant feeding. *Aids* 17, 407-414 (2003).
218. Rossenkhan, R. *et al.* Temporal reduction of HIV type 1 viral load in breast milk by single-dose nevirapine during prevention of MTCT. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 25, 1261-1264 (2009).
219. Lehman, D. A. *et al.* HIV-1 persists in breast milk cells despite antiretroviral treatment to prevent mother-to-child transmission. *Aids* 22, 1475-1485 (2008).
220. Semba, R. D. *et al.* Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 343, 1593-1597 (1994).
221. Baeten, J. M. *et al.* Selenium deficiency is associated with shedding of HIV-1--infected cells in the female genital tract. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 26, 360-364 (2001).
222. Kupka, R. *et al.* Selenium status, pregnancy outcomes, and mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 39, 203-210 (2005).
223. Mehta, S. *et al.* Perinatal outcomes, including mother-to-child transmission of HIV, and child mortality and their association with maternal vitamin D status in Tanzania. *J Infect.Dis.* 200, 1022-1030 (2009).
224. Humphrey, J. H. *et al.* Effects of a single large dose of vitamin A, given during the postpartum period to HIV-positive women and their infants, on child HIV infection, HIV-free survival, and mortality. *Journal of Infectious Diseases* 193, 960-971 (2006).
225. Baeten, J. M. *et al.* Vitamin A supplementation and human immunodeficiency virus type 1 shedding in women: results of a randomized clinical trial. *J Infect.Dis.* 185, 1187-1191 (2002).

226. Fawzi, W. W. *et al.* Randomized trial of vitamin supplements in relation to transmission of HIV-1 through breastfeeding and early child mortality. *Aids* 16, 1935-1944 (2002).
227. Coutoudis, A., Pillay, K., Spooner, E., Kuhn, L., & Coovadia, H. M. Randomized trial testing the effect of vitamin A supplementation on pregnancy outcomes and early mother-to-child HIV-1 transmission in Durban, South Africa. South African Vitamin A Study Group. *Aids* 13, 1517-1524 (1999).
228. Kumwenda, N. *et al.* Antenatal vitamin A supplementation increases birth weight and decreases anemia among infants born to human immunodeficiency virus-infected women in Malawi. *Clin Infect.Dis.* 35, 618-624 (2002).
229. Mandelbrot, L. *et al.* Obstetric factors and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: the French perinatal cohorts. SEROGEST French Pediatric HIV Infection Study Group. *Am J Obstet.Gynecol.* 175, 661-667 (1996).
230. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1--a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. The International Perinatal HIV Group. *N.Engl.J Med.* 340, 977-987 (1999).
231. Dickover, R. E., Garratty, E. M., Plaeger, S., & Bryson, Y. J. Perinatal transmission of major, minor, and multiple maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in utero and intrapartum. *J Virol.* 75, 2194-2203 (2001).
232. Scarlatti, G. *et al.* Comparison of variable region 3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus populations of their mothers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1721-1725 (1993).
233. Wolinsky, S. M. *et al.* Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 255, 1134-1137 (1992).
234. Verhofstede, C. *et al.* Diversity of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env sequence after vertical transmission in mother-child pairs infected with HIV-1 subtype A. *J Virol.* 77, 3050-3057 (2003).
235. Renjifo, B. *et al.* In-utero transmission of quasispecies among human immunodeficiency virus type 1 genotypes. *Virology* 307, 278-282 (2003).
236. Kwiek, J. J. *et al.* The molecular epidemiology of HIV-1 envelope diversity during HIV-1 subtype C vertical transmission in Malawian mother-infant pairs. *Aids* 22, 863-871 (2008).
237. Ceballos, A. *et al.* Lack of viral selection in human immunodeficiency virus type 1 mother-to-child transmission with primary infection during late pregnancy and/or breastfeeding. *J.Gen.Virol.* 89, 2773-2782 (2008).

238. Kourtis, A. P. *et al.* Various viral compartments in HIV-1-infected mothers contribute to in utero transmission of HIV-1. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 27, 421-427 (2011).
239. Salazar-Gonzalez, J. F. *et al.* Origin and evolution of HIV-1 in breast milk determined by single-genome amplification and sequencing. *J Virol.* 85, 2751-2763 (2011).
240. Heath, L. *et al.* Restriction of HIV-1 genotypes in breast milk does not account for the population transmission genetic bottleneck that occurs following transmission. *PLoS.One.* 5, e10213 (2010).
241. Zhang, H. *et al.* Restricted genetic diversity of HIV-1 subtype C envelope glycoprotein from perinatally infected Zambian infants. *PLoS.One.* 5, e9294 (2010).
242. Russell, E. S. *et al.* The Genetic Bottleneck in Vertical Transmission of Subtype C HIV-1 Is Not Driven by Selection of Especially Neutralization Resistant Virus from the Maternal Viral Population. *J Virol.* (2011).
243. Huang, W. *et al.* Vertical transmission of X4-tropic and dual-tropic HIV-1 in five Ugandan mother-infant pairs. *Aids* 23, 1903-1908 (2009).
244. Renjifo, B. *et al.* Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *Aids* 18, 1629-1636 (2004).
245. Yang, C. *et al.* Genetic diversity of HIV-1 in western Kenya: subtype-specific differences in mother-to-child transmission. *Aids* 17, 1667-1674 (2003).
246. Eshleman, S. H. *et al.* Comparison of mother-to-child transmission rates in Ugandan women with subtype A versus D HIV-1 who received single-dose nevirapine prophylaxis: HIV Network For Prevention Trials 012. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 39, 593-597 (2005).
247. Wellensiek, B. P., Sundaravaradan, V., Ramakrishnan, R., & Ahmad, N. Molecular characterization of the HIV-1 gag nucleocapsid gene associated with vertical transmission. *Retrovirology.* 3, 21 (2006).
248. Ryland, E. G., Tang, Y., Christie, C. D., & Feeney, M. E. Sequence evolution of HIV-1 following mother-to-child transmission. *J Virol.* 84, 12437-12444 (2010).
249. Ramakrishnan, R. *et al.* Evaluations of HIV type 1 rev gene diversity and functional domains following perinatal transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 21, 1035-1045 (2005).
250. Ramakrishnan, R., Mehta, R., Sundaravaradan, V., Davis, T., & Ahmad, N. Characterization of HIV-1 envelope gp41 genetic diversity and functional domains following perinatal transmission. *Retrovirology.* 3, 42 (2006).

251. Husain, M., Hahn, T., Yedavalli, V. R., & Ahmad, N. Characterization of HIV type 1 tat sequences associated with perinatal transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 17, 765-773 (2001).
252. Hahn, T., Ramakrishnan, R., & Ahmad, N. Evaluation of genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 NEF gene associated with vertical transmission. *J Biomed.Sci* 10, 436-450 (2003).
253. Ahmad, N. Molecular mechanisms of HIV-1 mother-to-child transmission and infection in neonatal target cells. *Life Sci* 88, 980-986 (2011).
254. Hahn, T., Matala, E., Chappey, C., & Ahmad, N. Characterization of mother-infant HIV type 1 gag p17 sequences associated with perinatal transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 15, 875-888 (1999).
255. Hahn, T. & Ahmad, N. Genetic characterization of HIV type 1 gag p17 matrix genes in isolates from infected mothers lacking perinatal transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 17, 1673-1680 (2001).
256. Kittinunvorakoon, C. *et al.* Mother to child transmission of HIV-1 in a Thai population: role of virus characteristics and maternal humoral immune response. *J Med.Virol.* 81, 768-778 (2009).
257. Padua, E. *et al.* Potential impact of viral load and genetic makeup of HIV type 1 on mother-to-child transmission: characterization of env-C2V3C3 and nef sequences. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 25, 1171-1177 (2009).
258. Yedavalli, V. R. & Ahmad, N. Low conservation of functional domains of HIV type 1 vif and vpr genes in infected mothers correlates with lack of vertical transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 17, 911-923 (2001).
259. Yedavalli, V. R., Chappey, C., & Ahmad, N. Maintenance of an intact human immunodeficiency virus type 1 vpr gene following mother-to-infant transmission. *J Virol.* 72, 6937-6943 (1998).
260. Yedavalli, V. R., Chappey, C., Matala, E., & Ahmad, N. Conservation of an intact vif gene of human immunodeficiency virus type 1 during maternal-fetal transmission. *J Virol.* 72, 1092-1102 (1998).
261. Singh, K. K. & Spector, S. A. Host Genetic Determinants of HIV Infection and Disease Progression in Children. *Pediatr.Res* (2009).
262. Wang, G., Izadpanah, N., Kitchen, C. M., & Bernstein, H. B. Fetal allostimulation of maternal cells: a potential mechanism for perinatal HIV transmission following obstetrical hemorrhage. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 24, 1545-1554 (2008).

263. MacDonald, K. S. *et al.* Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect.Dis.* 177, 551-556 (1998).
264. Polycarpou, A. *et al.* Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 18, 741-746 (2002).
265. Mackelprang, R. D. *et al.* Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. *J Infect.Dis.* 197, 1156-1161 (2008).
266. Winchester, R. *et al.* Mother-to-child transmission of HIV-1: strong association with certain maternal HLA-B alleles independent of viral load implicates innate immune mechanisms. *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.* 36, 659-670 (2004).
267. Paximadis, M. *et al.* KIR-HLA and maternal-infant HIV-1 transmission in sub-Saharan Africa. *PLoS.One.* 6, e16541 (2011).
268. Mackelprang, R. D. *et al.* Maternal human leukocyte antigen A*2301 is associated with increased mother-to-child HIV-1 transmission. *J Infect.Dis.* 202, 1273-1277 (2010).
269. Farquhar, C. *et al.* Human leukocyte antigen (HLA) B*18 and protection against mother-to-child HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 20, 692-697 (2004).
270. MacDonald, K. S. *et al.* The HLA A2/6802 supertype is associated with reduced risk of perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect.Dis.* 183, 503-506 (2001).
271. Winchester, R., Chen, Y., Rose, S., Selby, J., & Borkowsky, W. Major histocompatibility complex class II DR alleles DRB1*1501 and those encoding HLA-DR13 are preferentially associated with a diminution in maternally transmitted human immunodeficiency virus 1 infection in different ethnic groups: determination by an automated sequence-based typing method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12374-12378 (1995).
272. Ferre, A. L. *et al.* HIV controllers with HLA-DRB1*13 and HLA-DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J Virol.* 84, 11020-11029 (2010).
273. Malhotra, U. *et al.* Role for HLA class II molecules in HIV-1 suppression and cellular immunity following antiretroviral treatment. *J Clin Invest* 107, 505-517 (2001).
274. Aikhionbare, F. O. *et al.* Mother-to-child discordance in HLA-G exon 2 is associated with a reduced risk of perinatal HIV-1 transmission. *Aids* 15, 2196-2198 (2001).

275. Aikhionbare, F. O., Kumaresan, K., Shamsa, F., & Bond, V. C. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Res Ther.* 3, 28 (2006).
276. Segat, L. *et al.* HLA-G 3' UTR haplotypes and HIV vertical transmission. *Aids* 23, 1916-1918 (2009).
277. Fabris, A. *et al.* Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *Aids* 23, 177-182 (2009).
278. Matte, C., Zijenah, L. S., Lacaille, J., Ward, B., & Roger, M. Mother-to-child human leukocyte antigen G concordance: no impact on the risk of vertical transmission of HIV-1. *Aids* 16, 2491-2494 (2002).
279. Bashirova, A. A., Thomas, R., & Carrington, M. HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. *Annu.Rev Immunol.* 29, 295-317 (2011).
280. Brouwer, K. C. *et al.* Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. *Aids* 18, 1187-1194 (2004).
281. Choi, R. Y. *et al.* Infant CD4 C868T polymorphism is associated with increased human immunodeficiency virus (HIV-1) acquisition. *Clin Exp.Immunol.* 160, 461-465 (2010).
282. Martinson, J. J., Chapman, N. H., Rees, D. C., Liu, Y. T., & Clegg, J. B. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat.Genet.* 16, 100-103 (1997).
283. Contopoulos-Ioannidis, D. G., O'Brien, T. R., Goedert, J. J., Rosenberg, P. S., & Ioannidis, J. P. Effect of CCR5-delta32 heterozygosity on the risk of perinatal HIV-1 infection: a meta-analysis. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 32, 70-76 (2003).
284. Singh, K. K. *et al.* Associations of chemokine receptor polymorphisms With HIV-1 mother-to-child transmission in sub-Saharan Africa: possible modulation of genetic effects by antiretrovirals. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 49, 259-265 (2008).
285. Kostrikis, L. G. *et al.* A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *J Virol.* 73, 10264-10271 (1999).
286. Pedersen, B. R. *et al.* CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. *PLoS.One.* 2, e838 (2007).
287. Salkowitz, J. R. *et al.* CCR5 promoter polymorphism determines macrophage CCR5 density and magnitude of HIV-1 propagation in vitro. *Clin Immunol.* 108, 234-240 (2003).

288. Joubert, B. R., Franceschini, N., Mwapasa, V., North, K. E., & Meshnick, S. R. Regulation of CCR5 expression in human placenta: insights from a study of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *PLoS.One.* 5, e9212 (2010).
289. Behbahani, H. *et al.* Up-regulation of CCR5 expression in the placenta is associated with human immunodeficiency virus-1 vertical transmission. *Am J Pathol.* 157, 1811-1818 (2000).
290. Katz, D. A. *et al.* CCR5, RANTES and SDF-1 polymorphisms and mother-to-child HIV-1 transmission. *Int J Immunogenet.* 37, 301-305 (2010).
291. Berger, E. A., Murphy, P. M., & Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu.Rev Immunol.* 17, 657-700 (1999).
292. Smith, M. W. *et al.* Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277, 959-965 (1997).
293. Mabuka, J. M. *et al.* CCR2-64I polymorphism is associated with lower maternal HIV-1 viral load and reduced vertical HIV-1 transmission. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 51, 235-237 (2009).
294. Brouwer, K. C. *et al.* Effect of CCR2 chemokine receptor polymorphism on HIV type 1 mother-to-child transmission and child survival in Western Kenya. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 21, 358-362 (2005).
295. Wasik, T. J. *et al.* Protective role of beta-chemokines associated with HIV-specific Th responses against perinatal HIV transmission. *J Immunol.* 162, 4355-4364 (1999).
296. Meddows-Taylor, S. *et al.* Reduced ability of newborns to produce CCL3 is associated with increased susceptibility to perinatal human immunodeficiency virus 1 transmission. *J Gen.Virol.* 87, 2055-2065 (2006).
297. Kuhn, L. *et al.* African infants' CCL3 gene copies influence perinatal HIV transmission in the absence of maternal nevirapine. *Aids* 21, 1753-1761 (2007).
298. John, G. C. *et al.* Maternal SDF1 3'A polymorphism is associated with increased perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol.* 74, 5736-5739 (2000).
299. Joubert, B. R. *et al.* A whole genome association study of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *Genome Med.* 2, 17 (2010).
300. Thiel, S. *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386, 506-510 (1997).

301. Haurum, J. S. *et al.* Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *Aids* 7, 1307-1313 (1993).
302. Saifuddin, M., Hart, M. L., Gewurz, H., Zhang, Y., & Spear, G. T. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen. Virol.* 81, 949-955 (2000).
303. Mangano, A. *et al.* Detrimental effects of mannose-binding lectin (MBL2) promoter genotype XA/XA on HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *J Infect. Dis.* 198, 694-700 (2008).
304. Boniotto, M. *et al.* Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes Immun.* 1, 346-348 (2000).
305. Madsen, H. O. *et al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 155, 3013-3020 (1995).
306. Kuhn, L. *et al.* Synergy between mannose-binding lectin gene polymorphisms and supplementation with vitamin A influences susceptibility to HIV infection in infants born to HIV-positive mothers. *Am J Clin Nutr.* 84, 610-615 (2006).
307. Amoroso, A. *et al.* Polymorphism at codon 54 of mannose-binding protein gene influences AIDS progression but not HIV infection in exposed children. *Aids* 13, 863-864 (1999).
308. Ricci, E. *et al.* Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Transl. Med.* 8, 49 (2010).
309. Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Teran, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 135, 1-11 (2010).
310. Ricci, E. *et al.* Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 51, 13-19 (2009).
311. Milanese, M., Segat, L., Arraes, L. C., Garzino-Demo, A., & Crovella, S. Copy number variation of defensin genes and HIV infection in Brazilian children. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 50, 331-333 (2009).
312. Trowsdale, J. & Betz, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat. Immunol.* 7, 241-246 (2006).
313. Bansal, A. S. Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. *Am J Reprod. Immunol.* 64, 307-315 (2010).

314. Laresgoiti-Servitje, E., Gomez-Lopez, N., & Olson, D. M. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Hum.Reprod.Update.* 16, 510-524 (2010).
315. Mens, P. F., Bojtor, E. C., & Schallig, H. D. Molecular interactions in the placenta during malaria infection. *Eur.J Obstet.Gynecol.Reprod.Biol* 152, 126-132 (2010).
316. Lee, B. N. *et al.* Inflammatory cytokine expression is correlated with the level of human immunodeficiency virus (HIV) transcripts in HIV-infected placental trophoblastic cells. *J Virol.* 71, 3628-3635 (1997).
317. Faye, A. *et al.* Characterization of the main placental cytokine profiles from HIV-1-infected pregnant women treated with anti-retroviral drugs in France. *Clin Exp.Immunol.* 149, 430-439 (2007).
318. Reuben, J. M. *et al.* Induction of inflammatory cytokines in placental monocytes of gravaidae infected with the human immunodeficiency virus type 1. *J Interferon Cytokine Res* 16, 963-971 (1996).
319. Lee, B. N. *et al.* Production of interferons and beta-chemokines by placental trophoblasts of HIV-1-infected women. *Infect.Dis.Obstet.Gynecol.* 9, 95-104 (2001).
320. Kfutwah, A. *et al.* Plasmodium falciparum infection significantly impairs placental cytokine profile in HIV infected Cameroonian women. *PLoS.One.* 4, e8114 (2009).
321. Moussa, M. *et al.* Placental cytokine and chemokine production in HIV-1-infected women: trophoblast cells show a different pattern compared to cells from HIV-negative women. *Clin Exp.Immunol.* 125, 455-464 (2001).
322. Pornprasert, S. *et al.* Higher placental anti-inflammatory IL-10 cytokine expression in HIV-1 infected women receiving longer zidovudine prophylaxis associated with nevirapine. *Curr.HIV.Res* 7, 211-217 (2009).
323. Borges-Almeida, E. *et al.* The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC.Infect.Dis.* 11, 38 (2011).
324. Bento, C. A. *et al.* IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *Aids* 23, 9-18 (2009).
325. Pornprasert, S. *et al.* Down modulation of TNF-alpha mRNA placental expression by AZT used for the prevention of HIV-1 mother-to-child transmission. *Placenta* 27, 989-995 (2006).

326. Patterson, B. K. *et al.* Leukemia inhibitory factor inhibits HIV-1 replication and is upregulated in placenta from nontransmitting women. *J Clin Invest* 107, 287-294 (2001).
327. Hygino, J. *et al.* Altered immunological reactivity in HIV-1-exposed uninfected neonates. *Clin Immunol.* 127, 340-347 (2008).
328. Derrien, M. *et al.* Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro. *J Virol.* 79, 12304-12310 (2005).
329. Zachar, V., Fink, T., Koppelhus, U., & Ebbesen, P. Role of placental cytokines in transcriptional modulation of HIV type 1 in the isolated villous trophoblast. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 18, 839-847 (2002).
330. Kfutwah, A. K. *et al.* Tumour necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 replication in single-cycle infection of human term placental villi fragments in a time, viral dose and envelope dependent manner. *Retrovirology.* 3, 36 (2006).
331. Munoz, L. D., Serramia, M. J., Fresno, M., & Munoz-Fernandez, M. A. Progesterone inhibits HIV-1 replication in human trophoblast cells through inhibition of autocrine tumor necrosis factor secretion. *J Infect.Dis.* 195, 1294-1302 (2007).
332. Walter, J. *et al.* High concentrations of interleukin 15 in breast milk are associated with protection against postnatal HIV transmission. *J Infect.Dis.* 200, 1498-1502 (2009).
333. Walter, J. *et al.* Low and undetectable breast milk interleukin-7 concentrations are associated with reduced risk of postnatal HIV transmission. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 46, 200-207 (2007).
334. Rochman, Y., Spolski, R., & Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat.Rev Immunol.* 9, 480-490 (2009).
335. Farquhar, C. *et al.* CC and CXC chemokines in breastmilk are associated with mother-to-child HIV-1 transmission. *Curr.HIV.Res* 3, 361-369 (2005).
336. Bosire, R. *et al.* Longitudinal comparison of chemokines in breastmilk early postpartum among HIV-1-infected and uninfected Kenyan women. *Breastfeed.Med.* 2, 129-138 (2007).
337. Arsenault, J. E. *et al.* Association between breast milk erythropoietin and reduced risk of mother-to-child transmission of HIV. *J Infect.Dis.* 202, 370-373 (2010).
338. Miller, M., Iliff, P., Stoltzfus, R. J., & Humphrey, J. Breastmilk erythropoietin and mother-to-child HIV transmission through breastmilk. *Lancet* 360, 1246-1248 (2002).

339. Farquhar, C. *et al.* Salivary secretory leukocyte protease inhibitor is associated with reduced transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast milk. *J Infect.Dis.* 186, 1173-1176 (2002).
340. Jaspan, H. B., Lawn, S. D., Safrit, J. T., & Bekker, L. G. The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents. *Aids* 20, 483-494 (2006).
341. Kuhn, L., Meddows-Taylor, S., Gray, G., & Tiemessen, C. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cellular immune responses in newborns exposed to HIV in utero. *Clin Infect.Dis.* 34, 267-276 (2002).
342. Legrand, F. A. *et al.* Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS.One.* 1, e102 (2006).
343. Ono, E. *et al.* Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz.J Med.Biol Res* 41, 700-708 (2008).
344. Schramm, D. B., Meddows-Taylor, S., Gray, G. E., Kuhn, L., & Tiemessen, C. T. Low maternal viral loads and reduced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor levels characterize exposed, uninfected infants who develop protective human immunodeficiency virus type 1-specific responses. *Clin Vaccine Immunol.* 14, 348-354 (2007).
345. Schramm, D. B., Kuhn, L., Gray, G. E., & Tiemessen, C. T. In vivo effects of HIV-1 exposure in the presence and absence of single-dose nevirapine on cellular plasma activation markers of infants born to HIV-1-seropositive mothers. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 42, 545-553 (2006).
346. Kourtis, A. P. *et al.* Correlation of virus load and soluble L-selectin, a marker of immune activation, in pediatric HIV-1 infection. *Aids* 14, 2429-2436 (2000).
347. Bawdon, R. E., Kaul, S., & Sobhi, S. The ex vivo transfer of the anti-HIV nucleoside compound d4T in the human placenta. *Gynecol.Obstet.Invest* 38, 1-4 (1994).
348. Kuhn, L. *et al.* T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood: protection against intrapartum and breast-feeding transmission. *Aids* 15, 1-9 (2001).
349. Thobakgale, C. F. *et al.* Human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell activity is detectable from birth in the majority of in utero-infected infants. *J Virol.* 81, 12775-12784 (2007).

350. Shalekoff, S. *et al.* Identification of human immunodeficiency virus-1 specific CD8+ and CD4+ T cell responses in perinatally-infected infants and their mothers. *Aids* 23, 789-798 (2009).
351. Sandberg, J. K. *et al.* HIV-specific CD8+ T cell function in children with vertically acquired HIV-1 infection is critically influenced by age and the state of the CD4+ T cell compartment. *J Immunol.* 170, 4403-4410 (2003).
352. Lohman, B. L. *et al.* Longitudinal assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon responses during the first year of life in HIV-1-infected infants. *J Virol.* 79, 8121-8130 (2005).
353. Mansoor, N. *et al.* Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol.* 130, 280-289 (2009).
354. Lohman-Payne, B. *et al.* Infants with late breast milk acquisition of HIV-1 generate interferon-gamma responses more rapidly than infants with early peripartum acquisition. *Clin Exp.Immunol.* 156, 511-517 (2009).
355. Thobakgale, C. F. *et al.* CD8(+) T Cell Polyfunctionality Profiles in Progressive and Nonprogressive Pediatric HIV Type 1 Infection. *AIDS Res Hum.Retroviruses* (2011).
356. Brander, C. *et al.* Persistent HIV-1-specific CTL clonal expansion despite high viral burden post in utero HIV-1 infection. *J Immunol.* 162, 4796-4800 (1999).
357. Slyker, J. A. *et al.* Phenotypic Characterization of HIV-Specific CD8 T Cells during Early and Chronic Infant HIV-1 Infection. *PLoS.One.* 6, e20375 (2011).
358. John-Stewart, G. C. *et al.* HV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and breast milk HIV-1 transmission. *J Infect.Dis.* 199, 889-898 (2009).
359. Mold, J. E. *et al.* Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science* 330, 1695-1699 (2010).
360. Malhotra, I. *et al.* Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype? A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS.Med.* 6, e1000116 (2009).
361. Tiemessen, C. T. *et al.* Cutting Edge: Unusual NK cell responses to HIV-1 peptides are associated with protection against maternal-infant transmission of HIV-1. *J Immunol.* 182, 5914-5918 (2009).
362. Plaeger, S. *et al.* Decreased CD8 cell-mediated viral suppression and other immunologic characteristics of women who transmit human immunodeficiency virus to their infants. *J Infect.Dis.* 179, 1388-1394 (1999).

363. Adkins, B., Leclerc, C., & Marshall-Clarke, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat.Rev Immunol.* 4, 553-564 (2004).
364. Bunders, M., Pembrey, L., Kuijpers, T., & Newell, M. L. Evidence of impact of maternal HIV infection on immunoglobulin levels in HIV-exposed uninfected children. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 26, 967-975 (2010).
365. Samleerat, T. *et al.* Maternal neutralizing antibodies against a CRF01_AE primary isolate are associated with a low rate of intrapartum HIV-1 transmission. *Virology* 387, 388-394 (2009).
366. Barin, F. *et al.* Revisiting the role of neutralizing antibodies in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Infect.Dis.* 193, 1504-1511 (2006).
367. Dickover, R. *et al.* Role of maternal autologous neutralizing antibody in selective perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 escape variants. *J Virol.* 80, 6525-6533 (2006).
368. Guevara, H. *et al.* Maternal HIV-1 antibody and vertical transmission in subtype C virus infection. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 29, 435-440 (2002).
369. Tranchat, C. *et al.* Maternal humoral factors associated with perinatal human immunodeficiency virus type-1 transmission in a cohort from Kigali, Rwanda, 1988-1994. *J Infect.* 39, 213-220 (1999).
370. Calarota, S. A. & Libonatti, O. V. Maternal antibodies to HIV-1 envelope domains: No correlation with HIV-1 vertical transmission in patients from Argentina. *Scand.J Immunol.* 52, 292-297 (2000).
371. Goedert, J. J. & Dublin, S. Perinatal transmission of HIV type 1: associations with maternal anti-HIV serological reactivity. Mothers and Infants Cohort Study and the HIV-1 Perinatal Serology Working Group. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 10, 1125-1134 (1994).
372. Parekh, B. S. *et al.* Lack of correlation between maternal antibodies to V3 loop peptides of gp120 and perinatal HIV-1 transmission. The NYC Perinatal HIV Transmission Collaborative Study. *Aids* 5, 1179-1184 (1991).
373. Louisirootchakul, S. *et al.* Role of maternal humoral immunity in vertical transmission of HIV-1 subtype E in Thailand. *J Acquir.Immune.Defic.Syindr.* 21, 259-265 (1999).
374. Lynch, J. B. *et al.* The breadth and potency of passively acquired human immunodeficiency virus type 1-specific neutralizing antibodies do not correlate with the risk of infant infection. *J Virol.* 85, 5252-5261 (2011).
375. Farquhar, C. *et al.* Salivary human immunodeficiency virus (HIV)-1-specific immunoglobulin A in HIV-1-exposed infants in Kenya. *Clin Exp.Immunol.* 153, 37-43 (2008).

376. Mwapasa, V. *et al.* Maternal syphilis infection is associated with increased risk of mother-to-child transmission of HIV in Malawi. *Aids* 20, 1869-1877 (2006).
377. Lee, M. J., Hallmark, R. J., Frenkel, L. M., & Del Priore, G. Maternal syphilis and vertical perinatal transmission of human immunodeficiency virus type-1 infection. *Int J Gynaecol. Obstet.* 63, 247-252 (1998).
378. Cowan, F. M. *et al.* Maternal Herpes simplex virus type 2 infection, syphilis and risk of intra-partum transmission of HIV-1: results of a case control study. *Aids* 22, 193-201 (2008).
379. Sheffield, J. S. *et al.* Placental histopathology of congenital syphilis. *Obstet. Gynecol.* 100, 126-133 (2002).
380. Anderson, B. L. & Cu-Uvin, S. Determinants of HIV shedding in the lower genital tract of women. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 10, 505-511 (2008).
381. Gallagher, M. *et al.* The effects of maternal helminth and malaria infections on mother-to-child HIV transmission. *Aids* 19, 1849-1855 (2005).
382. Gupta, A. *et al.* Maternal tuberculosis: a risk factor for mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus. *J Infect. Dis.* 203, 358-363 (2011).
383. Dolcini, G. L. *et al.* Trypanosoma cruzi (Chagas' disease agent) reduces HIV-1 replication in human placenta. *Retrovirology.* 5, 53 (2008).
384. Shankar, E. M. *et al.* Current Views on the Pathophysiology of GB Virus C Coinfection with HIV-1 Infection. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 13, 47-52 (2011).
385. Supapol, W. B. *et al.* Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but not maternal GB virus C infection. *J Infect. Dis.* 197, 1369-1377 (2008).
386. Brahmbhatt, H. *et al.* Association of HIV and malaria with mother-to-child transmission, birth outcomes, and child mortality. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 47, 472-476 (2008).
387. Brahmbhatt, H. *et al.* The effects of placental malaria on mother-to-child HIV transmission in Rakai, Uganda. *Aids* 17, 2539-2541 (2003).
388. Ayisi, J. G. *et al.* Maternal malaria and perinatal HIV transmission, western Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 643-652 (2004).
389. Inion, I. *et al.* Placental malaria and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect. Dis.* 188, 1675-1678 (2003).
390. Msamanga, G. I. *et al.* Placental malaria and mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus-1. *Am J Trop. Med. Hyg.* 80, 508-515 (2009).

391. Nanche, D. *et al.* Mother-to-child transmission of HIV-1: association with malaria prevention, anaemia and placental malaria. *HIV.Med.* 9, 757-764 (2008).
392. Mwapasa, V. *et al.* The effect of Plasmodium falciparum malaria on peripheral and placental HIV-1 RNA concentrations in pregnant Malawian women. *Aids* 18, 1051-1059 (2004).
393. Kublin, J. G. *et al.* Effect of Plasmodium falciparum malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study. *Lancet* 365, 233-240 (2005).
394. Suguitan, A. L., Jr. *et al.* Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect.Dis.* 188, 1074-1082 (2003).
395. Ayouba, A. *et al.* Specific stimulation of HIV-1 replication in human placental trophoblasts by an antigen of Plasmodium falciparum. *Aids* 22, 785-787 (2008).
396. Steiner, K. *et al.* Fetal immune activation to malaria antigens enhances susceptibility to in vitro HIV infection in cord blood mononuclear cells. *J Infect.Dis.* 202, 899-907 (2010).
397. McGreal, E. P., Martinez-Pomares, L., & Gordon, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol.Immunol.* 41, 1109-1121 (2004).
398. Soilleux, E. J. DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 104, 437-446 (2003).
399. Bashirova, A. A. *et al.* Novel member of the CD209 (DC-SIGN) gene family in primates. *J Virol.* 77, 217-227 (2003).
400. Soilleux, E. J., Barten, R., & Trowsdale, J. DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13. *J Immunol.* 165, 2937-2942 (2000).
401. Ortiz, M. *et al.* The evolutionary history of the CD209 (DC-SIGN) family in humans and non-human primates. *Genes Immun.* 9, 483-492 (2008).
402. Barreiro, L. B. *et al.* The heritage of pathogen pressures and ancient demography in the human innate-immunity CD209/CD209L region. *Am J Hum.Genet.* 77, 869-886 (2005).
403. Trowsdale, J. & Parham, P. Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *Eur.J Immunol.* 34, 7-17 (2004).

404. Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K., & Weis, W. I. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294, 2163-2166 (2001).
405. Serrano-Gomez, D. *et al.* Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem.* 283, 3889-3903 (2008).
406. Tabarani, G. *et al.* DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol Chem.* 284, 21229-21240 (2009).
407. Snyder, G. A., Colonna, M., & Sun, P. D. The structure of DC-SIGNR with a portion of its repeat domain lends insights to modeling of the receptor tetramer. *J Mol.Biol* 347, 979-989 (2005).
408. Engering, A. *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol.* 168, 2118-2126 (2002).
409. Azad, A. K., Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells. *J Leukoc.Biol* 84, 1594-1603 (2008).
410. Koppel, E. A., van Gisbergen, K. P., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol.* 7, 157-165 (2005).
411. Mummidi, S. *et al.* Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. *J Biol Chem.* 276, 33196-33212 (2001).
412. Engering, A. *et al.* Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes. *Am J Pathol.* 164, 1587-1595 (2004).
413. Soilleux, E. J. *et al.* Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc.Biol* 71, 445-457 (2002).
414. Soilleux, E. J. *et al.* Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol.* 195, 586-592 (2001).
415. Jameson, B. *et al.* Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol.* 76, 1866-1875 (2002).

416. Kammerer, U. *et al.* Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol.* 162, 887-896 (2003).
417. Tailleux, L. *et al.* DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS.Med.* 2, e381 (2005).
418. Rappocciolo, G. *et al.* DC-SIGN on B lymphocytes is required for transmission of HIV-1 to T lymphocytes. *PLoS.Pathog.* 2, e70 (2006).
419. Dominguez-Soto, A. *et al.* Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin Expression on M2-Polarized and Tumor-Associated Macrophages Is Macrophage-CSF Dependent and Enhanced by Tumor-Derived IL-6 and IL-10. *J Immunol.* (2011).
420. Puig-Kroger, A. *et al.* Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem.* 279, 25680-25688 (2004).
421. Relloso, M. *et al.* DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol.* 168, 2634-2643 (2002).
422. Dominguez-Soto, A., Puig-Kroger, A., Vega, M. A., & Corbi, A. L. PU.1 regulates the tissue-specific expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem.* 280, 33123-33131 (2005).
423. Liu, H., Yu, W., Liou, L. Y., & Rice, A. P. Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene* 313, 149-159 (2003).
424. Herbein, G. & Varin, A. The macrophage in HIV-1 infection: from activation to deactivation? *Retrovirology.* 7, 33 (2010).
425. Martinez-Nunez, R. T., Louafi, F., & Sanchez-Elsner, T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha 1 (IL13Ralpha1). *J Biol Chem.* 286, 1786-1794 (2011).
426. Martinez-Nunez, R. T., Louafi, F., Friedmann, P. S., & Sanchez-Elsner, T. MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN). *J Biol Chem.* 284, 16334-16342 (2009).
427. Plazolles, N. *et al.* Pivotal advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated cis-infection of myeloid dendritic cells. *J Leukoc.Biol* 89, 329-342 (2011).

428. Nilsen, T. W. & Graveley, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457-463 (2010).
429. Liu, H. *et al.* Most DC-SIGNR transcripts at mucosal HIV transmission sites are alternatively spliced isoforms. *Eur.J Hum.Genet.* 13, 707-715 (2005).
430. Bashirova, A. A. *et al.* A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp.Med.* 193, 671-678 (2001).
431. Pohlmann, S. *et al.* DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2670-2675 (2001).
432. Geijtenbeek, T. B. *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.* 277, 11314-11320 (2002).
433. Guo, Y. *et al.* Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat.Struct.Mol.Biol* 11, 591-598 (2004).
434. Geijtenbeek, T. B. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585 (2000).
435. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat.Immunol.* 1, 353-357 (2000).
436. Garcia-Vallejo, J. J. *et al.* DC-SIGN mediates adhesion and rolling of dendritic cells on primary human umbilical vein endothelial cells through LewisY antigen expressed on ICAM-2. *Mol.Immunol.* 45, 2359-2369 (2008).
437. Snyder, G. A. *et al.* Characterization of DC-SIGN/R interaction with human immunodeficiency virus type 1 gp120 and ICAM molecules favors the receptor's role as an antigen-capturing rather than an adhesion receptor. *J Virol.* 79, 4589-4598 (2005).
438. van Gisbergen, K. P., Ludwig, I. S., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* 579, 6159-6168 (2005).
439. van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp.Med.* 201, 1281-1292 (2005).

440. Samsen, A. *et al.* DC-SIGN and SRCL bind glycans of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1): recombinant human glycan-binding receptors as analytical tools. *Eur.J Cell Biol* 89, 87-94 (2010).
441. Nonaka, M. *et al.* Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 180, 3347-3356 (2008).
442. van Gisbergen, K. P., Aarnoudse, C. A., Meijer, G. A., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res* 65, 5935-5944 (2005).
443. Laskarin, G. *et al.* Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) is a natural ligand for the C-type lectin-like domain that induces anti-inflammatory orientation of early pregnancy decidual CD1a+ dendritic cells. *J Reprod.Immunol.* 88, 12-23 (2011).
444. Tsegaye, T. S. & Pohlmann, S. The multiple facets of HIV attachment to dendritic cell lectins. *Cell Microbiol.* 12, 1553-1561 (2010).
445. Khoo, U. S., Chan, K. Y., Chan, V. S., & Lin, C. L. DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNs for infection. *J Mol.Med.(Berl)* 86, 861-874 (2008).
446. Cameron, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 257, 383-387 (1992).
447. Turville, S. G. *et al.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103, 2170-2179 (2004).
448. Nobile, C. *et al.* Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol.* 79, 5386-5399 (2005).
449. Burleigh, L. *et al.* Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol.* 80, 2949-2957 (2006).
450. Dong, C., Janas, A. M., Wang, J. H., Olson, W. J., & Wu, L. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J Virol.* 81, 11352-11362 (2007).
451. Wang, J. H., Janas, A. M., Olson, W. J., & Wu, L. Functionally distinct transmission of human immunodeficiency virus type 1 mediated by immature and mature dendritic cells. *J Virol.* 81, 8933-8943 (2007).

452. Blanchet, F., Moris, A., Mitchell, J. P., & Piguet, V. A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4+ T cells. *Curr.Opin.HIV.AIDS* (2011).
453. Wiley, R. D. & Gummuluru, S. Immature dendritic cell-derived exosomes can mediate HIV-1 trans infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 738-743 (2006).
454. Izquierdo-Useros, N. *et al.* Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113, 2732-2741 (2009).
455. Nikolic, D. S. *et al.* HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* (2011).
456. Arrighi, J. F. *et al.* DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp.Med.* 200, 1279-1288 (2004).
457. Baribaud, F., Pohlmann, S., Leslie, G., Mortari, F., & Doms, R. W. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol.* 76, 9135-9142 (2002).
458. Wu, L., Martin, T. D., Vazeux, R., Unutmaz, D., & KewalRamani, V. N. Functional evaluation of DC-SIGN monoclonal antibodies reveals DC-SIGN interactions with ICAM-3 do not promote human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol.* 76, 5905-5914 (2002).
459. Trumpheller, C., Park, C. G., Finke, J., Steinman, R. M., & Granelli-Piperno, A. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int Immunol.* 15, 289-298 (2003).
460. Arrighi, J. F. *et al.* Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J Virol.* 78, 10848-10855 (2004).
461. Granelli-Piperno, A. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol.* 175, 4265-4273 (2005).
462. Gummuluru, S., Rogel, M., Stamatatos, L., & Emerman, M. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J Virol.* 77, 12865-12874 (2003).
463. Boggiano, C., Manel, N., & Littman, D. R. Dendritic cell-mediated trans-enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity is independent of DC-SIGN. *J Virol.* 81, 2519-2523 (2007).

464. Turville, S. G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat.Immunol.* 3, 975-983 (2002).
465. Lambert, A. A., Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A. D., & Tremblay, M. J. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 112, 1299-1307 (2008).
466. de Witte, L. *et al.* Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19464-19469 (2007).
467. Lekkerkerker, A. N., van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr.HIV.Res* 4, 169-176 (2006).
468. Hu, Q. *et al.* Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue. *J Exp.Med.* 199, 1065-1075 (2004).
469. Engering, A., van Vliet, S. J., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100, 1780-1786 (2002).
470. Cambi, A., Beeren, I., Joosten, B., Fransen, J. A., & Figdor, C. G. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *Eur.J Immunol.* 39, 1923-1928 (2009).
471. Moris, A. *et al.* Dendritic cells and HIV-specific CD4+ T cells: HIV antigen presentation, T-cell activation, and viral transfer. *Blood* 108, 1643-1651 (2006).
472. Muratori, C. *et al.* DC contact with HIV-1-infected cells leads to high levels of Env-mediated virion endocytosis coupled with enhanced HIV-1 Ag presentation. *Eur.J Immunol.* 39, 404-416 (2009).
473. Smith, A. L. *et al.* Leukocyte-specific protein 1 interacts with DC-SIGN and mediates transport of HIV to the proteasome in dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 204, 421-430 (2007).
474. Moris, A. *et al.* DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103, 2648-2654 (2004).
475. Cavrois, M., Neidleman, J., Kreisberg, J. F., & Greene, W. C. In vitro derived dendritic cells trans-infect CD4 T cells primarily with surface-bound HIV-1 virions. *PLoS.Pathog.* 3, e4 (2007).
476. Sol-Foulon, N. *et al.* HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity.* 16, 145-155 (2002).

477. Lee, B. *et al.* cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol.* 75, 12028-12038 (2001).
478. Nobile, C., Moris, A., Porrot, F., Sol-Foulon, N., & Schwartz, O. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J Virol.* 77, 5313-5323 (2003).
479. Lozach, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem.* 280, 23698-23708 (2005).
480. Alvarez, C. P. *et al.* C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol.* 76, 6841-6844 (2002).
481. Wang, S. F. *et al.* DC-SIGN mediates avian H5N1 influenza virus infection in cis and in trans. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 373, 561-566 (2008).
482. Wang, J. H., Janas, A. M., Olson, W. J., KewalRamani, V. N., & Wu, L. CD4 coexpression regulates DC-SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 81, 2497-2507 (2007).
483. Wang, Q. & Pang, S. An intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) - grabbing nonintegrin (DC-SIGN) efficiently blocks HIV viral budding. *FASEB J* 22, 1055-1064 (2008).
484. de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y., & Geijtenbeek, T. B. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol.* 80, 3477-3486 (2006).
485. Cormier, E. G. *et al.* L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14067-14072 (2004).
486. Halary, F. *et al.* Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17, 653-664 (2002).
487. van Kooyk, Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem.Soc.Trans.* 36, 1478-1481 (2008).
488. Geijtenbeek, T. B. *et al.* Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp.Med.* 197, 7-17 (2003).
489. Caparros, E. *et al.* DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 107, 3950-3958 (2006).

490. Shan, M. *et al.* HIV-1 gp120 mannoses induce immunosuppressive responses from dendritic cells. *PLoS.Pathog.* 3, e169 (2007).
491. Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van, d., V., & Geijtenbeek, T. B. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat.Immunol.* 10, 1081-1088 (2009).
492. Smits, H. H. *et al.* Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol.* 115, 1260-1267 (2005).
493. Hovius, J. W. *et al.* Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS.Pathog.* 4, e31 (2008).
494. Bergman, M. P. *et al.* *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp.Med.* 200, 979-990 (2004).
495. Zeituni, A. E., Jotwani, R., Carrion, J., & Cutler, C. W. Targeting of DC-SIGN on human dendritic cells by minor fimbriated *Porphyromonas gingivalis* strains elicits a distinct effector T cell response. *J Immunol.* 183, 5694-5704 (2009).
496. Huang, H. J., Lin, Y. L., Liu, C. F., Kao, H. F., & Wang, J. Y. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma. *Mucosal.Immunol.* (2011).
497. Mittal, R., Bulgheresi, S., Emami, C., & Prasadarao, N. V. *Enterobacter sakazakii* targets DC-SIGN to induce immunosuppressive responses in dendritic cells by modulating MAPKs. *J Immunol.* 183, 6588-6599 (2009).
498. Steeghs, L. *et al.* *Neisseria meningitidis* expressing IgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function. *Cell Microbiol.* 8, 316-325 (2006).
499. Gringhuis, S. I. *et al.* HIV-1 exploits innate signaling by TLR8 and DC-SIGN for productive infection of dendritic cells. *Nat.Immunol.* 11, 419-426 (2010).
500. Schaefer, M. *et al.* Decreased pathology and prolonged survival of human DC-SIGN transgenic mice during mycobacterial infection. *J Immunol.* 180, 6836-6845 (2008).
501. Zhou, Y. *et al.* Oral tolerance to food-induced systemic anaphylaxis mediated by the C-type lectin SIGNR1. *Nat.Med.* 16, 1128-1133 (2010).
502. Yearley, J. H., Pearson, C., Shannon, R. P., & Mansfield, K. G. Phenotypic variation in myocardial macrophage populations suggests a role for macrophage

- activation in SIV-associated cardiac disease. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 23, 515-524 (2007).
503. Yearley, J. H., Pearson, C., Carville, A., Shannon, R. P., & Mansfield, K. G. SIV-associated myocarditis: viral and cellular correlates of inflammation severity. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 22, 529-540 (2006).
504. Yearley, J. H. *et al.* Tissue-specific reduction in DC-SIGN expression correlates with progression of pathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Dev.Comp Immunol.* 32, 1510-1521 (2008).
505. Sakuntabhai, A. *et al.* A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat.Genet.* 37, 507-513 (2005).
506. Chan, K. Y. *et al.* CD209 (DC-SIGN) -336A>G promoter polymorphism and severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Chinese. *Hum.Immunol.* 71, 702-707 (2010).
507. Wang, L. *et al.* DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 5, e934 (2011).
508. Ryan, E. J. *et al.* Variant in CD209 promoter is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C virus infection. *Hum.Immunol.* 71, 829-832 (2010).
509. Xu, Y. F. *et al.* Sequencing of DC-SIGN promoter indicates an association between promoter variation and risk of nasopharyngeal carcinoma in cantonese. *BMC.Med.Genet.* 11, 161 (2010).
510. Li, H. *et al.* Polymorphisms in the C-type lectin genes cluster in chromosome 19 and predisposition to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection. *J Med.Genet.* 45, 752-758 (2008).
511. Kashima, S. *et al.* DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in a Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Gen.Virol.* 90, 927-934 (2009).
512. Nunez, C. *et al.* A functional variant in the CD209 promoter is associated with DQ2-negative celiac disease in the Spanish population. *World J Gastroenterol.* 12, 4397-4400 (2006).
513. Barreiro, L. B. *et al.* Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS.Med.* 3, e20 (2006).
514. Vannberg, F. O. *et al.* CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS.One.* 3, e1388 (2008).

515. Zheng, R. *et al.* Relationship between polymorphism of DC-SIGN (CD209) gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis in an eastern Chinese population. *Hum.Immunol.* 72, 183-186 (2011).
516. Ben Ali, M. *et al.* Promoter and neck region length variation of DC-SIGN is not associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Hum.Immunol.* 68, 908-912 (2007).
517. Gomez, L. M. *et al.* Analysis of DC-SIGN (CD209) functional variants in patients with tuberculosis. *Hum.Immunol.* 67, 808-811 (2006).
518. Olesen, R. *et al.* DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun.* 8, 456-467 (2007).
519. Barreiro, L. B. *et al.* DC-SIGN interacts with Mycobacterium leprae but sequence variation in this lectin is not associated with leprosy in the Pakistani population. *Hum.Immunol.* 67, 102-107 (2006).
520. Martin, M. P. *et al.* Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 78, 14053-14056 (2004).
521. Koizumi, Y. *et al.* Rantes-28G Delays and Dc-Sign-139C Enhances Aids Progression in Hiv Type 1-Infected Japanese Hemophiliacs. *Aids Research and Human Retroviruses* 23, 713-719 (2007).
522. Wichukchinda, N. *et al.* The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *Aids Research and Human Retroviruses* 23, 686-692 (2007).
523. Liu, H. *et al.* Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect.Dis.* 190, 1055-1058 (2004).
524. Zhang, J. *et al.* Protective role of DC-SIGN (CD209) neck-region alleles with <5 repeat units in HIV-1 transmission. *J Infect.Dis.* 198, 68-71 (2008).
525. Rathore, A. *et al.* Risk for HIV-1 infection is not associated with repeat-region polymorphism in the DC-SIGN neck domain and novel genetic DC-SIGN variants among North Indians. *Clin Chim.Acta* 391, 1-5 (2008).
526. Chaudhary, O. *et al.* Polymorphic variants in DC-SIGN, DC-SIGNR and SDF-1 in high risk seronegative and HIV-1 patients in Northern Asian Indians. *J Clin Virol.* 43, 196-201 (2008).

527. Barreiro, L. B. *et al.* Length variation of DC-SIGN and L-SIGN neck-region has no impact on tuberculosis susceptibility. *Hum.Immunol.* 68, 106-112 (2007).
528. Chan, V. S. *et al.* Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat.Genet.* 38, 38-46 (2006).
529. Tang, N. L. *et al.* Lack of support for an association between CLEC4M homozygosity and protection against SARS coronavirus infection. *Nat.Genet.* 39, 691-692 (2007).
530. Zhi, L. *et al.* Lack of support for an association between CLEC4M homozygosity and protection against SARS coronavirus infection. *Nat.Genet.* 39, 692-694 (2007).
531. Gramberg, T. *et al.* Impact of polymorphisms in the DC-SIGNR neck domain on the interaction with pathogens. *Virology* 347, 354-363 (2006).
532. Nattermann, J. *et al.* The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene in HCV infection. *J Viral Hepat.* 13, 42-46 (2006).
533. Liu, H. *et al.* Repeat-region polymorphisms in the gene for the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related molecule: effects on HIV-1 susceptibility. *J Infect.Dis.* 193, 698-702 (2006).
534. Rathore, A., Chatterjee, A., Sivarama, P., Yamamoto, N., & Dhole, T. N. Role of homozygous DC-SIGNR 5/5 tandem repeat polymorphism in HIV-1 exposed seronegative North Indian individuals. *J Clin Immunol.* 28, 50-57 (2008).
535. Lichterfeld, M. *et al.* The tandem-repeat polymorphism of the DC-SIGNR gene does not affect the susceptibility to HIV infection and the progression to AIDS. *Clin Immunol.* 107, 55-59 (2003).
536. Soilleux, E. J. & Coleman, N. Transplacental transmission of HIV: a potential role for HIV binding lectins. *Int J Biochem.Cell Biol* 35, 283-287 (2003).
537. Bockle, B. C., Solder, E., Kind, S., Romani, N., & Sepp, N. T. DC-sign+ CD163+ macrophages expressing hyaluronan receptor LYVE-1 are located within chorion villi of the placenta. *Placenta* 29, 187-192 (2008).
538. Joerink, M., Rindsjo, E., van Riel, B., Alm, J., & Papadogiannakis, N. Placental macrophage (Hofbauer cell) polarization is independent of maternal allergen-sensitization and presence of chorioamnionitis. *Placenta* 32, 380-385 (2011).
539. Roussev, R. G., Higgins, N. G., & McIntyre, J. A. Phenotypic characterization of normal human placental mononuclear cells. *J Reprod.Immunol.* 25, 15-29 (1993).

540. Goldsobel, A., Ank, B., Spina, C., Giorgi, J., & Stiehm, E. R. Phenotypic and cytotoxic characteristics of the immune cells of the human placenta. *Cell Immunol.* 97, 335-343 (1986).
541. Repnik, U. *et al.* Comparison of macrophage phenotype between decidua basalis and decidua parietalis by flow cytometry. *Placenta* 29, 405-412 (2008).
542. Marlin, R. *et al.* Antigen-presenting cells represent targets for R5 HIV-1 infection in the first trimester pregnancy uterine mucosa. *PLoS.One.* 4, e5971 (2009).
543. te Velde, A. A. *et al.* Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Eur.J Immunol.* 33, 143-151 (2003).
544. Kamada, N. *et al.* Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 118, 2269-2280 (2008).
545. Shen, R., Smythies, L. E., Clements, R. H., Novak, L., & Smith, P. D. Dendritic cells transmit HIV-1 through human small intestinal mucosa. *J Leukoc.Biol* 87, 663-670 (2010).
546. Satomi, M. *et al.* Transmission of macrophage-tropic HIV-1 by breast-milk macrophages via DC-SIGN. *J Infect.Dis.* 191, 174-181 (2005).
547. Saeland, E. *et al.* MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol.Immunol.* 46, 2309-2316 (2009).
548. Requena, M. *et al.* Inhibition of HIV-1 transmission in trans from dendritic cells to CD4+ T lymphocytes by natural antibodies to the CRD domain of DC-SIGN purified from breast milk and intravenous immunoglobulins. *Immunology* 123, 508-518 (2008).
549. Naarding, M. A. *et al.* Bile salt-stimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrob.Agents Chemother.* 50, 3367-3374 (2006).
550. Naarding, M. A. *et al.* Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 115, 3256-3264 (2005).
551. Hong, P., Ninonuevo, M. R., Lee, B., Lebrilla, C., & Bode, L. Human milk oligosaccharides reduce HIV-1-gp120 binding to dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN). *Br J Nutr.* 101, 482-486 (2009).
552. Zhu, D., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., & Kitamura, Y. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing

- nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 393, 598-602 (2010).
553. Xu, L. *et al.* The nine-repeat DC-SIGNR isoform is associated with increased HIV-RNA loads and HIV sexual transmission. *J Clin Immunol.* 30, 402-407 (2010).
554. Limmer, A. *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat.Med.* 6, 1348-1354 (2000).
555. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat.Rev Immunol.* 7, 803-815 (2007).
556. Mukhtar, M. *et al.* Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* 297, 78-88 (2002).
557. Kanmogne, G. D., Primeaux, C., & Grammas, P. HIV-1 gp120 proteins alter tight junction protein expression and brain endothelial cell permeability: implications for the pathogenesis of HIV-associated dementia. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 64, 498-505 (2005).
558. Kanmogne, G. D. *et al.* HIV-1 gp120 compromises blood-brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood-brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cereb.Blood Flow Metab* 27, 123-134 (2007).
559. Yang, B., Akhter, S., Chaudhuri, A., & Kanmogne, G. D. HIV-1 gp120 induces cytokine expression, leukocyte adhesion, and transmigration across the blood-brain barrier: modulatory effects of STAT1 signaling. *Microvasc.Res* 77, 212-219 (2009).
560. Kwiek, J. J. *et al.* Maternal-fetal DNA admixture is associated with intrapartum mother-to-child transmission of HIV-1 in Blantyre, Malawi. *J Infect.Dis.* 197, 1378-1381 (2008).
561. Nagamatsu, T. & Schust, D. J. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod.Sci* 17, 209-218 (2010).
562. Onofre, G., Kolackova, M., Jankovicova, K., & Krejsek, J. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica.(Hradec.Kralove)* 52, 57-61 (2009).
563. Svajger, U., Obermajer, N., Anderluh, M., Kos, J., & Jeras, M. DC-SIGN ligation greatly affects dendritic cell differentiation from monocytes compromising their normal function. *J Leukoc.Biol* 89, 893-905 (2011).
564. Hurtado, C. W. *et al.* Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C--seropositive mother-infant dyads. *PLoS.One.* 5, e12232 (2010).

565. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc.Biol* 81, 584-592 (2007).
566. Fischer-Smith, T., Tedaldi, E. M., & Rappaport, J. CD163/CD16 coexpression by circulating monocytes/macrophages in HIV: potential biomarkers for HIV infection and AIDS progression. *AIDS Res Hum.Retroviruses* 24, 417-421 (2008).
567. Sconocchia, G. *et al.* Tumor infiltration by Fcγ₃ (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 128, 2663-2672 (2011).
568. Pillay, J. *et al.* Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc.Biol* 88, 211-220 (2010).
569. Ancuta, P. *et al.* CD16+ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells. *Virology* 344, 267-276 (2006).
570. Ancuta, P. *et al.* CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. *J Immunol.* 176, 5760-5771 (2006).
571. VandeWoude, S. & Apetrei, C. Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses. *Clin Microbiol.Rev* 19, 728-762 (2006).
572. Chahroudi, A. *et al.* Mother-to-Infant Transmission of Simian Immunodeficiency Virus Is Rare in Sooty Mangabeys and Is Associated with Low Viremia. *J Virol.* 85, 5757-5763 (2011).
573. Otsyula, M. G. *et al.* Apparent lack of vertical transmission of simian immunodeficiency virus (SIV) in naturally infected African green monkeys, *Cercopithecus aethiops*. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 89, 573-576 (1995).
574. Wilks, A. B. *et al.* High cell-free virus load and robust autologous humoral immune responses in breast milk of simian immunodeficiency virus-infected african green monkeys. *J Virol.* 85, 9517-9526 (2011).
575. Chen, Z. *et al.* Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J Exp.Med.* 188, 2057-2065 (1998).
576. Beaumier, C. M. *et al.* CD4 downregulation by memory CD4+ T cells in vivo renders African green monkeys resistant to progressive SIVagm infection. *Nat.Med.* 15, 879-885 (2009).

577. Murayama, Y., Mukai, R., Inoue-Murayama, M., & Yoshikawa, Y. An African green monkey lacking peripheral CD4 lymphocytes that retains helper T cell activity and coexists with SIVagm. *Clin Exp.Immunol.* 117, 504-512 (1999).
578. Pandrea, I. *et al.* Paucity of CD4+CCR5+ T cells is a typical feature of natural SIV hosts. *Blood* 109, 1069-1076 (2007).
579. Mandl, J. N. *et al.* Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat.Med.* 14, 1077-1087 (2008).
580. Diop, O. M. *et al.* Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol.* 82, 5145-5152 (2008).
581. Campillo-Gimenez, L. *et al.* Nonpathogenesis of simian immunodeficiency virus infection is associated with reduced inflammation and recruitment of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes, not to lack of an interferon type I response, during the acute phase. *J Virol.* 84, 1838-1846 (2010).
582. Klatt, N. R. *et al.* Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. *Mucosal.Immunol.* 3, 387-398 (2010).
583. Pandrea, I., Sodora, D. L., Silvestri, G., & Apetrei, C. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol.* 29, 419-428 (2008).
584. Favre, D. *et al.* Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS.Pathog.* 5, e1000295 (2009).
585. Lederer, S. *et al.* Transcriptional profiling in pathogenic and non-pathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization. *PLoS.Pathog.* 5, e1000296 (2009).
586. Kornfeld, C. *et al.* Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS. *J Clin Invest* 115, 1082-1091 (2005).
587. Yu, Q. D. *et al.* Autonomous Tetramerization Domains in the Glycan-binding Receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Mol.Biol* (2009).
588. Gornik, O., Pavic, T., & Lauc, G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. *Biochim.Biophys.Acta* (2011).

589. Abel, K. *et al.* Rapid virus dissemination in infant macaques after oral simian immunodeficiency virus exposure in the presence of local innate immune responses. *J Virol.* 80, 6357-6367 (2006).
590. Veazey, R. S. *et al.* Simian immunodeficiency virus infection in neonatal macaques. *J Virol.* 77, 8783-8792 (2003).

Annexes

Figure annexe 1. Expression de CD16 sur les populations de macrophages DC-SIGN⁺CD163⁺ et de cellules CD14⁻CD3⁻CD19⁻CD56⁻DC-SIGN⁻CD68⁻ du placenta. A) Fréquence des populations DC-SIGN⁺CD163⁺ CD16^{hi} et CD16^{lo} entre les enfants portant les allèles sauvages de DC-SIGN (WT) et les enfants portant les allèles mutés (Variants) nés de mères infectées (HIV Exposed) et non infectées au VIH-1 (HIV Unexposed). Les macrophages placentaires isolés mécaniquement de placentas de troisième trimestre ont été analysés par cytométrie en flux. Les cellules mortes et exprimant les marqueurs de cellules T, B et NK (CD3, CD19 et CD56) ont été exclues. Les macrophages placentaires CD14⁺CD68⁺CD163⁺DC-SIGN⁺HLA-DR⁺ sont ici analysés sur la base de l'expression de CD16 (HIV Unexposed; WT n=4; Variants n=11 et HIV Exposed; WT n=3; Variants n=6). B) La fréquence des populations CD14⁻CD3⁻CD19⁻CD56⁻DC-SIGN⁻CD68⁻ a été comparée entre les porteurs ou non des mutations de DC-SIGN nés ou non de mères infectées au VIH-1. C) Le pool placentaire de cellules CD14⁻CD3⁻CD19⁻CD56⁻DC-SIGN⁻CD68⁻ diffère sur la base de l'expression de CD16 entre les porteurs des allèles sauvages et des allèles mutés chez les enfants exposés au VIH-1. Les porteurs des allèles sauvages (WT) modulent à la baisse la fréquence des populations CD16^{hi} et à la hausse celle des populations CD16^{lo} à l'exposition au VIH-1. En contrepartie, l'exposition au VIH-1 n'a pas d'effet sur les fréquences des populations CD14⁻ chez les porteurs des allèles mutés (U = HIV Unexposed, E= HIV Exposed) (HIV Unexposed; WT n=4; Variants n=11 et HIV Exposed; WT n=3; Variants n=6). En A, B et C, les résultats représentent les fréquences (%) des différentes sous-populations, et la différence entre les enfants exposés et non exposés au VIH-1 ou entre les porteurs des allèles sauvages ou mutés a été calculée par un test de Student.

Figure annexe 1 : Expression de CD16 sur les populations de macrophages DC-SIGN⁺CD163⁺ et de cellules CD14⁻CD3⁻CD19⁻CD56⁻DC-SIGN⁻CD68⁻ du placenta.

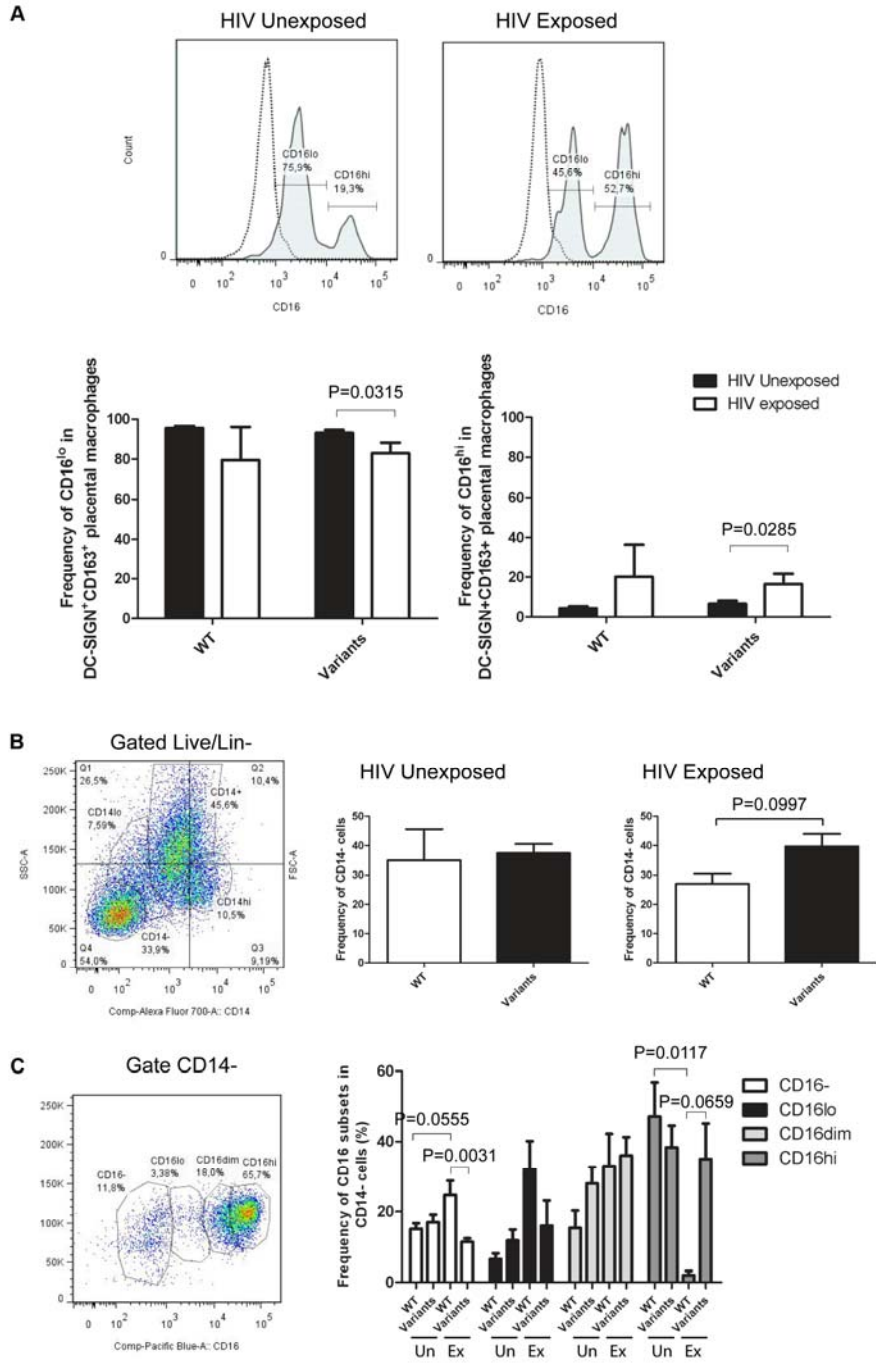


Figure annexe 2. Potentiel de différenciation des monocytes du sang de cordon en macrophages placentaires et en MDM. A) Les monocytes du sang de cordon chez un enfant portant l'allèle sauvage de DC-SIGN (BTH7N p-336TT) et un enfant portant l'allèle mutant de DC-SIGN (STL7N p-336CC) ont été analysés par cytométrie en flux. Les CBMC ont d'abord été isolés sur un gradient de Ficoll et les monocytes CD14⁺ ont été isolés par sélection négative avec des billes couplées aux anticorps dirigés contre CD3, CD7, CD19, CD56, CD123 et CD235 (DynaBead Untouched Human Monocytes, Invitrogen.). Les monocytes CD14⁺ ont été analysés par cytométrie en flux à l'aide d'un cocktail d'anticorps CD16-Pacific Bleu, CD14-Alexa700, HLA-DR-PeCy7 et CD3-FITC. Les trois populations de monocytes CD14⁺CD16⁻ (normalement 80-90 % des monocytes circulants), CD14⁺CD16⁺ et CD14^{lo}CD16⁺⁺ (5-10 % des monocytes circulants) ont été identifiées après l'exclusion des cellules CD3⁺ sur la base de leur expression de CD14 et CD16. B) Les macrophages placentaires ou cellules de Hofbauer ont été isolés de placentas de troisième trimestre et analysés par cytométrie en flux. Les histogrammes rapportant la différence entre les populations DC-SIGN⁺CD163⁺ et DC-SIGN⁺CD163⁻ pour l'expression de DC-SIGN, HLA-DR, CD68 et CD16 sont ici montrés. C) Les monocytes de sang de cordon des patients BTH7N et STL7N ont été mis en culture 7 jours en présence de 10ng/ml de M-CSF⁴¹⁹ dans l'IMDM avec 10 % FBS et différenciés en macrophages. À jour 5, 10 ng/ml d'IL-4 ont été ajoutés dans le milieu en plus du M-CSF afin d'induire l'expression de DC-SIGN sur les MDM⁴²⁰. À jour 7, les MDM ont été récoltés et analysés par cytométrie en flux avec le même cocktail d'anticorps que les cellules de placenta. Les histogrammes rapportant la différence entre les populations DC-SIGN⁺CD163⁺ et DC-SIGN⁺CD163⁻ pour l'expression de DC-SIGN, HLA-DR, CD68 et CD16 sont ici montrés. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Figure annexe 2 : Potentiel de différenciation des monocytes du sang de cordon en macrophages placentaires et en MDM.

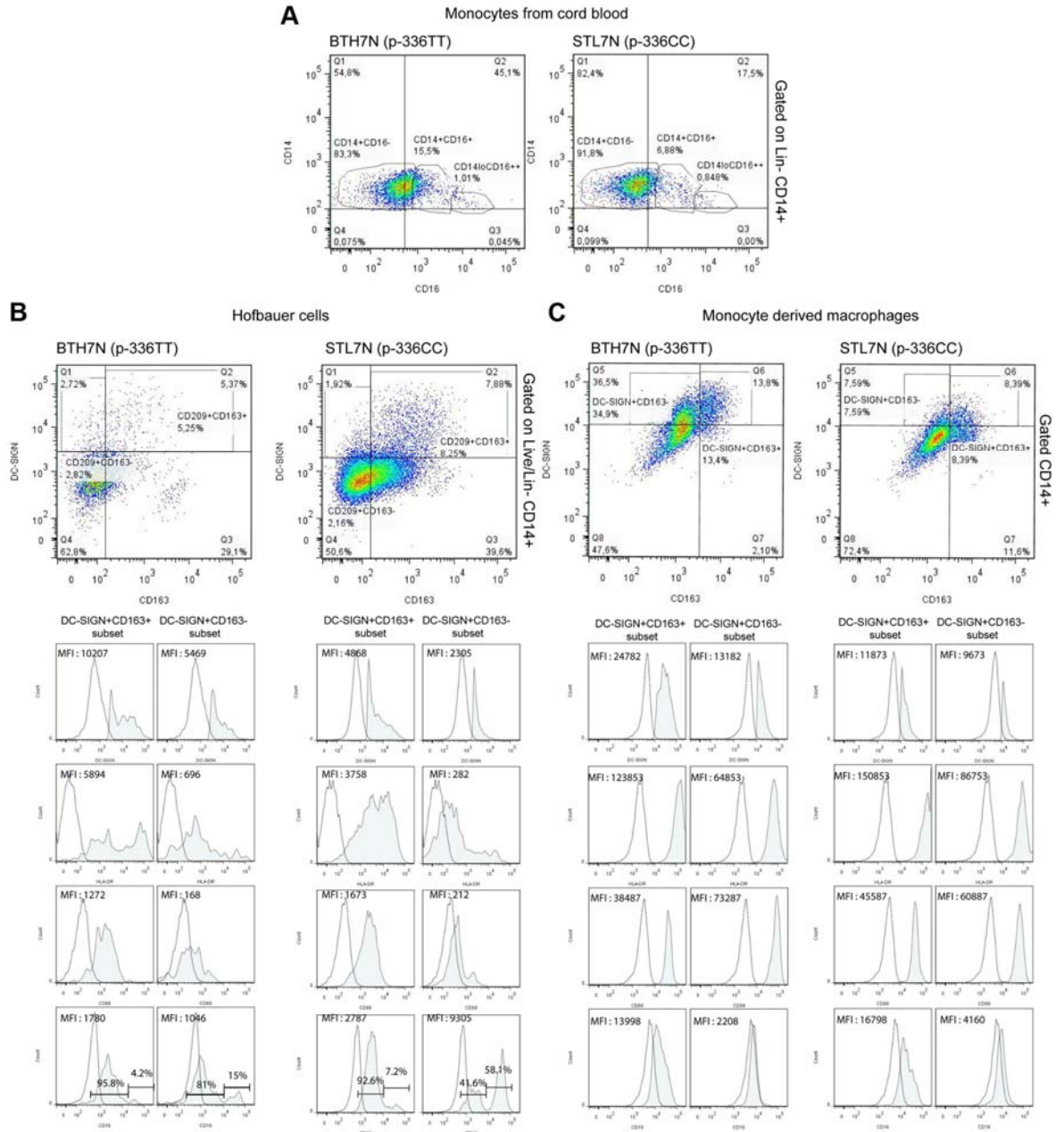


Figure annexe 3. Influence des mutations de la région « neck » sur la capacité de multimérisation et le profil de glycosylation de DC-SIGN. A) Capacité de multimérisation. Les lysats cellulaires des transfectants Raji de DC-SIGN ont été analysés par gel SDS-PAGE dans des conditions réduites et non-réduites. L'expression de DC-SIGN a été analysée par immunobuvardage avec un anticorps anti-DC-SIGN (clone 5D7). L'expression de GAPDH a été utilisée pour contrôler la quantité de protéines chargées sur gel. En conditions réduites et non-réduites, différentes quantités de lysats protéiques ont été chargées pour obtenir une expression totale de DC-SIGN similaire afin de comparer les niveaux de multimérisation et de tétramérisation en conditions non-réduites. Les colonnes comparées sont identifiées par *. Les graphiques représentent la quantification du signal sur gel de deux expériences indépendantes. En conditions réduites, l'expression de DC-SIGN a été normalisée par l'expression de GAPDH et l'expression relative est montrée par rapport à H1 (WT). L'expression relative des formes multimériques et tétramériques de DC-SIGN est montrée par rapport à l'expression totale de DC-SIGN. Les différences d'expression entre H1, H4 et H6 ont été calculées par un test de Student. B) Profil de glycosylation de DC-SIGN dans les transfectants Raji. Les lysats cellulaires ont été incubés avec ou sans la PNGase F pour 2h, chargés sur un gel SDS-PAGE et analysés par immunobuvardage. 25 µg de lysat H1, 8,3 µg de lysat H4 et 12,5 µg de lysat H6 ont été chargés sur gel pour obtenir un signal similaire de DC-SIGN. Les résultats montrent un gel représentatif de trois expériences indépendantes.

Figure annexe 3 : Influence des mutations de la région « neck » sur la capacité de multimérisation et le profil de glycosylation de DC-SIGN.

