

Université de Montréal

Étude de l'immunité mucoale génitale chez des femmes béninoises hautement exposées au VIH-1 séronégatives (HESN) et séropositives.

par

Valérie Thibodeau

Département de Microbiologie, Infectiologie 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

Le 14 novembre, 2014

© Valérie Thibodeau, 2015

Résumé

Introduction : Aujourd'hui, 35,3 millions de personnes vivent avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-1 dans le monde ; l'Afrique subsaharienne concentre 70% des nouvelles infections et les femmes en représentent plus de la moitié. Le mode de transmission du VIH le plus répandu est par voie mucoale génitale suite à des relations sexuelles. Le tractus génital féminin (TGF) possède un milieu immunitaire complexe qui doit contrer l'invasion par des pathogènes tout en maintenant la tolérance/contrôle de la flore normale vaginale étant sous la pression de procréation sous influence des hormones sexuelles. De plus, les mécanismes favorisant ou prévenant l'infection du TGF par le VIH ne sont pas précisément identifiés. Hypothèse : Le contexte inflammatoire mucoale génital et la résultante de dialogues intercellulaires tel qu'entre les cellules épithéliales génitales (CEG) et les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), qui sont des premières à rencontrer le virus aux portes d'entrée mucoales, modulent l'activité des lymphocytes qui est déterminante dans le type de réponse immunitaire élaborée par l'hôte. Méthodologie : Des spécimens provenant d'une cohorte de travailleuses du sexe (TS) recrutées à Cotonou au Bénin en Afrique subsaharienne ont été analysés. Nous avons caractérisé le milieu mucoale génital féminin hautement exposé au VIH de TS séronégatives (*highly exposed seronegative*; HESN) en comparaison avec celui de TS séropositives. Brièvement, les liquides cervicaux-vaginaux ont été déterminés par des techniques de multiplexes/Luminex ou par ELISA et le milieu cellulaire a été décrit suite à des analyses de cytométrie en flux (phénotypage et tri cellulaire). Résultats : Nous avons observé la présence augmentée d'un facteur soluble antiviral, immunomodulateur et antiprolifératif sécrété dans le TGF des TS HESN qui est l'interféron (IFN)- α . La présence augmentée de cette cytokine suggère l'existence possible de connexions intercellulaires clés qui pourraient mener à une régulation homéostatique du compartiment immunitaire génital permettant de contrôler l'infection par le VIH-1. En étudiant l'expression de molécules impliquées dans les voies de signalisation associées à la production d'IFN- α dans les CEG et les cellules myéloïdes du TGF, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un microenvironnement présentant un profil «tolérogénique/régulateur» dans le TGF des TS HESN. Conclusion : Nos observations nous ont permis d'élucider certaines hypothèses sur un potentiel mécanisme d'immunité naturelle protecteur chez les TS HESN. De plus, nous sommes des premiers à

décrire une population myéloïde présentant des caractéristiques de DC «tolérogéniques» de par leur expression d'interleukine (IL)-10, de *human leukocyte antigen* (HLA)-G et de *immunoglobulin-like transcript* (ILT)-4 dans le TGF de TS HESN. Cette étude aura des implications majeures dans le développement de stratégies d'interventions préventives afin de moduler des conditions inflammatoires préexistantes ainsi établissant une défense mucoale rapide et durable contre le VIH-1.

Mots-clés : HESN, VIH-1, immunité mucoale génitale innée et adaptative, microenvironnement tolérogénique/régulateur

Abstract

Background: Today, 35.3 million people live with human immunodeficiency virus (HIV)-1; and 70% of infections occur in sub-Saharan Africa, mostly through heterosexual intercourse and mainly affect women. The female genital tract (FGT) has a complex immune milieu that has to deal with invading pathogens while maintaining tolerance/control of the vagina microflora and being under the influence of sex hormones. Also, mechanisms favouring or preventing HIV infection of the FGT are not well identified. **Hypothesis:** The inflammatory environment and the outcome of crosstalk between epithelial genital cells (EGC) and the myeloid dendritic cells, which are of the first to encounter the virus at mucosal ports of entry, modulate lymphocytes activities that will be determinant in the type of immune response elaborated by the host. **Methods:** The samples obtained from women enrolled in a cohort of commercial sex workers (CSW) in Cotonou, Benin in sub-Saharan Africa were analyzed. We have characterized the female genital mucosal milieu of HIV-1 highly exposed seronegative (HESN) CSWs and have compared it with that of HIV-1 infected CSWs. Briefly, cervico-vaginal liquids were determined by multiplex/Luminex technologies or by ELISA and cells were described following flow cytometry analysis (phenotyping and cell sorting). **Results:** Our observations allow us to shed light on a potential natural immune protection mechanism in the HESN CSWs group. We have identified high levels of the antiviral, immunomodulatory and antiproliferative soluble cytokine interferon (IFN)- α in the FGT of the HESN CSWs group. The high levels of IFN- α at this site suggested the possible existence of critical cell crosstalks that would favour the control of the genital immune compartment in the restriction of HIV-1 infection. The study of molecules involved in IFN- α signaling pathways in the EGC and in myeloid cells, show the presence of a «tolerogenic/regulatory» microenvironment profile in the FGT of HESN CSWs. Furthermore, we have characterized for the first time a population of myeloid cells presenting features of «tolerogenic DC» in the FGT of HESN CSWs, and which express interleukin (IL)-10, human leukocyte antigen (HLA)-G and immunoglobulin-like transcript (ILT)-4. **Conclusion:** This study will have major impact on the development of preventive intervention strategies viewed to modulate preexisting inflammatory conditions, and establishing mucosal defence that will be held rapidly and will be long-lasting against the HIV-1 infection.

Keywords : HESN, HIV-1, innate and adaptive mucosal genital immunity, tolerogenic/regulatory microenvironment

Table des matières

Liste des Figures	viii
Liste des Abréviations	ix
Remerciements	xvii
Avant-propos	xix
Revue de la littérature	1
<i>1.1 Le virus du VIH</i>	<i>1</i>
1.1.1 Les origines.....	1
1.1.2 L'épidémiologie du VIH à l'échelle mondiale	4
1.1.3 L'organisation génomique et morphologique.....	5
1.1.3.1 Organisation génomique du VIH-1	6
1.1.3.2 Morphologie du VIH-1 mature.....	7
1.1.4 Le cycle répliatif	8
1.1.4.1 L'entrée (attachement, fusion, décapsidation) du VIH-1 dans la cellule	8
1.1.4.1.1 La fusion	8
1.1.4.1.2 L'endocytose	9
1.1.4.2 La transcription inverse	10
1.1.4.3 L'intégration.....	12
1.1.4.4 La transcription, l'épissage et la traduction.....	12
1.1.4.5 L'assemblage, le bourgeonnement et la libération des virions	13
1.1.5 La pathogénèse	14
1.1.5.1 La phase aiguë.....	15
1.1.5.2 La phase chronique.....	17
1.1.5.3 La phase SIDA	18
1.1.6 Les types de patients (progresseurs)	19
1.1.6.1 Progresseurs rapides	19
1.1.6.2 Non-progresseurs à long terme (LTNP).....	19
1.1.6.3 Élités contrôleurs (EC)	20
1.1.6.4 Hautement exposés séronégatifs (HESN)	21
1.1.6.5 Primates non humains : Hôtes naturels du VIS.....	21
1.1.7 Les traitements.....	23
1.1.8 Les modes de transmission	26
<i>1.2 L'hôte</i>	<i>28</i>

1.2.1	L'Anatomie et la physiologie du système génital féminin	28
1.2.1.1	Le tractus génital féminin.....	29
1.2.1.2	Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses génitales	29
1.2.2	Les hormones du cycle menstruel et le VIH-1	32
1.2.3	Les mécanismes d'invasion par le VIH-1 à la muqueuse génitale	36
1.2.3.1	Les mécanismes d'invasion par le VIH-1 : Les hypothèses.....	37
1.2.3.2	L'épithélium mucosal, les DC mucosales et le VIH-1	37
1.2.3.3	Les cellules NK mucosales et le VIH-1	39
1.2.3.4	Les lymphocytes B mucosaux et le VIH-1.....	40
1.2.3.5	Les lymphocytes T mucosaux et le VIH-1	40
1.2.3.6	L'importance des modèles d'études d'infection du VIH-1 à la muqueuse vaginale.....	41
1.2.3.7	La fenêtre de vulnérabilité virale.....	42
1.2.4	L'immunité mucosale : La tolérance	43
1.2.4.1	La tolérance centrale	44
1.2.4.1.1	Les lymphocytes B	44
1.2.4.1.2	Les lymphocytes T	44
1.2.4.2	La tolérance périphérique.....	45
1.2.4.2.1	Les lymphocytes B	45
1.2.4.2.2	Les lymphocytes T	46
1.2.4.3	HLA-G : Une molécule importante de la régulation immunitaire	47
1.2.4.3.1	D'autres molécules régulatrices primordiales	49
1.2.4.4	Les mécanismes de régulation immunitaire	50
1.2.4.4.1	Les DC «tolérogéniques»	51
1.2.4.4.2	Les cellules T régulatrices	52
1.2.4.4.3	Autres cellules régulatrices.....	53
1.2.4.5	La tolérance aux muqueuses orchestrée par les cellules myéloïdes.....	54
1.2.5	Les modes de prévention contre l'infection.....	57
1.2.5.1	La vaccination	57
1.2.5.2	Les microbicides.....	60
1.2.6	Les corrélats de protection établis	61
1.2.7	Les cohortes de HESN comme modèle de protection naturelle contre la transmission sexuelle du VIH-1	64
1.2.7.1	La cohorte béninoise	65
	Les hypothèses de recherche	67
	Les objectifs de recherche	68

1.3 <i>Objectif principal</i>	68
1.4 <i>Objectifs spécifiques</i>	68
Chapitre 2 (Article en préparation)	96
Chapitre 2 (Article en préparation)	97
La Discussion	127
Les conclusions	147
Les limites de l'étude.....	149
Les perspectives reliées à l'étude	150
Bibliographie	154
Annexes	xxii

Liste des Figures

Figure 1 : La prévalence de l'infection par le VIH (adultes de 15-49 ans) par région de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2013	4
Figure 2 : A) Organisation génomique du VIH-1 et B) Morphologie d'un virus mature	5
Figure 3. Le cycle répliatif du VIH-1.....	8
Figure 4. La pathogénèse de l'infection par le VIH	14
Figure 5. Épithélium du tractus génital féminin	28
Figure 6. Le cycle menstruel et l'immunité mucoale modifié.....	32
Figure 7. Modèle général de l'infection aiguë de la muqueuse cervico-vaginale par le VIH-1.....	36
Figure 8. Les isoformes de HLA-G produits suite à l'épissage alternatif du transcrit (ARNm) primaire.....	47
Figure 9. La boucle rétroactive de l'immunité innée et adaptative participe à la régulation des interactions bactériennes avec les surfaces mucoales.....	54
Figure 10. Distribution et fonction des DC dans la lamina propria intestinale	56
Figure 11. Représentation du microenvironnement «tolérogénique/régulateur» mucoal dans le TGF des TS VIH-1 HESN béninoises.....	144
Figure 12. Représentation du microenvironnement inflammatoire mucoal dans le TGF des TS infectées par le VIH-1 béninoises.....	145

Liste des Abréviations

ADCC antibody dependent cell cytotoxicity

ADN acide désoxyribonucléique

ADN CpG acide désoxyribonucléique cytosine polyguanine

AGM African Green Monkey

ARN acide ribonucléique

ARNsb ARN simple brin

ARNt ARN de transfert

APC Antigen presenting cells

APOBEC3G apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3G

AZT azidothymidine

Blys/BAFF B lymphocyte stimulator/B-cell activating factor

B2M beta-2-Microglobulin

Breg cellules B régulatrices

BST-2 bone marrow stromal cell antigen, tetherin

CA capsid protein

CCR5 CC-chemokine receptor 5

CCR6 CC-chemokine receptor 6

CCR5 delta32 CC-chemokine delta 32

CD1a cluster of differentiation 1a

CD1c cluster of differentiation 1c

CD3 cluster of differentiation 3

CD4 cluster of differentiation 4

CD8 cluster of differentiation 8

CD11c cluster of differentiation 11c

CD14 cluster of differentiation 14

CD16 cluster of differentiation 16

CD21 cluster of differentiation 21

CD25 cluster of differentiation 25

CD55 cluster of differentiation 55

CD63 cluster of differentiation 63
CD83 cluster of differentiation 83
CD103 cluster of differentiation 103
CDC Centers for Disease Control
CEG cellule épithéliale génitale
CRF circulating recombinant form
CTL cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL13 C-X-C chemokine ligand type 13
CXCR4 C-X-C chemokine receptor type 4
DC cellule dendritique
DC-SIGN Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin
DC-SIGNR Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin
receptor
DIST Dispensaire des Infections Sexuellement Transmissibles
dNTP deoxyribonucleotide
EC Élite contrôleurs
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
ENV enveloppe
ESCRT endosomal sorting complex required for transport
FOXP3 forkhead box P3
Gag group-specific antigen
Gal/Cer galactosylceramide
GALT gut associated lymphoid tissue
GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GML glycerol monolaurate
gp41 glycoprotein 41
gp120 glycoprotein 120
gp340 glycoprotein 340
HAART highly active anti-retroviral therapy
HESN HIV-1-exposed seronegatives

HIV-1 Human Immunodeficiency Virus type 1
HIV-2 Human Immunodeficiency Virus type 2
HLA-B*27 human leukocyte antigen-B*27
HLA-B*57 (Bw4) human leukocyte antigen-B*57 (Bw4)
HLA-B*58 :01 human leukocyte antigen-B*58 :01
HLA-C human leukocyte antigen-C
HLA-DR human leukocyte antigen-DR
HLA-E human leukocyte antigen-E
HLA-G human leukocyte antigen-G
HLA-G*0105N human leukocyte antigen-G*0105N
HSP 70 heat shock protein 70
HSV-2 Herpes simplex virus type 2
HTA Human transcriptome assay
ICAM-1 intercellular adhesion molecule 1
ICOS inducible T-cell costimulator
IDO indoleamine 2,3-dioxygenase
IgA immunoglobuline A
IgG immunoglobuline G
IFN α interferon-alpha
IFN β interferon-beta
IFN- ϵ interferon-epsilon
IFN- γ interferon-gamma
IL-1 interleukin 1
IL-6 interleukin 6
IL-10 interleukin 10
IL-12 interleukin 12
IL-22 interleukin 22
ILT2 immunoglobulin-like transcript 2
ILT3 immunoglobulin-like transcript 3
ILT4 immunoglobulin-like transcript 4
IN integrase

IRF-1 interferon regulatory factor-1
ISG 15 interferon stimulated-gene
IST infections sexuellement transmissibles
ITAM immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
iTreg induced T regulatory cells
iTreg 35 induced T regulatory cells 35
JAK/STAT Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
KIR killer immunoglobulin-like receptor
KIR2DL4 killer immunoglobulin-like receptor 2DL4
KIR3DL1 killer immunoglobulin-like receptor 3DL1
KIR3DS1 killer immunoglobulin-like receptor 3DS1
LFA-1 lymphocyte function-associated antigen-1
LGF, LEDGF/p75 lens epithelium-derived growth factor splice variant 75
LPS lipopolysaccharide
LTNP long-term-non-progressors
LTR long terminal repeat
LT- α lymphotoxine alpha
MA matrix protein
MALT mucosa-associated lymphoid tissue
MAMP microbial associated molecular pattern
mDC cellule dendritique myéloïde
MDSC myeloid-derived suppressor cells
MFI mean fluorescence intensity
MHC major histocompatibility class
MIP1 α macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP1 β macrophage inflammatory protein 1 beta
MIP-3 α macrophage inflammatory protein 3 alpha
mRNA messenger RNA
Mx2 myxovirus resistance protein 2

NC nucleocapsid protein
Nef Negative Regulatory Factor
NF- κ B nuclear factor kappa B
NK cell natural killer cell
NLM nodules lymphatiques mésentériques
NNRTI non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NRTI nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors
nTreg natural T regulatory cells
OAS 2'-5'-oligoadenylate synthase
ONUSIDA Organisation des Nations Unies Syndrôme de l'immunodéficience acquise
ORF open reading frame
PBMC peripheral blood mononuclear cells
PBS phosphate buffered saline
PCR polymerase chain reaction
PD-1 programmed cell death 1
pDC cellule dendritique plasmacytoïde
PE phycoerythrin
PerCP peridinin-chlorophyl protein
PIC pre-integration complex
Pol polymérase
PPT polypurine tracts
PR protease
PR55 Gag
PR160 Gag-Pol
PRR pathogen recognition receptor
P-Terb positive transcription elongation factor b
qPCR quantitative polymerase chain reaction
RANTES Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
Rev Regulator of Expression of Virion Proteins
RNA PolIII ribonucleic acid polymerase II
RT reverse transcriptase

RT-qPCR reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction
SAMHD1 sterile alpha motif- and metal-dependent phosphohydrolase
domain and HD domain-containing protein-1
SDF-1 stromal cell-derived factor-1
SIDA syndrome de l'immunodéficience acquise
SLPI secretory leukocyte protease inhibitor
SNP single nucleotide polymorphism
SRY Sex determining Region Y
SU surface
TAR Trans-Activation Response Element
Tat Trans-Activator of Transcription
TCR $\alpha\beta$ T cells receptor alpha beta
TCR $\gamma\delta$ T cells receptor gamma delta
TGF tractus génital féminin
TGF- β transforming growth factor beta
Th1 T helper cells type 1
Th3 T helper cells type 3
Th17 T helper cells type 17
TLR-7 Toll-like receptor-7
TLR-8 Toll-like receptor-8
TLR-9 Toll-like receptor-9
TM transmembrane
TNF- α tumor necrosis factor-alpha
Tr1 T regulatory cells type 1
Treg cellules T régulatrice
TRIM5 α tripartite motif 5alpha
TRIM 22 tripartite motif 22
TS travailleuse du sexe
Tsg 101 tumor susceptibility gene 101
TSLP thymic stromal lymphopoietin

UDI utilisateurs de drogues injectables
VHB virus de l'hépatite B
VHC virus de l'hépatite C
VHS-2 virus de l'herpès simplex-2
VIH-1 virus de l'immunodéficience humaine-1
VIH-2 virus de l'immunodéficience humaine-2
VIHC virus de l'immunodéficience humaine chimérique
Vif viral infectivity factor
VIS virus de l'immunodéficience simienne
VL viral load
Vpr viral protein R
Vpu viral protein U
Vpx viral protein X
WT wild type

*À maman Loulou, de qui j'ai hérité ce courage
et cette détermination, à Saradou et à Noélie
petite Loulou, à qui je m'efforce de transmettre
cet héritage à tous les jours au nom de la
liberté, l'autonomie, l'accomplissement.*

Je vous aime...

Remerciements

Je désire remercier toutes les personnes qui ont contribuées, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Par un support académique et/ou moral, toutes ces personnes m'ont aidé à accomplir mes études doctorales. D'abord un grand merci à toutes les participantes de l'étude «Immunité mucoale», à Cotonou, au Bénin, sans qui la réalisation de cette étude n'aurait jamais eu lieu. Merci à toute l'équipe (médecins, infirmières et techniciens (ennes) de laboratoire) qui nous a permis d'obtenir des échantillons aussi précieux. Je remercie mon directeur de recherche Dr Michel Roger pour m'avoir fait confiance et aussi pour son soutien et ses bons conseils. J'ai bénéficié d'une grande latitude pour poursuivre ce projet et j'en suis reconnaissante car cette expérience a été des plus enrichissantes et constructives favorisant l'évolution de mon cheminement académique et surtout l'apprentissage de la gestion de projets de recherche. Je remercie ma co-directrice de recherche Dre Johanne Poudrier, qui a été mon Mentor d'immunologie, ma guide et ma conseillère. Son soutien académique, moral et sa grande disponibilité et générosité autant à un niveau personnel que scientifique ont été fort appréciés tout au long de ces années de travail. Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'immunogénétique, spécifiquement à Josiane Geneviève et à Karine, avec qui j'ai partagé mon quotidien pendant une longue ou une courte période, qui m'ont fourni une aide morale et technique précieuse, et avec qui j'ai partagé des discussions scientifiques ou non enrichissantes, et plusieurs moments de rire... Merci aux stagiaires Stéphanie, Marion et Tina qui ont fait avancer le volet génétique de mon projet. Un grand merci aussi aux membres du laboratoire de Réjean Lapointe, spécialement à Dominique, Laïla (BFF de cuve d'azote), Cécile (BFF en général !), Alex et Pamela qui m'ont aidé d'un point de vue technique (au FACS) et morale. Je remercie de plus Dr Archambault pour ses dons de cellules C33A contribuant à la mise au point de mes premières expériences et Dre Grandvaux pour ses bons conseils en signalisation cellulaire. Dre Diane Provencher, Sylvain (BD), Martin (ebioscience), Éric (IRCM), Raphaëlle (IRIC) et Mohamed (ami) qui m'ont aussi fourni une aide et une disponibilité considérable. Enfin, je termine ces remerciements avec une mention spéciale à ma famille et mes amis (es) qui, tous les jours, depuis toujours, rendent ma vie valorisée, grandit, belle et riche : Mon père Gilles, sa conjointe Céline, ma sœur Nini (merci

de tes encouragements, je t'aime), mon beau-frère Sylvain, mon conjoint Jean-Christophe (merci de ton aide sans relâche depuis ces 4 dernières années), mes enfants Saradou et Noélie (merci de m'avoir donné la force d'accomplir mon rêve), mes amis (es) Pierrot, Coco, Marie et Alain, Charlotte et François, Bernard (promesse d'une bouteille de Cristal !) et Armelle, Nathalie et Stéphane et ma belle-famille française Josette, Germain, Jean-Lou et Gaëlle. Pour finir, merci à Nad (39 ans d'amitié !), Dan (27 ans d'amitié) et Caro (25 ans d'amitié) qui me font l'honneur d'une amitié fidèle, inébranlable et sans mesure.

Avant-propos

Un cas exceptionnel de dysfonctionnement du système immunitaire engendré par un pathogène est celui du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'infection par le VIH mène à une perte graduelle des compétences immunitaires (dérégulation, inflammation et activation chronique) permettant des infections par des organismes opportunistes et/ou la création de tumeurs malignes rares menant à la mort (1). Aujourd'hui, 35,3 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde. Ceci représente une augmentation par rapport aux années antérieures qui s'explique par un nombre croissant de gens infectés ayant accès à des thérapies antirétrovirales (ARV) ce qui amène une baisse de mortalité causée par le SIDA (1,6 millions de morts par rapport à 2,3 millions en 2005). En 2012, il y a eu 2,3 millions de nouvelles infections représentant une diminution de 33% depuis 2001 (2). Globalement, l'Afrique subsaharienne concentre 70% des nouvelles infections. Certaines initiatives sont prises dans le but de réduire les risques d'infections comme par exemple, augmenter le nombre de gens à tester, le nombre de gens à traiter, promouvoir la circoncision masculine volontaire, etc. Cependant, une diminution de l'usage du préservatif, une diminution de l'âge des premières relations sexuelles et une augmentation du nombre de partenaires sont des facteurs qui augmentent les risques d'infections. L'ONUSIDA estime à 54% le nombre de gens en Afrique subsaharienne (2) qui ignorent leur séropositivité comparé à environ 20% au Canada/États-Unis (3).

Le mode de transmission du VIH le plus répandu est par voie mucosale génitale suite à des relations sexuelles (1/200 à 1/2000 relation à risque). En Afrique subsaharienne, plus de la moitié des nouvelles infections surviennent chez les femmes. Elles sont plus vulnérables dû à plusieurs facteurs par exemple, la maltraitance et la violence sexistes, le manque d'éducation, les difficultés financières, l'accès limité aux médicaments, etc. Il y a de plus un fort taux de travail du sexe en Afrique occidentale et la prévalence du VIH chez les travailleuses du sexe (population vulnérable) est de 37%; ces femmes ayant environ quatorze fois plus de risques d'infections que les femmes de la population générale (2). Seulement une faible proportion de la population d'Afrique subsaharienne a accès aux ARV (2) et bien que ces traitements soient de plus en plus efficaces, ils démontrent un niveau de toxicité élevé, exigent une adhérence complète et ne réussissent pas à éradiquer complètement les réservoirs viraux.

La venue de méthodes préventives (vaccins et/ou microbicides) fiables et efficaces est incontournable dans la conquête vers l'éradication du VIH. Afin de résoudre ce défi délicat, complexe et d'importance capitale pour la santé publique mondiale, il est primordial d'étudier et de comprendre les facteurs clés (immunologiques et génétiques) de l'hôte restreignant ou favorisant l'infection mucoale génitale par le VIH, ce qui favorisera l'élaboration de stratégies préventives efficaces.

Le tractus génital féminin (TGF) possède un milieu immunitaire complexe qui doit composer avec des facteurs tels que la tolérance/contrôle de la flore normale vaginale et la pression de procréation sous influence des hormones sexuelles. Ces facteurs doivent être pris en considération afin de pouvoir mieux comprendre les réactions immunitaires du TGF envers un envahisseur tel que le VIH-1. Aussi, le contexte inflammatoire environnant et la résultante de dialogues intercellulaires impliquant des populations qui échantillonnent l'espace luminale du TGF, telles que les cellules épithéliales génitales (CEG) et les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) orchestrant/modulant l'activité et le recrutement des leucocytes sur le site seront déterminants dans le type de réponse élaborée par l'hôte.

Dans le cadre de cette étude, nous avons eu la chance de travailler avec des spécimens provenant d'une cohorte de travailleuses du sexe (TS) recrutées à Cotonou au Bénin en Afrique subsaharienne. Nous avons caractérisé le milieu mucosal génital féminin hautement exposé au VIH de TS séronégatives (*highly exposed seronegative*; HESN) et l'avons comparé avec celui de TS séropositives. La caractérisation complète du milieu mucosal génital de femmes non TS de la population générale de Cotonou est à venir et sera aussi comparée aux deux premiers groupes à l'étude. Jusqu'à maintenant, nos observations nous ont permis d'élaborer certaines hypothèses prometteuses sur un mécanisme potentiel de protection chez les TS négatives, qui sont un excellent modèle naturel d'immunité mucoale génitale contre le VIH-1.

À l'aide de cette cohorte, nous avons pu identifier la présence augmentée d'un facteur soluble majeur sécrété dans le TGF des femmes HESN qui est l'interféron-alpha (IFN- α). La présence augmentée de cette cytokine antivirale, immunomodulatrice et antiproliférative de l'immunité innée nous a mis sur la piste de l'existence possible de connexions intercellulaires clés qui pourraient mener à une régulation homéostatique du compartiment immunitaire génital. Ce maintien naturel de l'homéostasie du milieu génital pourrait être un déterminant majeur du

contrôle de l'infection par le VIH. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude d'une voie de signalisation menant à la production d'IFN- α dans les CEG et les mDC du TGF, ces cellules étant les premières à rencontrer le virus à la porte d'entrée mucosale vaginale. En étudiant les paramètres reliés au dialogue intercellulaire génital chez ces mêmes femmes, nous avons aussi observé l'existence d'un microenvironnement présentant un profil de type «tolérogénique/régulateur» par la présence d'IL-10, de *human leukocyte antigen* (HLA)-G et de *immunoglobulin-like transcript* (ILT)-4 dans une sous-population de mDC.

Cette étude aura des implications majeures dans la mise au point d'interventions efficaces et sera déterminante dans le développement de stratégies pour moduler des conditions inflammatoires préexistantes, ainsi établissant une défense mucosale de première ligne, rapide et durable contre le VIH-1.

Avant d'aborder le travail de recherche, le virus du VIH sera présenté sous les aspects de son origine, de sa structure et de son cycle répliatif, de sa pathogénèse, des traitements visant à l'éradiquer, du profil des individus infectés, des différents types de progression de l'infection et des modes de transmission. Par la suite, les facteurs de l'hôte tels que l'anatomie, la physiologie et l'immunité (innée, adaptative) du TGF et les facteurs génétiques seront traités. Puis, seront évoqués les corrélats de protections établis, les avenues thérapeutiques et préventives pour terminer avec les hypothèses et objectifs du projet de recherche. Les résultats seront présentés sous forme d'articles et démontreront l'existence d'un microenvironnement antiviral efficace et à profil «tolérogénique/régulateur» possiblement initié suite au dialogue intercellulaire de première ligne dans le TGF des femmes TS HESN. Pour finir, nous terminerons par une discussion de ces résultats, une conclusion et les perspectives d'études reliées à ce projet de recherche.

Revue de la littérature

1.1 Le virus du VIH

1.1.1 Les origines

La maladie connue aujourd'hui sous le nom de syndrome d'immunodéficience humaine acquise (SIDA) a été rapportée par les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dans la littérature médicale pour la première fois aux États-Unis en 1981. Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine)-1 a été identifié comme étant l'agent étiologique du SIDA et observé au microscope électronique pour la première fois en 1983 par l'équipe de recherche des docteurs Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier, à l'Institut Pasteur de Paris, qui se sont tous deux mérités le Prix Nobel de Médecine en 2008 (4). Trois ans plus tard, le VIH-2 a été trouvé morphologiquement similaire mais antigéniquement distinct du VIH-1. Le VIH-2 est moins virulent et est endémique en Afrique de l'Ouest (5). Le VIH-1 est très virulent et est responsable de la pandémie mondiale (plus haut niveau épidémique en 1996-1997). Par la suite, le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) a été découvert dans différents primates non-humains vivant en Afrique subsaharienne. Les singes de l'ancien monde (Singes verts d'Afrique, Sooty Mangabeys, Mandrilles et Chimpanzés) et d'autres qui peuplent essentiellement l'Afrique et l'Asie sont naturellement infectés par le VIS (infection non-pathogénique), par opposition aux singes du Nouveau Monde (Macaques), que l'on trouve en Amérique du Sud et en Amérique centrale qui sont infectés par le VIS et développent la maladie du SIDA (infection pathogénique) (1). Étrangement, les VIS non-pathogéniques pour leurs hôtes naturels sont phylogénétiquement reliés avec le virus humain. Le VIH-1 tient son origine du VIS du chimpanzé et du VIS du gorille retrouvés dans la forêt équatoriale du Cameroun (1, 6). Dernièrement, une étude critique et convainquante sur les origines du VIH-1, utilisant des approches statistiques appliquées à des données sur les séquences nucléotidiques de souches de VIH-1 provenant de l'Afrique centrale, a démontré que les premières transmissions zoonotiques du VIS à l'Homme (VIH-1) ont bien eu lieu au Cameroun en 1916 suite à des activités de chasse (7). Dans cette étude, il est aussi révélé que le foyer des premières transmissions d'Homme à Homme ont eu lieu à Kinshasa (capitale de la

République Démocratique du Congo) en 1920 et que cette même ville serait la source de la pandémie virale survenue dans les pays africains voisins vers 1960 (période de l'Indépendance du Congo et de l'urbanisation). Suite à cette période de grands bouleversements, il y eut établissement de la pandémie au sein de groupes d'individus à hauts risques comme chez les travailleuses du sexe (plusieurs partenaires sexuels, augmentation des infections sexuellement transmissibles et injections intraveineuses non-stériles). Une combinaison de circonstances durant une fenêtre spatiale et socio-historique particulière a permis l'établissement, la dissémination et la croissance épidémique de la pandémie par le VIH-1 du groupe M (7).

Comme chez l'humain, quelques espèces de macaques asiatiques ont développé le SIDA suite à une infection par le VIS des Sootys Mangabey (hôtes naturels) devenu le VISmac (8, 9). Cette observation a démontré le potentiel pathogénique de souches virales après transmission inter-espèces. De plus, le VISmac est devenu un excellent modèle expérimental par lequel les facteurs de l'hôte et viraux ont pu être étudiés indépendamment (10).

Le VIH-2, pour sa part, proviendrait de la souche de VISsm de Côte d'Ivoire et aurait infecté l'homme à partir de 1932 (5). Le VIH-1 fait preuve d'une grande variabilité génétique et est classifié selon sa séquence nucléotidique en quatre grands groupes : M (major), O (outlier), N (non M et non O) et P (représentant 0,06% des infections par le VIH-1 (11)). Le groupe M prédomine et est responsable de 90% de la pandémie du SIDA. Il existe aussi plusieurs sous-groupes (clades) du groupe M: A-D, F, G, H, J et K et des formes recombinantes circulantes (CRF). L'épidémie en Afrique subsaharienne est principalement causée par les clades C (lequel serait originaire de Mbuji-Mayi vers 1960 (7)), A et CRF02_AG qui représente environ 75% des nouvelles infections chaque jour. En Amérique du nord, en Europe et en Australie, le clade B (lequel serait originaire du Kinshasa en 1944 et disséminé à Haïti en 1964 lors du retour de travailleurs du Congo (7)) prédomine et a été le premier à être identifié en 1983 (1, 12).

Le VIH et le SIV doivent interagir avec un grand nombre de protéines de l'hôte pour réussir à se répliquer dans les cellules infectées (13). De ce fait, les primates (incluant les humains) encodent un grand nombre de facteurs de restriction antiviraux (produits suite à l'induction des interférons (IFN) de type-I, faisant partie de la réponse immunitaire innée contre une grande variété de pathogènes (14) (réf. section 1.1.3). Cette forte pression sélective de l'hôte a

forcé le VIH-1 à s'adapter, au cours du temps, pour survivre à ces facteurs de restriction viraux. Le virus a dû subir de multiples variations génétiques dans le but de pouvoir échapper aux mécanismes immunitaires de l'hôte (1, 7, 12). Trois classes de facteurs de restriction ont constitué une barrière à la transmission inter espèces du VIS et du VIH-1; ces facteurs étant d'actualité pour contrer l'infection par le VIH-1: 1- APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G), qui interfère avec la transcriptase inverse (15); 2- TRIM5 α (tripartite motif 5a protein), qui interfère avec le phénomène de décapsidation (chez le singe) (16) et 3- tétherine (aussi nommé BST-2 et CD317) qui inhibe le bourgeonnement et la relâche des virions des cellules infectées (17). Cependant, pour contrer les facteurs de restriction viraux, comme mécanismes d'évasion immunitaire, le VIH-1 utilise sa protéine accessoire Vif pour dégrader APOBEC3G (18-20), ses protéines Vpu, Env et Nef pour dégrader la tétherine (18, 20, 21) et TRIM5 α n'est pas contrecarrée par une protéine accessoire virale car cette protéine possède une mutation chez l'humain qui la rend inactive contre le VIH-1, elle sert plutôt de récepteur reconnaissant des patrons moléculaires conservés (*patterns recognition receptors*; PRR). Par contre, il est à noter que chez l'humain, certains polymorphismes (*single-nucleotide polymorphism*; SNP) R332 et R335 dans le domaine B.30.2 rendent TRIM5 α très efficace pour restreindre l'infection par le VIH (14, 16, 20, 22). Par conséquent, il s'avère que ces mutations pourraient être utilisées en thérapie génique pour le traitement de l'infection par le VIH (réf. section 1.1.3). D'ailleurs, vers 1960, l'évolution génétique du VIH-1 groupe M vers l'acquisition du gène *Vpu* lui a permis d'être responsable de la pandémie vs le VIH-1 groupe O qui, étant susceptible au facteur de restriction viral tétherine s'est trouvé confiné à une dissémination locale africaine (7).

Dans la population hautement exposée au VIH-1, il y a des individus ayant une susceptibilité accrue ou ayant une capacité à contrôler l'infection, qui progressent rapidement ou lentement vers la phase SIDA ou qui sont hautement exposés au virus mais qui ne deviennent pas infectés (23-25). Des méta-analyses de cohortes infectées par le VIH-1 ont révélé la présence de variants polymorphiques dans des loci affectant l'entrée virale, des processus critiques à la réplication intracellulaire de lentivirions et aussi des réponses de l'hôte innées et spécialement des réponses adaptatives spécifiques (26, 27). Plusieurs autres facteurs de restriction viraux,

mécanismes d'évasion immunitaires et variants polymorphiques de l'hôte limitant l'infection par le VIH-1 existent et feront l'objet de chapitres ultérieurs.

1.1.2 L'épidémiologie du VIH à l'échelle mondiale

Globalement, on estime à 35,3 (32,2–38,8) million de personnes vivant avec le VIH, en 2012. Ceci représente une augmentation par rapport aux années précédentes étant donné que plus de gens ont accès à des traitements ARV qui prolongent leur vie. Pour ce qui est des nouvelles infections, elles sont estimées à 2,3 (1,9–2,7) million à travers le monde, montrant une baisse de 33% par rapport à 2001. De plus, la mortalité attribuée au SIDA est en diminution avec 1,6 (1,4–1,9) million de morts en 2012 comparée à 2,3 (2,1–2,6) million en 2005 (2).

En 2012, la prévalence du SIDA, dans le monde, est évaluée à 0,8% en moyenne. La prévalence pour l'Amérique du Nord est estimée à 0,1% comparée à celle pour l'Afrique subsaharienne qui est estimée à 4,7% (23% pour le Botswana) qui reste la région du monde la plus dévastée par l'infection par le VIH (2) (réf. figure 1).

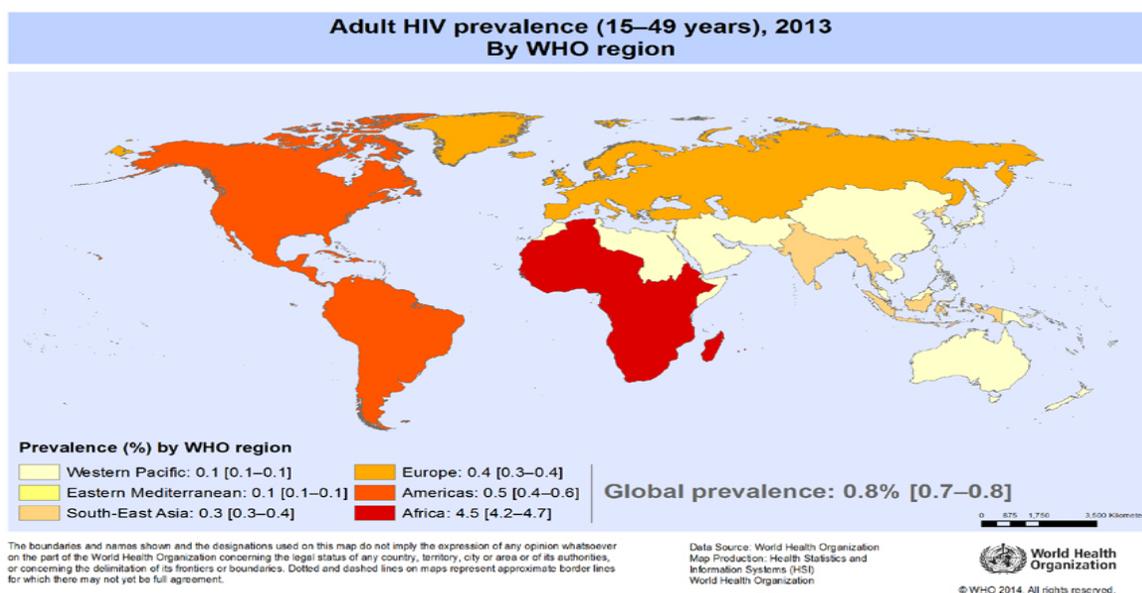


Figure 1 : La prévalence de l'infection par le VIH (adultes de 15-49 ans) par région de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2013

Tiré de : World Health Organization : Health Statistics and Information System, 2013

1.1.3 L'organisation génomique et morphologique

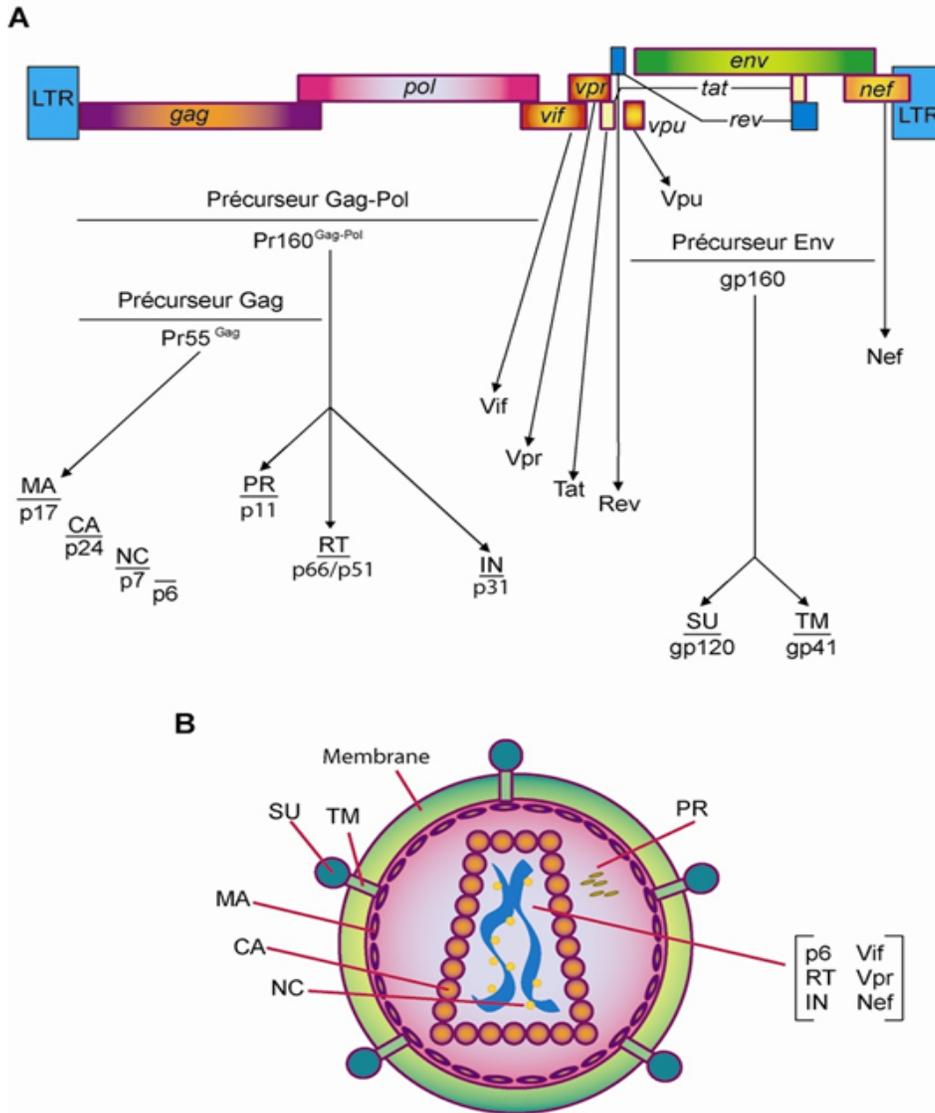


Figure 2 : A) Organisation génomique du VIH-1 et B) Morphologie d'un virus mature

Tiré de : Annual Review of Biochemistry, Vol. 67: 1-25, 1998 (28)

SU (protéine de surface ou gp120), TM (protéine transmembranaire ou gp41), MA (matrice ou p17), CA (capside ou p24), NC (nucléocapside ou p7), PR (protéase), IN (intégrase), RT

(transcriptase inverse), Vif (*Viral infectivity factor*), Vpr (*Viral protein R*), Nef (*Negative factor*).

1.1.3.1 Organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 est un virus groupe VI à ARNs_b (simple-brin) de la famille des *retroviridae* du genre *lentiviridae* (se caractérisant par une longue période d'incubation avec une évolution lente de la maladie). Ce virus icosaédrique a un diamètre moyen de 145 nm (29). Le génome rétroviral est constitué de deux copies d'ARN simple brin de polarité inverse de 9181 nucléotides et possède neuf cadres de lecture ouverts (*Open Reading Frames*, ORFs). Trois de ces cadres de lecture codent pour les polyprotéines Gag, Gag-Pol et Env, qui sont par la suite clivées individuellement en protéines. Premièrement, le précurseur Env (ou gp160) génère les deux protéines qui forment l'enveloppe virale: la protéine de surface SU (ou la gp120), responsable de l'attachement du virus aux récepteurs CD4 et CXCR4 ou CCR5 de la cellule hôte, et la protéine transmembranaire TM (ou la gp41), responsable de l'initiation de la fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire (30). Deuxièmement, outre la kinase p6 qui intervient dans les interactions membranaires entre le virus et la cellule hôte qui sont importantes dans la formation d'un virus infectieux lors du bourgeonnement (31), le précurseur de 55 kDa Gag (Pr55^{Gag}), produit les protéines structurales de la matrice (MA ou p17) qui ont pour fonction principale de diriger l'assemblage viral à la membrane plasmique (32). De plus, Gag produit la capside (CA ou p24) et de la nucléocapside (NC ou p7) qui ont pour fonction de protéger les acides nucléiques viraux (33). Troisièmement, le clivage de la polyprotéine Gag-Pol (Pr160^{Gag-pol}) génère la protéase (PR ou p12) qui a une activité catalytique critique dans les étapes de maturation et de bourgeonnement viral, l'intégrase (IN ou p32), une enzyme nécessaire à l'insertion de l'ADN viral à l'ADN hôte et la transcriptase inverse (*Reverse transcriptase*, RT ou p66/p51) qui est responsable de la conversion de l'ARN génomique viral en ADN double brin linéaire (33). Ces trois enzymes sont la cible principale des traitements ARV, car elles sont spécifiques aux rétrovirus. D'autre part, les six autres cadres de lecture produisent les protéines suivantes: Tat (*Transactivator of transcription*) et Rev (*Regulator of viral expression*) qui assurent entre autre des fonctions de régulation génique pré-transcriptionnelle et post-transcriptionnelle respectivement (34, 35), Vpu (*Viral protein U*), responsable de l'assemblage viral et de contrer le facteur de l'hôte tétherine (17),

Vif (*Viral infectivity factor*), qui neutralise le facteur de l'hôte APOBEC3 (36), Vpr (*Viral protein R*) et Nef (*Negative factor*) qui possèdent un grand nombre de fonctions contre divers facteurs antiviraux de l'hôte (37, 38). Les gènes *tat* et *rev* codent pour des protéines virales régulatrices qui sont indispensables à la réplication virale. Par contre, les gènes *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* codent pour des protéines accessoires puisque leur expression n'est généralement pas essentielle à la réplication du VIH-1 *in vitro*. Ces protéines auxiliaires demeurent toutefois requises pour la réplication virale et la pathogenèse *in vivo*. Notons que le VIH-2 et le VISmac ne possèdent pas le gène *vpu* mais le gène *vpx* (28, 34, 39-41) (réf. figure 2).

1.1.3.2 Morphologie du VIH-1 mature

Le VIH-1 est un virus enveloppé. Cette enveloppe est composée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte. À la surface des virions, on retrouve la glycoprotéine gp120 qui est attachée de façon non covalente à la protéine virale transmembranaire gp41 formant des trimères (29). La bicouche lipidique contient aussi plusieurs protéines d'origine cellulaire telles que l'ICAM-1, le LFA-1, le CD63, le CD55 et l'HLA-DR (42). Sous la bicouche lipidique, on retrouve environ 2000 copies de la protéine de la matrice. La capside de forme conique est située au centre du virus et est constituée d'environ 2000 copies de la protéine p24. Elle englobe les deux brins d'ARN du génome viral stabilisés par la présence de la nucléocapside. La protéine p6, les protéines IN, PR et RT de même que les protéines accessoires, Vpr, Vif et Nef, sont aussi retrouvées dans le virion, alors que le Vpu, le Tat et le Rev ne le seraient pas (28). Outre les protéines virales, on retrouve aussi dans la particule virale des molécules d'origine cellulaire dont l'actine, l'ARNt synthétase, la cyclophiline A, le Tsg101, l'APOBEC3G et le HSP70 (*Heat shock protein*) (42, 43) (réf. figure 2).

1.1.4 Le cycle réplcatif

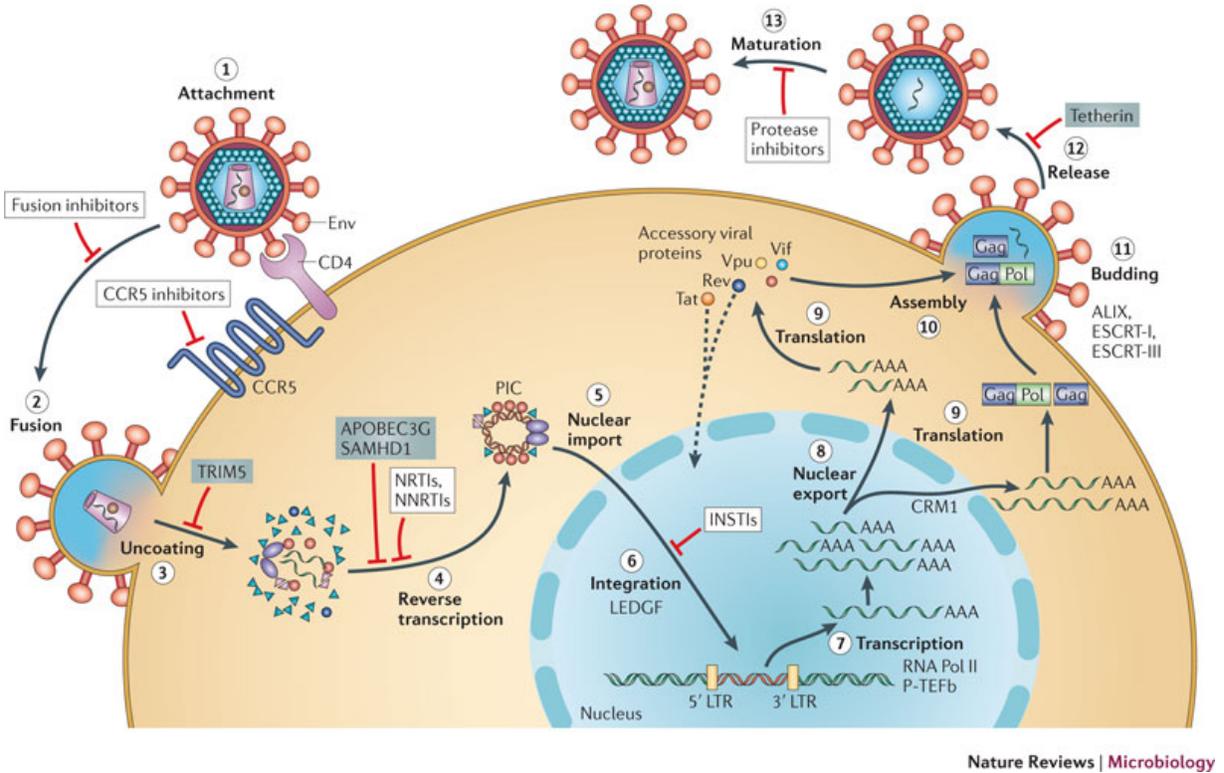


Figure 3. Le cycle réplcatif du VIH-1

Tiré de : Alan Engelman & Peter Cherepanov *Nature Reviews Microbiology* 10, 279-290 (April 2012) (33)

1.1.4.1 L'entrée (attachement, fusion, décapsidation) du VIH-1 dans la cellule

1.1.4.1.1 La fusion

L'entrée classique du virus dans la cellule cible est caractérisée par l'adsorption de la particule virale à la surface cellulaire. Tout d'abord, la glycoprotéine de surface du VIH-1, la gp120, s'attache à la molécule CD4 de la cellule cible. La molécule CD4 est principalement présente sur les lymphocytes T auxiliaires, thymocytes, les macrophages, les DC et les cellules microgliales du cerveau (33, 44). Suite à cet attachement, la gp120 et le récepteur CD4 subissent des changements conformationnels permettant à la gp120 le recrutement d'un corécepteur de surface se trouvant près du CD4. Environ une dizaine de corécepteurs ont été identifiés, mais les principaux sont le récepteur de chimiokines CC de type 5 (CCR5) (utilisés

en début d'infection) et le récepteur de chimiokines CXC de type 4 (CXCR4) (en phase tardive de l'infection) (réf. figure 3) (45).

Ces changements de conformation séquentiels mènent à terme à la dissociation de la gp120 de la gp41 et provoquent l'exposition de l'ectodomaine de la gp41 au corécepteur, puis la transition de la gp41 à sa forme fusogénique. La gp41 se replie sur elle-même, attire l'enveloppe virale vers la membrane cytoplasmique, puis la fusion des membranes cellulaire et virale se produit grâce à un peptide de fusion dans la gp41. La capsid du VIH-1 pénètre dans le cytoplasme de la cellule hôte. La capsid se désagrège, libérant les deux brins d'ARN et les enzymes viraux (33, 46) (réf. figure 3).

Il est reconnu que les lymphocytes T CD4⁺ sont la cible privilégiée de l'infection à VIH-1. Cependant, de nombreux autres types cellulaires, aussi bien hématopoïétiques que non hématopoïétiques jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de ce rétrovirus et l'infection de ces cellules ne suit pas toujours le mécanisme établi pour les cellules T CD4⁺ (47-54).

1.1.4.1.2 L'endocytose

L'endocytose, est un mécanisme d'entrée cellulaire par lequel un ligand lie spécifiquement un récepteur exposé à la surface cellulaire. Ce complexe ligand-récepteur se retrouve internalisé dans des vésicules primaires. Ce mécanisme d'entrée du VIH-1 est différent de celui de la fusion qui nécessite la présence du récepteur cellulaire CD4. L'endocytose implique des récepteurs cellulaires qui détectent la présence de matériel viral (récepteurs cytosoliques *versus* récepteurs endosomaux) qui peuvent utiliser des voies différentes de signalisation menant à l'induction des IFN-I (55) (réf. section 1.2.3.2). En effet, l'endocytose permet dans certains types cellulaires : l'entrée du virus menant à l'infection productive d'une cellule cible, le transport trans-cellulaire (i.e. la transcytose) et/ou l'infection en *trans* d'une cellule cible (56, 57).

On sait que dans les cellules déficientes en CD4 et/ou CCR5/CXCR4, l'enveloppe virale se lie à d'autres récepteurs exprimés à la surface cellulaire. On pense que ceux-ci pourraient pallier, à divers degrés, l'absence des molécules requises pour l'entrée du virus et, ainsi permettre une certaine infection. Les CEG par exemple, n'ayant pas le récepteur CD4, le virus du VIH-1 doit alors utiliser un mécanisme non-conventionnel pour traverser l'épithélium génital. Spécifiquement, les galactosylcéramides (Gal/Cer) (58), les molécules d'adhésion cellulaire

telles que ICAM-1 et LFA-1 (59, 60), les lectines de type C (DC-SIGN, DC-SIGNR), les langérines, les récepteurs de mannose (47, 61-63), la gp 340 (exprimée sur les CEG) (64) et les protéoglycannes (syndecan-1 et -2) (51) ont tous démontré la capacité à favoriser l'attachement et/ou l'entrée du VIH-1 dans des cellules (épithéliales ou DC). De surcroît, à la muqueuse intestinale, il a été démontré que la gp120 de l'enveloppe du VIH-1 se lie à l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sur les cellules T CD4+. L'interaction gp120- $\alpha 4\beta 7$ induit l'activation de l'intégrine LFA-1 ; cette intégrine facilite la formation de la synapse virologique et donc la *trans*-infection du VIH-1 (65-67). De plus, outre les interactions directes entre l'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires, des molécules de l'hôte acquises par le VIH-1 interagissent avec leurs ligands présents à la surface d'une cellule cible, favorisant ainsi les étapes précoces de son cycle répliatif. De telles interactions ont des conséquences importantes sur le cycle viral du VIH-1. A titre d'exemples, la présence de molécules de l'hôte comme HLA-DR, CMH classe I et ICAM-I (CD54) à la surface du VIH-1 peut : réduire la neutralisation du VIH-1 par des anticorps et sa destruction par le complément, induire une signalisation à la surface d'une cellule cible, et augmenter la cinétique et l'efficacité d'entrée du VIH-1 à partir du CD4 et du corécepteur CXCR4 ou CCR5 sur cette dite cellule (42).

À cette étape, le facteur de restriction TRIM5 α agit en engageant une décapsidation hâtive chez le singe. Chez l'humain, il agit comme PRR et induit l'activation de NF κ B alors il n'est pas contrecarré par une protéine accessoire virale. Il possède cependant une mutation chez l'humain qui le rend actif contre le VIH-1 (SNP R332Q dans le domaine B.30.2) et d'autres membres de la même famille semble aussi efficace comme TRIM 22 (réf. figure 3) (16, 20, 68).

1.1.4.2 La transcription inverse

Cette étape est spécifique aux rétrovirus. La transcriptase inverse, une ADN polymérase ARN-dépendante associée à l'ARN viral dans la nucléocapside, parcourt l'ARN viral et le rétro-transcrit en une molécule d'ADN simple brin (-). Pendant cette synthèse, l'ARN matrice est dégradé par une activité ribonucléase H portée par la transcriptase inverse sauf pour deux courtes séquences riches en purines appelées PPT (polypurine tracts). Ces PPT servent d'amorces à la transcriptase inverse pour la synthèse du second brin d'ADN (+).

Il a été décrit qu'une exonucléase cytoplasmique hôte nommée TREX1 a la capacité de favoriser la réplication du VIH-1 en aidant le virus à échapper à la réponse immunitaire innée en digérant les transcrits produits par l'étape de rétrotranscription qui ne seront pas importés dans le noyau de la cellule ; transcrits qui auraient autrement déclenchés la réponse innée et stimulés la production des IFN-I (69).

L'ADN double-brin est maintenant formé et fait partie d'un complexe de pré-intégration (PIC). Il est à noter que la transcriptase inverse est dépourvue de mécanisme de réparation de l'ADN formé alors elle est responsable de nombreuses erreurs qui ont lieu lors de la rétrotranscription expliquant la très grande variabilité génétique du VIH-1. Cette forte diversification des virus mène à la génération de quasi-espèces, ce phénomène s'amplifie à mesure que l'infection progresse (réf. figure 3).

Le PIC est composé de l'ADN viral, de l'intégrase et de deux séquences particulières LTR (*long terminal repeat*) à chaque extrémité et l'intégrase. En 5' le LTR est un promoteur puissant de la transcription et en 3' le LTR fournit le signal de coupure qui précède la polyadénylation. C'est aussi un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire à proximité (33, 70).

À cette étape, APOBEC 3 (*mRNA editing enzyme*), ciblée par Vif (dégradation par le protéasome), est une cytidine déaminase qui mute un C (cytosine) pour un U (uracil) dans le brin négatif de l'ADN complémentaire augmentant la probabilité d'un STOP codon ou de protéines non fonctionnelles. Si APOBEC3G n'est pas dégradée, cette enzyme de l'hôte est intégrée dans le nouveau virion formé et bloque la réplication du VIH dans une nouvelle cellule infectée (réf. figure 3) (19, 20, 71).

Le facteur SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*) ciblé par Vpx de VIH-2 (dégradation par le protéasome), n'est pas contrecarré par le VIH-1 et se trouve plus particulièrement dans des cellules myéloïdes différenciées. Ce facteur de restriction inhibe la transcription inverse, réduisant la concentration de dNTP (désoxyribonucléotides) dans ces cellules qui en ont moins créant un milieu non favorable à la synthèse de l'ADN virale. C'est une raison pour laquelle les mDC ne sont pas infectables facilement par le VIH-1 (réf. figure 3) (40).

1.1.4.3 L'intégration

Le PIC, formé aussi de protéines de l'hôte, est transporté activement par les microtubules de la cellule jusqu'au noyau. À la membrane du noyau, le PIC favorise le passage du double brin linéaire d'ADN viral dans les pores du noyau où l'intégrase virale, de concert avec une protéine liée à la chromatine hôte LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*), permet son intégration dans une région transcriptionnellement active de l'ADN cellulaire. Les LTR flanquent les extrémités de l'ADN viral linéaire et conduisent l'insertion de celui-ci dans l'ADN de l'hôte permettant ainsi à l'ADN proviral d'être transcrit en ARNm en utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte. L'intégration dans le génome cellulaire permet au provirus de rester latent dans certains types cellulaires lui permettant d'évader le système immunitaire de l'hôte (réf. figure 3) (33, 72).

1.1.4.4 La transcription, l'épissage et la traduction

La transcription provirale est induite par l'ARN polymérase II (*RNA Pol II*) cellulaire. La formation d'une boucle en épingle à cheveux par le facteur TAR (*transcription elongation factor*) à l'extrémité 5' du brin naissant d'ARN crée un site de liaison pour la protéine régulatrice virale Tat qui recrute efficacement l'ARN polymérase II et le facteur P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*).

L'ARNm viral obtenu (introns et exons) passe par une série de modifications post-transcriptionnelles avec la participation de Rev qui effectue l'épissage alternatif. Différentes tailles d'ARNm sont produits et les plus longs requièrent la protéine d'exportation énergie-dépendante CRM1 (*chromosome region maintenance*) de l'hôte. La traduction a lieu dans le cytoplasme cellulaire. Trois types d'ARN viraux sont exportés au cytoplasme : 1- l'ARN génomique non-épissé génère les précurseurs Gag et Pol, 2- l'ARN partiellement épissé sera traduit en Vif, Vpr et Env et 3- l'ARN épissé totalement ou à plusieurs reprises sera traduit en Tat, Rev et Vpu et Nef. Tat et Rev étant des protéines régulatrices primordiales pour le virus sont exprimées très tôt dans le cycle réplcatif permettant l'expression, dans un deuxième temps, des autres protéines du VIH-1. Les protéines structurales du VIH-1 sont synthétisées en tant que précurseurs polypeptidiques (réf. figure 3) (33, 41, 73).

1.1.4.5 L'assemblage, le bourgeonnement et la libération des virions

Les polypeptides formés ne sont pas fonctionnels, ils doivent subir une maturation dans l'appareil de Golgi. Les protéines de structure virales sont produites sous forme de polyprécurseurs Gag (matrice, capsid et nucléocapsid). Les enzymes virales sont aussi produites sous forme de polyprotéines appelées Gag-Pol (matrice, capsid, nucléocapsid, réverse transcriptase, intégrase et protéase). Suite à la sortie du Golgi, les polyprotéines Gag et Gag-Pol migrent à la membrane plasmique où elles rejoignent les glycoprotéines virales membranaires (gp 120 et gp41) qui, au préalable, ont subi une glycosylation avant de sortir du Golgi (précurseur gp160) et ont été clivées par une protéase cellulaire. Les domaines MA (matrice) interagissent avec la membrane et les ARN génomiques viraux sont capturés par les domaines NC (nucléocapsid). Des interactions entre les domaines de Gag (les capsides) permettent l'assemblage d'une structure globulaire formant une particule virale par bourgeonnement de la membrane cellulaire sur laquelle sont fixées les protéines virales de surface la gp120 et la gp41.

Le bourgeonnement et la libération des particules virales sont médiés par les complexes protéiques cellulaires ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) et sont suivis de la maturation par les protéases virales pour créer une particule virale infectieuse (33, 41, 73). Chaque étape dans le cycle de réplication du VIH-1 est une cible potentielle d'intervention antivirale.

À cette étape, le facteur de restriction tétherine (BST-2/CD317) inhibe l'étape du bourgeonnement viral. Cependant, ce facteur de l'hôte est ciblé par Vpu, Env et Nef du VIH-1, prévenant ainsi l'incorporation de BST-2 dans le virion en diminuant son expression et en facilitant sa dégradation dans le protéasome (réf. figure 3) (21, 74).

1.1.5 La pathogénèse

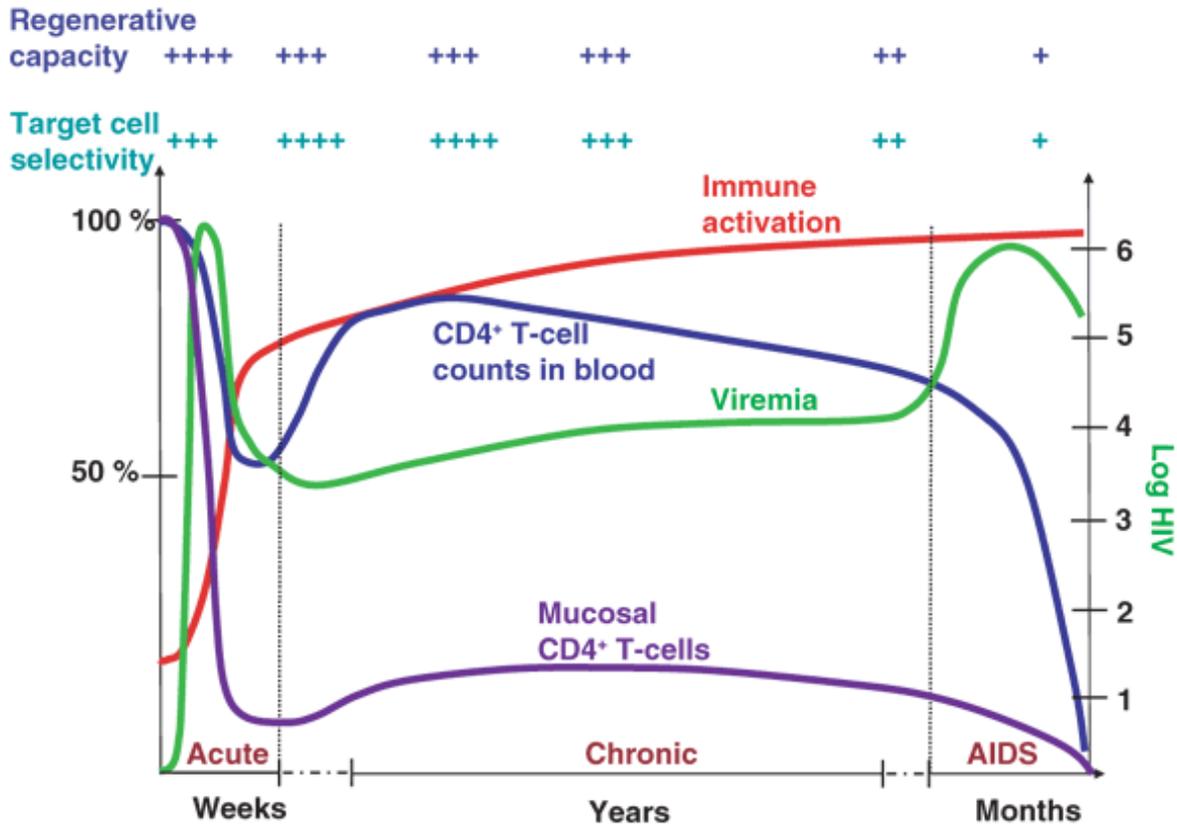


Figure 4. La pathogénèse de l'infection par le VIH

Tiré de : Zvi Grossman, Martin Meier-Schellersheim, William E Paul & Louis J Picker *Nature Medicine* **12**, 289 - 295 (2006)

Il y a trois phases distinctes dans l'évolution de l'infection causée par le VIH-1 :

- i) La phase aiguë;
- ii) La phase chronique (ou latente) et;
- iii) Le stade SIDA.

La figure 4 démontre les changements mucosaux et sanguins dans les nombres de cellules T CD4+ et dans la virémie durant l'infection par le VIH-1 en relation avec les changements des niveaux relatifs de l'activation immunitaire, de la capacité régénératrice et de la sélection des cellules cibles.

1.1.5.1 La phase aiguë

Cette phase de l'infection (primo-infection, phase asymptomatique, séroconversion ou latence) est caractérisée par une déplétion rapide des cellules T CD4⁺ CCR5⁺ mémoires mucosales (75, 76). La muqueuse du tractus gastro-intestinal a été fort étudiée chez les humains infectés par le VIH et chez les macaques infectés par le VIS (77, 78). Il s'avère que cette muqueuse, en plus d'être un site où il y a déplétion massive des cellules T CD4⁺ causée par l'infection virale, il y a aussi apoptose des entérocytes, bris des jonctions serrées épithéliales, augmentation de la perméabilité mucosale menant à une translocation de produits microbiens (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycannes, flagellines, lipoprotéines, acides lipotéichoïques et autres) dans la circulation et fibrose des tissus lymphoïdes (79, 80). Il est bien connu que des niveaux élevés en produits microbiens circulants sont fortement associés à l'activation immune. Plusieurs récepteurs reconnaissant des patrons moléculaires conservés (PRR) sont impliqués dans la reconnaissance de produits microbiens et mènent à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I et d'indoleamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1) par les macrophages et les DC (81). La fibrose des tissus lymphoïdes est la conséquence d'une activation immune locale (79) et de l'inflammation qui cause la formation de dépôts de collagène à ces sites, ce qui empêche la restauration de ces tissus en cellules T CD4⁺ naïves (82).

L'activation immune en phase aiguë et chronique est le facteur principal qui cause les dysfonctions immunitaires dans l'infection par le VIH-1 favorisant la réplication virale et la déplétion graduelle et inévitable des cellules T CD4⁺ (83). L'activation immune implique les systèmes immunitaires inné et adaptatif et est donc entraînée par les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC), granulocytes) et lymphoïdes (cellules T, cellules B, cellules NK et autres) (84). Lors de l'inflammation intestinale en phase aiguë de l'infection, la production de cytokines pro-inflammatoires, telle que l'IL-6, et de chimiokines par les monocytes favorise le recrutement de neutrophiles qui sécrètent à leur tour des chimioattractants attirant des macrophages au site de l'inflammation ce qui exacerbe la réponse inflammatoire (85). Les mDC présentes aux muqueuses et dans la circulation sanguine sont impliquées dans le transfert du virus aux cellules T CD4⁺. Durant l'infection aiguë, le nombre de mDC est diminué, les cellules sont altérées et sont caractérisées par leur

habileté à sécréter des hauts niveaux d'IL-12 ce qui attire les cellules T CD4+ au site de l'infection (86). L'activation immune lymphoïde à cette phase de l'infection est caractérisée par la migration des lymphocytes T et B au site de l'infection, l'activation de ces cellules via un environnement pro-inflammatoire, la prolifération et différenciation cellulaire jusqu'au bris de l'homéostasie entraînant des dysfonctions immunes et la déplétion des cellules lymphoïdes (87).

Il est à noter que dans la muqueuse du tractus gastro-intestinal ainsi que dans la muqueuse génitale (cellules cervicales), les cellules T CD4+ exprime fortement le corécepteur CCR5 et une sous-population de ces cellules $CCR5^{high}$ exprime aussi l'intégrine $\alpha_4\beta_7$, le récepteur de «*homing*» du tractus gastro-intestinal. Les cellules T CD4+ $CCR5^{high} \alpha_4\beta_7^{high}$ sont hautement susceptibles à l'infection par le VIH-1 et sont alors des cibles idéales à l'établissement d'une infection productive efficace à ce site de transmission mucosale. La gp120 lie l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ ce qui initie l'activation de l'intégrine LFA-1 et cette dernière favorise la formation de synapses virologiques et la dissémination du VIH-1 (65, 88).

En outre, la virémie augmente en phase exponentielle, le compte cellulaire T CD4+ sanguin décline en début d'infection car les cellules migrent vers les tissus lymphoïdes et ensuite, le compte cellulaire remonte à un niveau sous la normale. Cette phase est parfois symptomatique et se manifeste par un état de lymphadénopathie généralisée. La primo-infection dure de une à trois semaines et correspond à une multiplication virale intense. Le système immunitaire devient hautement activé et sa capacité régénératrice demeure intacte (89). Les virus R5-tropique, qui ont un tropisme particulièrement pour les corécepteurs CCR5, persistent généralement tout au long de l'infection (45, 90). La réplication virale se stabilise à un niveau viral de base coïncidant, dans un premier temps, avec une expansion clonale de lymphocytes T cytotoxiques (CTL), suivit par l'apparition des premiers anticorps IgG sériques 4 à 6 semaines après la primo-infection. Le virus entame alors un processus de mutations pour échapper aux stratégies du système immunitaire qui réagit à l'infection. Les cellules CTL contrôlent partiellement la réplication virale, permettant une restauration incomplète du compte T CD4+ sanguin (10). La réplication virale intense se poursuit pour atteindre tous les tissus lymphoïdes. Ces événements surviennent tôt dans l'infection et mènent à l'établissement de réservoirs dans les nodules lymphatiques (le virus s'intègre au matériel génétique des cellules

T CD4⁺ au repos et demeure latent) (89) (réf. figure 4).

De plus, dès cette phase aiguë de l'infection on peut constater une dérégulation au niveau du compartiment des cellules B (91), incluant une activation polyclonale qui résulte en une augmentation du niveau d'immunoglobulines polyclonales (hyperglobulinémie) et d'auto-anticorps (92-94). Ces auto-anticorps sont dirigés principalement contre la cardiolipine, la beta-2-Glycoprotéines 1, l'ADN, les petites ribonucléoprotéines nucléaires, la thyroglobuline, la thyroïde peroxidase, la myosine et l'érythropoïétine. En effet, un bon nombre de maladies autoimmunes se développent chez les patients infectés par le VIH suite à plusieurs mécanismes reliés à l'activation immune lymphoïde aberrante (95). Cette dérégulation est associée à une diminution des cellules B du sang périphérique. La progression de la maladie serait associée avec une diminution de la fréquence relative des cellules B mémoires et à une expansion de la fréquence des cellules B CD10⁺CD27 transitionnelles immatures, des cellules B CD21^{lo}CD10 matures activées (96, 97) et des cellules B de premières lignes (98-100). Ces conditions pourraient limiter l'induction de réponses générant des anticorps neutralisants efficace contre le VIH-1 (101). Cette dérégulation du compartiment des lymphocytes B évolue vers des manifestations autoimmunes et des lymphomes. La charge virale à cette phase peut atteindre des millions de copies d'ARN/mL de plasma et le compte de cellules T CD4⁺ sanguin est diminué de 50% (comparé au compte cellulaire avant l'infection) (102).

1.1.5.2 La phase chronique

Cette phase, qui dure entre dix à quinze ans est généralement asymptomatique. Les mutations engendrées suite à l'évasion virale s'accroissent, les CTL s'épuisent (changements phénotypiques et fonctionnels apparaissent) et les autres cellules immunitaires deviennent de plus en plus dérégulées ; les organes lymphoïdes centraux ne permettent plus le renouvellement immunitaire. L'activation immune continue d'augmenter progressivement. Le nombre de cellules T CD4⁺ muco-sales diminue, le compte T CD4⁺ sanguin continue de baisser tranquillement et la virémie augmente. À ce stade, la capacité régénératrice se perd graduellement jusqu'à la phase chronique tardive, le virus continue d'accroître sa capacité d'adaptation aux cellules T par mutations sélectives (90). De ce fait, l'apparition de l'immunodéficience s'accompagne, chez environ la moitié des patients infectés par le VIH-1

de clade B, de l'émergence de virus capables d'utiliser le corécepteur CXCR4 exclusivement (virus X4 tropique) ou CCR5 et CXCR4 (virus R5X4 tropique). Le tropisme pour CXCR4 n'est toutefois pas nécessaire à l'immunodéficience (45). Les études de modèles animaux et humains, démontrent que l'activation immunitaire induite par le VIH-1 est un déterminant majeur de la pathogénèse de ce virus et a des causes multifactorielles.

Lors de l'établissement de la virémie qui devient persistante, les cellules de l'immunité innée et adaptative deviennent activées soit par les protéines virales, soit par les produits de la translocation microbienne provenant de l'intestin et de la muqueuse génitale, soit par les réponses de l'hôte qui se traduisent par une tempête cytokinique pro-inflammatoire (TNF- α , IFN- α , IL-1, IL-6, Blys/BAFF, etc.), comme mentionné dans la section précédente pour ce qui est de la phase aiguë de l'infection (89). En plus des monocytes, macrophages et DC, les neutrophiles jouent un rôle important dans l'activation immunitaire myéloïde chronique. En sécrétant de l'IL-12, des α -défensines et PD-L1 (ligand pour (*programmed cell death-1*) PD-1) qui a comme conséquence une amplification des dysfonctionnements immunitaires, les neutrophiles causent une activation lymphoïde chronique suivie d'une suppression lymphocytaire (87). Cet environnement inflammatoire chronique semble être responsable de la fibrose et de la perte structurale des organes lymphoïdes entraînant un dysfonctionnement cellulaire général empêchant toute réponse immunitaire efficace et raffinée (103). Des changements structuraux lymphoïdes s'opèrent. Des dépôts de collagène remplacent le réseau réticulaire fibroblastique produisant l'IL-7 (importante pour le «*homing*» et la survie des cellules T CD4⁺ naïves) empêchant la restauration des tissus lymphoïdes en cellules T CD4⁺ naïves (104). La charge virale à cette phase est entre 11 000 et 50 000 copies d'ARN/mL de plasma et le compte de cellules T CD4⁺ passe d'environ 700 à 200 cellules T CD4⁺/mm³ de plasma (102) (réf. figure 4).

1.1.5.3 La phase SIDA

Les changements observés à la phase chronique s'accroissent, la capacité régénératrice est détruite et le nombre de cellules T CD4⁺ muco-sales est presque inexistant (90). Cette dernière phase est caractérisée par un nombre de lymphocytes T CD4⁺ inférieur à 200/mm³ de plasma et le syndrome d'immunodéficience apparaît, se manifestant par des infections opportunistes ou des tumeurs rares conduisant au décès (10, 90, 105-107). Cette section décrit la

séquence des évènements de la pathogénèse chez un hôte qualifié de progresser classique. Nous allons maintenant décrire d'autres profils de progression de l'infection par le VIH-1 (réf figure 4).

1.1.6 Les types de patients (progresser)

1.1.6.1 Progresser rapides

Les progresser rapides favorisent une grande capacité de réplication virale «fitness», un tropisme X4 privilégié, des réponses T CD8+ VIH-1 spécifiques et une activité de neutralisation par les anticorps limités ou dysfonctionnels dû à la dérégulation progressive du compartiment B. Ils ont un taux de cellules T CD4+ inférieur à 300/mm³ de plasma dans les trois ans suivant leur diagnostic de séropositivité et progressent vers la phase SIDA dans les quatre ans suivant leur primo-infection (108, 109). Dans ce cas, le traitement aux anti-rétroviraux (ARV) doit débiter plus tôt (avant la phase SIDA).

1.1.6.2 Non-progresser à long terme (LTNP)

Les non-progresser à long terme (moins de 5% des gens séropositifs) demeurent cliniquement asymptomatiques pour plus de 10 ans ayant une séropositivité depuis au moins 8 ans. Ces gens ont un taux de cellules T CD4+ stable et supérieur à 500/mm³ de plasma et ne sont pas sous ARV. Aussi, leur charge virale est maintenue très basse (moins de 10 000 copies/mL) mais elle est persistante (110, 111). Il est vrai que certains LTNP sont infectés avec une souche virale ayant des protéines accessoires inefficaces. Toutefois, leurs méthodes de contrôle sont plus précisément basées sur la génétique et l'immunité de l'hôte. Des études ont démontré que certains LTNP ont un avantage génétique unique qui est celui d'être hétérozygote pour un polymorphisme (délétion de 32 paires de bases) sur le gène du corécepteur CCR5 (CCR5Δ32) du VIH-1. Ils peuvent aussi présenter des mutations qui augmentent la production de β-chimiokines («*macrophage inflammatory protein-1 alpha*»; MIP-1α et «*macrophage inflammatory protein-1 beta*»; MIP-1β) qui compétitionnent avec le VIH-1 pour les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (112-114). Finalement, d'autres LTNP ont des réponses immunitaires cellulaires et humorales efficaces, polyfonctionnelles et à large spectre. Plusieurs portent aussi l'allèle HLA-B*57 qui favorise la présentation antigénique par les

cellules T CD4⁺ infectées aux cellules T CD8⁺ cytotoxiques (113, 115). L'allèle HLA-B*27 a été associé à des maladies rhumatoïdes comme la spondyloarthropathie inflammatoire. Cependant, cet allèle joue un rôle protecteur dans la maladie du VIH et les patients portant HLA-B*27 démontrent une réponse forte et spécifique contre la protéine p24 du VIH qui est assez conservée. Cet allèle est prédominant chez les patients LTNP (116). Pour ces raisons, les LTNP sont un bon modèle d'étude de contrôle naturel de l'infection virale (102, 109, 113).

1.1.6.3 Élités contrôleurs (EC)

De rares patients LTNP (moins de 1%) infectés par le VIH-1 sont séropositifs sans ARV depuis plus de 35 ans sans ne jamais développer la maladie du SIDA (117, 118). Ces patients peuvent contrôler naturellement la réplication virale jusqu'à moins de 50 copies d'ARN viral/mL de plasma et maintiennent un compte normal de lymphocytes CD4⁺T (109, 118). Les EC ont un niveau d'activation immunitaire systémique et d'inflammation muqueuse plus bas que les individus infectés par le VIH mais un peu plus élevé que les individus non infectés (119, 120). Bien qu'il y ait évidence d'une très faible persistance de réplication virale et d'activation immunitaire, une étude a démontré que les EC ont aussi des dommages structurels fibrotiques dans leurs tissus lymphoïdes qui pourraient prévenir la restauration complète des fonctions immunitaires. Cette fibrose tissulaire est un processus cumulatif qui survient sur une période prolongée. Cette étude stipule donc que le modèle des EC n'est pas le meilleur dans l'élaboration de traitements contre le VIH (104). Ce phénotype «contrôleur» est associé à des facteurs immunologiques et génétiques de l'hôte et à des facteurs génétiques viraux (118). Comme chez les LTNP, les EC ont des réponses immunitaires cellulaires et humorales efficaces, polyfonctionnelles et à large spectre (102, 121).

Il est à noter que contrairement au modèle de singe résistant à l'infection, les EC contrôlent la réplication virale et démontrent une forte réponse CD8⁺T contribuant à la non progression vers la maladie du SIDA (122).

Des études effectuées dans notre laboratoire ont déterminé certaines caractéristiques propres aux individus EC. En effet, les EC, contrairement aux progressifs rapides et classiques, ont un profil inflammatoire plasmatique très bas dans lequel on remarque principalement des niveaux normaux (comme chez les individus non-infectés) de BLyS (B *Lymphocyte Stimulator*)/ BAFF (*B-cell activating factor*) ainsi que la préservation du compartiment DC et

B. De plus, des éléments de translocation microbienne sont indétectables suggérant que les EC peuvent maintenir un certain degré d'intégrité immunitaire. Ces études ont aussi démontré que, autant les contrôleurs virémiques (LTNP) que les avirémiques (EC) ont des fréquences relatives diminuées de cellules B de premières lignes «MZ-like» matures dans leur compartiment cellulaire B comparé aux progresseurs rapides et classiques et même aux individus non-infectés. Ceci suggère que la capacité de recruter cette population vers la périphérie pourrait être favorable au contrôle de la progression de la maladie (100). De plus, les EC démontrent une capacité de réguler leur expression d'IL-10, ce qui pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie immunitaire associée au contrôle viral.

En outre, il a été constaté que les cellules B «MZ-like» chez les EC expriment la lymphotoxine (LT)- α , maintenant des niveaux efficaces de CXCL13 (*B lymphocyte chemoattractant*) qui pourrait aussi participer à l'homéostasie lymphoïde (98). Finalement, nos études démontrent l'importance des cellules B de premières lignes dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 (123, 124).

1.1.6.4 Hautement exposés séronégatifs (HESN)

Chez de rares personnes hautement exposées au VIH-1, certains individus demeurent cliniquement non infectés. Ces gens ont été identifiés dans quelques cohortes de couples sérodiscordants (125), de travailleuses du sexe (TS) (126-129) et enfants nés de femmes infectées par le VIH-1 (130). Suite à l'étude de ces quelques personnes représentant un modèle de protection naturelle contre l'infection par le VIH-1 (réf. section 1.2.6), des facteurs de résistance ont été ciblés et même, des corrélats de protection ont été établis. Par exemple, des individus (10% de la population caucasienne) homozygotes pour la mutation CCR5 Δ 32 ont été identifiés comme étant résistants à l'infection (112). Les corrélats de protection immunologiques et génétiques chez les HESN seront énoncés en détails plus loin.

1.1.6.5 Primates non humains : Hôtes naturels du VIS

De multiples données élaborées sur la pathogénèse de l'infection par le VIH et les mécanismes d'entrée, par voie mucoale, de ce virus dans la cellule hôte viennent de l'étude du modèle singe pathogénique, sensible à l'infection ou non (hôte naturel) (131-133). Plusieurs espèces africaines de primates non humains, comme les singes verts d'Afrique, les Sooty Mangabeys,

les Mandrilles et les Chimpanzés sont infectées naturellement par le VIS et contrairement au modèle sensible à l'infection (macaques rhésus d'Asie et humains infectés par le VIH-1 et le VIH-2), les hôtes naturels ne développent pas le SIDA bien qu'ils aient une grande charge virale plasmatique. Cette observation démontre que les espèces résistantes à l'infection ont développées des mécanismes pour contrôler l'infection par le virus pour ne pas développer la maladie (134). Ce modèle préserve les cellules T CD4⁺ sanguines, l'intégrité mucoale (absence de translocation microbienne) et ne démontre pas d'activation immune chronique (133-135). Les lymphocytes T CD4⁺ isolés de sang périphérique, de nodules lymphatiques et de tissu mucoale de ces individus expriment un très faible niveau du corécepteur CCR5 (133). L'hôte naturel du VIS restaure les cellules CD4⁺T mucoales suite à la phase aiguë de l'infection (136, 137), supporte un niveau de réplication virale élevée et tolère la destruction chronique des cellules T CD4⁺ effectrices activées tout en préservant l'homéostasie des cellules T CD4⁺ naïves et mémoires du compartiment systémique les protégeant de l'effet directe de la réplication virale. La capacité à maintenir un niveau d'expression CCR5 très faible (comparé à l'humain), pourrait aussi prévenir la migration de cellules T CD4⁺ activées aux tissus enflammés et particulièrement aux muqueuses restreignant le nombre de cellules cibles à être infectées par le VIS et l'inflammation aux muqueuses (136). En effet, l'infection par le VIS, dans le modèle résistant à l'infection, révèle aussi une forte réponse immunitaire innée et adaptative avec une production d'IFN de type 1, une activation et prolifération des cellules T CD4⁺ et une production de cytokines pro-inflammatoires.

Cependant, cette réponse immunitaire est résolue quelques semaines après la primo-infection. L'absence d'activation immune chronique, l'expression réduite de CCR5 et la faible production d'IFN- α en phase chronique de l'infection, même après stimulation de TLR7/9, sont des différences marquées entre le modèle d'infection résistant et celui de l'infection par le VIH-1 chez l'homme. Quelques études expliquent la faible activation immune chronique par une modulation/suppression active des réponses immunitaires innées et adaptatives contre le virus. Certaines études génétiques expliquent ce phénomène par une modulation à la baisse des gènes stimulés par les IFN-I (ISG) et des défenses sécrétés par les cellules myéloïdes de l'immunité innée, cependant ces mécanismes restent à être élucidés (131, 138-140).

Les informations obtenues suite à ces études à l'aide du modèle de singes résistants à l'infection sont primordiales et d'une importance capitale dans l'identification de cibles thérapeutiques pour l'élaboration de méthodes préventives futures.

Pour sa part, le modèle de singe macaque sensible à l'infection a permis de mieux comprendre les événements qui surviennent très tôt dans la transmission mucosale du VIH-1; ces étapes seront développées dans une prochaine section.

1.1.7 Les traitements

Le développement des ARV a significativement réduit la morbidité et la mortalité reliée au VIH-1 en diminuant la virémie plasmatique et augmentant le compte cellulaire T CD4+. Cependant, une restauration immunitaire incomplète et une inflammation chronique persistent à degrés variés dans bon nombre d'individus infectés par le VIH-1 (89). Il s'avère que de 15% à 30% des patients traités avec un ARV depuis un certain temps, ne démontrent aucune augmentation dans leur nombre de cellules T CD4+. Ces sujets sont définis comme étant non-répondants immunologiques «*immunological nonresponders*», ces patients ayant un risque accru pour la progression de la maladie et la mort suite à des infections opportunistes et à des cancers (141). L'initiation d'un traitement hâtif aurait peut-être été bénéfique pour cette catégorie de patients.

La période optimale pour initier un traitement ARV chez les gens infectés par le VIH-1 est en cours d'évaluation. Un nombre important d'études a lieu dans le but de résoudre cette question. En 2006, l'Organisation Mondiale sur la Santé recommandait de commencer une thérapie ARV, pour les adultes et les adolescents ayant un compte cellulaire T CD4+ entre 200 et 350 cellules par mm³ de plasma. Il en était de même pour les patients ayant en plus la tuberculose et pour les patientes enceintes (142). Aujourd'hui, de nouvelles données concernant les réponses cliniques, immunologiques et virologiques de patients infectés par le VIH-1 révèlent une efficacité accrue si le traitement ARV est initié dès un compte cellulaire entre 350 et 499 cellules T CD4+ par mm³ de plasma. Il en est de même pour les patients tuberculeux, étant atteints de l'hépatite B démontrant une évidence de maladie hépatique chronique, les partenaires infectés faisant partie d'un couple séro-discordant et les patientes enceintes ou qui allaitent (143).

Actuellement, plusieurs molécules peuvent bloquer complètement le cycle de réplication du VIH-1 et ce, à différents stades du cycle. 1987 fut l'année de l'arrivée du premier ARV sur le marché; soit un inhibiteur de la transcriptase inverse. Le premier médicament fut un analogue nucléoside comme la zidovudine (AZT). L'efficacité de ces médicaments était limitée car le fait de bloquer la rétrotranscriptase n'empêche pas la production virale établie. Toutefois, les virions libérés ne sont pas infectieux et les cycles de réplication suivant sont empêchés (144).

Il y a un seul virus fondateur de l'infection et sa grande variabilité due aux erreurs spontanées de rétrotranscription et de la pression sélective engendrée par le système immunitaire et/ou les ARV, la résistance envers le système immunitaire et/ou ARV est inévitable. Certaines mutations mènent à une diminution de l'efficacité de réplication «fitness» virale ou de l'infectivité, dans ce cas, les virus seront éliminés. À l'opposé, certaines mutations mènent à une résistance virale accrue, dans ce cas, le traitement doit être modifié en conséquence, c'est-à-dire que de nouvelles molécules inhibitrices devront être utilisées pour contrer de nouvelles cibles virales (145-150).

Il y a cinq classes de médicaments qui sont normalement utilisés en combinaison pour traiter l'infection par le VIH. L'utilisation de ces médicaments en combinaison peut être nommée : thérapie anti-rétrovirale, thérapie anti-rétrovirale combinatoire ou thérapie anti-rétrovirale hautement active (*highly active antiretroviral treatment*, HAART). Ces médicaments sont classifiés selon la phase, dans le cycle de vie du VIH-1, qui est inhibée par le médicament. La combinaison typique inclus deux inhibiteurs de réverse transcriptase nucléosidiques avec un inhibiteurs de reverse transcriptase non-nucléosidique ou un inhibiteur de protéase ou un inhibiteur d'intégrase (151).

Les inhibiteurs de réverse transcriptase nucléosidiques inclus : Zidovudine, Abacavir, Lamivudine, Emtricitabine et Tenofovir. Ils agissent comme compétiteurs pour un substrat et leur molécule cible est la réverse transcriptase, enzyme qui rétrotranscrit l'ARN viral en ADN double brins (152).

Les inhibiteurs de réverse transcriptase non-nucléosidiques inhibent la réverse transcriptase en se liant à un site allostérique (site actif) de l'enzyme. Ils inclus : Nevirapine, Efavirenz (1^{ère} génération) et Etravirine, Rilpivirine (2^{ème} génération) (152).

Les inhibiteurs d'intégrase inhibent l'enzyme intégrase qui est responsable d'intégrer l'ADN

viral à l'ADN cellulaire. Ils incluent : Raltegravir, Elvitegravir et Dolutegravir qui agissent comme compétiteurs de substrat (153).

Les inhibiteurs de protéase bloquent cette enzyme virale qui est nécessaire pour produire des virions matures lors du bourgeonnement de la membrane cellulaire de l'hôte. Ce médicament prévient le clivage des précurseurs gag et gag/pol et rendent les virions non infectieux (154). Cette catégorie de médicaments inclut : Lopinavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprénavir, Ritonavir, Darunavir et Atazanavir (151).

Les thérapies combinatoires évitent ou retardent l'évolution de l'infection vers la phase SIDA. Ces thérapies restreignent les niveaux de réplication du virus au plus bas possible (près de la limite de détection de 50 copies d'ARN/mL de plasma), restaurent le compte lymphocytaire T CD4+ sanguin (cependant de manière incomplète dans le compartiment muqueux), empêchent l'activation immunitaire systémique et bloquent le virus à plusieurs étapes de son cycle répliquatif simultanément (155). Même si HAART prévient la progression vers la phase SIDA et diminue les risques de transmission du VIH-1, cette thérapie est inefficace pour éradiquer les réservoirs viraux établis dans les cellules T CD4+ CD45RO mémoires anergiques des organes lymphoïdes (156). Aussi, dans plusieurs cas, l'arrêt de HAART mène à une multiplication virale très rapide alors les patients sont voués à être traités durant toute leur vie.

Cependant, certains patients sont capables de contrôler leurs charges virales de façon efficace suite à l'interruption du traitement. Ces patients avaient commencé le traitement dans les 10 semaines suivant l'infection (très tôt) et l'ont suivi pendant au moins 12 mois avant de l'interrompre (157). Ces derniers facteurs négatifs jumelés à un coût énorme et à une toxicité considérable, ont poussé les chercheurs à investiguer sur de nouvelles avenues thérapeutiques. De nouvelles molécules ont été découvertes telles que : des inhibiteurs d'entrée virale par la gp120 (attachement) ou la gp41 (fusion) et des inhibiteurs d'intégrase (158-163).

Des stratégies pour réactiver et nettoyer les réservoirs viraux (inhibiteurs d'histone déacétylases) sont aujourd'hui à l'étude alors ils ne font pas partie des thérapies actuelles. Les histone déacétylases font partie d'une famille de protéines associées à la chromatine qui régulent l'acétylation des histones et l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription. L'inhibition des histone déacétylases est suffisante pour réactiver le VIH latent *in-vitro*. L'activation de la transcription du VIH-1 pourrait mener à l'expression virale, à la mort du virus ou de la cellule hôte et finalement à l'éradication des cellules infectées (164).

Toutefois, étant donné l'existence de toutes les embuches thérapeutiques, la recherche sur les déterminants génétiques de l'hôte, les réponses immunitaires innées et adaptatives et sur les facteurs de restriction associés avec la progression de l'infection par VIH-1 dans le développement de stratégies préventives est obligatoire et d'une importance capitale dans la lutte pour l'éradication du VIH-1 (89).

1.1.8 Les modes de transmission

Le VIH-1 est transmis par voies mucoales (transmission hétérosexuelle et homosexuelle) suite à des relations sexuelles, par expositions mère-enfant et par inoculations percutanées. La transmission mère-enfant peut se produire durant la grossesse (*in utero*) (165), à l'accouchement (*intrapartum*) ou lors de l'allaitement (*postpartum*) (166). L'utilisation d'ARV durant la grossesse, l'accouchement, la pratique de césarienne, l'évitement de l'allaitement et la prophylaxie néonatale ont permis de diminuer le taux de transmission de 14-42% à 1-2% (167). Pour sa part, la transmission percutanée ou parentérale (intraveineuse) se produit majoritairement chez les utilisateurs de drogues injectables (UDI), représentant environ 10% des nouvelles infections aux VIH-1 (2). Une minorité des infections percutanées sont causées soit par transfusions sanguines contaminées, soit par injection accidentelle du virus (168). De plus, l'évolution de l'infection de la phase aiguë vers la phase chronique est identique dans les contextes de transmission parentérale et de transmission par voie mucoale (169). Le sujet de la transmission par voie mucoale sera maintenant abordé d'une manière plus complète.

Pour des raisons encore incomprises, les virus R5 tropique sont plus facilement disséminés par toutes les voies de transmission. La transmission est suivie de l'apparition de marqueurs d'infection virale chez l'hôte. À la phase aiguë de l'infection, le VIH-1 se réplique exponentiellement et se diversifie, ce qui rend difficile l'identification moléculaire du virus fondateur de l'infection. Des études utilisant un modèle d'explant tissulaire provenant de cellules primaires cervico-vaginales et des modèles animaux de la transmission du VIS, du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine chimérique) et du VIH-1 ont pu élucider les mécanismes fondamentaux de transmission du VIH-1 (170).

La transmission hétérosexuelle (homme à femme) est responsable de près de 70% des nouvelles infections par le VIH-1 à travers le monde avec une probabilité de transmission par

acte coïtal de 1/200 à 1/2000 (50). Les liquides génitaux (séminaux et cervico-vaginaux) sont des vecteurs importants dans la transmission sexuelle du VIH-1 et le risque de transmission augmente avec la quantité d'ARN du VIH-1 présent dans ces liquides (171). Une charge virale plasmatique indétectable (< 50 copies ARN/mL de plasma) n'est pas nécessairement prédictive d'une charge virale génitale indétectable. De 5% à 25% de ces individus peuvent démontrer une charge virale génitale détectable (172). Aussi, notons que les sécrétions rectales contiennent les niveaux les plus élevés en VIH-1 comparé au plasma et aux liquides vaginaux et séminaux (173). Toutefois, il faut prendre en considération que les études menées sur les charges virales de ces liquides sont limitées et parfois contradictoires.

Il est cependant à noter que des cofacteurs de risque confondants comme la préexistence d'infections sexuellement transmises (IST) (inflammation et lésions), de vaginoses bactériennes, la circoncision chez les hommes (diminution du risque de transmission de 60% (174-176)). Par exemple, il est établi que l'infection par le virus de l'Herpès Simplex-2 (HSV-2), qui est un virus commun dans la population, latent, persistant et menant à la formation d'ulcères génitaux (inflammation et lésions de la muqueuse), augmente le risque d'infection par le VIH-1. L'infection par le HSV-2 favorise la réplication, augmente la charge virale, accélère la progression de la maladie et la transmission du VIH-1 (177, 178). Aussi, le stade d'évolution de l'infection (le risque de transmission en phase aiguë est plus élevé qu'en phase chronique (179, 180)) suggère qu'il est préférable d'évaluer la dernière probabilité à un niveau plus faible. Il faut aussi souligner que la transmission pénis-vagin a été rapportée à une fréquence aussi élevée que 1 exposition/10 et que la fréquence de transmission pénis-anus était de l'ordre de 1 exposition/3 dépendamment des cofacteurs de risque (179).

Les facteurs socio-économiques peuvent aussi influencer la transmission du VIH-1; les comportements, moeurs sexuels ainsi que la prévalence du VIH-1 dans le pays dans lequel on se trouve (pays développé ou en voie de développement) (2, 179, 181-184).

L'infection par un seul virus fondateur dans la majorité des individus démontre l'importance du phénomène de goulot génétique à la transmission (185). Aussi, des analyses génétiques réalisées avec le VIH-1 de clade B ont suggéré une observation universelle; l'infection mucosale par le VIH-1, origine la plupart du temps d'une seule unité infectieuse, un virus fondateur de l'infection (186).

La charge virale (inoculum) du partenaire infecté joue un rôle majeur dans l'évaluation du risque encouru par l'individu non-infecté. Plus la charge virale du partenaire est élevée, plus il y a de risques de transmission du VIH-1. Même si la charge virale génitale ne corrèle pas avec la charge virale plasmatique, il a été remarqué que les partenaires ayant une charge virale plasmatique à moins de 1000 copies d'ARN/mL transmettent rarement le virus à leurs partenaires non-infectés (45, 187-189). La prise d'ARV par le partenaire séropositif peu réduire de 96% le risque de transmission (190).

1.2 L'hôte

1.2.1 L'Anatomie et la physiologie du système génital féminin

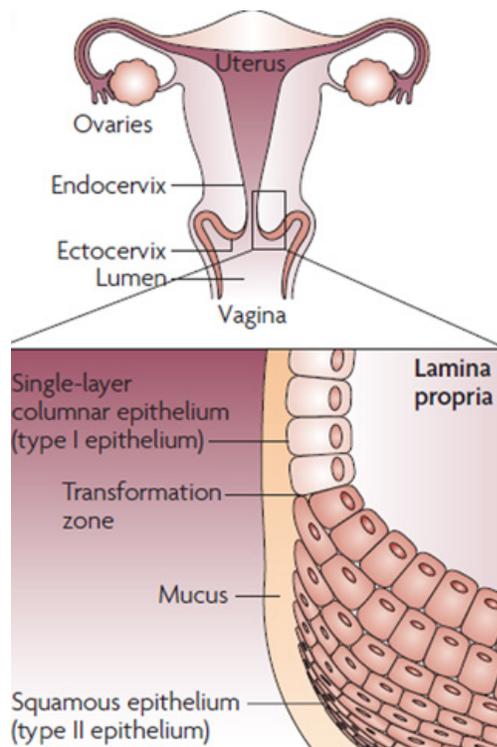


Figure 5. Épithélium du tractus génital féminin

Tiré de : Akiko Iwasaki Nat Rev Immunol. Oct 2010; 10(10): 699–711

1.2.1.1 Le tractus génital féminin

Le système reproducteur féminin doit produire des gamètes, se préparer à soutenir le développement d'un embryon mais aussi il doit se défendre contre une panoplie de microorganismes pathogènes pendant qu'il doit tolérer la microflore vaginale. Le tractus génital supérieur regroupe les trompes utérines, l'utérus et l'endocol. La muqueuse du canal du col utérin contient les glandes utérines qui sécrètent un mucus qui remplit le canal du col utérin. Ce mucus empêche les bactéries, virus et les spermatozoïdes présents dans le vagin de se rendre jusqu'à l'utérus (sauf pour ce qui est des spermatozoïdes en milieu de cycle menstruel où sa consistance est moins visqueuse). La tunique muqueuse de la cavité utérine, l'endomètre, est composée d'un épithélium simple prismatique uni à épais stroma (muqueuse de type I) et celle-ci s'étend jusqu'à la zone de transformation (réf. figure 5).

Le tractus génital inférieur regroupe l'ectocol et le vagin. La muqueuse de ce compartiment est composée d'un épithélium stratifié squameux non kératinisé (muqueuse de type II) capable de supporter la friction. Les cellules épithéliales de la muqueuse vaginale sécrètent du glycogène que les bactéries de la flore vaginale normale transforment en acide lactique. Cette acidité protège le vagin contre les infections. La zone de transformation est celle dans laquelle il y a transition entre l'endocol (épithélium simple) et l'ectocol (épithélium stratifié) (191, 192) et cette zone semble être un site privilégié mais non exclusif d'entrée et de réplication du VIH-1 (193) (réf. figure 5).

Une stérilité microbienne relative est observée dans l'utérus et les trompes utérines. En revanche, une flore commensale vaginale dynamique, composée par exemple de *Lactobacillus crispatus*, est retrouvée dans le tractus génital inférieur, celle-ci étant sous contrôle hormonal (194).

1.2.1.2 Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses génitales

Les surfaces muqueuses du corps sont protégées par un système interconnecté de tissus lymphoïdes appelé le MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Ce système contient un nombre de leucocytes/lymphocytes (T, B, plasmocytes et macrophages) supérieur au reste du corps et il a une organisation en structures cellulaires spécialisées (organes lymphoïdes secondaires et nodules lymphatiques) tout au long de la surface mucoale. Les cellules

composant le MALT sont stratégiquement situées pour rencontrer les antigènes qui traversent la muqueuse (195). Le TGF contient une structure lymphoïde dans la paroi utérine, un agrégat lymphoïde composé d'un centre de cellules B et T CD8+ entouré par des macrophages (196). Le TGF contient plusieurs éléments de l'immunité mucoale innée et adaptative. Les cellules immunitaires le composant sont distribuées et sont en nombre varié à différents sites tout au long du TGF (192, 197, 198).

La majorité des composantes lymphocytaires du TGF sont des cellules NK et des lymphocytes T. Les cellules T CD3+ sont présentes dans tout le tractus. Les cellules T CD4+ et T CD8+ sont dispersées dans le stroma du tractus génital inférieur tandis qu'elles sont organisées en agrégats lymphoïdes dans la muqueuse utérine, comme mentionné précédemment (196, 199). Les granulocytes présents sont majoritairement dans les trompes utérines. Finalement, relativement aux lymphocytes T, un plus petit nombre de monocytes et de lymphocytes B est retrouvé dispersé dans le tractus génital (196). Les macrophages, lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont prévalent à la zone de transformation et les lymphocytes intraépithéliaux de cette zone démontrent une prédominance dans l'expression du récepteur CD8+ (200).

Dans le TGF, les cellules immunitaires myéloïdes et lymphoïdes expriment des récepteurs de patrons moléculaires conservés (*pattern recognition receptors* ; PRR) de surface et cytosolique, comme les récepteurs Toll-like (TLR) qui sont les plus étudiés. Les TLR 2 et 4 reconnaissant des patrons moléculaires bactériens (de surface) sont hautement exprimés dans le tractus génital supérieur comparé au tractus génital inférieur. Les TLR 7, 8 et 9 reconnaissant des ARNs (TLR7/8) et des ADN CpG (TLR9) (endosomaux) sont exprimés à un niveau similaire le long du tractus (201).

De surcroît, en plus de fournir une barrière physique protectrice au tractus génital, les cellules épithéliales génitales (CEG) formant la muqueuse sont immunologiquement très actives. Elles sont d'ailleurs initiatrices des réponses immunitaires innées et adaptatives en réagissant aux stimuli par la sécrétion de cytokines et chimiokines (202, 203).

La protection du TGF est assurée par l'immunité innée et adaptative (204). Les effecteurs de la réponse non-spécifique sont les CEG, monocytes, macrophages, granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), DC (mDC et pDC (cellules dendritiques plasmacytoïdes qui sont les principales sécrétrices rapides d'IFN- α)) et les cellules NK qui confèrent une protection

via la sécrétion de cytokines et de chimiokines recrutant et activant des cellules immunitaires (205).

Les défenses innées de l'hôte, particulièrement dans le tractus génital inférieur, sont orchestrées par : la flore vaginale normale (206, 207) de concert avec le mucus, une myriade de facteurs solubles (peptides antimicrobiens, défensines, élafine, inhibiteurs de protéases (SLPI), lectines liant le mannose, facteurs du complément et oxide nitrique), les composantes associées aux membranes cellulaires tels que les PRR se retrouvant dans le fluide cervico-vaginal et les cellules phagocytaires (206, 208-210). Tous ces facteurs solubles contribuent à la défense du TGF contre des pathogènes.

1.2.2 Les hormones du cycle menstruel et le VIH-1

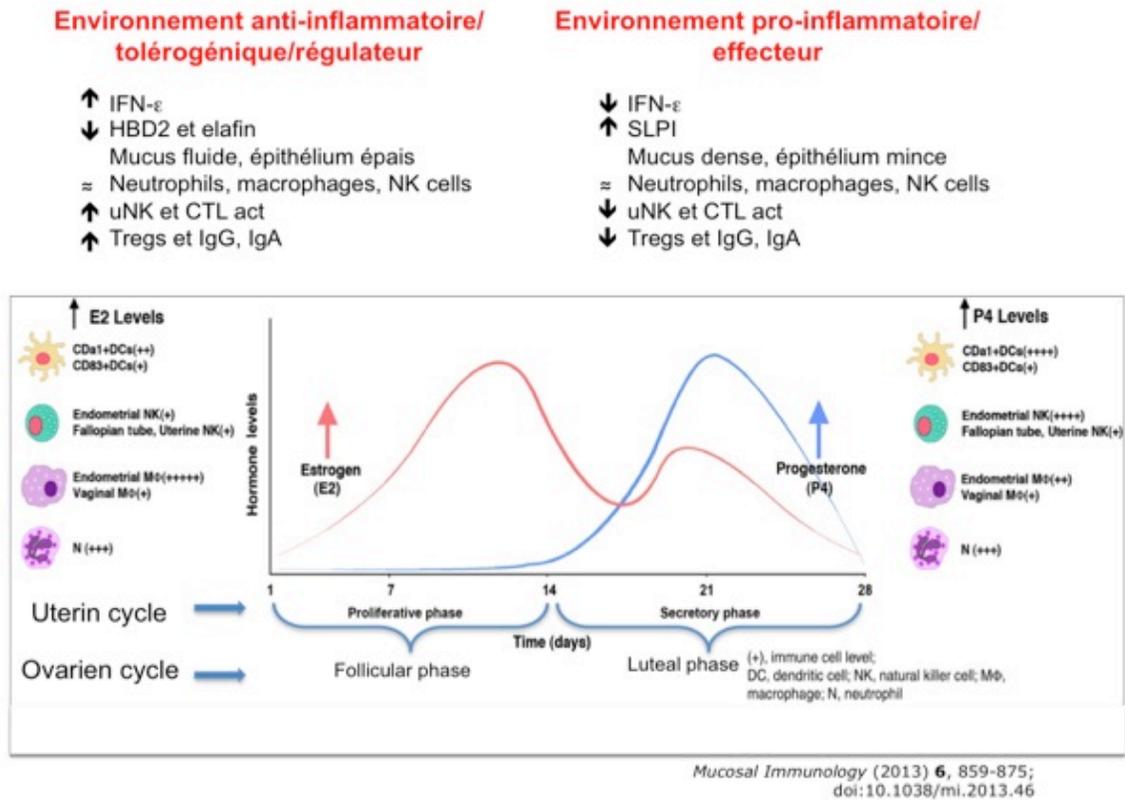


Figure 6. Le cycle menstruel et l'immunité mucoale modifié

Tiré de : *Mucosal Immunology* (2013) **6**, 859-875, Modifié

Le TGF est la porte d'entrée principale du VIH-1 mais les mécanismes responsables de la transmission mucoale ne sont pas encore bien connus chez la femme ; la plupart des connaissances à ce sujet viennent d'études de modèles simiens (107, 211) ou du tractus gastro-intestinal (105). L'environnement du TGF doit être évalué dans le contexte de sa fonction primaire ; la reproduction.

Le système immunitaire est régulé par les changements hormonaux (estrogènes, E2 ou 17β-estradiol et progestérone, P4 ou pregn-4-ene3, 20-dione) survenant lors du cycle menstruel pour optimiser les conditions d'implantation du fœtus (212). Le succès de la reproduction

porte sur une balance adéquate entre la protection immune contre les pathogènes et la tolérance au sperme et au fœtus (199). Dans le cycle menstruel/ovarien féminin, l'endomètre se développe et les follicules prolifèrent jusqu'à l'ovulation dans la phase proliférative/folliculaire. La phase sécrétrice/lutéale est caractérisée par de hauts niveaux de progestérone venant du corps lutéal pour conserver l'endomètre intact. Finalement, le corps lutéal régresse et les menstruations surviennent. Lors des menstruations, le niveau de E2 est faible pour augmenter graduellement pendant la phase folliculaire jusqu'au pic pré-ovulatoire (jour 14). Une baisse de E2 sérique s'observe lors de l'ovulation et remonte quelque peu en phase lutéale. Le niveau de P4 augmente alors et est à son maximum au jour 21 du cycle (210) (réf. figure 6).

Dans la phase folliculaire, il a été observé qu'un niveau d'estrogène prédominant favorise l'expression de l'IFN- ϵ . Cette cytokine, récemment découverte, a été classée dans la famille des IFN de type I par la similarité du type de récepteur, de la structure protéique et de son locus génétique. L'IFN- ϵ est composé de 192 acides aminés et l'analyse de sa structure protéique révèle une grande proximité avec l'IFN- β qui est un IFN de type I signalisant par les récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 pour induire la production des facteurs de restriction viraux (213). Différemment des autres IFN I, IFN- ϵ est exprimé constitutivement dans la muqueuse du TGF et son expression est régulée/induite par les hormones sexuelles (non pas suite à une signalisation par des PRR) et est beaucoup plus élevée en phase proliférative (dominance de E2). Il a été démontré que l'expression de l'IFN- ϵ au niveau du TGF est requise pour le maintien d'un niveau basal de facteurs de restriction viraux qui sont cruciaux dans l'immunité innée (214). Les cellules T CD8+ prédominent (important dans la réponse contre l'infection par le VIH-1), il y a une petite population de plasmocytes sécrétant les IgA, un faible niveau d'expression de facteurs solubles et une dominance en IgG (210, 215).

Les changements dans les niveaux hormonaux durant le cycle menstruel résultent en des changements dans les réponses immunitaires innées et adaptatives dans le TGF et des populations cellulaires présentes qui modulent les conditions d'établissement opportuniste de l'infection par le VIH-1.

Les hormones sexuelles régulent la présentation antigénique par les DC et aussi le nombre de macrophages et autres cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui sont retrouvées avec les

CEG dans les tissus utérins et vaginaux (216). Il a été démontré que les estrogènes ont la capacité de moduler l'expression de cytokines/chimiokines par les DC dérivées de monocytes montrant une augmentation de stimulation de cellules T CD4⁺ naïves. Ces études concluent aussi que la progestérone inhibe la fonction des pDC ce qui peut rendre plus difficile les réponses antivirales tel que démontré dans le contexte de l'infection à VIH ou virus de l'herpès simplex (VHS)-2 (217, 218).

L'expansion des cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺ CD25⁺ (réf. section 1.2.6) a été observée durant la phase folliculaire tardive (219). Cette expansion corrèle avec le niveau élevé de E2 sérique et aussi avec l'expression du facteur de transcription FOXP3, ce facteur étant le régulateur transcriptionnel principal des cellules Treg (220). Il est aussi intéressant de noter que E2 est connu pour être responsable du potentiel immunosuppresseur élevé des Treg. Alors, la phase folliculaire initie un environnement tolérogénique/régulateur dans le TGF, ce qui pourrait favoriser le développement d'infections par des pathogènes. Cependant, dans le contexte de transmission du VIH-1, d'autres facteurs comme la présence de l'IFN- ϵ , de CTL et la diminution du nombre des cellules cibles pour le virus ne favorisent pas le risque d'infection (221).

L'anticorps prédominant dans les sécrétions cervico-vaginales est l'IgG (222) mais les IgA sécrétoires dans leurs forme polymérique sont aussi présentes et les niveaux d'IgG et d'IgA dans les fluides du TGF sont modulés par les hormones du cycle menstruel (223).

Dans des études utilisant le modèle simien (macaques rhésus ovariectomisés), un traitement systémique avec des estrogènes résultent en un épaississement de l'épithélium vaginal. Le fait d'épaissir l'épithélium peut interférer avec l'accès du virus à ses cellules cibles (LC (cellules de Langerhans)/DC, cellules T CD4⁺ et macrophages) dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Les estrogènes diminuent la fréquence des LC dans le vagin et diminuent le pH, rendant le milieu un peu plus hostile au VIH-1.

En revanche, chez des femelles macaques traitées à la progestérone, l'épithélium s'amincit permettant un accès plus facile du VIH-1 à ses cellules cibles. D'autres études associent des hauts niveaux de progestérone avec un déséquilibre du microbiome vaginal, résultant en une augmentation du risque de contracter des IST telles que : vaginose bactérienne, candidose, chlamydie et gonorrhée chez les femmes. Ces facteurs peuvent augmenter le risque d'infection par le VIH-1. Les données obtenues par le modèle simien suggèrent fortement que

les estrogènes amplifient les propriétés naturelles de protection de la femme en diminuant sa susceptibilité à l'invasion par le VIH-1 (revue par (224)). Pour ces raisons, la phase folliculaire, dominante en niveau de E2, est donc réfractaire à l'infection par le VIH-1.

Plusieurs études ont examiné l'effet des hormones sexuelles sur l'immunité induite par vaccination contre des pathogènes en utilisant le modèle murin entrant en phase de l'estrus de leur cycle ovarien. Une grande similitude existe entre les phases du cycle ovarien murin et celui de la femme. De façon intéressante, lorsque l'on administre un antigène oralement ou de manière intra nasale durant la phase E2 dominante du cycle (réf. section 1.2.1.2 (MALT), la production d'anticorps spécifiques contre l'antigène dans le TGF est amplifiée (225) (réf. figure 6).

L'induction d'une immunité protectrice optimale au TGF requiert l'acquisition de plus de connaissances sur le statut ovarien (E2, P4) au moment de l'immunisation mucosale ; les études sur l'immunité innée, la présentation antigénique, l'immunité cellulaire et humorale par rapport aux hormones sexuelles étant controversées (210).

1.2.3 Les mécanismes d'invasion par le VIH-1 à la muqueuse génitale

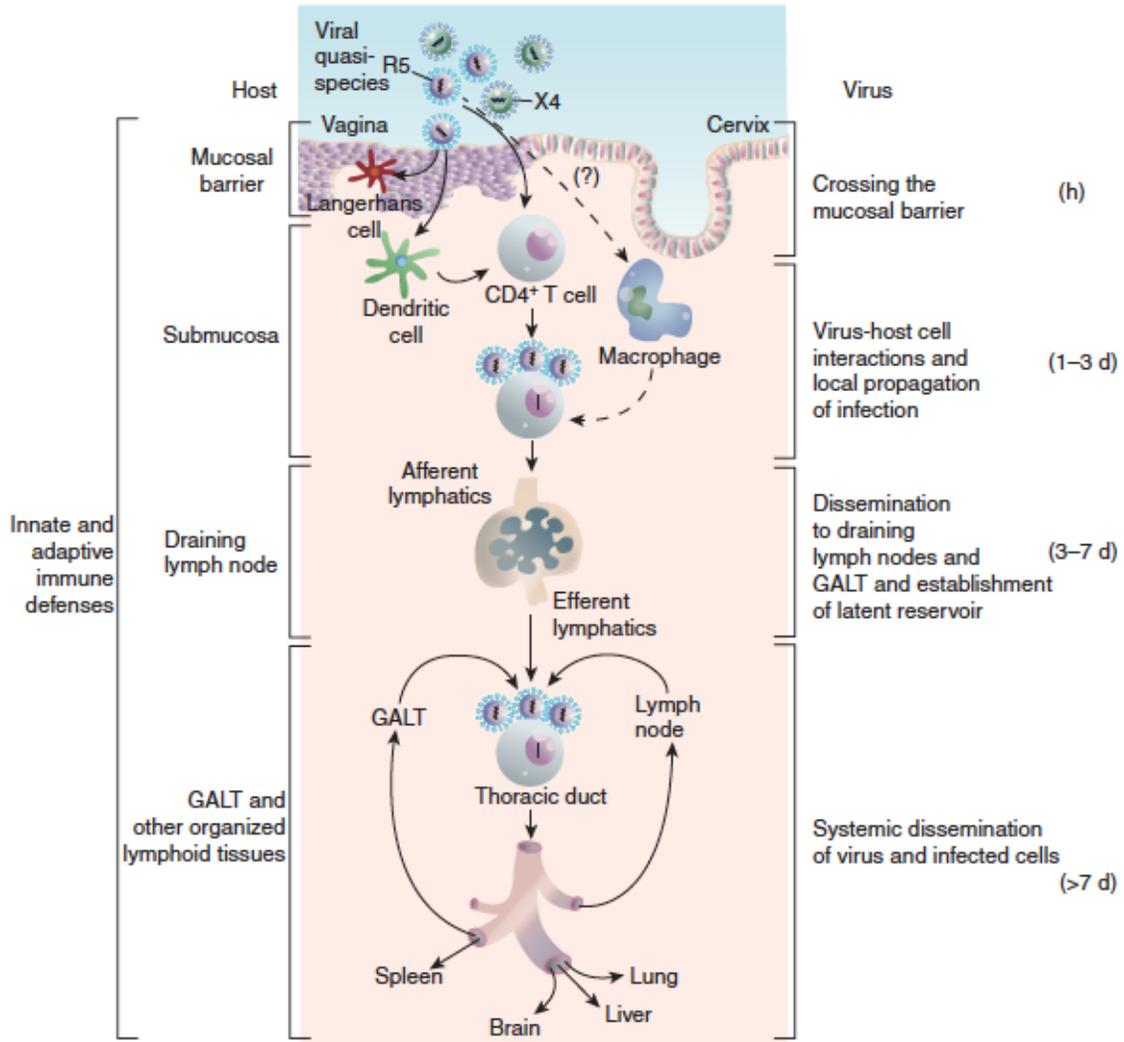


Figure 7. Modèle général de l'infection aiguë de la muqueuse cervico-vaginale par le VIH-1

Tiré de: George M. Shaw and Eric Hunter *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012

Durant une courte période, tôt dans le processus d'invasion virale, les réponses immunitaires innées à la muqueuse peuvent réduire efficacement la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 ou l'interrompre complètement avant la propagation (212). Selon les études provenant de modèles d'infection de macaques par le VIS, de modèles d'explants tissulaires vaginales, de modèles mucosaux gastro-intestinaux et de modèles *in vitro* décrivant les interactions virus-

hôte, le passage transmuqueux du VIH-1 et la dissémination se définissent de la façon suivante :

1.2.3.1 Les mécanismes d'invasion par le VIH-1 : Les hypothèses

Le passage transmuqueux viral pourrait s'effectuer comme suit : i) par l'intermédiaire de lésions préexistantes causées par les ITS (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, vaginose bactérienne, VHS-2, etc.), ii) par des brèches épithéliales suite à des trauma (mœurs d'hygiène ou relations sexuelles) de l'épithélium ce qui augmente le risque d'infection favorisant l'inflammation et le recrutement de cellules cibles, iii) par transcytose (transport transcellulaire rapide des virions; i.e. les virions libres ou qui bourgeonnent de cellules infectées dans le lumen vaginal formant des synapses, sont internalisés dans des structures endosomales épithéliales et relâchés au pôle cellulaire opposé (49)) de l'épithélium ou entre les jonctions serrées de celui-ci, iiiii) par l'intermédiaire de cellules de Langerhans (LC) ou de mDC intra épithéliales (réf. section 1.1.3.1), via leurs dendrites qui ont accès au lumen vaginal, pour ensuite infecter les cellules cibles se situant dans la lamina propria. Les LC et DC de la lamina propria peuvent aussi capturer le virus et le transporter, soit directement ou via un transfert à d'autres populations de DC, jusque dans les organes lymphoïdes drainants pour infecter les cellules T CD4⁺ (études du modèle singe d'infection génitale par le VIS *in vivo*) (50, 107, 170, 211, 226, 227) (réf. figure 7).

1.2.3.2 L'épithélium mucosal, les DC mucosales et le VIH-1

Il a été proposé que les mécanismes d'entrée potentiels du VIH-1 (études *in vitro*) par la muqueuse intestinale/vaginale, impliqueraient l'interaction de la gp 120 du virus avec TLR2/4 à la surface des cellules épithéliales et l'internalisation de celui-ci par les cellules épithéliales, productivement infectées ou non. Ces cellules sécrèteraient alors des cytokines pro-inflammatoires, entres autres TNF- α , altérant l'intégrité mucosale de l'intestin (ou du TGF) favorisant la translocation microbienne et alors l'activation immune. Les facteurs de l'immunité innée et l'alcalinisation par le liquide séminal peuvent aussi affaiblir les fonctions de la barrière épithéliale. (228-230).

De plus, il a été suggéré que l'interaction du virus avec l'épithélium mènerait à la sécrétion massive de CCL20 (MIP-3 α) pour attirer les mDC inflammatoires (sécrétant de l'IL-12

favorisant une différenciation Th1) qui secrèteraient à leur tour des β -chimiokines comme CCL3 (MIP-1 α) et CCL4 (MIP-1 β) et des ligands CCR5. Ces ligands bloquent le corécepteur principal du VIH-1 mais aussi peuvent recruter les cellules cibles du VIH qui sont les macrophages et les cellules T CD4+ (études du modèle singe d'infection génitale par le VIS *in vivo*) (231).

CCL20 (MIP-3 α) a aussi des propriétés antimicrobiennes (232) et se lie exclusivement au récepteur CCR6 chez l'humain, ce récepteur étant un marqueur pour les cellules Th17 qui sont des cibles de choix pour le VIH-1 (études sang périphérique *in vivo*) (233, 234), pour les mDC (études mucosales *in vivo*) (235) et pour certaines populations de cellules B (études sang périphérique *in vitro*) (236). L'expression et la sécrétion de cette chimiokine par les CEG du TGF sont constitutives et peuvent aussi être modulées par des conditions inflammatoires (237) (réf. figure 7).

En outre, il a été postulé que l'interaction du VIH-1 avec l'épithélium mènerait à la sécrétion de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) par les CEG via la voie de signalisation menant à l'induction de NF κ B. Le TSLP sécrété par les CEG exposées au VIH-1 activerait les mDC, favorisant la prolifération et la réplication du VIH-1, lorsque co-cultivées avec des cellules T CD4+ autologues. Dans un modèle de singe macaques il a observé une augmentation drastique de l'expression de TSLP avec une augmentation de la réplication virale dans les tissus vaginaux dans les deux premières semaines suite à l'exposition vaginale au VIS. Ces chercheurs stipulent que le dialogue intercellulaire entre les CEG et les mDC, médié par le TSLP induit par le VIH-1, pourrait être un mécanisme important d'invasion du VIH-1 dans la muqueuse (52).

La bataille est extrême et complexe. Comme indiqué plus haut, le VIH-1 peut lier une panoplie de récepteurs de surface cellulaire (réf. section 1.1.3.1). Toutefois, la reconnaissance de molécules virales par les récepteurs Toll-like (TLR) 7 et 9 endosomaux ou d'autres PRR cytosoliques comme les récepteurs hélicases de la famille des RIG-1 like (*retinoic acid-inducible gene* ; RIG-1 et *Melanoma Differentiation-Associated protein 5* ; MDA5) qui sont activés par les ARN db viraux présents dans le cytoplasme, résulte en une sécrétion d'IFN de type I, surtout IFN- α par les plasmacytoïdes DC (pDC) mais aussi par les CEG et les mDC (55, 238). D'une manière autocrine ou paracrine, les IFN-I activent la voie Jak-Stat pour

induire une production de facteurs de restriction viraux tels que APOBEC-3G, SAMHD1, tétherine, ISG15, OAS, MX2, etc. (études du modèle singe d'infection génitale par le VIS *in vivo*) (18, 19, 21, 239-242).

1.2.3.3 Les cellules NK mucosales et le VIH-1

Les cellules NK sont des lymphocytes ayant une importante fonction effectrice dans la défense innée. Premièrement, ces lymphocytes participent à la régulation de la réponse immune innée et adaptative en produisant diverses cytokines et chimiokines. Deuxièmement, les cellules NK, par un processus ne requérant pas leur immunisation préalable, lysent les cellules tumorales ou infectées par des virus. Leur cytotoxicité est contrôlée par deux types de récepteurs membranaires à activité antagoniste. Il existe sur la membrane cellulaire des NK des récepteurs activateurs (portant des séquences « ITAM » : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); il en existe 22 dont les NKp ou inhibiteurs (portant des séquences « ITIM » : *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*); il en existe 7 dont les KIR (*killer inhibitory receptors*) (243). En effet, l'engagement de ces récepteurs engendre des signaux d'activation ou d'inhibition selon l'identité et la balance du type de récepteur impliqué. Par exemple, les cellules NK sont tenues en échec par la reconnaissance des molécules du CMH-I présentes à la surface de la majorité de nos cellules ; la régulation à la baisse de ces molécules diminue ou parfois même annule l'interaction des récepteurs d'inhibition des cellules NK avec leurs ligands naturels. La cellule infectée devient alors vulnérable à l'activité lytique des cellules NK.

Une sous-population de cellules NK, exprimant le CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5, peuvent être infectées de façon productive par les souches R5 et X4 du VIH-1 *in vitro* (244). La régulation à la baisse de la synthèse du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I par le virus (Nef) ajouté à la présence d'IFN- α et de cytokines pro-inflammatoires de type Th1 activent les cellules NK, car il y a moins de ligands pour les KIR (études du modèle singe d'infection génitale par le VIS *in vivo*) (231). Il a été démontré, dans notre laboratoire, qu'un niveau peu élevé de HLA-G soluble plasmatique, une molécule immunosuppressive ligand des KIR, (réf. section 1.2.6.2) est associée à l'infection par le VIH-1. En effet, dans ce contexte d'infection virale, HLA-G soluble n'avait jamais été étudiée au niveau mucosal génital, ce qui a été fait dans cette étude et nous en parlerons d'avantage dans la section

discussion de cette thèse (modèle TS VIH-1 positives humain *ex vivo*).

Une autre fonction effectrice primordiale des cellules NK dans la réponse immunitaire contre le VIH-1 est son activité ADCC (cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante) médiée par des anticorps antiviraux se liant au récepteur FcγRIIIa (CD16) sur les cellules NK (245).

1.2.3.4 Les lymphocytes B mucosaux et le VIH-1

Le microenvironnement mucosal génital infecté par le VIH-1 est producteur de facteurs de restriction viraux, toutefois, la formation d'anticorps neutralisants efficaces est limitée par l'excessive mutagénèse et la glycosylation des épitopes de l'enveloppe virale. Les lymphocytes B sont peu permissifs à l'infection par le VIH-1. Par ailleurs, le VIH-1 opsonisé par des molécules du complément peut s'attacher au récepteur CD21 en surface de ces cellules.

D'autres récepteurs de surface peuvent aussi interagir avec le VIH-1 (DC-SIGN et les récepteurs de mannose). L'infection par le VIH-1 aux muqueuses entraîne une profonde dérégulation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B et ceci, tôt dans l'infection (revue par (89, 246, 247)). D'autre part, les cellules B jouent un rôle très important aux muqueuses dans l'infection par le VIH-1. En effet, des études menées par Bomsel et al., sur la production d'anticorps spécifiques contre le VIH-1 à la muqueuse génitale ont démontré le principe de la compartimentalisation immunitaire mucosale (réf. section 1.2.6). Ces études montrent qu'un vaccin qui a stimulé la production d'anticorps (IgA et IgG) spécifiques contre la gp41 à la muqueuse vaginale a été suffisant pour protéger des singes de l'exposition à un virus virulent.

Les IgAs ont bloqué la transcytose du virus vers la lamina propria et les IgG mucosaux se sont avérés efficaces en effectuant de l'opsonisation et en participant à l'ADCC. Ceci explique le fait que certains individus ne développant pas d'anticorps anti-VIH-1 dans le sang périphérique mais peuvent contrôler l'infection même s'ils sont hautement exposés au VIH-1 (modèle vaccinal de singe infectés par le VIH-1 *in vivo*) (248, 249).

1.2.3.5 Les lymphocytes T mucosaux et le VIH-1

Les événements précédents causent de l'inflammation à la muqueuse. Il y a aussi production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui empêche la prolifération des cellules T. IDO est une

enzyme intracellulaire particulièrement exprimée par les DC et les macrophages et elle pourrait être induite par la protéine régulatrice Tat du VIH. De plus, dernièrement, il a été rapporté que le catabolisme du tryptophane induit par IDO résulte en un déséquilibre du ratio Th17/Treg et favorise la translocation microbienne dans la phase chronique de l'infection par le VIH (250). La production d'IDO dans la muqueuse génitale peut limiter la progression virale mais aussi l'action antivirale des cellules T.

Cet état inflammatoire du TGF active NFκB amplifiant la réplication virale. D'un autre côté, les lymphocytes Treg (réf. section 1.2.6) s'accumulent restreignant l'activation immunitaire et les réponses antivirales spécifiques au VIH-1. L'intégrité muco-sale médiée par les cellules Th17 (réf. section 1.2.3.2) est aussi perturbée. On estime aussi que les cellules Treg pourraient altérer les propriétés des cellules présentatrices d'antigènes en envoyant un signal inhibiteur via la molécule de surface CTLA-4 reconnue sur la cellule présentatrice d'antigène par CD80 ou CD86, de même que les interactions entre ces cellules et les lymphocytes T. C'est pourquoi la capacité de l'hôte à maintenir une balance adéquate T effectrice/Treg est importante dans le succès de la réponse immunitaire contre le VIH-1 (251, 252).

Le dysfonctionnement immunitaire associé à l'infection par le VIH-1 est éloquent en ce qui concerne les cellules T CD8+. Alors que les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle clé cytotoxique dans le contrôle de la virémie durant la phase aiguë, ils présentent de nombreuses anomalies durant la phase chronique telles que la perte des fonctions cytolytiques, une maturation inadéquate et une prolifération limitée. Ceci engendre une incapacité des cellules T CD8+ à contrôler la réplication virale (études du modèle singe d'infection génitale par le VIS *in vivo*) (253, 254).

1.2.3.6 L'importance des modèles d'études d'infection du VIH-1 à la muqueuse vaginale

Les interactions intercellulaires hôte-virus dans les jours initiaux suivant l'infection ont été élucidées grâce au modèle de singe macaques indiens infectés par le VIS/VIHC (107, 211), au modèle d'explant cervico-vaginal humain et au modèle *in vitro* d'infection par le VIH-1 (50, 255).

Auparavant, les modèles d'explants tissulaires étaient davantage utilisés dans l'étude du prépuce et des tissus gastro-intestinaux (256, 257). La plupart des informations obtenues par

ces études corrèlent avec les études d'infection de primates par le SIV (211). Ensuite, Hladik et al., en 2007, ont décrit un système de culture d'organe vaginal humain. Ce modèle a permis l'identification, l'étude de la signalisation et du transport de cellules infectées par le VIH-1 qui provenaient exclusivement de l'épithélium vaginal vers le milieu de culture. Dans ce système, les virions ont lié (à l'aide de la protéine Env) et infecté productivement des cellules T CD4+ CCR5+ CD45RO (mémoires), suite à 2 heures d'exposition du virus à l'épithélium intact (50). Cette étude a démontré une infection productive rapide des cellules T CD4+ mémoires, l'internalisation et la persistance du VIH-1 dans les LC associées aux cellules T CD4+ ce qui corrèle avec les données obtenues par les modèles d'infection de macaques par le VIS (211, 258-260) .

Bien que ces modèles de culture cellulaires *in vitro*, d'explants tissulaires *ex vivo* ou les modèles d'infection de macaques par le VIS/VIHC nous aient apporté un nombre significatif d'observations et de données concernant la transmission par voie mucoale génitale du VIH-1, maintes questions restent en suspens. D'autres études de transmission devront avoir lieu et devront porter une attention particulière aux souches virales utilisées qui devraient mieux refléter la réalité des souches transmises fondatrices naturelles (170).

La progression de l'infection par le VIH-1 est influencée par plusieurs paramètres complexes dépendants de la génétique et facteurs de virulence viraux, de la génétique de l'hôte, de son environnement inflammatoire en place et de facteurs environnementaux.

1.2.3.7 La fenêtre de vulnérabilité virale

Le virus doit établir une petite population fondatrice pour amplifier sa réplication localement utilisant les cellules cibles présentes et celles nouvellement recrutées par la signalisation cellulaire. À ce moment, un vaccin ciblant une immunité mucoale induisant des réponses de premières lignes et adaptatives induisant des anticorps neutralisants ou des anticorps favorisant une ADCC avec l'aide des cellules tueuses naturelles (NK) et des macrophages pourraient prévenir ou contrôler l'infection, comme le font les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces mécanismes doivent avoir lieu à la porte d'entrée virale où ils auraient le plus de chances d'être efficace contre le virus (107, 249).

Dans le tissu cervico-vaginal, après la phase d'entrée, une fenêtre d'opportunité d'intervention efficace très tôt en début d'infection a été déterminée par Haase et al. Cette fenêtre dure 4

jours post-infection où l'ADN est détectable mais pas l'ARN viral ni les cellules infectées (107, 170, 211). La modulation de l'inflammation par le microbicide glycérol monolaurate (GML) chez le modèle macaques infectés par le VIS représente une preuve de concept de l'efficacité potentielle de cette approche préventive. Ce microbicide agit sur des voies de signalisation des cellules épithéliales génitales pour diminuer l'expression de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (193) (réf. section 1.2.5.2). Ensuite, une immunisation passive avec l'aide d'anticorps monoclonaux neutralisants comme par exemple le 2F5, 4E10, 2G12 et B12 dans un modèle d'infection par un VIH-1, a procuré une autre preuve de concept de la vulnérabilité du VIH-1 à la porte d'entrée mucoale (261-267).

Une interaction complexe de réponses innées de l'hôte très tôt dans l'infection peut contribuer au contrôle et à l'élimination du virus, cependant, ces réponses peuvent aussi faciliter la transmission en recrutant de nouvelles cibles potentielles pour l'infection (193, 211).

L'établissement de l'infection survient si les cellules infectées parviennent à migrer aux nodules lymphatiques drainants génitaux et aux tissus lymphatiques du GALT (*gastrointestinal associated lymphoid tissue*) (107, 211, 227, 231). Lorsque l'ARN viral est détectable dans le plasma, le virus se réplique d'une manière exponentielle (268) dans le GALT et dans les tissus lymphoïdes systémiques (105, 211).

1.2.4 L'immunité mucoale : La tolérance

La tolérance immunologique est un aspect important du projet de recherche. Nous croyons que la tolérance aux muqueuses chez notre groupe de femmes HESN pourrait être un mécanisme de modulation de l'inflammation et donc de contrôle de l'infection par le VIH-1. Les principes de la régulation immunitaire se définissent comme suit : empêcher l'activation lymphocytaire excessive et les dommages tissulaires durant les réponses protectrices normales contre des pathogènes, prévenir les réactions inappropriées contre les antigènes du soi (tolérance au soi) et la défaillance des mécanismes de contrôle qui mènent à l'apparition de maladies inflammatoires induites par l'immunité (autoimmunité) (269).

1.2.4.1 La tolérance centrale

La tolérance centrale ne sera que brièvement résumée ici, le but principal étant d'expliquer les mécanismes de tolérance aux muqueuses. Les lymphocytes proviennent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Le développement de ces cellules souches précurseur en cellules qui seront appelées à devenir des cellules B ou T suit les principes de la différenciation cellulaire. Le microenvironnement spécialisé de la moelle osseuse fournit les signaux nécessaires pour que la différenciation ait lieu (195).

1.2.4.1.1 Les lymphocytes B

En bref, le développement des cellules B commence par un réarrangement du locus des gènes de chaînes lourdes des cellules pro-B dans la moelle osseuse. Les cellules pré-B réarrangent le locus du gène de la chaîne légère (Igκ), expriment des immunoglobulines (IgM) à la surface cellulaire et se différencient en cellules B immatures. Ces cellules sont ensuite testées (sélection clonale) pour leur autoréactivité avant de quitter la moelle osseuse. Les cellules autoréactives peuvent changer leurs récepteurs de surface (*B cell receptor*; BCR) ou être éliminées par délétion clonale. L'élimination ou l'inactivation des cellules B autoréactives assure que la population de cellules B nouvellement produite sera tolérante aux antigènes du soi; c'est ce que l'on nomme la tolérance centrale (195).

1.2.4.1.2 Les lymphocytes T

En ce qui concerne les lymphocytes T, en définitive, les progéniteurs des cellules T originent de la moelle osseuse, mais tous les événements importants de leur développement surviennent dans le thymus. Les précurseurs des cellules T prolifèrent dans le thymus et plusieurs meurent par apoptose, ceci reflétant le triage intensif et restrictif déjà à cette étape. Des étapes successives dans le développement des thymocytes sont marquées par des changements dans leurs molécules de surface cellulaires (réarrangements génétiques des récepteurs (*CD3/T cell receptor*; TCR) et des corécepteurs (CD4 et CD8) des cellules T). Le type de CMH du soi exprimé sur les cellules du stroma thymique sélectionne (choisit) un répertoire de TCR sur les cellules T matures qui peuvent reconnaître des antigènes étrangers présentés par le même type de CMH du soi (sélection positive). La sélection positive coordonne l'expression de CD4 ou

de CD8 avec la spécificité du récepteur de cellules T et les fonctions effectrices potentielles de ces cellules T. Les cellules T qui réagissent avec une trop forte affinité avec des antigènes du soi sont délétées dans le thymus (sélection négative). Lorsqu'un récepteur de cellules T d'un thymocyte en développement se lie fortement à un peptide du soi : CMH dans le thymus (présenté principalement par des DC ou des macrophages), il meurt par apoptose. La réponse d'une cellule T immature à une stimulation antigénique est la base de la sélection négative dans le thymus. L'élimination de ces cellules T immatures prévient de potentielles réactions autoimmunes futures (195).

La contribution des cellules myéloïdes dans la tolérance immune centrale est très importante mais encore mal connue. Les DC, cellules sentinelles qui ont la capacité de présenter des peptides et d'activer des cellules T naïves (270). Il a été proposé que les DC thymiques présentent des antigènes du soi acquis des cellules épithéliales médullaires thymiques qui expriment plusieurs protéines spécifiques tissulaires (271). Un autre mécanisme proposé est celui par lequel il y a une recirculation des DC périphériques dans le thymus qui présentent des antigènes périphériques du soi pour induire une délétion clonale ou pour générer des Treg (272, 273).

1.2.4.2 La tolérance périphérique

1.2.4.2.1 Les lymphocytes B

Les cellules B autoréactives qui ont échappées à la sélection clonale de la tolérance au soi et qui continuent leur développement peuvent toujours être éliminées en sortant de la moelle osseuse. Premièrement, lorsque des cellules B en développement expriment des récepteurs qui reconnaissent des ligands (molécules du soi) multivalents, il y a délétion clonale (mort cellulaire par apoptose) ou bien réorganisation des récepteurs autoréactifs pour générer des cellules B non autoréactives. Aussi, des cellules B immatures peuvent lier des antigènes du soi solubles, exposés d'une manière chronique, et alors devenir anergiques (répondant faiblement ou pas du tout aux signaux de stimulations; sont inactivées). Ces cellules migrent tout de même vers les organes lymphoïdes périphériques, elles expriment des IgD mais restent anergiques. Finalement, des cellules B immatures liant des autoantigènes avec une faible affinité demeurent dans un état d'ignorance immunologique (ont une affinité pour un antigène

du soi mais ne réagissent pas à sa rencontre) (195, 269). Les mécanismes de tolérance périphérique sont ébranlés dans plusieurs contextes inflammatoires tels que dans le cas de VIH ou de maladies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn (274) ou la rectocolite hémorragique (275).

1.2.4.2.2 Les lymphocytes T

La sélection négative survenue dans le thymus ne prenait en compte que des autoantigènes pouvant être exprimés dans le thymus mais ce n'est pas tous les antigènes du soi qui peuvent être exprimés dans les organes lymphoïdes centraux, plusieurs sont hautement tissus spécifiques et/ou compartimentalisés. La plupart du temps, les cellules T matures qui réagissent à un antigène du soi dans un organe lymphoïde secondaire sont éliminées par apoptose. Parfois, il arrive tout de même que les cellules T matures réagissant aux molécules du CMH du soi d'une manière faible et chronique; elles sont devenues anergiques, inactives, elles n'ont pas de fonction effectrice (276).

La contribution des cellules myéloïdes dans la tolérance immune périphérique est aussi critique. La spécificité d'un antigène cible et l'identité d'une population de DC ciblée sont des facteurs très importants dans la résultante d'une réponse immunitaire. Aussi, l'identité du récepteur ciblé, par un antigène, sur les DC et sa voie de signalisation peuvent fondamentalement influencer la réponse cellulaire T soit vers une réponse très faible, soit vers une activation (273, 277).

1.2.4.3 HLA-G : Une molécule importante de la régulation immunitaire

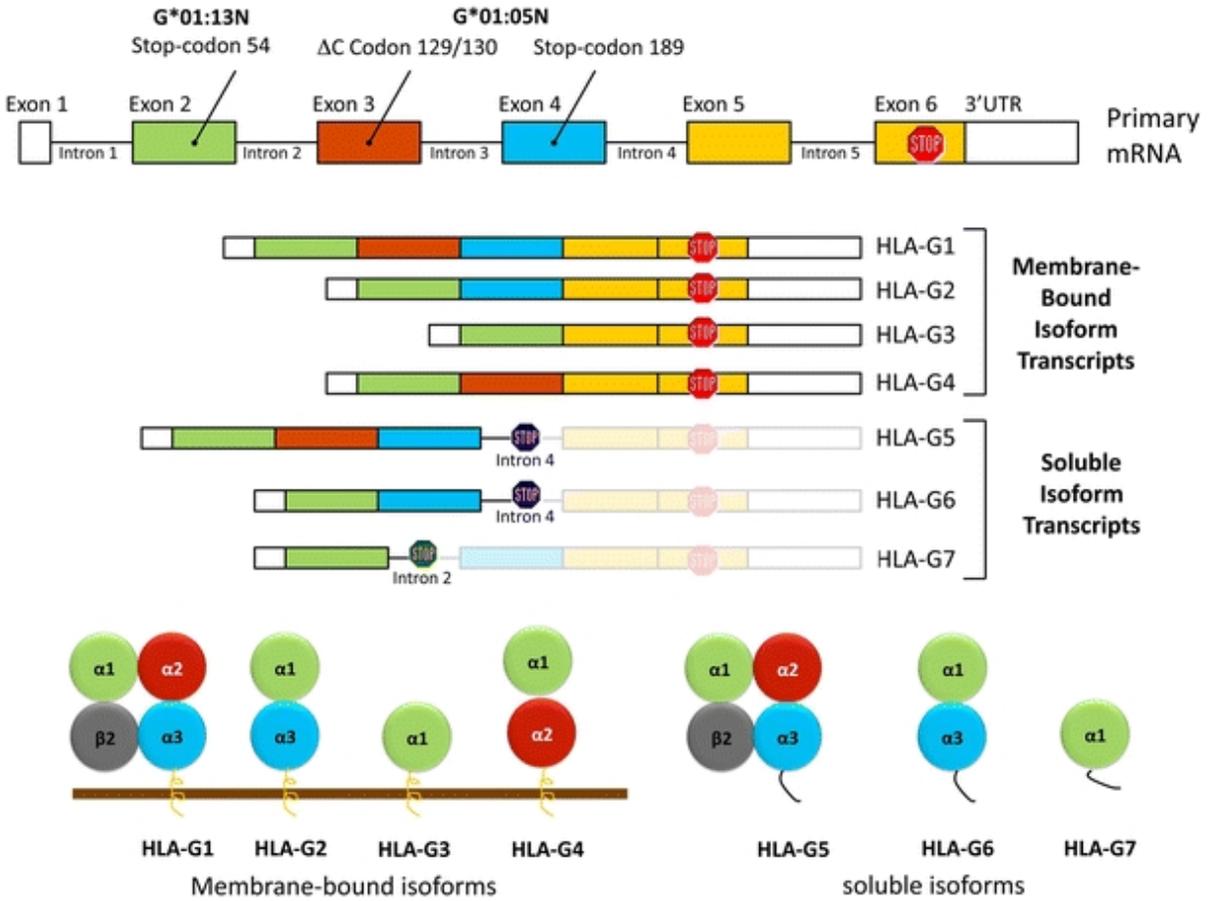


Figure 8. Les isoformes de HLA-G produits suite à l'épissage alternatif du transcrit (ARNm) primaire.

Tiré de : Donadi et al. Cell Mol Life Sci. Feb 2011; 68(3): 369–395.

HLA-G est une molécule fortement immunosuppressive faisant partie du HLA classe Ib non-classique ayant une expression restreinte à certains tissus requérant une tolérance entière en condition physiologique tels que : placenta, cornée, thymus, épithélium génital féminin (278). HLA-G a été premièrement décrite en condition de tolérance materno-fœtale (279). Cette molécule a un polymorphisme (variabilité protéique) limité. Les sites polymorphiques présents dans les régions codantes et non-codantes dans le gène de HLA-G peuvent potentiellement affecter ses caractéristiques biologiques (280). HLA-G fonctionne via les récepteurs inhibiteurs ILT2 (LILRB1), ILT4 (LILRB2) et KIR2DL4 (CD158d) en inhibant l'activation

de plusieurs cellules immunitaires (T CD4+, T CD8+, DC, NK) et son rôle en pathologie est prouvée dans les domaines suivants : autoimmunité, transplantation tissulaire, oncologie, maladies inflammatoires et infections virales (résumé par (281)). Structuralement, HLA-G a 7 isoformes (4 membranaires : HLAG-1 à -G4, et 3 solubles : HLA-G5 à -G7) qui sont générés par épissage alternatif du transcrite primaire. Les isoformes de HLA-G solubles et membranaires ont des fonctions similaires (278, 282). Jusqu'à présent, 44 allèles de HLA-G ont été décrits et codent pour 14 protéines fonctionnelles qui sont : HLA-G*0101, *0102, *0103, *0104, *0106, *0107, *0108, *0109, *0110, *0111, *0112, *0114, *0115 et *0116. L'allèle G*01:13N n'est probablement pas exprimés du à la présence d'un codon stop prématuré à l'exon 2 et une délétion d'une cytosine à l'exon 3 de l'allèle G*01:05N occasionne un changement de cadre de lecture ouvert provoquant aussi la présence d'un codon stop à l'exon 4 (réf. figure 8).

L'évolution virale a créé plusieurs stratégies pour évader les réponses et immuno-surveillance de l'hôte. Des stratégies comme la modulation à la baisse de HLA classe I prévient la présentation de peptides viraux pour échapper à la cytolysse des cellules T (283). En principe, les cellules infectées par des virus dont leurs molécules de HLA classe I sont régulées à la baisse devraient être vulnérables à la cytolysse médiée par les cellules NK. Cependant, les virus ont développé des mécanismes pour empêcher la reconnaissance par les cellules NK en exprimant des molécules de HLA-G (284) qui peut supprimer les fonctions de plusieurs cellules immunitaires, comme mentionné précédemment. Les propriétés immunosuppressives de HLA-G, pourraient contribuer à la susceptibilité et persistance d'infections virales.

Des études décrivant l'association entre l'expression de HLA-G et l'infection par le VIH-1 ont démontré des résultats contradictoires. De hauts niveaux de HLA-G solubles (285) et l'augmentation d'un niveau d'expression de surface de HLA-G sur des monocytes et des lymphocytes T (286) ont été observé chez des européens caucasiens infectés par le VIH-1 et traités comparés à des individus contrôles sains. En revanche, de faibles niveaux de HLA-G solubles plasmatiques ont été associés à l'infection par le VIH-1 chez des TS béninoises non-traitées (nos travaux) (8). La différence entre les résultats de ces études peut être attribuée premièrement au traitement ARV qui induit l'expression de surface de HLA-G sur les monocytes du sang périphérique de patients infectés par le VIH-1 (287). Dans le contexte

d'infections virales, l'expression de HLA-G est un processus complexe modulé par plusieurs facteurs tels que : le polymorphisme de HLA-G, le stade de l'infection, les traitements et le patron d'expression cytokiniques pouvant contribuer à l'environnement immunologique affectant la résultante de l'infection. HLA-G, que ce soit membranaire ou soluble, n'a jamais été étudié dans le contexte de l'infection par le VIH-1 au niveau de la muqueuse génitale féminine.

1.2.4.3.1 D'autres molécules régulatrices primordiales

L'IL-10 est une cytokine ayant majoritairement des propriétés immunosuppressives bien que cette cytokine puisse activer les cellules B, dépendamment du contexte inflammatoire dans lequel elle se retrouve; elle diminue l'inflammation et la réponse immunitaire en modulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires et en régulant à la baisse l'expression de molécules de surface cellulaire telles que les molécules du CMH II (288). IL-10 est exprimé par les monocytes, les DC, les cellules T, les cellules B et aussi par des cellules tumorales (289). IL-10 est régulée, entre autres, par les interférons. En particulier, IFN- γ diminue l'expression de l'IL-10 (290) pendant que IFN- α augmente son expression (291, 292).

ILT-2 et ILT-4 sont exprimés par les cellules NK (ILT2), les cellules T CD4+ (ILT-2) et CD8+ (ILT-2), les cellules B (ILT-2), les monocytes/macrophages (ILT-2 et ILT-4) et les DC myéloïdes (ILT-2, ILT-3 et ILT-4). Il a été postulé que le récepteur ILT-4 pourrait moduler des fonctions de capture et présentation antigénique, de capacité migratoire, de production cytokinique et d'expression de molécules de costimulation par les cellules myéloïdes (293). De plus, le traitement de mDC avec HLA-G soluble altère la communication DC/NK, menant à une cytotoxicité réduite par les cellules NK (294).

Il a aussi été observé qu'une surexpression d'ILT-3 et ILT-4 était une caractéristique des DC tolérogéniques (295). HLA-G, en se liant aux récepteurs ILT présents sur les APC myéloïdes, induit leur différenciation en cellules régulatrices. Les APC sont sensibles aux interactions avec HLA-G et aussi peuvent exprimer tous les isoformes d'HLA-G (HLA-G 1 et -5 ayant été les plus décrits). Les propriétés de ces APC sont: l'inhibition de la lyse cellulaire par les cellules NK, les cellules T CD8+ et la suppression des fonctions effectrices des cellules T CD4+ (296). L'expression basale de HLA-G par les cellules myéloïdes est vraiment favorisée

par les facteurs microenvironnementaux comme par exemple, les interférons de type I et II (297, 298) et l'IL-10 (299, 300). Des études *in vitro* ont démontré que les mDC sont devenues tolérogéniques suite à un traitement avec de l'IL-10 et/ou IFN- α et que l'expression de leurs récepteurs ILT3 et ILT4 a été augmentée (293). De plus, il a été démontré que IFN- α , - β and - γ augmentent l'expression de HLA-G à la surface de cellules tumorales ou de monocytes (297, 301-303) et que HLA-G augmente l'expression de ILT-2, ILT-3 et ILT-4 dans des lignées cellulaires lymphocytaires et myéloïdes (304).

Dans cette étude qui porte sur l'infection par le VIH-1, les interférons de type I sont des cytokines primordiales considérant leurs propriétés antivirales et aussi immunorégulatrices. Ces IFN-I sont sécrétés par des cellules infectées et effectues trois fonctions principales. Premièrement, ils induisent un état antiviral dans les cellules infectées (ou pas, dans le cas de IFN- ϵ) et dans les cellules voisines (par la synthèse de plusieurs différents facteurs de restrictions viraux), ce qui limite la propagation virale. Ensuite, ils modulent les réponses immunitaires innées d'une manière à maintenir un état homéostatique du microenvironnement en favorisant la présentation antigénique et les fonctions cellulaires des NK tout en limitant les voies de signalisation cytokiniques pro-inflammatoires. Troisièmement, ils activent les réponses immunitaires adaptatives, favorisant le développement des réponses cellulaires T et B de hautes affinités et de la mémoire immunologique (305).

1.2.4.4 Les mécanismes de régulation immunitaire

Les APC sont des cellules spécialisées qui capturent, traitent et présentent des antigènes (peptides), par l'intermédiaire du CMH, antigènes leucocytaires humains (HLA) classe I et II, pour activer les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. Elles font la liaison entre l'immunité innée et adaptative. Lorsqu'une réponse immune est engendrée, pour les lymphocytes B suite à la rencontre d'un antigène microbien ou d'un complexe immun présenté par les DC et pour les lymphocytes T suite à la rencontre d'un complexe peptide-CMH présenté par les DC, il y a généralement d'abord induction de l'expression de molécules de costimulation sur les DC présentatrices d'antigènes et production de cytokines favorisant l'activation lymphocytaire. Le résultat de la rencontre avec un antigène, dans ces conditions, est l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes pour générer des cellules-filles effectrices (sécrétion

d'anticorps, de cytokines/chimiokines et cytolysse par les CTL) et mémoires. En plus d'induire des réponses immunitaires adaptatives, les DC soutiennent et maintiennent la tolérance immunologique. Les mDC qui se retrouvent dans un microenvironnement anti-inflammatoire et qui se nomment aussi les DC «tolérogéniques», sont impliquées dans l'homéostasie immunitaire et dans l'initiation et le maintien de la tolérance périphérique via l'induction de cellules T régulatrices (Treg) (306).

En absence d'inflammation, les DC continuent de présenter des antigènes du soi mais en absence de signaux de costimulation adéquats, les interactions entre les lymphocytes matures et leurs antigènes spécifiques résulteront, soit en la mort cellulaire (apoptose), l'anergie cellulaire (l'inactivation) ou bien en une induction de tolérance, rendant les lymphocytes capables de suppression immunitaire (195, 269). Les cellules NK, les cellules T et les cellules B ont à leur surface des récepteurs inhibiteurs (responsables de la régulation des réponses immunitaires) majeurs de costimulation se liant à la protéine membranaire périphérique B7 sur les APC (DC) qui sont : CTLA-4, ICOS et PD-1. Ces récepteurs préviennent les réactions contre les antigènes du soi et suppriment les réactions immunes contre des tumeurs et des infections chroniques (virus de l'hépatite C (VHC) et VIH) (269).

1.2.4.4.1 Les DC «tolérogéniques»

Les DC «tolérogéniques» (nommées DC-10) circulantes ou résidentes dans les tissus, sont caractérisées par une forte expression d'IL-10, moins d'IL-12 et de molécules de costimulation et peuvent amorcer la différenciation des cellules T en Treg. Ces DC ont aussi le marqueur CD103 (*homing receptor*) dans les tissus intestinaux et langérine dans les tissus épidermiques (revue par (306)). Les DC-10 circulantes sont identifiées comme suit : CD14+, CD16+, CD11c+, CD11b+, HLA-DR+, CD83+, CD1a-, CD1c-. Elles expriment aussi ILT-2, ILT3, ILT4, HLA-G et ont la fonction spécifique d'induire les Tr1 via l'IL-10 et la voie de signalisation ILT4/HLA-G (299, 307, 308). Les DC-10 n'ont jamais été identifié au niveau du TGF.

1.2.4.4.2 Les cellules T régulatrices

Les cellules Treg retrouvées en périphérie sont des cellules immuno-modulatrices et plusieurs sous-populations existent (309, 310). Les cellules Treg naturelles (nTreg) et induites (iTreg) ont été décrites. Les nTreg (CD4+, CD25+) proviennent du thymus et leur fonction suppressive est dépendante du facteur de transcription FOXP3+ (*forkhead box P3*) (311). Pour leur part, les iTreg comprennent : les cellules Treg type 1 productrices d'IL-10 (Tr1) (299, 309), les cellules T auxiliaire 3 sécrétrices de TGF- β (*transforming growth factor*) (Th3) (312), ces deux types cellulaires proviennent de cellules T naïves en périphérie suite à l'activation de DC dans un milieu tolérogénique. Les cellules Treg FOXP3+ induites peuvent être générées de cellules T CD4+ en présence de TGF- β (313) et finalement, les cellules iT35 qui sont aussi générées en périphérie, le sont d'une manière IL-35 et IL-10 dépendante (314). Une autre sous-population existe et est celle des cellules T CD8+ CD28- suppressives (Ts) spécialisées qui rendent les APC tolérogéniques en favorisant l'expression de ILT3 et ILT4 (LILRB2) (293).

Une sous-population de nTreg circulantes nommées Treg HLA-G+ qui effectuent leur fonction suppressive par la sécrétion d'IL-10 et partiellement par la sécrétion de HLA-G5 mais qui, contrairement aux Tr1, n'a pas besoin d'un autre type cellulaire (DC) pour fonctionner a été identifiée. Ces cellules semblent être d'origine thymique, CD4+ ou CD8+ CD25-, FOXP3- (315, 316).

Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, un autre groupe a identifié une sous-population de cellules Treg cette fois nommée Treg HLAG+ non-classique ayant la capacité fonctionnelle de réduire l'activation immunitaire environnante mais un potentiel inhibiteur pour les cellules T spécifiques au VIH-1, ce qui nuit à la réponse anti-virale de l'hôte. Cette population de cellules Treg pourrait donc être une cible pour de futures interventions thérapeutiques. Ces cellules Treg HLA-G+ pourraient contribuer à balancer l'activité immunitaire antivirale et l'activation immunitaire pendant l'infection par le VIH-1 (317).

Les cellules Treg FOXP3+ font la liaison entre la tolérance centrale et périphérique ; ces cellules contrôlent les T autoréactives et l'activité des T effectrices en périphérie et toutes deux ont, au préalable, été soumises au processus de sélection négative thymique. La balance

Teffectrices/Treg FOXP3⁺ est maintenue d'une manière dynamique suite à des stimulations antigéniques qui activent les deux populations. Les variations (génétiques, environnementales) qui peuvent affecter cette balance prédisposent l'hôte à des déséquilibres immunitaires se manifestant par une susceptibilité accrue à certaines infections, des maladies autoimmunes, etc (276).

1.2.4.4.3 Autres cellules régulatrices

D'autres cellules à fonctions régulatrices existent comme par exemple certains macrophages ou des cellules myéloïdes dérivées suppressives (MDSC) (revue par (318)). Il a aussi été observé que des cellules souches mésenchymales peuvent avoir des propriétés régulatrices, ayant la capacité de supprimer les fonctions effectrices des cellules T via des mécanismes de contact cellulaire et de sécrétion de facteurs solubles incluant HLA-G soluble et IL-10 (319). Il est à noter qu'il existe aussi une sous-population de cellules B régulatrices (Breg), produisant de l'IL-10, qui a été identifiée chez la souris et l'humain (320, 321). On pense que les cellules Breg sont impliquées dans le contrôle de certaines maladies autoimmunes par l'inhibition des cellules T CD4⁺ (322). En particulier, les cellules Breg peuvent aussi contrôler des réponses T CD8⁺ spécifiques contre le virus de l'hépatite B (VHB) chez des individus ayant une infection chronique par le VHB ; la suppression est médiée par l'IL-10 (323). Cependant, une surexpression de l'IL-10 par les Breg dans le contexte VIH et VHB active les cellules B et supprime les cellules T effectrices. Une autre étude a démontré que les cellules Breg (productrices d'IL-10), induites tôt dans l'infection, peuvent inhiber des réponses T effectrices spécifiques contre le VIH-1 chez des individus infectés; le VIH-1 pourrait déréguler la balance cellules B effectrices/Breg comme stratégie d'évasion immune (101). De plus, des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré l'importance du maintien de l'intégrité des cellules B de premières lignes (exprimant l'IL-10 et la lymphotoxine- α) dans le contrôle de l'infection par le VIH-1 (98). (réf. section 1.1.5.3)

Finalement, les APC HLA-G⁺ sont des cellules «tolérogéniques» ayant la capacité de promouvoir la différenciation de cellules T naïves en cellules Treg. Ce qui est intéressant est que l'expression de HLA-G1 et de ses récepteurs est favorisée par l'IL-10 sur les DC-10 et les cellules T et que l'expression de HLA-G1, ILT-4 et l'IL-10 est favorisée par les DC-10 qui

sont critiques dans la génération des Tr1. Les Tr1 sécrètent aussi de l'IL-10 favorisant la synthèse *de novo* de HLA-G et de ses récepteurs par les DC voisines (324). C'est ce que l'on appelle la boucle d'amplification tolérogénique, donnant à HLA-G un rôle central dans l'initiation d'un microenvironnement tolérogénique (282).

1.2.4.5 La tolérance aux muqueuses orchestrée par les cellules myéloïdes

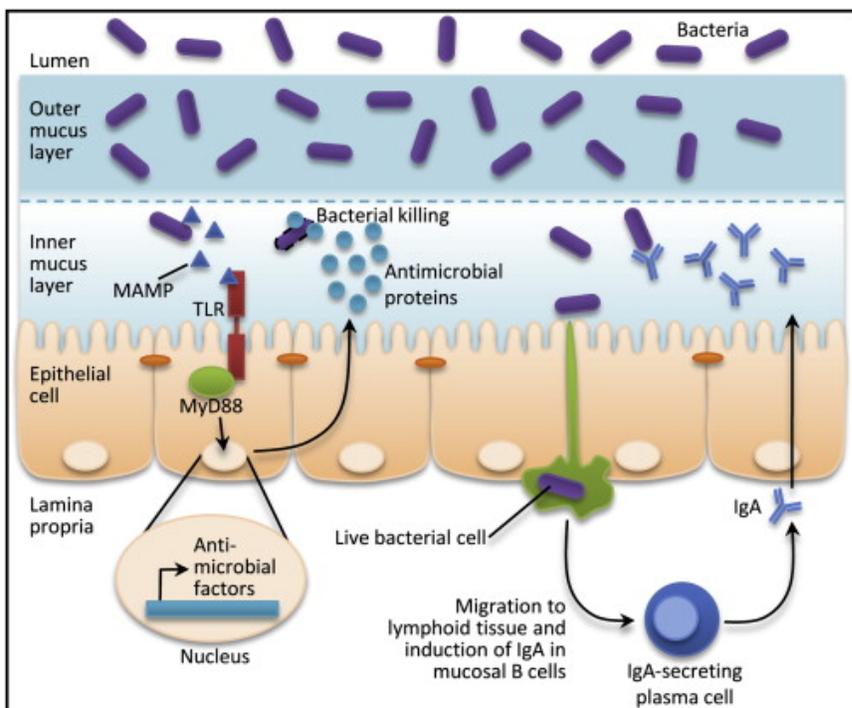


Figure 9. La boucle rétroactive de l'immunité innée et adaptative participe à la régulation des interactions bactériennes avec les surfaces muqueuses.

Tiré de : Breck A. Duerkop et al. *Immunity* vol.31, Issue 3, 18 Sept. 2009, pp.368-376

Avant d'entamer cette section, il est important de mentionner que ce mécanisme de tolérance est d'avantage étudié dans le modèle mucosal gastro-intestinal ; ces mécanismes étant probablement semblables pour le TGF. Le système immunitaire mucosal doit faire la distinction entre ce qui est bénéfique, i.e. la nourriture, les antigènes environnementaux et la flore commensale et y demeurer «tolérant» *versus* un pathogène potentiel et générer une forte réponse effectrice. Par exemple, une bactérie pathogène entérique utilise diverses stratégies

pour envahir l'hôte induisant des mécanismes inflammatoires. Une forte réponse Th1/Th17 résulte souvent en l'élimination du pathogène (325, 326). Par opposition, les microorganismes de la flore commensale sont reconnus seulement par le système immunitaire muco-sal (muqueuse et tissus lymphoïdes drainants).

Les cellules muco-sales «voient» d'une façon régulière (répétée) les antigènes composant la microbiota qui sont en densité (quantité) constante, ce qui permet le maintien d'une niche cellulaire effectrice et d'une balance Treg/Teffecteurs adéquate. Les microorganismes qui arrivent à joindre la couche de mucus interne (sur laquelle repose l'épithélium), sont détectés par les PRR tels les TLR sur les DC qui reconnaissent les patrons moléculaires conservés des microorganismes (*microbial associated molecular pattern* ; MAMP). À ce moment, des voies de signalisation cellulaire sont activées induisant la synthèse de cytokines/chimiokines anti-inflammatoires. Ensuite, les antigènes microbiens sont présentés, dans un environnement non-inflammatoire, aux cellules T régulatrices résidentes (portant à leur surface le récepteur $\alpha 4\beta 7$, intégrine qui lie CD103 sur les DC) et aux cellules B par des DC spécialisées (CD103+) qui migrent de l'épithélium intestinal aux nodules lymphatiques mésentériques, des réponses adaptatives primordiales ont lieu (326-329) (réf. figure 9).

Les cellules B, de premières lignes et adaptatives, différenciées en plasmocytes productrices d'IgAs, sont très abondantes et les mieux caractérisées de la lamina propria intestinale (124). Ceci résulte en une tolérance muco-sale active qui implique la production locale d'anticorps IgAs spécifiques restreignant/contrôlant la colonisation muco-sale par les microorganismes. Les IgAs se retrouvent par transcytose à la surface apicale des cellules épithéliales limitant ainsi la pénétration des bactéries dans la muqueuse. La qualité ainsi que la densité des microorganismes composant la flore commensale sont aussi contrôlées par les PRR (TLR) sur les cellules épithéliales. Ces cellules, ainsi que les macrophages et les neutrophiles peuvent produire des peptides antimicrobiens et d'autres cytokines (IL-10, TGF- β , TSLP et autres) anti-inflammatoires qui participent au maintien de l'homéostasie cellulaire génital (330, 331). Les bactéries commensales ont un effet bénéfique pour l'hôte mais ne doivent pas pénétrer la barrière muco-sale c'est pourquoi les mécanismes d'immunorégulation muco-saux sont si importants. En même temps, une «ignorance immunitaire» de ces antigènes par le système

immunitaire systémique a lieu ; ce principe est celui de la compartimentalisation mucoale (332) (réf. figure 9).

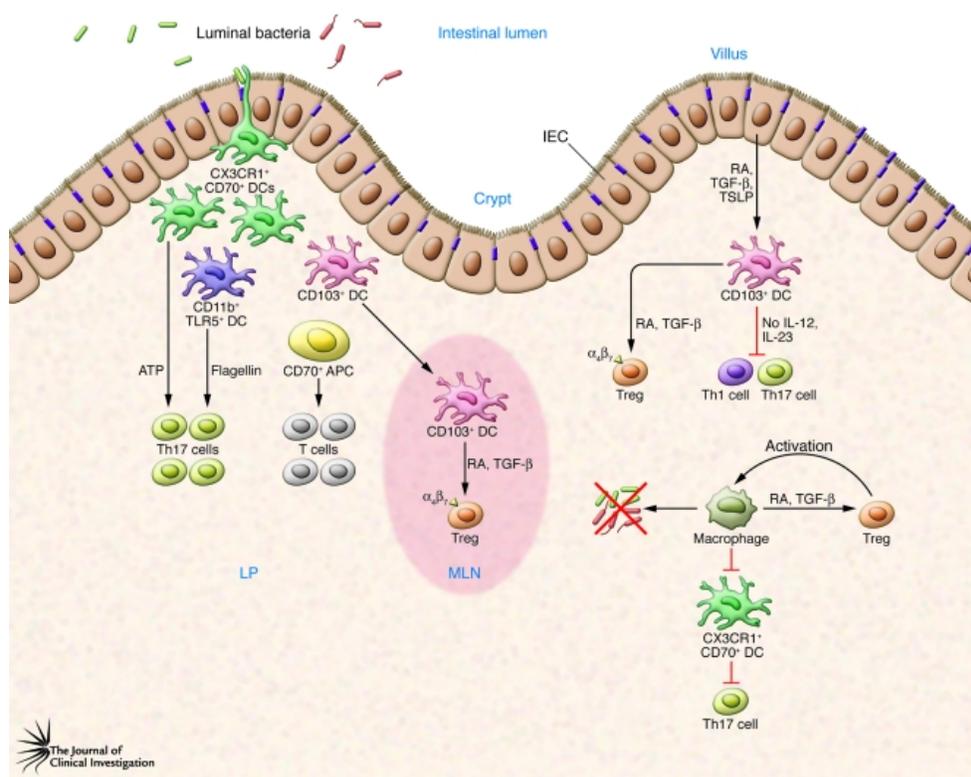


Figure 10. Distribution et fonction des DC dans la lamina propria intestinale

Tiré de : Rescigno et al. J Clin Invest. Sep 1, 2009; 119(9): 2441–2450

Il a également été déterminé que la balance homéostatique entre les cellules T effectrices mucoales *versus* les Treg $\alpha 4\beta 7+$ dans l'intestin (nodules lymphatiques mésentériques) est modulée par le dialogue intercellulaire entre les cellules épithéliales qui produisent les facteurs comme l'acide rétinoïque (métabolite de la vitamine A), TGF- β et TSLP, dans un environnement non-inflammatoire, qui influencent hautement le phénotype CD 103+ des DC (les DC ayant aussi la capacité de produire ces facteurs). Les DC CD103+ peuvent ensuite médier la différenciation des Treg en inhibant le développement des cellules Th1 et Th17. Les

macrophages limitent aussi l'inflammation intestinale via l'activation des cellules Treg. (326, 333, 334) (réf. figure 10).

Dans le contexte de l'infection par le VIH-1, l'inflammation et l'activation immune à la porte d'entrée mucoale déterminent l'ampleur de l'expansion de la population virale fondatrice (335). Toutefois, l'induction de réponses tolérogéniques hâtives au virus peut bloquer la propagation virale ou minimiser les dommages aux populations de cellules T auxiliaires mucoales; ceci réduisant l'activation immune résultant de la translocation microbienne. L'activation immunitaire dans la muqueuse est une composante critique dans la susceptibilité à l'infection vaginale par le VIH-1 et dans la pathogénèse du SIDA dans le tractus gastro-intestinal (23).

L'induction de la «tolérance» a un potentiel thérapeutique; elle peut être exploitée pour prévenir le rejet de greffe, pour traiter l'autoimmunité ou des réactions allergiques, pour prévenir des réponses immunes en thérapie génique, en transplantation de cellules souches et potentiellement dans la prévention de l'infection par le VIH-1 qui est favorisée par un milieu mucoal inflammatoire et activé.

1.2.5 Les modes de prévention contre l'infection

1.2.5.1 La vaccination

Au même titre que pour les autres maladies infectieuses, la meilleure approche pour contrôler la propagation virale consiste à développer un vaccin empêchant l'établissement de l'infection à VIH-1 chez l'hôte. La majorité des gens infectés par le VIH-1 vivent dans les pays en développement. L'accès aux traitements est limité dans ces pays pour des raisons économiques. La disponibilité d'un vaccin peu coûteux est essentielle et plus que jamais d'actualité. Bien que d'intenses recherches fondamentales donnent lieu à des résultats d'études cliniques encourageants, aucun vaccin anti-VIH protecteur n'a encore été mis au point (revue par (336-338)). En effet, le développement d'un vaccin fait face à de nombreux obstacles. Par exemple, la diversité génétique du VIH-1 et sa capacité à muter, sa capacité à être glycosylé et donc à être très faiblement immunogène et les changements de conformation qui surviennent lors de sa liaison aux récepteurs et corécepteurs cellulaires sont des éléments qui rendent la conception d'un vaccin problématique (339).

Plusieurs vaccins existants (variole, hépatite B, rougeole, rubéole, polio, rage, fièvre jaune) induisent des anticorps spécifiques qui font même état de corrélats de protection (337, 340, 341).

Les approches privilégiées à l'heure actuelle dépendent de la production d'anticorps neutralisants à large spectre de spécificité, de la stimulation des cellules T CD8+, ou des deux, dans l'espoir que ces réponses immunitaires puissent prévenir la transmission de l'infection à VIH-1. Dans le cas de la production d'anticorps, la conception de puissants immunogènes, induisant chez l'hôte la production d'anticorps neutralisants à large spectre de spécificité dirigés contre les protéines virales, dont la gp120 et la gp41 est difficile dû à l'extraordinaire variabilité génomique de VIH-1 et à sa capacité d'évader aux pressions immunitaires. Les anticorps neutralisants à large spectre de spécificité se forment spontanément chez de rares (2-4%) patients infectés par le VIH-1 et ces anticorps, souvent polyréactifs et autoréactifs, se forment quelques années suite à la primo-infection, c'est pourquoi ces anticorps sont incapables de contrôler la virémie (342, 343).

Pour être efficace, un vaccin préventif contre la VIH-1 devra induire des anticorps à large spectre de spécificité qui devront être maintenus à la surface mucoale au moment de l'exposition au VIH-1. Cette affirmation est supportée par des résultats d'études cliniques de protection passive de primates non-humains chez qui des anticorps à large spectre contre les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 ont été capables de bloquer l'infection par un virus chimérique (VIHC) (261, 266, 267, 344).

Il est à noter que, ces anticorps à large spectre de spécificité, étant issus d'infections chroniques, de re-stimulations répétitives de populations cellulaires B dérégulées et provenant d'un milieu dans lequel il y a bris des mécanismes de tolérance périphérique, la grande question reste à savoir : comment sera-t-il possible de faire produire ce type d'anticorps chez des individus sains ?

En 2009, en Thaïlande, l'étude clinique RV144 (ALVAC-prime AIDSVAX-boost) a démontré un certain degré de protection à court terme (345). Cette étude a eu une efficacité estimée à 31% sans induire un haut niveau d'anticorps neutralisants (346), suggérant que le vaccin a ciblé des épitopes qui ont induit des anticorps non-neutralisants contre l'enveloppe et que ces anticorps peuvent conférer une protection contre la transmission du VIH-1, via l'ADCC ou bien via un autre mécanisme d'inhibition virale ou par un mécanisme d'inhibition de la

transcytose médié par des IgG (347).

D'autres éléments vraisemblablement cruciaux dans l'induction de réponses humorales dans les sécrétions externes génitales et intestinales dans l'élaboration d'un vaccin sont à considérer, par exemple la voie d'administration de l'antigène. Il est intéressant de noter que la voie intra-nasale pour l'administration d'antigènes, avec ou sans adjuvant convenable, a induit des réponses immunitaires humorales systémique et mucoale dans le TGF et dans l'intestin (222, 223).

Aussi, quand une immunisation systémique (intra-musculaire) a été combinée à une immunisation mucoale (intra-nasale), un haut niveau d'IgA et d'IgG spécifiques contre des antigènes de l'enveloppe du VIH-1 a été induit dans les sécrétions génitales chez la souris (348) ; l'utilisation de ces 2 voies combinées a de plus été un succès de protection dans une étude d'immunisation avec la sous-unité gp 41 du VIH-1 chez des primates non-humains (249). Un autre avantage du «*priming*» systémique et «*boosting*» mucoale est la diminution non-négligeable du risque d'induction de tolérance mucoale définie par une anergie des cellules T systémiques à un antigène rencontré pour la première fois par la voie mucoale (327, 349-351).

La seconde possibilité envisagée est l'induction d'une forte réponse immune cellulaire anti-VIH-1. En effet, la réponse des lymphocytes cytotoxiques *in vivo* est primordiale dans la lutte contre l'infection. Pour ce faire, on a utilisé des vaccins de VIS très affaiblis, qui se sont avérés puissants chez le singe. Cependant, une telle stratégie vaccinale chez l'humain n'est pas envisageable. Dans ce contexte, les chercheurs ont présentement recours à des vaccins d'ADN (352) ou à des vecteurs viraux autres que le VIH, notamment le virus de la variole, le virus canarypox, l'adénovirus, les alphavirus ou le virus de la stomatite vésiculaire inactivé où sont insérées des protéines du VIH-1. Malheureusement, la stimulation des cellules CD8+ n'offre vraisemblablement pas une protection complète contre le VIH-1 parce que les CD8+ ne s'en prennent qu'aux cellules *déjà* infectées par le VIH-1. Ainsi, chez le macaque, de tels vaccins permettent de contrôler la virémie, de même que la progression de la maladie, mais ne bloquent pas l'infection proprement dite (revue par (353-356)).

De plus, l'immunité adaptative a besoin de temps pour consolider ses défenses contre les pathogènes envahissants, cette réponse cellulaire ayant été bien décrite par Reynolds comme étant trop faible, trop lente (*too little too late*) pour être efficace aux muqueuses (357). Or, on

aura besoin d'une réponse très rapide, se déclenchant après à peine quelques minutes ou heures, si on espère maîtriser le VIH-1 dans les parties du corps les plus susceptibles de le rencontrer lors de la primo-infection, soit les muqueuses.

Nouvellement, un vaccin mucosal contre le VIS composé de particules virales inactivées et d'adjuvants bactériens (faisant partie de la flore normale génitale) a induit des cellules T CD8⁺ régulatrices qui ont inhibé l'activation de cellules T CD4⁺ et qui ont empêché l'infection par le VIS dans un modèle de macaques. L'induction de cette nouvelles classe de cellules T CD8⁺ régulatrices pourrait possiblement être utilisée comme méthode préventive vaccinale, et aussi thérapeutique pour empêcher la réplication du VIH-1 chez des patients infectés ; ce nouveau vaccin «tolérogénique» pourrait avoir un potentiel pour traiter plusieurs maladies d'ordre immunologiques (358).

Un vaccin idéal éliciterait l'induction efficace de l'immunité innée mucosale, une réponse humorale de première ligne, systémique neutralisante et mémoire ainsi qu'une réponse cellulaire tissulaire et systémique CD4⁺ et CD8⁺ effectrice, polyfonctionnelle à haute avidité et mémoire (spécificité) (249, 359, 360).

1.2.5.2 Les microbicides

Le développement d'un vaccin préventif reste la stratégie la plus efficace pour contrôler la transmission du VIH-1 dans le monde. Cependant, une autre méthode préventive existe et est celle d'un microbicide qui serait capable d'inhiber le VIH-1 aux portes d'entrées mucosales.

Un microbicide est un virucide appliqué sous forme de gel, d'anneau de silicone ou de comprimés à insérer dans le vagin des femmes (361). Des microbicides rectaux pour les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes sont aussi actuellement en développement, comme par exemple un gel Tenofovir 1% qui est en phase clinique II (362).

Un vaste spectre de molécules antivirales ont démontré une efficacité *in vitro* et quelques unes ont déjà été testées dans des études pré-cliniques et cliniques. Toutefois, des incertitudes demeurent à propos des choix d'inhibiteurs, du véhicule d'administration et de formulation du médicament pour obtenir un microbicide sécuritaire et efficace (363). Les microbicides ont 4 modes d'action : tuent ou inactivent le VIH, empêchent l'entrée du VIH dans les cellules humaines, amplifient les mécanismes normaux de défense contre le VIH ou ils inhibent la réplication du VIH.

Des études ont examiné des microbicides non-spécifiques comme par exemple des détergents ou des molécules polyanioniques (Nonoxynol-9 et sulfate de cellulose) qui se sont avérés inefficaces et dans quelques cas ont même augmenté le risque d'acquisition du VIH-1 car ces molécules ont amplifié l'inflammation au TGF ce qui favorise l'appel de cellules cibles pour le virus (364-366).

Une catégorie spéciale de microbicides contre le VIH-1 est celle basée sur des peptides ou protéines interférant avec les étapes précoces du cycle répliatif viral. L'étude clinique Caprisa 004, présentée en 2010 (367-369), basée sur l'utilisation d'un agent topique antirétroviral spécifique (gel tenofovir) a diminué de 39% le risque d'infection par le VIH-1 chez des femmes.

L'équipe de Haase a démontré l'efficacité d'environ 60% du glycérol monolaurate à protéger des macaques de la transmission mucosale du VIS. Le glycérol monolaurate est un composé antimicrobien largement utilisé ayant une activité inhibitrice pour la production de MIP-3 α et de d'autres cytokines pro-inflammatoires. Cette molécule inhibe des voies de signalisation et les réponses innées et inflammation de la muqueuse vaginale *in vitro* et *in vivo* (193). Le contrôle de l'inflammation est une nouvelle avenue dans le développement d'interventions pour bloquer la transmission mucosale du VIH-1.

Il existe aussi des microbicides ayant un haut niveau de spécificité et une absorption systémique limitée, basés sur l'expression protéique par des vecteurs bactériens ou viraux qui pourraient assurer une protection prolongée sans le besoin de les appliquer avant, pendant, ou après la relation sexuelle. La flore normale vaginale ou rectale comme par exemple les *Lactobacillus spp.* pourrait représenter un système d'expression idéal qui produirait un inhibiteur à la surface mucosale mais aussi qui se mélangerait normalement à la flore commensale résidente et offrirait en plus un effet homéostatique (363, 370).

1.2.6 Les corrélats de protection établis

Les corrélats de protection contre un agent pathogène sont des faits mesurables immunitaires et génétiques identifiés dans un hôte potentiel envers ce pathogène. Pour plusieurs virus les anticorps servent de corrélats d'immunité à l'infection. Toutefois, dans le cas du VIH, la corrélation n'est pas si évidente ; les individus infectés développent des anticorps contre le VIH sans être protégés. Ce fait est d'ailleurs une barrière au développement d'un vaccin

contre le VIH. Il y a cependant des évidences, dans une minorité de gens hautement exposés au virus mais séronégatifs, de résistance et de contrôle de l'infection par le VIH suggérant que l'immunité est possible et qu'un vaccin est envisageable. Mais, sans connaître les corrélats de protection, il est difficile pour les chercheurs de savoir exactement quelle genre d'immunité un vaccin doit induire.

Il est important d'évaluer les corrélats de risque d'infection par le VIH-1 fournis par des études cliniques vaccinales pour énoncer des hypothèses sur les mécanismes de protection immune contre le VIH-1. Jusqu'à maintenant, six études d'efficacité vaccinale contre l'infection par le VIH-1 ont été conduites (VAX003, Vaxgen, Inc., San Francisco, CA, USA), VAX004 (Vaxgen, Inc.), HIV-1 Vaccine Trials Network (HVTN) 502 (Step), HVTN 503 (Phambili), RV144 (sponsored by the U.S. Military HIV Research Program, MHRP) et HVTN 505) (371). L'étude RV144 a été la seule à démontrer une diminution du risque d'infection virale *versus* le groupe placebo avec une efficacité de 31% (48 mois depuis l'immunisation) (345). L'analyse de ces études impliquent la compréhension des réponses immunitaires (innée, cellulaire et humorale), de la génétique de l'hôte (par exemple ; l'expression des récepteurs Fc, les molécules HLA) et de l'analyse des mutations virales durant les infections (placebo et vaccinés) qui générera un nombre très important d'informations pour conduire de prochaines études (371).

Il a été démontré, dans des infections aiguës par le VIH-1, que les cellules T CD8+ sont associées au contrôle de la réplication du VIH-1 (revue par (372)). La génétique de l'hôte joue un rôle d'une grande importance dans l'immunité ; par exemple les vaccinés ayant les allèles HLA (B*27, B*57, B*58:01) connus pour être associés au contrôle du VIH-1, ont eu des charges virales diminuées (373) et leurs cellules T CD8+ ont démontré un plus grand potentiel de cytotoxicité dans des essais *in vitro* (374). Les sous-classes d'IgG spécifiques au VIH-1 lient des récepteurs Fc distincts et peuvent avoir différentes fonctions effectrices. L'étude des profils de ces sous-classes d'IgG induites dans différentes études cliniques vaccinales contre le VIH-1 qui sont plus ou moins concluantes pourrait donner des informations sur la qualité des réponses B induites par le vaccin. Yates et al. ont démontré que les IgG3 spécifiques pour le VIH-1 induites par le vaccin de l'étude RV144 corrélaient avec une diminution du risque d'infection par le VIH-1. Cette réponse humorale élicitée était par ailleurs de courte durée. Ces

IgG3 devraient donc être testés dans une étude future en tant que corrélats de protection potentiel contre le VIH-1 (375). Dans cette même étude, la présence des IgA plasmatiques (la plupart monomériques) qui sont différents des IgA mucoales (dimériques) spécifiques à un épitope de l'enveloppe du VIH-1 a été corrélée avec l'infection par le VIH-1 (via l'encombrement des récepteurs Fc des cellules NK, empêchant ainsi l'activité ADCC médiée normalement par le IgG). Pour bien comprendre la réponse humorale, l'analyse de cette étude clinique nécessitera la description du compartiment mucoal (263, 347).

La description d'individus HESN est aussi primordiale dans l'identification de mécanismes potentiels de résistance. Des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques contre le VIH-1 ont été identifiées dans des sujets HESN, par exemple la présence d'IgA dans les muqueuses et dans le plasma ainsi qu'une activité cellulaire T CD4⁺ et CTL spécifique et polyfonctionnelle (376-381). Sachant que la moitié des individus HESN n'ont aucune réponse adaptative systémique détectable, d'autres mécanismes de protection existent probablement (24). Actuellement, l'immunité innée est d'ailleurs privilégiée dans un bon nombre de recherches en immunologie mucoale. Par exemple, l'augmentation de l'activité des cellules NK a été corrélée à une protection contre l'infection par le VIH-1 chez différents types de sujets HESN (usagers de drogues intraveineuses, couples sérodiscordants et enfants exposés pendant leur développement *in utero*) (382, 383).

Certains allèles de récepteurs cellulaires NK (KIR3DL1^{high} et KIR3DS1) chez des sujets HESN ont été corrélés à une protection contre l'infection (115). L'interaction de KIR3DL1/S1 avec son ligand HLA-Bw4-801 (B*5701) est reconnue comme étant un déterminant de l'hôte associé au contrôle de la réplication virale. Un SNP dans la région du promoteur de HLA-C a aussi été associé avec le contrôle de la réplication virale (284, 384, 385) et certains polymorphismes liés à HLA-E et HLA-G (HLA-G*0105N) ont été associés à une diminution du risque d'infection par le VIH-1 chez des femmes africaines (386). Certains autres polymorphismes génétiques de l'hôte associés à l'immunité innée corrélerent avec une résistance naturelle contre l'infection par le VIH-1 tels que des variations génétiques dans le gène de CCR5 qui est en fait une délétion de 32 paires de bases dans la région codante du gène. Ce polymorphisme génétique résulte en la production d'une protéine tronquée qui n'est pas exprimée à la surface cellulaire ce qui confère une protection pour les individus

homozygotes pour cet allèle (387, 388). Des variations génétiques associées à l'expression des ligands CCR5, des β -chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5) ont de plus été corrélées à une diminution dans la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (114, 389, 390). D'autres SNP dans les gènes codant pour TLR3 (25) et pour l'IRF-1 sont associés à une protection virale (391). Des facteurs sécrétés antiviraux comme par exemple des β -chimiokines, des défensines, élafine, des inhibiteurs de protéases (SLP-I), des protéines immunomodulatrices modulant les PRR empêchant l'activation immune, les inhibiteurs de cathepsines (serpine b) et cystatine sont d'autres mécanismes de l'immunité innée qui ont été corrélés à la résistance chez des individus HESN supportant le rôle clé du microenvironnement épithéliale et de l'immunité innée dans le maintien de la résistance contre l'infection par le VIH-1 (128, 392-394). L'efficacité de la réponse immunitaire de première ligne détermine le niveau de difficulté avec lequel le VIH-1 doit faire face pour établir une infection productive.

1.2.7 Les cohortes de HESN comme modèle de protection naturelle contre la transmission sexuelle du VIH-1

Il y a une sous-population d'individus identifiés qui demeurent non infectés par le VIH-1 bien qu'ils aient été exposés à répétition (réf. section 1.1.6.4) (395). Cette sous-population est d'un fort intérêt dans l'identification de mécanismes potentiels de résistance contre l'infection par le VIH-1. Des réponses cellulaires T et B spécifiques ont été identifiées dans 50% des sujets HESN suggérant que d'autres mécanismes de protection contre le VIH-1 existent (381, 396). Des mécanismes de résistance par la réponse immunitaire innée sont aussi étudiés ; par exemple, l'augmentation de l'activité des cellules NK corrèle avec une protection dans quelques cohortes HESN à haut risque d'infection virale, incluant les usagers de drogues intraveineuses, les couples discordants pour l'infection par le VIH-1 et les enfants nés de femmes infectées par le VIH-1 (397, 398). Les allèles pour les récepteurs KIR3DL1/S1 des cellules NK ont aussi été associés à la protection chez des sujets HESN usagers de drogues intraveineuses et chez des couples discordants pour l'infection par le VIH-1 (115, 399, 400). D'autres mécanismes de protection par l'immunité innée ont été observés dans des cohortes HESN, comme par exemple des réponses DC accrues par la sécrétion de facteurs anti-viraux (β -chimiokines, défensines) (392, 401, 402). Dans certaines cohortes HESN, un rôle important

est attribué au microenvironnement épithélial et au système immunitaire inné dans la résistance à l'infection par le VIH-1 (98, 99, 126). De toute évidence, l'immunité innée, produisant les réponses de premières lignes, est déterminante dans l'établissement ou non d'une infection productive par le VIH-1 (24).

1.2.7.1 La cohorte béninoise

La cohorte béninoise est le cœur de mes travaux de recherche; il est alors important de bien la définir. Les TS faisant partie du projet de recherche ont été recrutées via une Clinique (Le Dispensaire pour les Infections Sexuellement Transmises (DIST)) dédiée aux TS à Cotonou au Bénin, Afrique subsaharienne. Les femmes devaient venir à 9 visites de suivi à 3 mois d'intervalle chacune (étude longitudinale). Les femmes sélectionnées pour participer à cette étude spécifique ont été divisées en 2 groupes : les TS non-infectées par le VIH-1 (n=22) et les TS infectées par le VIH-1 non traitées (n=24). Un autre groupe, des femmes de la population générale non-infectées par le VIH-1 à faible risque d'exposition au VIH-1 (n=13) ont été recrutées dans une clinique de santé générale à Cotonou. Un recrutement est en cours, en ce moment, pour pouvoir avoir plus de femmes contrôles de la population générale et plus d'échantillons pour ainsi compléter les analyses qui n'ont pas pu être comparées avec un groupe contrôle par manque d'échantillons de cytobrossage du col utérin.

Les femmes étaient exclues de l'étude si elles étaient âgées de moins de 18 ans, menstruées lors des visites, ou enceintes. Lors de la visite de recrutement, les femmes ont répondu à un questionnaire pour que nous ayons accès à leurs informations démographiques personnelles, à leur comportements sexuels, à savoir depuis combien de temps elles pratiquent le travail du sexe, le nombre de partenaires sexuels, l'utilisation de préservatifs, à savoir si elles pratiquent des douches vaginales et pour savoir si elles ont déjà été enceintes et si elles ont des enfants. Toutes les participantes ont subi un examen médical complet par un médecin. Des échantillons vaginaux ont été prélevés pour le diagnostic d'ITS (candidose, trichomonase et vaginose bactérienne) par examens microscopiques et par qPCR (HSV-2).

Des écouvillons endocervicaux ont été prélevés pour tester pour les infections par *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* en utilisant le système BD ProbeTec ET (*Strand Displacement Assay*).

Du sang périphérique a été prélevé pour tester pour les infections par le VIH et le VSH-2,

pour doser la progestérone et pour des analyses génotypiques ultérieures. Le plasma et le sérum ont été gardé à - 80⁰C jusqu'à leur utilisation.

La séropositivité a été déterminée par la présence d'anticorps IgG anti-VIH-1 à l'aide du test Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab. Les échantillons non-réactifs ont été considérés séronégatifs pour le VIH alors que les échantillons réactifs ont été testés avec le test Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Les échantillons qui ont été réactifs pour VIH-1 et ceux qui ont été non-réactifs suite à ce dernier test (échantillons discordants) ont été ensuite testés par le INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). La charge virale plasmatique a été déterminée pour toutes les femmes infectées par le VIH-1 à l'aide du test VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown NY).

Les TS et les femmes non-TS venant de la population générale à faible risque d'infection sélectionnées pour répondre aux objectifs de cette étude précise, étaient dans leur 4 à 6 années de travail du sexe (pour les TS), étaient âgées de 20 à 60 ans, négatives pour VSH-2 dans leurs lavages cervico-vaginaux (LCV) par qPCR, ne prenaient aucun contraceptif oral, n'avaient aucune IST ni signe ou symptôme clinique et étaient toutes dans la phase folliculaire de leur cycle menstruel (Réf. Annexe 1).

La notion de compartimentalisation immunitaire (immunité systémique *versus* mucosale) a été observée ; c'est-à-dire que les médiateurs de l'inflammation retrouvés dans le sang (en qualité et en quantité) ne correspondaient pas avec ceux retrouvés dans le lumen vaginal d'une même femme. Une réaction inflammatoire locale dans le TGF des TS infectées par le VIH-1 a été notée. L'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ a suggéré qu'il y avait une activation de la réponse immunitaire dans ce compartiment (403). De plus, l'analyse de l'expression des chimiokines nous a permis de constater la présence d'une migration des cellules immunitaires du sang vers le TGF de ces femmes (404). Ces facteurs peuvent favoriser la dissémination et la perpétuation du virus au site d'infection ainsi que la progression de la maladie. Cela nous a permis de reconfirmer l'importance de mieux comprendre l'immunité mucosale au niveau de la porte d'entrée du virus.

En effet, plusieurs facteurs immunologiques et génétiques restent à être élucidés ; nos études préliminaires nous ont amené à poser les hypothèses suivantes.

Les hypothèses de recherche

Chez les TS béninoises HESN, l'immunité naturelle protectrice contre l'infection par le VIH-1 pourrait être associée à la capacité de l'hôte à contrôler l'activation immune mucoale génitale et systémique, à préserver l'intégrité de ces deux compartiments en modulant les conditions inflammatoires à la porte d'entrée mucoale, limitant ainsi le recrutement de cellules cibles du VIH-1, empêchant la pénétration du VIH-1 et l'établissement de l'infection.

A) D'un point de vue immunologique, la résistance impliquerait:

1. La production d'IFN-I dans le compartiment mucoal génital permettant une réponse antivirale efficace.
2. La production de molécules «tolérogéniques/régulatrices» dans le compartiment mucoal génital restreignant l'inflammation, l'activation immune et le recrutement de cellules cibles du VIH-1 et à la porte d'entrée virale.

B) D'un point de vue génétique, ce phénotype «tolérogénique/régulateur» pourrait aussi être prédéterminé.

Les objectifs de recherche

1.3 Objectif principal

Étudier le profil d'expression des cellules épithéliales et myéloïdes mucoales dans la modulation de l'environnement inflammatoire génital associé à une protection ou une infection par le VIH-1.

1.4 Objectifs spécifiques

1. Caractérisation des LCV par leur composition en molécules immunomodulatrices et pro-inflammatoires (facteurs immunologiques solubles) à l'aide d'immuno-essais.
2. Identification des populations cellulaires génitales composant les prélèvements cellulaires du col utérin à l'aide de marqueurs spécifiques.
3. Caractérisation du profil d'expression cytokinique des cellules épithéliales et myéloïdes mucoales génitales cervicales.
4. Évaluation de l'association entre les facteurs immunologiques (solubles et intracellulaires) et génétiques des TS.

★ Avant d'entamer la section articles scientifiques, pour l'article 2, il est très important de mentionner que tous les résultats concernant la caractérisation intracellulaire ont été effectué sur des échantillons cellulaires provenant de TS VIH-1 HESN et de TS infectées par le VIH-1. Au moment de faire cette analyse, il était impossible d'obtenir des cellules provenant de femmes contrôles de la population générale. Cependant, aujourd'hui, ces échantillons contrôles ont été récoltés, sont en voie d'arriver à Montréal, seront donc analysés de la même façon et comparés aux groupes de TS VIH-1 HESN et de TS infectées par le VIH-1 (Réf. Perspectives).

Chapitre 1 (Article premier auteur publié)

High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection.

PLoS One. 2011;6(9):e25185. doi: 10.1371/journal.pone.0025185. Epub 2011 Sep 23

Auteurs : Valérie Thibodeau, Julie Lajoie, Annie-Claude Labbé, Marcel D. Zannou, Keith R Fowke, Michel Alary, Johanne Poudrier, Michel Roger

Contribution détaillée des auteurs :

Conçu et mis au point les expériences : VT, JL, JP et MR

Manipulé les échantillons et effectué les expériences : VT et JL

Analysé les données : VT et MR

Contribué à l'approvisionnement en réactifs, matériel et outils d'analyse : A-CL, MDZ, KRF, JP et MA

Écrit l'article : VT et MR

Dirigé la recherche : MR

High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection.

Valérie Thibodeau^{1,2}, Julie Lajoie³, Annie-Claude Labbé^{2,4}, Marcel D. Zannou⁵, Keith R Fowke³, Michel Alary^{6,7}, Johanne Poudrier^{1,2}, Michel Roger^{1,2*}

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

² Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Montreal, Canada

³ Department of Medical Microbiology University of Manitoba, Winnipeg, Canada

⁴ Département de Microbiologie Médicale, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada

⁵ Centre National Hospitalier Universitaire Hubert K. Maga, Université d'Abomey Calavi, Cotonou, Bénin.

⁶ Unité de Recherche en Santé des Populations, Centre hospitalier affilié universitaire de Québec and Université Laval, Quebec, Canada.

⁷Département de médecine sociale et préventive, Université Laval, Quebec, Canada

Word count (excluding abstract, acknowledgments, references, figure legends and tables): 2469

Running head: Soluble HLA-G genital level correlates with HIV-1 infection

Key words: HLA-G, mucosal genital tract, viral escape mechanism, HIV-1 infection

*Address correspondence to

[Redacted contact information]

Funding: This work was supported by grant HOP-79213 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and by the Réseau SIDA from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) to MR. JL holds a Student Research award from the CIHR. MR is recipient of a Research Scholar award from the FRSQ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Conflict of interest declaration. The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Background: Most HIV infections are transmitted across mucosal epithelium. Understanding the role of innate and specific mucosal immunity in susceptibility or protection against HIV infection, as well as the effect of HIV infection on mucosal immunity, are of fundamental importance. HLA-G is a powerful modulator of the immune response. The aim of this study was to investigate whether soluble HLA-G (sHLA-G) expression in the female genital tract is associated with HIV-1 infection.

Methods and findings: Genital levels of sHLA-G were determined in 52 HIV-1-uninfected and 44 antiretroviral naïve HIV-1-infected female commercial sex workers (CSWs), as well as 71 HIV-1-uninfected non-CSW women at low risk of exposure, recruited in Cotonou, Benin. HIV-1-infected CSWs had higher genital levels of sHLA-G compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW ($P= 0.009$) and non-CSW groups ($P= 0.0006$). The presence of bacterial vaginosis ($P= 0.008$), and HLA-G*01:01:02 genotype ($P= 0.002$) were associated with higher genital levels of sHLA-G in the HIV-1-infected CSWs, whereas the HLA-G*01:04:04 genotype was also associated with higher genital level sHLA-G in the overall population ($P= 0.038$). When adjustment was made for all significant variables, the increased expression of sHLA-G in the genital mucosa remained significantly associated with both HIV-1 infection ($P= 0.02$) and bacterial vaginosis ($P= 0.03$).

Conclusion: This study demonstrates that high level of sHLA-G in the genital mucosa is independently associated with both HIV-1 infection and bacterial vaginosis.

Word count: 229

Introduction

HIV vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV-1 infection [1,2] but successful design of such agents requires a clear understanding of the mechanisms of HIV-1 transmission at the initial site of infection [3]. Most HIV-1 infections occur during heterosexual intercourse, and women are more likely to become infected than men [4]. Initial exposure to HIV-1 during sexual transmission occurs in the genital tract; however, little is known about HIV-1-specific immune responses at this site, as well as the effect of HIV-1 on mucosal immunity.

Human leukocyte antigen (HLA)-G is a non-classical major histocompatibility class I protein, characterised by limited polymorphism and tissue-restricted distribution. HLA-G is expressed as membrane-bound (HLA-G1, -G2, -G3 and -G4) and soluble (HLA-G5, -G6, -G7) isoforms as a result of alternative splicing [5]. The major isoforms present in the plasma are soluble HLA-G (sHLA-G)-1 and -G5 which are generated by shedding or proteolytic cleavage of membrane-bound HLA-G1 isoform and by secretion of a soluble form, respectively. Under physiological conditions, sHLA-G levels correlate with gender and HLA-G genetic polymorphisms. The level of sHLA-G is higher in women than in men [6]. Healthy individuals carrying the HLA-G*01:01:03 and HLA-G*01:05N alleles have lower plasma sHLA-G levels than subjects carrying the more frequent HLA-G*01:01:01 allele. In addition, individuals with the latter allele have lower plasma sHLA-G levels than those with the HLA-G*01:04 allele. Polymorphisms in the 3'-untranslated region (3'UTR) can also affect the production of HLA-G molecules. The presence of a 14-bp sequence insertion in HLA-G 3'UTR has been associated with lower levels of sHLA-G in serum of healthy subjects [7–9]. HLA-G expression can be induced during pregnancy [10], antiretroviral (ART) therapy [11,12] and in pathological conditions such as autoimmune diseases, cancers, transplantations, and viral infections [13]. HLA-G molecules inhibit the activity and mediate apoptosis of natural killer (NK) cells and cytotoxic CD8⁺ T cells [14–17], as well as CD4⁺ T cell proliferation [18] and induce tolerogenic dendritic (DC) and regulatory T cells [19–22].

The immunosuppressive properties of HLA-G might contribute to the susceptibility to HIV-1 infection. Recent studies have shown that HLA-G polymorphisms are associated with altered risks of heterosexual acquisition [23–25] and vertical transmission [26,27] of HIV-1. Plasma sHLA-G expression, at the protein level, was recently associated with increased risk of HIV-1 infection and more rapid disease progression [19,28,29]. However, initial exposure to HIV-1 during sexual transmission occurs in the female genital tract and no data are available on the possible association between genital HLA-G expression and susceptibility to HIV-1 infection. We have therefore measured the genital levels of sHLA-G in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected female commercial sex workers (CSWs), as well as HIV-1-uninfected non-CSW women at low risk for exposure to investigate whether sHLA-G expression is associated with HIV-1 infection.

Methods

Study population: Female CSWs were enrolled through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin and were divided into two groups: HIV-1-uninfected CSWs (n = 52) and ART-naïve HIV-1-infected CSWs (n = 44). The HIV-1-uninfected non-CSW control subjects at low risk for exposure (n = 71) were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women were excluded from the study if < 18 years old, menstruating, or pregnant. At enrolment, participants were asked to answer a questionnaire about demographic information, sexual behaviour, duration of prostitution, number of sex partners, condom use, vaginal douching practices, and reproductive history. Each participant underwent a genital examination by a physician. Vaginal specimens were obtained for diagnosis of candidiasis and bacterial vaginosis by microscopic examination. Endocervical swabs were obtained to test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection using BD ProbeTec ET system (Strand Displacement Assay, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Peripheral blood was taken for HIV, HLA-G and CCR5 genotypes determination. Plasma and serum were kept frozen at - 80°C until use. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV-1 antibodies tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV-seronegative, whereas reactive

samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II non-reactive) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). Viral loads were determined in the plasma of all HIV-1 infected CSWs using VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown NY). DNA samples were genotyped for the CCR5 32-bp deletion allele and all women were found to be homozygous for the wild-type allele.

Mucosal sample collection and preparation: Cervicovaginal lavage (CVL) samples were obtained from all study participants by a physician, using a 10-ml syringe filled with sterile phosphate-buffered solution and aimed directly into the cervical os. CVL fluids were then collected, transferred immediately into 20 ml of RPMI-1640, kept on ice, and processed within 1 hour. CVL samples were centrifuged at 1500 r.p.m. for 10 min to remove cells and debris, and supernatants were stored at – 80°C until shipped on dry ice to Montreal, Canada. CVL samples were concentrated with Amicon Ultra-15 5 kDa (Millipore, Billerica MA) prior to sHLA-G measurement.

Soluble HLA-G measurements and HLA-G genotyping: sHLA-G CVL levels were measured using the Human sHLA-G Immunoassay kit (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), which allows simultaneous detection of HLA-G1 and -G5 soluble proteins without discrimination. The final concentration of sHLA-G in the CVL sample was determined as follows: concentration obtained with the sHLA-G Elisa assay (units per ml)/(CVL concentration factor) x total CVL volume prior to concentration. HLA-G alleles were determined by direct DNA sequencing analysis of the nucleotide regions encompassing HLA-G exons 2-4 and using purified DNA from blood samples as described previously [30]. HLA-G 3-UTR polymorphisms were determined according to the protocol previously described by [31].

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using the GraphPad PRISM 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). One-way analysis of variance and χ^2 tests were used to assess the significance of the associations between continuous and categorical variables across all study groups. Comparisons of continuous and categorical variables between two groups were assessed by the Mann-Whitney U and χ^2 or Fisher exact tests, respectively. Spearman's rank test was used to determine correlations between continuous variables. Multiple logistic regression analysis was used to define independent predictors identified as significant in the crude analysis. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were calculated with the exact method. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$ or $P \leq 0.015$ when comparing two or three groups, respectively.

Ethics statement: Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study and the investigation reported in this paper was approved by the Comité National Provisoire d'Éthique de la Recherche en Santé in Cotonou and the CHUM Research Ethics Committee.

Results

Sociodemographic and clinical characteristics of the study population are described in Table 1. These data were collected to address the issue of confounding variables for risk of HIV-1 infection. The three groups were similar with respect to age, days from last menses, vaginal douching, and the presence of vaginal candidiasis. The HIV-1-infected CSWs were more likely to have a bacterial vaginosis ($P=0.003$) than the HIV-1-uninfected non-CSWs. The HIV-1-uninfected non-CSWs, were less likely to have *Chlamydia trachomatis* or *Neisseria gonorrhoeae* genital infections than the HIV-1-uninfected ($P=0.027$) and HIV-1-infected ($P=0.022$) CSW groups. The average number of clients was higher in HIV-1-uninfected CSWs than in HIV-1-infected CSWs ($P=0.044$), whereas the duration of sex work, and condom use were equivalent between the two CSW groups.

HIV-1-infected CSWs had significantly higher levels of sHLA-G in their CVL samples (94 ± 145 units/ml) than did the HIV-1-uninfected CSWs (35 ± 53 units/ml; $P= 0.009$) and the HIV-1-uninfected non-CSW women (26 ± 53 units/ml; $P= 0.0006$) (Figure 1). There was no significant correlation between the HIV-1 plasma viral load and the sHLA-G level in the CVLs of the HIV-1-infected CSWs ($r^2= -0.162$, $P= 0.344$).

Since sHLA-G expression has been associated with HLA-G polymorphism [7–9], we looked at the distribution of sHLA-G levels, either between study groups or in the total population, according to the HLA-G genetic variants (Table 2). The HLA-G*01:01:02 genotype, in the heterozygous or homozygous states, was associated with increased expression of genital sHLA-G in HIV-1-infected CSWs compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW ($P= 0.051$) and non-CSW ($P= 0.002$) groups. In the overall population, women carrying the HLA-G*01:04:04 heterozygous or homozygous genotypes expressed the highest levels of genital sHLA-G molecules when compared with those expressed by women harbouring other genotypes ($P= 0.038$). However, there was no significant association between HLA-G alleles and sHLA-G levels within the three groups taken separately. Because HLA-G polymorphism can also be associated with HIV-1 infection [23–27], we looked at the distribution of the HLA-G genetic variants among the study groups (Table 2) and found no significant association between HLA-G alleles and HIV-1 infection (data not shown). The presence of bacterial vaginosis could potentially affect the genital level of sHLA-G molecules and since the rate of bacterial vaginosis was significantly higher in the HIV-1-infected CSWs (Table 1), we investigated the possible correlation between sHLA-G levels and the presence of bacterial vaginosis (Table S1). We found that the expression of sHLA-G in genital samples was significantly associated with bacterial vaginosis among the HIV-1-infected CSWs ($P= 0.035$).

When adjustment was made for all significant variables found in the crude analysis (HIV-1 infection, bacterial vaginosis, HLA-G*01:01:02 and HLA-G*01:04:04 genotypes), the expression of

sHLA-G in the genital mucosa remained significantly associated with both HIV-1 infection (OR: 3.0, 95% CI = 1.17-7.53, P= 0.02) and bacterial vaginosis (OR 3.4, 95% CI = 1.10-10.5, P= 0.03).

Discussion

High level of sHLA-G in the genital mucosa is associated with HIV-1 infection in Beninese CSWs. In the present study, we have carefully controlled for potential confounding factors that could influence HLA-G expression such as gender [6], pregnancy [10], ART therapy [11,12] and HLA-G polymorphism [7–9]. All study participants were ART-naïve nonpregnant women. The HLA-G*01:01:02 and HLA-G*01:04:04 genotypes were significantly associated with sHLA-G expression in the crude analysis but these associations disappeared after adjustment was done for HIV-1 infection. In contrast to previous studies [23–25], HLA-G polymorphism was not associated with risk of HIV-1 infection among the Beninese CSWs. The relatively small number of subjects analysed in each groups have limited the power of the present study to reproduce previous findings.

We have previously measured the level of sHLA-G in the blood of these women and found that HIV-infected CSWs had lower plasma levels when compared to HIV-uninfected CSWs and non-CSWs. This is in sharp contrast with that found in the genital mucosa of these women. The discordance in the production of sHLA-G between the two compartments may depend on local factors such as immune cells, micro-organisms and derived products that could affect sHLA-G expression. sHLA-G plays a crucial role in the regulation of both innate and adaptive immunity by modulating the function of DC, NK and T lymphocytes [14-22]. These effects depend on interactions of HLA-G molecules with inhibitory receptors expressed on myeloid cells (immunoglobuline-like transcripts (ILT)-4), on myeloid and lymphoid cells (ILT-2) and on NK cells (killing inhibitory receptor (KIR)-2DL4) [32]. The outcome of the immune response may therefore vary according to the specific interactions of sHLA-G with the different types of cells and receptors. Interaction of sHLA-G with ILT-2 receptor on DC and NK cells decreased the release of interferon (INF)- γ and increased the production of interleukin (IL)-10 and transforming growth factor (TGF)- β [33,34]. IL-10 has been shown to induce HLA-G expression [35] and HLA-G can

also stimulate IL-10 expression in peripheral blood monocytes [36]. Triggering ILT-4 by sHLA-G induces tolerogenic DC and T regulatory cells [20,37]. On the other hand, interaction of sHLA-G with KIR2DL4 receptor on peripheral blood monocytes and NK cells promotes the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [36,38–40]. We have previously measured the cytokine and chemokine expression patterns in the genital samples of our study subjects and found that HIV-1-infected CSWs had significantly higher levels of INF- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein (MCP-3/CCL7) and monokine induced by IFN- γ (MIG/CXCL9) compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups [41,42]. The same observation was made for IL-1 β and IL-8 (data unpublished). High level of IL-1 β and TNF- α in the female genital tract has been associated with enhanced HIV-1 shedding at this site [43]. The inflammatory response observed in the genital mucosa of HIV-1-infected women may promote the recruitment, differentiation and activation of immune cells, which act as targets favouring viral replication and viral dissemination at the initial site of infection. As to whether sHLA-G is directly involved in the induction of such mucosal inflammation via its interaction with KIR2DL4 on monocytes and NK cells in the female genital tract remains to be confirmed. Although the genital mucosa levels of sHLA-G correlate significantly with those of the cytokines and chemokines in the HIV-1-uninfected groups, these correlations were not significant in the HIV-1-infected CSW group (Tables S2 and S3). Thus, in the absence of HIV-1, genital levels of the immunosuppressive sHLA-G molecules and pro-inflammatory cytokines and chemokines are low and correlate to maintain mucosal homeostasis. Conversely, in the presence of HIV-1, there is an aberrant and independent production of both factors in the female genital tract that may reflect a viral strategy of immune piracy, allowing for the simultaneous production of chemokines/cytokines to recruit and activate HIV-1 target cells and sHLA-G to induce immune tolerance towards HIV-1.

Interestingly, the increased level of sHLA-G in genital samples was also significantly associated with the presence of bacterial vaginosis. Although HIV-1-infected CSWs had higher levels of sHLA-G and were more likely to have a bacterial vaginosis than the HIV-1-uninfected non-CSWs, the association between sHLA-G levels and bacterial vaginosis remained significant after adjusting for

HIV-infection. This suggests that genital sHLA-G level is independently associated with both bacterial vaginosis and HIV-I infection. Bacterial vaginosis is an established risk factor for HIV infection [44,45]. It has been suggested that bacterial vaginosis increases risk of HIV infection by inducing a clinical or subclinical mucosal inflammatory response, recruiting target cells and breaching of intact cervico-vaginal mucosa [46]. Indeed, bacterial vaginosis has been associated with increased levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α , RANTES (CCL5), macrophage inflammatory protein (MIP-1 α /CCL3) and MIP-1 β (CCL4) in genital samples [47–49]. However, bacterial vaginosis was not associated with the production of these cytokines and chemokines in the genital tract of the Beninese women (Tables S4 and S5).

Altogether, these results suggests that in the context of HIV-1 infection, sHLA-G expression in the female genital tract is a complex process modulated by many factors such as HIV-1, bacterial vaginosis HLA-G genotypes, and cytokine/chemokine expression patterns, which may all contribute to an immunological environment promoting viral replication and escape from the mucosal immune response.

Acknowledgments

We are indebted to N Geraldo, A Gabin, C Assogba and C Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M Massinga-Loembe, G Ahotin, L Djossou, and E Goma for their technical assistance and to G Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VT, JL, JP, MR; Performed the experiments: VT, JL; Analysed the data: VT, MR; Contributed reagents/materials/analysis tools: ACL, MDZ, KRF, JP, MA; Wrote the paper VT, MR; Lead investigator of this study: MR.

References

1. Padian NS, van der SA, Ramjee G, Chipato T, de Bruyn G, et al. (2007) Diaphragm and lubricant gel for prevention of HIV acquisition in southern African women: a randomised controlled trial. *Lancet* 370: 251-261.
2. Haynes BF, Alam SM (2008) HIV-1 hides an Achilles' heel in virion lipids. *Immunity* 28: 10-12.
3. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J (2006) HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol* 27: 274-281.
4. UNAIDS report of the global AIDS epidemic 2010.
5. Ishitani A, Geraghty DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3947-3951.
6. Rudstein-Svetlicky N, Loewenthal R, Horejsi V, Gazit E (2007) HLA-G levels in serum and plasma. *Tissue Antigens* 69 Suppl 1: 140-142.
7. Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB (2004) Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 64: 66-69.
8. Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, et al. (2004) HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 56: 135-141.

9. Rebmann V, van d, V, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, et al. (2001) Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 57: 15-21.
10. Hackmon R, Hallak M, Krup M, Weitzman D, Sheiner E, et al. (2004) HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 19: 404-409.
11. Cabello A, Rivero A, Garcia MJ, Lozano JM, Torre-Cisneros J, et al. (2003) HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. *Hum Immunol* 64: 1045-1049.
12. Rivero A, Lozano JM, Gonzalez R, Garcia-Jurado G, Camacho A, et al. (2007) Nucleoside reverse transcriptase inhibitors are able and protease inhibitors unable to induce the tolerogenic molecule HLA-G1 on monocytes from HIV-1 infected patients. *Hum Immunol* 68: 303-306.
13. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S (2007) Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 17: 469-479.
14. Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Martinozzi S, Pla M, et al. (2001) HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int Immunol* 13: 193-201.
15. Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam A, et al. (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164: 6100-6104.
16. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, et al. (1999) HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 11: 1351-1356.
17. Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, et al. (2004) Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 606-611.

18. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED (2001) Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12150-12155.
19. Huang J, Burke P, Yang Y, Seiss K, Beamon J, et al. (2010) Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *J Virol* 84: 10784-10791.
20. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, et al. (2010) Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116: 935-944.
21. Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, et al. (2006) Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells. *J Immunol* 176: 3266-3276.
22. LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le Rond S, et al. (2007) Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 109: 2040-2048.
23. Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ, et al. (2004) Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *AIDS* 18: 427-431.
24. Segat L, Catamo E, Fabris A, Morgutti M, D'Agaro P, et al. (2010) HLA-G*0105N allele is associated with augmented risk for HIV infection in white female patients. *AIDS* 24: 1961-1964.
25. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, et al. (2006) Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J Infect Dis* 193: 298-301.

26. Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, Bond VC (2006) HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Res Ther* 3: 28.
27. Fabris A, Catamo E, Segat L, Morgutti M, Arraes LC, et al. (2009) Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 23: 177-182.
28. Lajoie J, Massinga LM, Poudrier J, Guedou F, Pepin J, et al. (2010) Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. *Hum Immunol* 71: 182-185.
29. Lajoie J, Fontaine J, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, et al. (2009) Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. *AIDS* 23: 1437-1440.
30. Ferguson R, Ramanakumar AV, Richardson H, Tellier PP, Coutlee F, et al. (2011) Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence. *Hum Immunol* 72: 337-341.
31. Yie SM, Li LH, Xiao R, Librach CL (2008) A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 14: 649-653.
32. LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED (2005) HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J* 19: 662-664.
33. Morel E, Bellon T (2008) HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j. *J Immunol* 181: 2368-2381.
34. McIntire RH, Morales PJ, Petroff MG, Colonna M, Hunt JS (2004) Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1. *J Leukoc Biol* 76: 1220-1228.

35. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, et al. (1999) IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11: 803-811.
36. van der MA, Lukassen HG, van Cranenbroek B, Weiss EH, Braat DD, et al. (2007) Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 13: 123-133.
37. Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED, et al. (2008) Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6--STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8357-8362.
38. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, et al. (2001) Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Mol Hum Reprod* 7: 195-200.
39. Li C, Houser BL, Nicotra ML, Strominger JL (2009) HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5767-5772.
40. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, Geraghty DE, van der MA, et al. (2006) Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 4: e9.
41. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, et al. (2008) Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol* 1: 309-316.
42. Lajoie J, Poudrier J, Massinga LM, Guedou F, Leblond F, et al. (2010) Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *J Clin Immunol* 30: 90-98.

43. Gumbi PP, Nkwanyana NN, Bere A, Burgers WA, Gray CM, et al. (2008) Impact of mucosal inflammation on cervical human immunodeficiency virus (HIV-1)-specific CD8 T-cell responses in the female genital tract during chronic HIV infection. *J Virol* 82: 8529-8536.
44. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS (2008) Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 22: 1493-1501.
45. Low N, Chersich MF, Schmidlin K, Egger M, Francis SC, et al. (2011) Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and HIV infection in women: individual participant data meta-analysis. *PLoS Med* 8: e1000416.
46. Thurman AR, Doncel GF (2011) Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *Am J Reprod Immunol* 65: 89-98.
47. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, et al. (2011) The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 65: 190-195.
48. Cohen CR, Plummer FA, Mugo N, Maclean I, Shen C, et al. (1999) Increased interleukin-10 in the the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? *AIDS* 13: 327-332.
49. Yasodhara P, Raghunath M, Sreeramulu D, Venu L, Hemalatha R, et al. (2006) Local immunity in Indian women with bacterial vaginosis. *J Reprod Immunol* 70: 133-141.

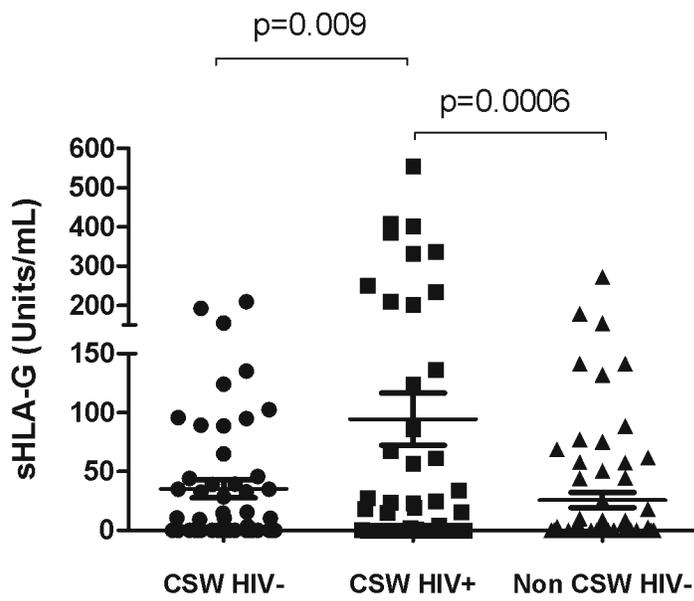


Figure 1 Mean genital soluble HLA-G levels according to the study groups. Statistical significance of differences in the genital levels were evaluated with the Mann-Whitney *U* test. CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1

Table 1 Distribution of demographic, sexual behaviour and genital tract infection characteristics in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW women.

	HIV-1-uninfected CSWs N = 52	HIV-1-infected CSWs N = 44	HIV-1-uninfected non-CSWs N = 71	p value ^a
Age, mean (SD), years	34.4 (12.3)	34 (8.7)	32.6 (9.4)	NS
Duration of sex work, mean (SD), years	4.3 (3.2)	4.1 (2.6)	NA	NS
Number of clients last week, mean (SD)	17.1 (14.0)	11.3 (11.0)	NA	0.044
Days since last menses, mean (SD)	17.1 (13.0)	18.2 (15.4)	19.1 (12.3)	NS
Vaginal douching	50/52 (96%)	42/43 (98%)	65/71 (93%)	NS
Condom always used with clients past month	39/52 (75%)	22/39 (56%)	NA	NS
Bacterial vaginosis	33/51 (65%)	34/43 (79%)	36/71 (51%)	0.009 ^b
Candidiasis	4/51 (8%)	5/44 (11%)	15/71 (21%)	NS
NG and/or CT infections	7/46 (15%)	6/39 (15 %)	2/72 (3%)	0.029 ^c

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N: number of participants; NA: non applicable; NG/CT: *Neisseria gonorrhoeae/Chlamydia trachomatis*, NS: nonsignificant; SD, standard deviation.

^aP-values for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA analysis of variance for the age and days since last menses; Mann-Whitney U test for the duration of sex work and average number of clients; Chi-square test for vaginal douching, condom use, bacterial vaginosis, candidiasis, and NG/CT infections.

^bP=0.125 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, P=0.105 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs, and P=0.003 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Chi-square test.

^c P=0.987 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, P=0.027 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs, and P=0.022 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Fisher exact test.

Table 2. Genital soluble HLA-G levels in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects according to the HLA-G gene polymorphism.

HLA-G allele ^a	HIV-1- uninfected CSWs		HIV-1-infected CSWs		HIV-1 uninfected non-CSWs		P-value ^b	Total population		P-value ^c
	N	Levels	N	Levels	N	Levels		N	Levels	
01:01:01	34	59.4 (148)	20	113 (230)	33	48.0 (86)	NS	87	67.0 (152)	NS
01:01:02	15	64.5 (203)	14	191 (259)	15	3.9 (12)	0.034 ^d	44	84.0 (200)	NS
01:03	11	47.8 (73)	11	59.4 (109)	8	12.2 (27)	NS	30	42.6 (81)	NS
01:04:01	4	48.2 (96)	7	171 (228)	14	18.0 (49)	NS	25	65.6 (142)	NS
01:04:04	20	118 (248)	19	118 (165)	12	31.8 (59)	NS	51	97.6 (188)	0.038
0105N	8	30.7 (32)	5	67.4 (151)	10	14.1 (42)	NS	23	31.5 (75)	NS
3'UTR SNP ^e										
3777 (c/c)	12	81.8 (228)	5	61.6 (107)	13	6.5 (21)	NS	30	45.8 (151)	NS
3952 (a/a)	27	86.7 (217)	11	64.6 (134)	27	39.1 (77)	NS	65	64.0 (158)	NS
14-bp (l/l)	6	16.4 (36)	7	97.7 (135)	6	0.45 (1.1)	NS	19	41.3 (92)	NS

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; l, insertion,

N, number of participants; NS, nonsignificant; SD, standard deviation; SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region

Data are mean (SD)

^a P-values for the comparison between all groups were calculated with one-way analysis of variance test.

^b P-values were calculated with Mann-Whitney U test

^c Presence of the allele in the homozygous or heterozygous states

^d P=0.051 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, P=0.153 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs and P=0.002 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U test

^e Presence of the variants in the homozygous state

Table S1 sHLA-G genital levels according to the presence or absence of vaginosis in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSWs					HIV-1-infected CSWs					HIV-1-uninfected non-CSWs				
	Bacterial Vaginosis					Bacterial Vaginosis					Bacterial Vaginosis				
	N	+	N	-	P-value ^a	N	+	N	-	P-value ^a	N	+	N	-	P-value ^a
sHLA-G	33	81 (198)	18	42 (63)	0.460	34	118 (155)	9	110 (309)	0.035	70	80 (128)	44	55 (158)	0.007

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N, number of participants;

Data are mean (SD).

^a P-values were calculated with Mann-Whitney *U* test.

Table S1 sHLA-G genital levels according to the presence or absence of vaginosis in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSWs					HIV-1-infected CSWs					HIV-1-uninfected non-CSWs				
	Bacterial Vaginosis		Bacterial Vaginosis		P-value ^a	Bacterial Vaginosis		Bacterial Vaginosis		P-value ^a	Bacterial Vaginosis		Bacterial Vaginosis		P-value ^a
	N	+	N	-		N	+	N	-		N	+	N	-	
sHLA-G	33	81 (198)	18	42 (63)	0.460	34	118 (155)	9	110 (309)	0.035	70	80 (128)	44	55 (158)	0.007

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N, number of participants;

Data are mean (SD).

^a P-values were calculated with Mann-Whitney *U* test.

Table S2 Spearman's correlations between soluble HLA-G and cytokine genital levels in uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW women.

	HIV-1-uninfected CSWs		HIV-1-infected CSWs		HIV-1-uninfected non-CSWs	
	N		N		N	
IL-1 beta	49	r^2	41	r^2	64	r^2
		0.325		0.067		0.364
		p value		p value		p value
		0.023		0.677		0.003
IL-6	49	r^2	42	r^2	67	r^2
		0.400		0.221		0.477
		p value		p value		p value
		0.004		0.160		<0.000
IL-8	47	r^2	43	r^2	63	r^2
		0.208		0.046		-0.042
		p value		p value		p value
		0.016		0.769		0.746
IL-10	49	r^2	41	r^2	65	r^2
		0.305		0.056		0.492
		p value		p value		p value
		0.033		0.728		<0.000
TNF-alpha	49	r^2	42	r^2	66	r^2
		0.291		0.072		0.323
		p value		p value		p value
		0.043		0.648		0.008
IFN-gamma	48	r^2	42	r^2	64	r^2
		0.349		0.013		0.262
		p value		p value		p value
		0.015		0.937		0.037

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N: number of partici

Table S3 Spearman's correlations between soluble HLA-G and chemokine genital levels in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW women.

	HIV-1-uninfected CSWs		HIV-1-infected CSWs		HIV-1-uninfected non-CSW controls	
	N		N		N	
MCP-1	49	r^2 0.411 p-value 0.003	43	r^2 0.132 p-value 0.397	65	r^2 0.149 p-value 0.235
MCP-3	50	r^2 0.386 p-value 0.006	42	r^2 -0.048 p-value 0.761	64	r^2 0.271 p-value 0.030
MIG	49	r^2 0.197 p-value 0.175	42	r^2 -0.058 p-value 0.715	65	r^2 0.206 p-value 0.100
MIP-1 alpha	49	r^2 0.239 p-value 0.100	42	r^2 -0.045 p-value 0.775	65	r^2 0.185 p-value 0.137
MIP-1 beta	49	r^2 0.327 p-value 0.022	42	r^2 0.079 p-value 0.621	66	r^2 0.430 p-value 0.0003
RANTES	50	r^2 0.480 p-value 0.0004	41	r^2 -0.063 p-value 0.696	65	r^2 0.312 p-value 0.011

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N, number of participants; Data are mean (SD).

^a P-values were calculated with Mann-Whitney U test.

Table S4 Cytokine genital levels according to the presence or absence of bacterial vaginosis in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1- uninfected non-CSW women.

	HIV-1-uninfected CSWs				HIV-1-infected CSWs				HIV-1-uninfected non-CSW controls			
	Bacterial vaginosis			P-value ^a	Bacterial vaginosis			P-value ^a	Bacterial vaginosis			P-value ^a
	N	+	-		N	+	-		N	+	-	
IL-1 beta	56	271 (577)	57.5 (65.1)	0.361	45	224 (455)	157 (222)	0.632	68	151 (226)	61.6 (95.5)	0.067
IL-6	56	51.5 (173)	83.3 (93.6)	0.107	50	85.8 (140)	28.1 (27.3)	0.654	70	99.1 (182)	121 (244)	0.174
IL-8	55	4392 (9896)	2130 (2152)	0.181	45	5518 (9211)	20562 (55063)	0.557	69	4245 (7650)	2500 (3748)	0.890
IL-10	56	0.93 (1.9)	1.10 (3.2)	0.856	50	0.91 (2.3)	0.84 (1.1)	0.262	71	2.45 (4.0)	6.10 (27.1)	0.152
TNF-alpha	57	8.15 (15.6)	1.50 (3.1)	0.390	50	15.0 (26.1)	7.80 (9.9)	0.929	68	5.70 (12.2)	4.30 (11.8)	0.108
IFN-gamma	54	1.20 (3.0)	0.17 (0.7)	0.548	50	12.3 (30.4)	3.49 (6.5)	0.263	69	4.00 (11.7)	2.50 (13.7)	0.054

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N, number of participants;

Data are mean (SD).

^a P-values were calculated with Mann-Whitney U test.

Table S5 Chemokine genital levels according to the presence or absence of bacterial vaginosis in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1- uninfected non-CSW women.

	HIV-1-uninfected CSWs				HIV-1-infected CSWs				HIV-1-uninfected non-CSW controls			
	Bacterial vaginosis			P-value ^a	Bacterial vaginosis			P-value ^a	Bacterial vaginosis			P-value ^a
	N	+	-		N	+	-		N	+	-	
MCP-1	49	41.8 (144)	18.9 (31)	0.507	43	56.2 (94)	44.5 (56)	0.887	67	40.7 (95)	33.1 (86)	0.858
MCP-3	50	13.3 (29)	7.30 (11)	0.783	42	13.4 (17)	14.7 (18)	0.555	67	7.00 (10.8)	4.70 (6.8)	0.875
MIP-1 alpha	50	2.50 (3.9)	4.90 (6.8)	0.078	42	2.50 (2.9)	5.50 (6.1)	0.129	67	1.4 0(1.6)	3.60 (9.8)	0.263
MIP-1 beta	48	55.8 (67)	142 (122)	0.007	43	91.8 (128)	185 (219)	0.124	67	68.3 (92)	158 (416)	0.351
RANTES	50	20.0 (41)	10.4 (19)	0.696	42	12.9 (19)	48.2 (106)	0.274	68	6.70 (8.3)	4.40 (7.5)	0.124

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; N, number of participants; Data are mean (SD).

^a P-values were calculated with Mann-Whitney U test.

Chapitre 2 (Article en préparation)

Characterisation of myeloid cells expressing high levels of IFN- α with tolerogenic/regulatory phenotype in the Genital Mucosa of Highly-Exposed and HIV seronegative (HESN) Beninese Female Commercial Sex Workers

Pour soumission à Mucosal Immunology

Auteurs : Valérie Thibodeau, Annie-Claude Labbé, Michel Alary, Fernand Guédou, Jo Poudrier, Michel Roger

Contribution détaillée des auteurs :

Conçu et mis au point les expériences : VT, JP et MR

Manipulé les échantillons et effectué les expériences : VT

Analysé les données : VT, JP et MR

Contribué à l'approvisionnement en réactifs, matériel et outils d'analyse : A-CL, FG, JP et MA

Écrit l'article : VT, JP et MR

Dirigé la recherche : MR

Chapitre 2 (Article en préparation)

Characterisation of myeloid cells expressing high levels of IFN- α with a tolerogenic/regulatory phenotype in the Genital Mucosa of Highly-Exposed and HIV-1 seronegative (HESN) Beninese Female Commercial Sex Workers

Valérie Thibodeau^{1,2}, Annie-Claude Labbé², Michel Alary^{3,4}, Fernand Guédou⁵, Johanne Poudrier^{1,2}, Michel Roger^{1,2*}

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

Word count in text: 3581

Word count in abstract: 217

Number of figures; 5 and table; 0.

Reference count: 61

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

Address correspondence to: [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Abstract

We and others have shown that HIV-1 highly-exposed seronegative (HESN) female commercial sex workers (CSWs) maintain low genital inflammatory conditions to prevent infection. HIV-1 is known to interact with toll-like receptors (TLR)-7/8 to induce production of interferon (IFN)- α , an important antiviral, but also immunomodulatory cytokine. Interleukin (IL)-10, human leukocyte antigen (HLA)-G and immunoglobulin-like transcript (ILT)-4 have immunosuppressive capacities that act together with IFN- α to initiate a tolerogenic/regulatory anti-inflammatory loop. As such, we have characterised and compared TLR-7 as well as IFN- α , IL-10, HLA-G and ILT-4 expression profiles in the female genital tract (FGT) of HIV-1 HESN and HIV-1-infected Beninese CSWs. Levels of IFN- α were significantly higher in the genital samples of HIV-1 HESN CSWs compared to those observed in HIV-1-infected CSWs. Moreover, genital myeloid HLA-DR+CD11c+CD14+ dendritic cells of HIV-1 HESNs expressed higher levels of TLR-7, IFN- α , ILT-4, IL-10, and HLA-G than did the HIV-1-infected CSWs. Interestingly, two regulatory CD8+ T-cell phenotypes expressing IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β were significantly increased in the genital samples of HIV-1 HESN CSWs when compared with the HIV-1-infected CSWs. Therefore, natural immunity/resistance to HIV-1 infection may be orchestrated by specific mucosal tolerogenic/regulatory myeloid cell populations, which induce a potent antiviral but regulated immune response to prevent excessive immune activation, lower HIV-1 target availability, and maintain the integrity of the mucosal barrier.

Key Words: HIV-1, CSWs, tolerogenic/regulatory microenvironment

Introduction

In 2012, an estimated 35.3 million people were living with HIV/AIDS worldwide. Most HIV-1 infections are acquired through heterosexual intercourse, and in Africa, 60% of new HIV-1 infections affect women [1]. Vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV-1, but the success of designing such agents needs a better understanding of the mechanisms of transmission and HIV-specific immune responses at the initial site of infection.

The female genital tract (FGT) constitutes a main portal of entry for HIV-1, and plays a critical role in protecting the host against pathogens while maintaining a tolerance to a commensal flora. To this end, the FGT is provided with an array of protective mechanisms from the innate and adaptive arms of the immune system to maintain a delicate balance between protection and tolerance [2, 3]. FGT immunity is also tightly regulated by a hormonal/inflammatory process throughout the menstrual cycle, having to deal with the pressure of procreation and microbial control [4, 5]. The innate immune compartment of the FGT involves genital epithelial cells (GEC), dendritic cells (DC), Langerhans cells (LC), macrophages, natural killer (NK) cells and neutrophils, which confer protection through the production of antimicrobial agents, chemokines and cytokines [6-8]. GECs which form an uninterrupted barrier between the lumen and underlying cells, have been shown to express toll-like receptors (TLRs) 1 to 9, indicating the potential to respond to a wide range of microbes/pathogens [8, 9]. Given the pivotal role that GECs play in the modulation of FGT mucosal integrity [6-8], it is likely that sensing through TLRs is involved in regulating the balance between tolerance vs defence, and modulating subsequent acquired immunity [7, 10].

The FGT associated lymphoid organs are part of the mucosal associated lymphoid tissue (MALT), which also include the gastro-intestinal (GALT) lymphoid tissue. Unlike the GALT, the FGT does not include M cells or organised lymphoid crypts or follicles in the sub-mucosa [11] but contain uterine lymphoid aggregates [12]. Local immunisations at the FGT level have been shown to induce local CD8⁺ CTL, IgG and IgA responses. However, mechanisms of immune induction in the FGT remain poorly understood. The link with adaptive immunity mainly involves DC, the latter which through pattern recognition receptor (PRR) sensing are also involved in maintaining a homeostatic balance between tolerance and inflammation [6, 7, 13]. Cross-talk between epithelial cells and sub-mucosal DC involves immunoregulatory cytokines and lead to activation of effector cells in the lamina propria. DC are also pivotal in orchestrating adaptive immune responses by migrating to FGT mucosal associated draining lymphoid organs to regulate B and T lymphocyte responses.

Mucosal exposure to HIV-1 in the absence of infection was documented in different cohorts across the world, including the Beninese commercial sex workers (CSWs) [14, 15] and evidence supports a major role for the FGT microenvironment and innate immune system in sustaining resistance against HIV-1 infection [16]. The demonstration of the presence of low-inflammatory conditions in the FGT of HIV-1 highly-exposed seronegative (HESN) Beninese and Kenyan CSWs has recently been described [17-20]. However, the biological impact of HIV-1 on FGT immunity and how infection could be avoided/controlled are still largely unresolved partially because studies on HIV FGT immunity remain challenging, principally due to the difficulty of recruiting participants, obtaining fresh samples, adequate

numbers of viable cells, and controlling for major confounders such as sexually transmitted infections, menstrual cycle and risk behaviours.

Based on our previous studies [19-21] and others [17, 22, 23], we hypothesized that maintenance of low-inflammatory conditions in the FGT of HESN individuals helps to prevent excessive immune activation and lower HIV-1 target availability, likely maintaining the integrity of the mucosal barrier and reflecting in a healthy systemic immune compartment [16]. In the present study, we aimed to further characterize the immune cells involved in the production of the low inflammatory conditions observed in the FGT of HIV-1 HESN CSWs.

Material and Methods

Study population

Female CSWs were recruited through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin. Non-CSW control subjects at low risk for exposure were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Women were invited to participate in the study as they attended clinics. Women were excluded from the study if, they were less than 18 years old, menstruating, or pregnant. At enrolment, participants were asked to answer a questionnaire about demographic information, sexual behaviour, duration of sex work, number of sex partners, condom use, vaginal douching practices, and reproductive history. Each participant underwent a genital examination by a physician. Vaginal specimens were obtained for diagnosis of candidiasis, trichomoniasis and bacterial vaginosis by microscopic examination and HSV infection by PCR. Endocervical swabs were obtained to test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection using BD ProbeTec ET system (Strand Displacement Assay, Becton

Dickinson, Heidelberg, Germany). Peripheral blood was taken for HIV, syphilis and progesterone testing by immunoassays. HIV-1 positivity was defined by the presence of HIV-1 specific IgG tested with Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV seronegative, whereas reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA). Genie II dually reactive samples (to HIV-1 and HIV-2) and discordant samples (Vironostika reactive/Genie II non-reactive) were further tested by INNO-LIA HIV I/II Score (Innogenetics NV, Technologiepark 6, Gent, Belgium). For the present study we selected samples from 22 HIV-1-uninfected CSWs, 24 treatment-naïve HIV-1-infected CSWs and 13 HIV-1-uninfected non-CSW control subjects. The three study groups were similar with respect to age and they were all in the follicular phase of their menstrual cycle, not taking oral contraception, had no co-infections, bacterial vaginosis, trichomoniasis or candidiasis. Duration of sex work, average number of clients during the past week, vaginal douching and condom use were equivalent between the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected CSW groups. The average blood CD4⁺ T cells count was 500 cells/mm³ in HIV-1-infected CSWs.

Cervico-vaginal lavage (CVL) sample collection and preparation

CVL samples were obtained from all study participants by a physician, using a 10-ml syringe filled with sterile 1x phosphate-buffered solution (PBS) and aimed directly into the cervical os. CVL fluids were then collected, transferred immediately into 20 ml of RPMI-1640, kept on ice, and processed within 1 hour. CVL samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and supernatants were concentrated on a 3 KDa Amicon membrane and were stored at -80⁰C until shipped on dry ice to Montreal, Canada.

Endocervical cell sample collection and preparation

Endocervical cells were collected using a cytobrush under speculum examination by inserting the cytobrush into the cervix, rotating 360° and immediately placing in 5 mL of RPMI. Cytobrush samples with visible blood contamination were excluded from further analysis. Samples were kept on ice and processed within 1 hour. The cytobrush was vortexed, cells were flushed out of the brush, mixed 1:1 in glycerol and cryopreserved in liquid nitrogen until shipped in transport tanks to Montreal, Canada.

Cytokines measurement

Cytokines were measured in CVL samples using the ProcartaPlex immunoassay (Affimetrix/eBioscience), which allows simultaneous detection of interferon (IFN)- β , interleukin (IL)-10, IL-17A, IL-22, and tumor necrosing factor (TNF)- α . IFN- α and IFN- γ were quantified by Bio-Plex cytokine/chemokine assay (Bio-Rad). Analysis was performed on a Luminex® 200 System (Luminex Corpora- tion, Austin, TX, USA). The final concentration for a given cytokine in the CVL sample was determined as follows: concentration obtained with the Luminex analyser (pg ml^{-1})/(CVL concentration factor). The concentration factor was calculated as follows: initial volume/final volume (after concentration). Samples below the LDL were assigned a value of 0 pg ml^{-1} . Soluble HLA-G (sHLA-G) levels were measured using the Human sHLA-G Immunoassay kit (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), which allows simultaneous detection of HLA-G1 and -G5 soluble proteins without discrimination. The final concentration of sHLA-G in the CVL sample was determined as follows: concentration obtained with the sHLA-G Elisa assay (units per ml)/(CVL

concentration factor).

Multicolour Flow-Cytometry analyses

Endocervical cells from cytobrush samples were thawed, washed and processed for flow-cytometry analysis. Briefly, a maximum of 2×10^5 endocervical cells per well were used for staining. Live/dead exclusion was performed using Aqua-LIVE/DEAD Fixable Stain (Invitrogen Life technologies, Eugene, OR, USA). Non-specific binding sites were blocked using fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1x PBS, 2% heat inactivated (hi)-FBS, and 0.1% sodium azide) supplemented with 20% hi-FBS and 10 μ g mouse IgG (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). The following conjugated mouse anti-human monoclonal antibodies were used: anti-CD3-e fluor 605 NC, anti-CD138-Pe, anti-CD158a-Pe Cy7, anti-CD3/anti-CD19/ anti-CD56-Per CP e fluor 710, anti-CD14-e fluor 605 NC, anti-CD11c-Pe, anti-HLA-DR-APC 780, anti-BDCA2-Pe Cy7, and anti-CD11c Pe Cy7, anti-CD103-FITC, anti-CD8-APC 780, anti-LAP-Pe, and anti-FOXP3-488 (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD66b-FITC, anti-CD1a-a fluor 700, and anti-CD207-Pe, anti-ILT4-APC, anti-CD56-Brilliant Violet 510, and rat anti-IL-10-Pe Cy7 (BioLegend, San Diego, CA, USA); anti-CD19-FITC, anti-CD45-V450, anti-CD209-Pe CF594, and anti-CD45-V450, anti-HLA-G-biotin/Streptavidin-Pe CF594, anti-IFN- α 2b-Pe, anti-TLR7-FITC, anti-CD11c-Pe CF594, HLA-G-Per CP Cy5.5, anti-CD138-BV510, anti-CD4-a fluor 700, and anti-CCR5 (CD 195)-Pe CF504 (BD-Biosciences); anti-Pan Cytokeratin-APC (EXBIO Praha Czech Republic); anti-CD19-Pacific Green (Life Technologies). Intracellular labelling was performed using the Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization kit and perm/wash buffer (BD-Biosciences). Intracellular non-specific binding sites were blocked using perm/wash buffer containing 20%

hi-FBS, 50% rat serum and 20 ug mouse IgG. Cells were kept at 4⁰C in 1.25% paraformaldehyde for 18 hours prior to analysis. Data acquisition of 5X10⁴ events per sample was performed with LSRFortessa (BD-Biosciences), and analysis was done with FlowJo7.6.3 software (TreeStar, Ashland, OR, USA). All stainings were compared to that of fluorescence minus one (FMO) values and isotype controls. Anti-mouse Ig(k) Compbeads (BD-Biosciences) were used to optimize fluorescence compensation settings and calibrate the LSRFortessa. Gating strategies could be found in the Figure 6.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the GraphPad PRISM5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). A Fisher exact test was used to assess the significance of the associations between categorical variables, Gaussian distribution was tested by D'Agostino and Pearson omnibus normality test. One-way analysis of variance (Kruskal–Wallis test) and Mann–Whitney U test were used for variables that were not normally distributed between 3 groups and 2 groups, respectively. Differences were considered significant at P<0.05 or P<0.015 when comparing two or three groups, respectively.

Results

Cytokines and sHLA-G expression patterns in CVL samples from HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

The detection rates and expression levels of IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-10, and IL-22 were significantly higher in the CVLs from HIV-1-infected CSWs when compared to those measured in the CVLs from both HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW

control subjects (Figure 1 B-G). sHLA-G detection rates and expression levels were significantly higher in the CVLs from both HIV-1-infected and HIV-1-uninfected CSWs when compared to those from HIV-1-uninfected non-CSW controls (Figure 1 H). Interestingly, CVLs from HIV-1-uninfected CSWs had higher levels of INF- α than those from HIV-1-infected CSWs (Figure 1 A).

Phenotypic characterisation of endocervical cell populations in cytobrush samples from HIV-1-uninfected and HIV-1-infected CSWs

Cells of the epithelial, myeloid and lymphoid lineages were characterized in the cytobrush samples following multi-colour flow cytometric analysis. The GECs (CD45-CK+) were the most abundant cell population (42%) found in the endocervical samples followed by CD45+CK-CD3-CD19-CD56- cells (41%). The latter group of cells were divided into two groups based on HLA-DR expression; myeloid (HLA-DR+) cells (6%) and granulocytes (HLA-DR-, CD66b+) cells (35%). Cells carrying markers of the lymphoid lineage CD45+CK-CD3+ (T lymphocytes) or CD19+CD138+ (plasmablasts, and/or plasma cells) or CD56+ (NK cells) represented 17% of the total cell population. The relative frequencies of these cell populations in the HIV-1-infected CSWs were similar to those observed in HIV-1-uninfected CSWs. Unfortunately, cytobrush samples from the HIV-1-uninfected non-CSW control subjects were not available at the time of this study (Data not shown).

We then evaluated the GECs' and myeloid cells' expression of TLR-7, IFN- α , IL-10, and HLA-G found to be of major importance for their antiviral and immune-regulatory properties by us and others [21, 24-28]. The frequencies of GEC expressing TLR7, IFN- α and

HLA-G were similar between the two groups (Figure 2 A, C, and G), whereas the mean percentage of GEC expressing IL-10 in HIV-1-uninfected CSWs was higher than that observed in HIV-1-infected CSWs (Figure 2, E). However, GEC levels of expression of TLR-7, IFN- α , IL-10, and HLA-G were lower in HIV-1-uninfected CSWs when compared to those found in HIV-1-infected CSWs (Figure 2 B, D, F, and H). In contrast, the percentages and levels of expression of TLR-7, IFN- α , IL-10, HLA-G and ILT-4 in endocervical myeloid cells were higher in HIV-1-uninfected CSWs when compared to those observed in HIV-1-infected CSWs (Figure 3 A, B, C, D, F, H, and I) except for IL-10 and HLA-G for which the percentages are similar for the two groups (Figure 3 E and G) and for ILT-4 for which the levels of expression are similar for the two groups (Figure 3 J).

Further phenotypic characterization of the endocervical myeloid HLA-DR⁺ cells revealed a population of cells expressing CD11c⁺ CD14⁺ with increased frequencies in the HIV-1-uninfected CSWs compared to the HIV-1-infected CSWs (Figure 4 A). This cell subset mainly expressed CD103 (80%), CD1a (66%), HLA-G (87%), IL-10 (85%) and IFN- α (83%), and ILT-4 (55%). However, a population of myeloid HLA-DR⁺ which were negative for CD11c and CD14 expression were rather increased in the HIV-1-infected CSW group compared to the HIV-1-uninfected CSWs (Figure 4 B), and these cells expressed the same level of CD1a (72%) but lower levels of CD103 (30%), HLA-G (40%), IL-10 (72%), IFN- α (65%), and ILT-4 (36%). There were two major phenotypically distinct myeloid HLA-DR⁺ sub-populations, CD11c⁺ CD14⁺ IFN- α ⁺ IL-10⁺ and CD11c⁻ CD14⁻ ILT-4⁺ IFN- α ⁺ that were significantly increased in the HIV-1-uninfected CSWs when compared with the HIV-1-infected CSWs (Figure 4 C and E), whereas we found one major sub-population that

was significantly increased in the HIV-1-infected CSWs when compared with the HIV-1-uninfected CSWs: CD11c- CD14- IFN- α + IL-10+ (Figure 4 D).

The percentages of endocervical CD4+T cells were similar between the two groups, whereas the frequency of endocervical CD8+ T cells was higher in HIV-1-infected CSWs than that observed in HIV-1-uninfected CSWs (Figure 5 A and B). Two distinctive CD8+ T cell phenotypes, CD45+ CD3+ CD8+ IL-10+ and CD45+ CD3+ CD8+ LAP+, were significantly increased in the HIV-1-uninfected CSWs when compared with the HIV-1-infected CSWs (Figure 5 D and E). In contrast the percentage of CD45+ CD3+ CD8+ FOXP3- phenotype was significantly increased in the HIV-1-infected CSWs when compared to the HIV-1-uninfected CSWs (Figure 5 C). Flow cytometry analyses for the B and NK lineage cells will not be presented herein as they require further experimentation.

Discussion

We and others have shown that HIV-1 HESN CSWs maintain low genital inflammatory conditions to prevent infection [19-23]. To further our understanding of the mechanisms conferring protection against HIV-1, we have characterized the genital immune cells and inflammatory cytokine production associated with either infection or resistance to HIV-1 in CSWs from Benin.

As expected, HIV-1-infected CSWs had higher percentages and levels of expression of pro-inflammatory cytokines in their genital fluids than did the HIV-1 HESN CSWs and HIV-

1-uninfected non-CSW controls (Figure 1). HIV-1 viral envelope glycoproteins, single-stranded RNA, and possibly viral DNA have been shown to activate DCs and GECs via endosomal TLR-7, TLR-8 and 9 or cytosolic RIG-I and MDA5 leading to the induction of type I IFN via the IRF-3/IRF-7 pathway and the induction of pro-inflammatory molecules such as TNF α through the NF- κ B pathway [29]. High extracellular levels of IL-10 are associated with inflammation and immune dysregulation in the context of HIV-1 infection [30-33]. Moreover, it has been shown that mucosal epithelial cells (genital and intestinal) respond directly to envelope glycoproteins of HIV-1 by upregulating inflammatory cytokines. Sustained inflammation leads to barrier impairment, increasing epithelium permeability and allowing for microbial translocation, which highly contributes to the chronicity of inflammation/activation [34]. The relatively high levels of IL-22 in HIV-1-infected CSWs may possibly reflect an attempt from the infected host to preserve mucosal integrity [35]. IL-22 in conjunction with IL-17A or IL-17F synergistically induced the expression of β -defensin 2 and other antimicrobial peptides (S100A9, S100A7 and S100A8) [36]. Interestingly, IFN- α levels were significantly higher in the CVLs from HVI-1 HESN than in CVLs from HIV-1-infected CSWs. The relatively high IFN- α levels in the HIV-1 HESN could be critical to sustain restriction factors in cells at the portal of entry for the virus. Following viral infection, the induced interferons can upregulate a myriad of interferon-stimulated genes (ISGs), which have been shown to interfere with multiple viruses at various life cycle stages [26, 37-39]. Moreover, a recent study demonstrated that blockade of the IFN-I receptor caused reduced antiviral gene expression, increased SIV reservoir size and accelerated CD4⁺ T cell depletion with progression to AIDS [40].

GECs from HIV-1 HESN CSWs maintained low levels of expression of TLR7, IFN- α , IL-10, and HLA-G when compared to those observed in HIV-1-infected CSWs (Figure 2). In contrast, endocervical myeloid HLA-DR⁺ cells from HIV-1 HESN CSWs expressed higher levels of TLR-7, IFN- α , IL-10, and HLA-G than did those cells from the HIV-1-infected CSWs (Figure 3), possibly to promote a potent antiviral and yet at the same time immunoregulatory response, as observed in the HIV-1 HESNs (Figure 1). Furthermore, we found two phenotypically distinct populations of myeloid HLA-DR⁺ cells, CD11c⁺ CD14⁺ IFN- α ⁺ IL-10⁺ and CD11c⁻ CD14⁻ ILT-4⁺ IFN- α ⁺, which relative percentages are significantly increased in HIV-1 HESN CSWs (Figure 4 C and E). The fact that we found a significant increase in IFN- α expression to be associated with phenotypically distinct myeloid HLA-DR⁺ cells in endocervical samples of HIV-1 HESN CSWs supports the notion that production of IFN- α may be tightly regulated and restricted in these individuals. These myeloid HLA-DR⁺ cells expressed also high levels of CD1a and CD103, which correspond to their function as sentinels poised to respond to and translate microbial antigens to cells of the innate and adaptive immune response [41]. Also, similarly to murine CD103⁺ DCs [42], human CD103⁺ DCs found throughout the gut lamina propria are thought to be more effective at promoting T regulatory (Treg) responses and therefore play a central role in maintaining tolerance and tissue homeostasis [43, 44]. Inversely, the myeloid HLA-DR⁺ CD11c⁻ CD14⁻ IFN- α ⁺ IL-10⁺ population which frequencies are significantly increased in the FGT of HIV-1-infected CSWs (Figure 4 C) expressed lower levels of CD14, CD11c, and CD103. Interestingly, in contrast to CD103⁺ DCs, gut CD103⁻ DCs have a more immunogenic phenotype in both the steady state [45] and in an inflammatory context [46]. Moreover,

CD103⁻ intestinal mouse DCs have been shown to induce differentiation of IFN- γ and IL-17-producing effector T cells. [47].

The myeloid HLA-DR⁺ IFN- α ⁺ cells in the endocervical samples of HIV-1 HESN CSWs expressed higher levels of HLA-G, IL-10 and ILT-4 molecules than those observed in HIV-1-infected CSWs (Figure 7 and 8). *In vitro* studies demonstrated that monocyte derived immature DCs CD14⁻ CD11c⁺ HLA-DR⁺ treated with IL-10 and/or IFN- α were rendered “tolerogenic” and upregulated the inhibitory receptors ILT-3 and ILT-4, which promoted their capacity to induce Tregs [24, 48]. IL-10 is known to have immunoregulatory properties [49], and is involved in differentiation of long-lasting antigen-specific T-cell anergy and type 1 Tregs (Tr1) [50]. In addition to IL-10, it has been shown that other cytokines, such as IFN- α [51] can also promote Tr1 cell differentiation. IL-10 is one of the key cytokines inducing HLA-G expression on myeloid cells [52]. The engagement of the inhibitory molecules ILT-2, ILT-3 and ILT-4 on myeloid cells by HLA-G prevents the up-regulation of costimulatory molecules, inhibits maturation and allows them to promote the differentiation of CD4⁺Tregs [25, 53]. Recently, it has been reported that, in addition to its membrane-bound form, soluble HLA-G (sHLA-G) also plays a role in promoting the induction of Tregs [54]. Amodio and colleagues newly identified a subset of “tolerogenic” DCs, named DC-10 that secrete high amounts of IL-10, express high levels of HLA-G and ILT-4 and bind CD4⁺ HLA-G⁺ T-cells at the fetal maternal interface, where they may contribute to tolerance [28]. Furthermore, Gregori and colleagues have demonstrated that these DC-10 favour induced Tregs (Tr1) via an IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway [27]. Interestingly, two distinctive CD8⁺ T cell phenotypes, CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ IL-10⁺ and CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ LAP⁺, were significantly increased in

the endocervical samples of HIV-1 HESN CSWs when compared with the HIV-1-infected CSWs (Figure 5 D and E) CD8⁺ T cells expressing IL-10⁺ or LAP (latency-associated protein)/transforming growth factor (TGF)- β ⁺ have been shown to have potential regulatory capacities (Figure 7 and 8). Indeed, CD8⁺ Tregs act via a cell contact suppression mechanism (class I restricted) [55] to exert their inhibitory effects on T cell proliferation and cytokine production [56, 57]. Moreover, CD8⁺ Tregs act by secreting the immunosuppressive cytokines IL-10 and TGF- β [58, 59]. It was also shown that an IL-10⁺ CD8⁺T cells played a protective role in a murine colitis model, indicating a role in regulatory immune response [60]. In addition, an HIV-specific CD8⁺ T cell population that mediated *in vitro* suppression of HIV-specific effector function through the production of TGF- β as been described [61] but the contribution of these TGF- β ⁺ CD8⁺ T cells to the immune dysfunction observed in HIV infection is currently unknown.

We suspect that myeloid HLA-DR⁺ cells characterized herein are monocyte derived populations and/or DCs, either resident and/or recruited to FGT. However, further phenotypic and functional characterisations are required to confirm the exact nature of these cells, and whether they represent different populations or stages of differentiation remain to be established. The same applies for the two phenotypically distinct populations of CD8⁺ T cells that express IL-10⁺ or TGF- β ⁺ in endocervical samples of HIV-1 HESN CSWs.

Overall our results support the hypothesis that natural immunity/resistance to HIV-1 infection may be orchestrated by specific mucosal tolerogenic/regulatory myeloid cell populations, which induce a potent antiviral but regulated immune response to prevent

excessive immune activation, lower HIV-1 target availability, and maintain the integrity of the mucosal barrier.

Ethics statement

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

Funding

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

Acknowledgments

We are indebted to N. Geraldo, A. Gabin, C. Assogba and C. Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to M. Massinga-Loembe, G. Ahotin, L.Djossou, and E. Goma for their technical assistance and to G. Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We thank S. Gimmig, Drs D. Gauchat, C. Grange and L. Aïcha-Hanafi for their precious flow-cytometry expertise. We thank Drs M. Bourbonnière, J. Archambault and F. Rodier for their precious advice. We are thankful to Josiane Chagnon-Choquet and Karine Beauchemin for managing the Benin-Montreal specimen importation.

References

1. UNAIDS, «*Report on the global AIDS epidemic 2013*» (*unaidsglobalreport2013_en.pdf*).
2. Brandtzaeg, P., et al., *Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1**(1): p. 31-7.
3. Hickey, D.K., et al., *Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections*. *J Reprod Immunol*, 2011. **88**(2): p. 185-94.
4. Wira, C.R. and J.V. Fahey, *A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle*. *AIDS*, 2008. **22**(15): p. 1909-17.
5. Wira, C.R., et al., *Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 544-65.
6. Quayle, A.J., *The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells*. *J Reprod Immunol*, 2002. **57**(1-2): p. 61-79.
7. Wira, C.R., et al., *Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions*. *Immunol Rev*, 2005. **206**: p. 306-35.
8. Horne, A.W., S.J. Stock, and A.E. King, *Innate immunity and disorders of the female reproductive tract*. *Reproduction*, 2008. **135**(6): p. 739-49.

9. Trifonova, R.T., G.F. Doncel, and R.N. Fichorova, *Polyanionic microbicides modify Toll-like receptor-mediated cervicovaginal immune responses*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(4): p. 1490-500.
10. Gribar, S.C., et al., *The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(3): p. 493-8.
11. Pala, P., et al., *An African perspective on mucosal immunity and HIV-1*. *Mucosal Immunol*, 2009. **2**(4): p. 300-14.
12. Yeaman, G.R., et al., *Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(4): p. 427-35.
13. den Dunnen, J., S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, *Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(7): p. 1149-57.
14. Fowke, K.R., et al., *Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya*. *Lancet*, 1996. **348**(9038): p. 1347-51.
15. Jennes, W., et al., *Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6588-92.
16. Poudrier, J., V. Thibodeau, and M. Roger, *Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 875821.
17. Yao, X.D., et al., *Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers*. *Mucosal Immunol*, 2013.

18. Lajoie, J., et al., *A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers.* Mucosal Immunol, 2012. **5**(3): p. 277-87.
19. Lajoie, J., et al., *Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin.* Mucosal Immunol, 2008. **1**(4): p. 309-16.
20. Lajoie, J., et al., *Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin.* J Clin Immunol, 2010. **30**(1): p. 90-8.
21. Thibodeau, V., et al., *High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection.* PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25185.
22. Card, C.M., T.B. Ball, and K.R. Fowke, *Immune Quiescence: a model of protection against HIV infection.* Retrovirology, 2013. **10**(1): p. 141.
23. Lajoie, J., et al., *Association of sex work with reduced activation of the mucosal immune system.* J Infect Dis, 2014. **210**(2): p. 319-29.
24. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4.* Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
25. Ristich, V., et al., *Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells.* Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 264-71.
26. Verhoeven, D., et al., *Enhanced Innate Antiviral Gene Expression, IFN-alpha, and Cytolytic Responses Are Predictive of Mucosal Immune Recovery during Simian Immunodeficiency Virus Infection.* J Immunol, 2014. **192**(7): p. 3308-18.

27. Gregori, S., et al., *Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway*. *Blood*, 2010. **116**(6): p. 935-44.
28. Amodio, G., et al., *HLA-G expressing DC-10 and CD4(+) T cells accumulate in human decidua during pregnancy*. *Hum Immunol*, 2013. **74**(4): p. 406-11.
29. Miedema, F., et al., *Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 298.
30. Chagnon-Choquet, J., et al., *IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e101949.
31. Liu, J., et al., *IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e89236.
32. Orsilles, M.A., et al., *IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy*. *APMIS*, 2006. **114**(1): p. 55-60.
33. Ji, J., et al., *HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway*. *Int Immunol*, 2005. **17**(6): p. 729-36.
34. Nazli, A., et al., *Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(4): p. e1000852.
35. Kim, C.J., et al., *A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis*. *Mucosal Immunol*, 2012. **5**(6): p. 670-80.
36. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. *J Exp Med*, 2006. **203**(10): p. 2271-9.

37. Mous, K., et al., *Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e33934.
38. Malim, M.H. and P.D. Bieniasz, *HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(5): p. a006940.
39. Goujon, C., et al., *Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection*. Nature, 2013. 502(7472): p. 559-62.
40. Sandler, N.G., et al., *Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression*. Nature, 2014. 511(7511): p. 601-5.
41. Masten, B.J., et al., *Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung*. J Immunol, 2006. 177(11): p. 7784-93.
42. Jaensson, E., et al., *Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans*. J Exp Med, 2008. 205(9): p. 2139-49.
43. Geissmann, F., et al., *Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin*. J Exp Med, 2002. 196(4): p. 417-30.
44. Rescigno, M. and A. Di Sabatino, *Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease*. J Clin Invest, 2009. 119(9): p. 2441-50.
45. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. J Exp Med, 2007. 204(8): p. 1757-64.
46. Siddiqui, K.R., S. Laffont, and F. Powrie, *E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis*. Immunity, 2010. 32(4): p. 557-67.

47. Cerovic, V., et al., *Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(1): p. 104-13.
48. Min, W.P., et al., *Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1304-12.
49. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
50. Steinbrink, K., et al., *CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2468-76.
51. Levings, M.K., et al., *IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5530-9.
52. Moreau, P., et al., *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
53. LeMaoult, J., et al., *HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7064-9.
54. Naji, A., et al., *Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways*. Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 233-9.
55. Noble, A., A. Giorgini, and J.A. Leggat, *Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4475-83.

56. Elrefaei, M., et al., *HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells suppress cytolysis and IL-2 production by CD8+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3265-71.
57. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
58. Levings, M.K., et al., *Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1335-46.
59. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 207-14.
60. Zhao, Y., et al., *IL-4 induces a suppressive IL-10-producing CD8+ T cell population via a Cdkn2a-dependent mechanism*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(6): p. 1103-12.
61. Elrefaei, M., et al., *TGF-beta and IL-10 production by HIV-specific CD8+ T cells is regulated by CTLA-4 signaling on CD4+ T cells*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8194.

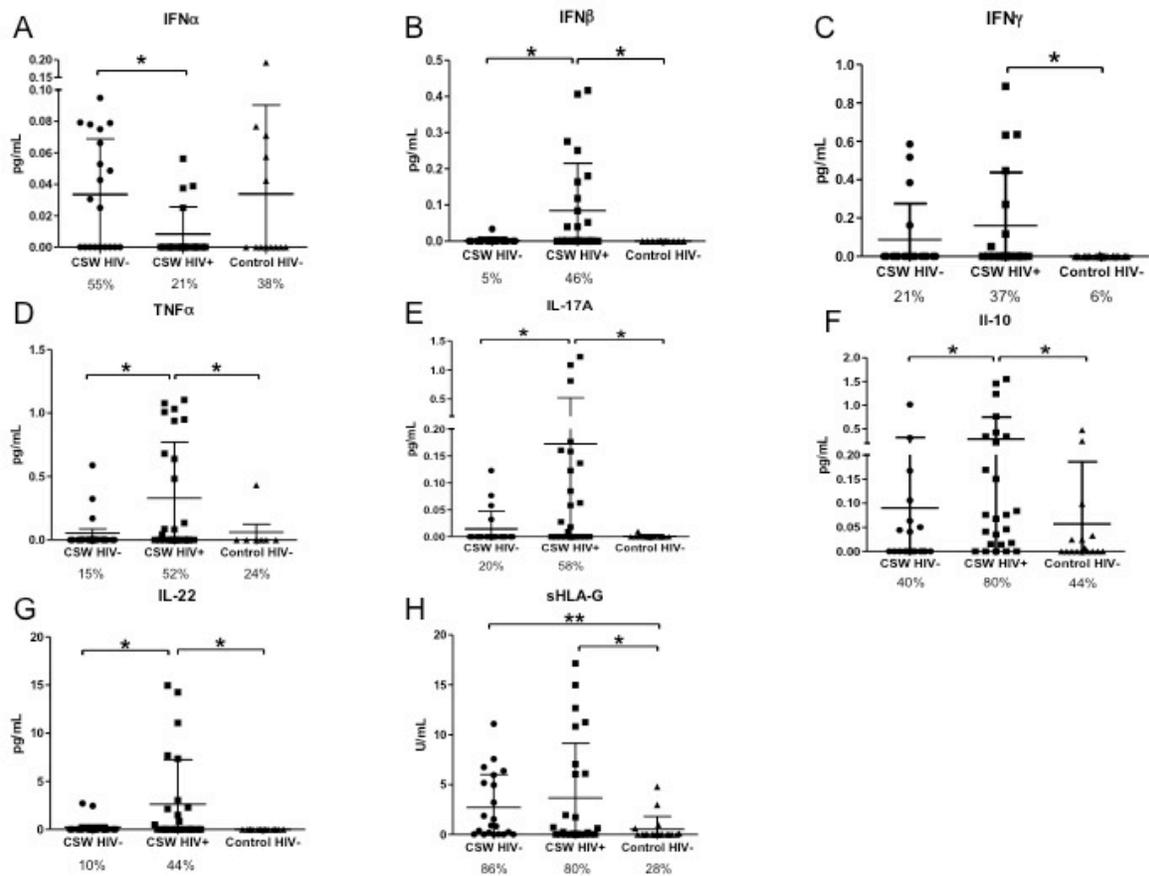


Figure 1. Distribution of IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-10, IL-22 and sHLA-G cervicovaginal lavage levels according to the study groups. Sample measurements below the Lower Detection Limit (LDL) for each assay were assigned a value of 0. Cytokine values are expressed in pg/mL and sHLA-G values are expressed in U/mL. Cytokine levels were also dichotomized as detectable and undetectable in all analysis and are represented in percentage of producing women. P-values for the comparison across all groups were calculated with the Kruskal-Wallis test. P-values for the comparison between two groups were calculated with a Mann-Whitney U test. Data shown are Mean \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IFN, interferon; IL, interleukine; TNF, tumor necrosis factor, and sHLA-G, soluble human leukocyte antigen-G.

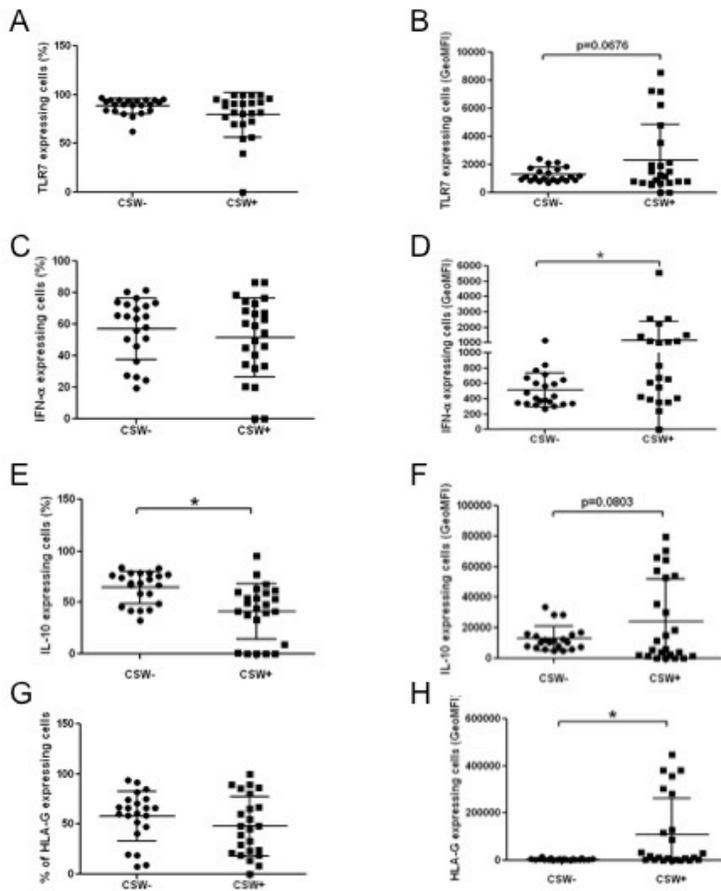


Figure 2. Endocervical epithelial cells. Mean relative frequencies and GeoMFI of TLR-7, IFN- α , IL-10 and HLA-G expressing cells according to the study groups. Statistical significance of differences of the relative frequencies and GeoMFI of expressing cells were evaluated with Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$. CSW, commercial sex worker; TLR, Toll-like receptor; IL, interleukine; IFN, interferon; HLA, human leukocyte antigen.

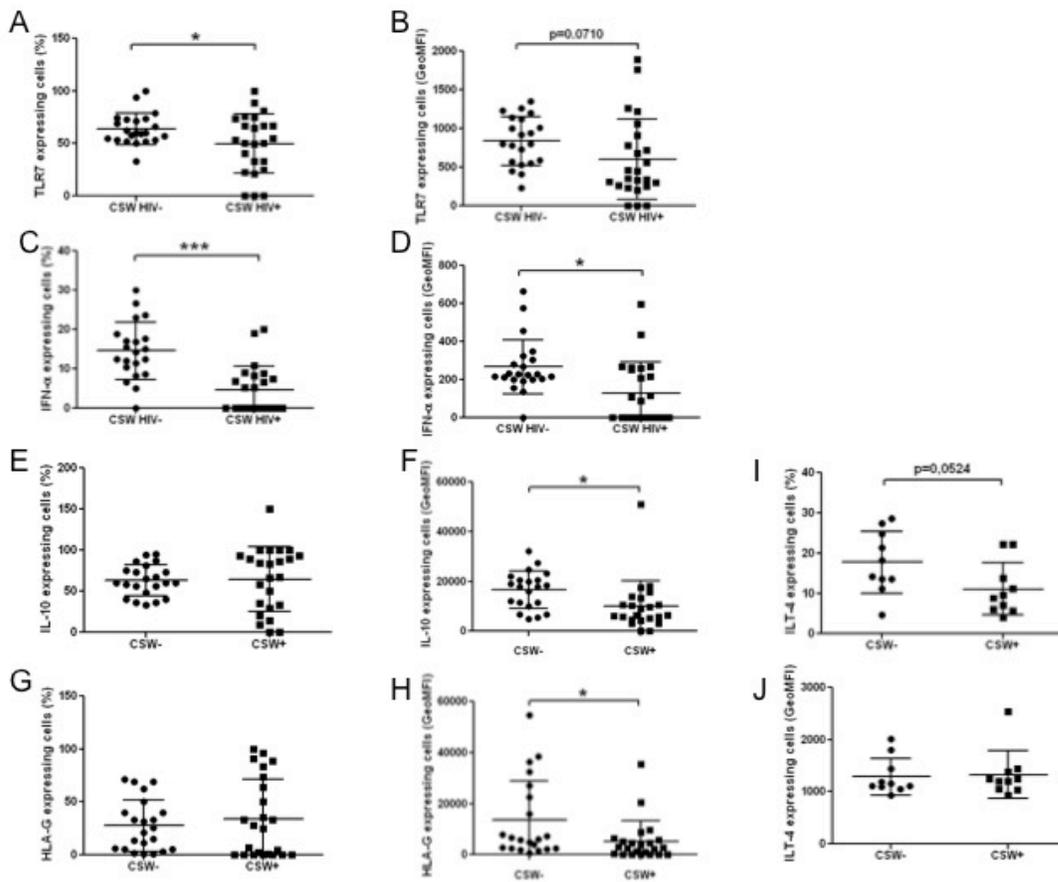


Figure 3. Endocervical myeloid HLA-DR+ cells. Mean relative frequencies and GeoMFI of TLR-7, IFN- α , IL-10, HLA-G, and ILT-4 expressing cells according to the study groups. Statistical significance of differences of the relative frequencies and GeoMFI of expressing cells were evaluated with Mann-Whitney U test * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$. CSW, commercial sex worker; TLR, Toll-like receptor; IL, interleukine; IFN, interferon; HLA, human leukocyte antigen; ILT, immunoglobulin like transcript.

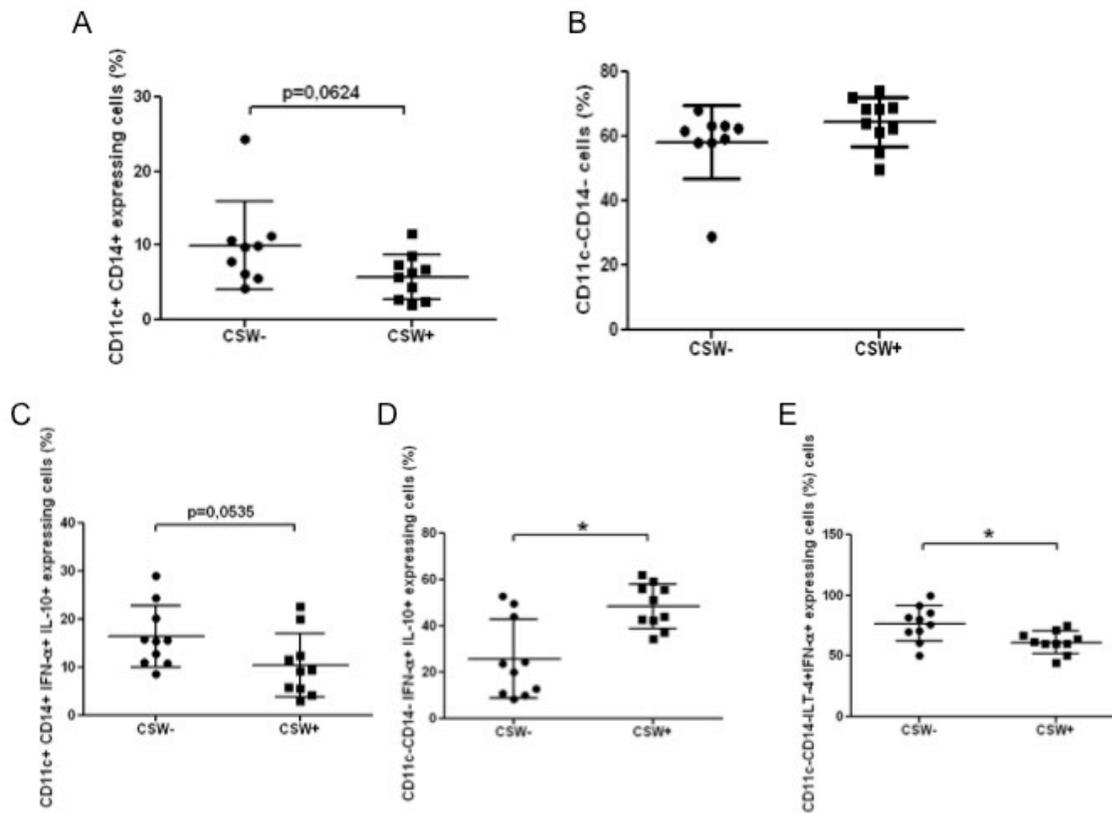


Figure 4. Endocervical myeloid HLA-DR+CD11c+CD14+ and HLA-DR+CD11c-CD14- cells. Mean relative frequencies of A) CD11c+CD14+ cells B) CD11c-CD14- cells, C) CD11c+CD14+IFN- α +IL-10+ cells, D) CD11c-CD14-IFN- α +IL-10+ cells, and E) CD11c-CD14-ILT-4+ IFN- α + cells. Statistical significance of differences of the relative frequencies of expressing cells was evaluated with Mann-Whitney U test. *p<0.05. CSW, commercial sex worker; IL, interleukine; IFN, interferon; ILT, immunoglobulin like transcript.

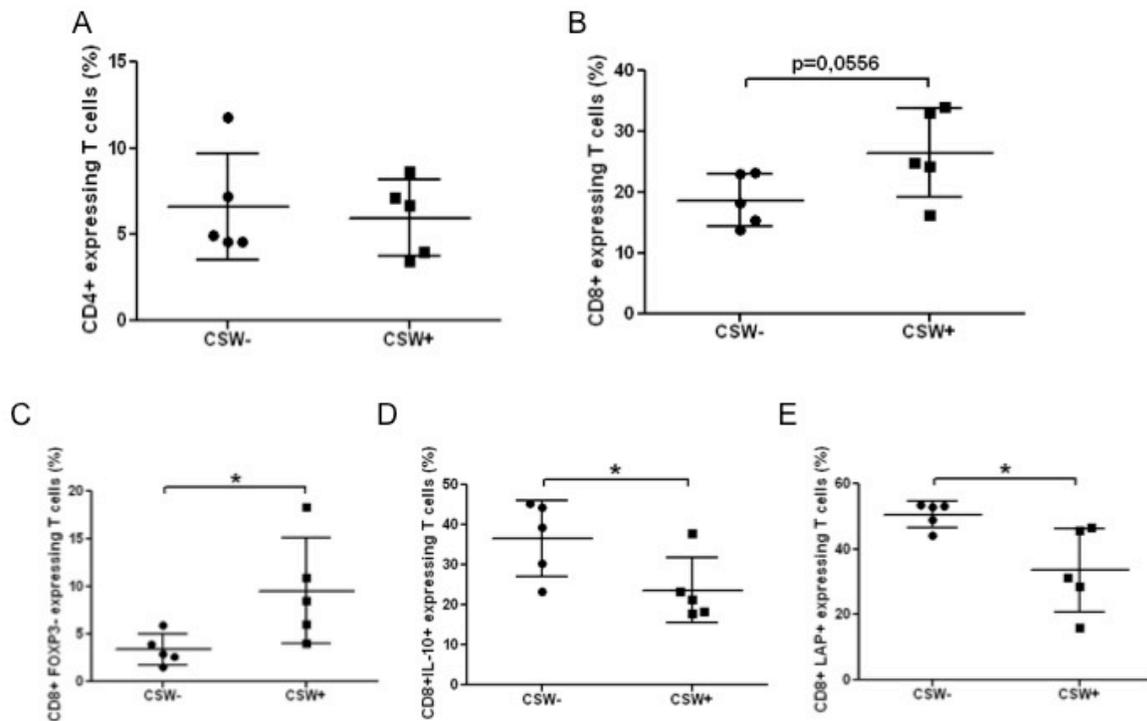


Figure 5. Endocervical CD4+ and CD8+ T cells. Mean relative frequencies of A) CD4+T cells, B) CD8+T cells, C) CD8+ FOXP3- T cells, D) CD8+ IL-10+ T cells, and E) CD8+ LAP+ T cells. Statistical significance of differences of the relative frequencies of expressing cells was evaluated with Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$. CSW, commercial sex worker; IL, interleukine; LAP, latency associated peptide; FOXP3, forkhead box P3.

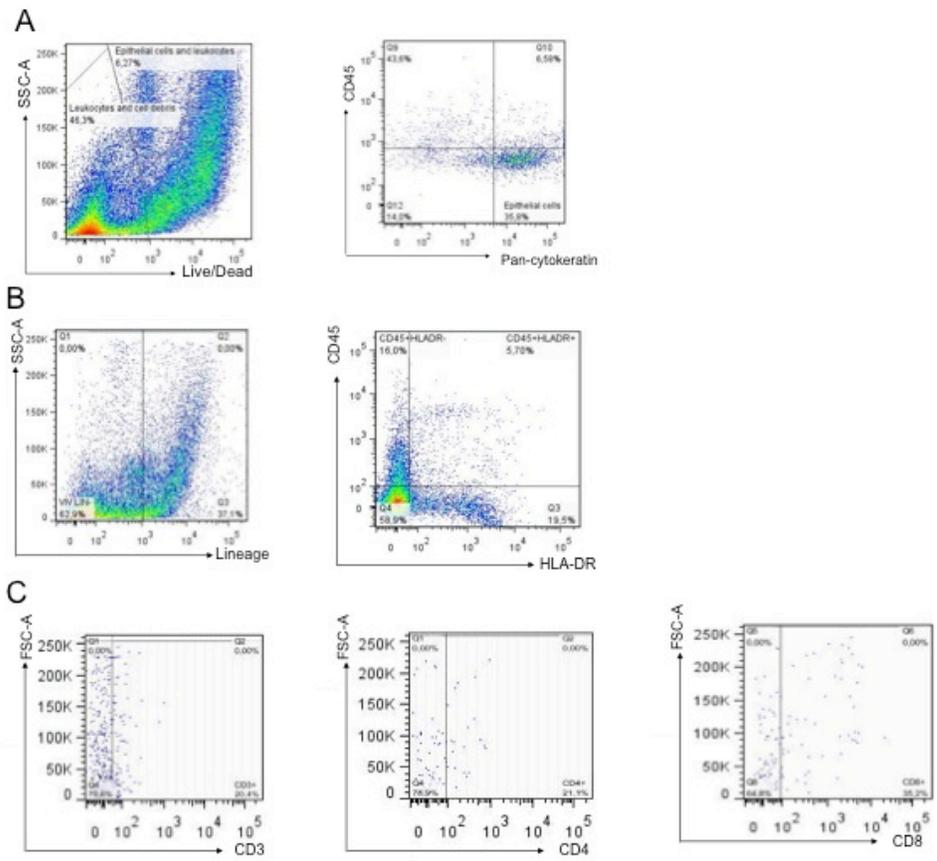


Figure 6. Gating strategies of a cytobrush sample for A) genital epithelial cells (GEC), B) myeloid HLA-DR+ cells, and C) CD4+ and CD8+T cells

La Discussion

Comprendre les mécanismes naturels de protection contre l'infection par le VIH-1 est prioritaire dans le développement de vaccins et microbicides efficaces. Le travail de recherche présenté dans cette thèse a focalisé sur la caractérisation de molécules susceptibles d'être impliquées dans des mécanismes d'immunité naturelle de défense chez des femmes TS VIH-1 HESN. Il est judicieux de penser qu'il existe probablement plus d'un mécanisme vu la complexité des réponses immunitaires pouvant être engendrées suite à une rencontre virus-hôte. Toutefois, ces femmes VIH-1 HESN ont naturellement la capacité de résister à l'infection par le VIH-1, possiblement, principalement en contrôlant le niveau inflammatoire au TGF lorsque l'on compare avec un groupe de femmes TS infectées par le VIH-1. Ce dernier groupe de femmes est infecté depuis une période indéterminée, a une charge virale sanguine de 30 000 copies/mm³ de sang en moyenne, un nombre de cellules T CD4⁺ de 570/mm³ de sang en moyenne, n'est pas traité et démontre un niveau inflammatoire plus élevé au TGF.

Il est capital de mentionner que la sélection (critères d'inclusion) des participantes à cette étude a été effectuée d'une manière très restrictive de façon à pouvoir répondre à nos hypothèses de recherche efficacement et avec le plus de fiabilité possible. Tous les paramètres (facteurs confondants) pouvant influencer la modulation de l'inflammation/activation cellulaire du compartiment mucosal génital tels que la phase du cycle ovulatoire, la prise de contraceptifs oraux, les IST (gonorrhée, chlamydia, syphilis, HSV-2, candidose, trichomonase, vaginose bactérienne), les mœurs sexuels et hygiéniques ont été considéré. De plus, d'autres facteurs comme le nombre d'années de travail du sexe d'une manière active, l'utilisation de préservatifs et le nombre de partenaires par semaine ont été répertoriés et pris en compte dans la sélection des femmes.

Il est aussi important de spécifier que la présence d'ARNm Gag du VIH-1 a été détecté dans des mDC cervicales de femmes VIH-1 HESN (2 échantillons sur 3) et VIH-1-infectées (2 échantillons sur 3) ce qui pourrait constituer une preuve de la rencontre réelle de ces femmes avec le VIH-1 (Réf. Annexe 4). De plus, il sera essentiel de procéder à la caractérisation de réponses, telles que IgA, IgG et CTL envers le VIH-1 chez les femmes HESN (sérum et LCV) afin de supporter une exposition et réponse au virus par ces individus

(Réf. Perspectives). En ce sens, nous avons trouvé des IgA dirigés contre la gp 140 dans les LCV des femmes HESN de la cohorte béninoise précédente (Lajoie, Poudrier, Roger non-publié). Il est certain que la détection de la présence de ces anticorps doit être accompagnée d'études fonctionnelles, telles que activité de neutralisation et ADCC pour les IgG et neutralisation et inhibition de transcytose pour les IgA (Réf. Perspectives).

L'hypothèse centrale de cette thèse est que, la modulation des conditions inflammatoires à la porte d'entrée génitale mucoale, serait un facteur de protection contre l'infection par le VIH-1. Nous avons abordé cette hypothèse par l'évaluation et la comparaison de facteurs immunitaires dans des spécimens provenant des TS VIH-1 HESN et des TS VIH-1 séropositives sans traitement de la cohorte de TS de Cotonou au Bénin, Afrique sub-Saharienne. Une étude fonctionnelle utilisant un modèle expérimental *in vitro* devrait suivre à la caractérisation présentée ici afin de mieux comprendre les résultats présentés dans cette thèse. Nous observons que, dans le groupe des TS VIH-1 HESN, les niveaux de médiateurs pro-inflammatoires présents dans la muqueuse vaginale sont plus faibles que ceux mesurés chez les TS VIH-1 séropositives. De surcroît, nous avons démontré que l'IFN- α est un facteur soluble majeur faisant partie de l'environnement génital des TS VIH-1 non-infectées HESN.

Cette étude a démontré que les cellules épithéliales endocervicales génitales (CEG) des TS VIH-1 HESN maintiennent un faible niveau d'expression de TLR7/9, d'IFN- α , d'IL-10 et de HLA-G mais un haut pourcentage de cellules exprimant l'IL-10 lorsque comparées aux femmes infectées par le VIH-1 dénotant un faible niveau d'activation cellulaire. Toutefois, les spécimens endocervicaux des TS VIH-1 HESN sont aussi composés de cellules myéloïdes HLA-DR+ qui expriment des niveaux élevés de TLR-7, IFN- α , IL-10, HLA-G et ILT-4, ce qui leur confère possiblement la capacité de promouvoir une réponse antivirale efficace et en même temps immunorégulatrice. Une analyse plus exhaustive nous a permis d'identifier deux populations phénotypiquement distinctes au sein de la population endocervicale myéloïde HLA-DR+ chez les TS VIH-1 HESN et qui étaient moins représentées chez les TS VIH-1 séropositives, soit 1) HLA-DR+ CD11c+ CD14+ IFN- α + IL-10+ et 2) HLA-DR+ CD11c- CD14- ILT-4+ IFN- α +. Cette caractérisation nous porte à penser que la population de cellules myéloïdes HLA-DR+ pourrait comporter des mDC par la présence de marqueurs CD103, CD1a et ILT-4 rapportés chez les DC mucoales. De plus, nous observons l'expression de

marqueurs retrouvés sur les DC dites «tolérogéniques». Malgré ces faits, il est impossible, à ce stade-ci de l'étude, de confirmer la nature exacte de ces DC. Il en est de même pour les deux phénotypes majeurs de cellules T CD8⁺ exprimant IL-10 et TGF- β identifiés dans les spécimens endocervicaux des TS VIH-1 HESN.

Les médiateurs immunologiques solubles dans le TGF des femmes de la cohorte béninoise

Ce volet de l'étude a bénéficié de la présence de spécimens provenant d'un groupe contrôle de femmes de la population générale de Cotonou au Bénin. Comme rapporté ci-haut et dans nos études précédentes ainsi que par d'autres (23, 392, 403, 404), les TS infectées par le VIH-1 ont un environnement extracellulaire génital pro-inflammatoire comparé aux TS VIH-1 HESN qui ont plutôt un bas profil inflammatoire.

IFN- β , IFN- γ , IL-10, TNF- α , 17A et IL-22

Nous avons démontré que les TS infectées ont un profil pro-inflammatoire dans leur TGF caractérisé par des niveaux d'IFN- β , d'IFN- γ et d'IL-10 augmentés et que le pourcentage de femmes avec production détectable de ces cytokines est significativement plus élevé que dans les groupes des TS HESN et contrôles. En effet, dans une étude similaire réalisée dans notre laboratoire, il a été rapporté, dans le LCV et le sérum que des niveaux extracellulaires plus élevés d'IFN- γ étaient observés chez des femmes TS infectées par le VIH-1 en comparaison avec des femmes TS HESN et contrôles (403).

Pour mieux comprendre les résultats obtenus il faut, en premier lieu spécifier que, les interférons sont classifiés selon trois types majeurs: Les IFN de type I (α (14 sous-types), β , ω , ϵ), les interférons de type II (IFN- γ) et les interférons de type III (IFN- λ (IL-28 et IL-29)). Ils se distinguent de par la spécificité de leurs récepteurs, l'homologie dans leurs séquences en acides aminés, leurs locus génétiques, et le type cellulaire qui les produisent. Les IFN de type I induisent un état cellulaire anti-viral, inhibent la prolifération cellulaire et modulent la survie/l'apoptose, la différenciation et la migration cellulaire. Leurs actions peuvent être locales ou systémiques et ils agissent sur une grande

variété de cellules impliquées dans les réponses innées et adaptatives. Aussi, puisqu'ils sont produits rapidement en réponse à un stimulus, ils sont considérés comme étant des effecteurs clés de l'immunité innée faisant le pont avec l'immunité adaptative (recrutement et régulation cellulaire). Cependant, comme pour plusieurs autres cytokines, une réponse IFN excessive est toxique et semble contribuer à la pathogénèse de maladies autoimmunes et cause de multiples effets secondaires (405-407).

Généralement, toutes les cellules du corps peuvent produire des IFN de type I, mais les cellules hématopoïétiques en sont la source prédominante, surtout les pDC. Ces dernières ont un haut niveau d'expression d'IRF-7 (facteur transcriptionnel primordial dans la production des IFN type I), d'une manière constitutive, comparativement aux autres cellules chez qui l'expression de ce facteur de transcription est plus bas et doit être initié par une première boucle d'amplification par l'IFN- β avant la production des autres sous-types d'IFN-I (405). Tous les sous-types d'IFN-I lient le récepteur IFNAR, démontrant une forte affinité pour la sous-unité IFNAR2 et une plus faible affinité pour la sous-unité IFNAR1. Normalement, les IFN-I lient premièrement IFNR2 qui est suivi du recrutement de la sous-unité IFNR1 initiant la signalisation par la voie canonique de signalisation Jak-Stat résultant en l'activation de la transcription des ISG (*Interferon Stimulated Genes*). Dans notre étude, les niveaux génitaux d'IFN- α et IFN- β ne vont pas dans le même sens. En effet, chez les TS VIH-1 infectées, les niveaux génitaux d'IFN- β sont élevés, ceux pour l'IFN- α sont bas et on observe le phénomène inverse chez les TS VIH-1 HESN. Ceci n'est pas étonnant étant donné que ces deux cytokines ont des activités fonctionnelles différentes. Par exemple, l'IFN- β est plus efficace dans l'induction des voies apoptotiques et antiprolifératives que l'IFN- α et est aussi connu pour jouer un rôle dans la production de TNF- α induit par les LPS (408). Une étude a démontré que, dans un contexte pro-inflammatoire et où il y a une toxicité induite par les LPS, l'IFN- β peut utiliser une voie de signalisation alternative qui est IFNR1 dépendante/IFNR2 indépendante et qui exacerbe la toxicité du milieu par les LPS en conditions inflammatoires (409). Dans notre étude, il est donc possible de croire que l'IFN- β sécrété dans le TGF des femmes infectées par le VIH-1 pourrait emprunter cette voie alterne par le IFNR1 seul et favoriser la pathogénèse de l'infection.

Ensuite, pour ce qui est de l'IFN- γ , cette cytokine pro-inflammatoire qui est augmentée à la muqueuse génitale des femmes infectées par le VIH-1, il a été démontré, dans le tractus gastro-intestinal que la réplication virale ainsi que la déplétion des cellules T CD4+ coïncidaient avec une augmentation marquée de la transcription de gènes impliqués dans l'activation immune et l'inflammation (410). Aussi, des études effectuées chez des femelles rhésus macaques infectées génitalement par le VIS ont démontré la présence de réponses cytokiniques pro-inflammatoires à la muqueuse génitale et dans les tissus lymphoïdes drainants, ce qui corrélait avec la réplication virale dans ces tissus (411).

De plus, il a été constaté que les cellules T CD8+ composant la muqueuse génitale de femmes infectées par le VIH-1 produisaient de l'IFN- γ en réponse au VIH *in vitro* (412). Dans un modèle murin intestinal *in vivo*, il a aussi été révélé que l'IFN- γ pouvait jouer un rôle dans l'augmentation de la perméabilité épithéliale et alors favoriser le phénomène de translocation microbienne vue dans l'infection par le VIH (413). Dans la muqueuse génitale des femmes infectées par le VIH-1, l'augmentation des niveaux de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires pourrait favoriser le recrutement de cellules cibles, par chimiotactisme, pour la réplication du VIH-1 et la progression de l'infection.

En ce qui concerne l'IL-10, nous observons que les niveaux génitaux sont augmentés chez les TS VIH-1 infectées. Ceci est en accord avec le fait que l'IL-10 a été démontré comme étant aussi associé avec l'inflammation, l'activation cellulaire et la dérégulation immunitaire dans l'infection par le VIH-1 (48, 98, 101, 414). Il est aussi connu que la production d'IL-10 est induite suite à une stimulation des monocytes humains par la protéine Tat du VIH-1 (415). Un autre groupe a démontré que la production d'IL-10 corrèle avec la progression de l'infection, son expression est augmentée dans plusieurs types cellulaires et supprime les réponses T CD4+ et T CD8+ effectrices VIH-spécifiques chez des individus virémiques (416). Récemment, dans notre laboratoire, il a été démontré que des fréquences de cellules B totales exprimant l'IL-10 dans le sang de patients infectés par le VIH-1 progressifs rapides et classiques étaient augmentées comparé à celles observées dans des donneurs non infectés par le VIH-1 favorisant l'activation des cellules B et l'activité suppressive des cellules T, et prévenant l'éradication virale dans le contexte de la progression de l'infection (98).

Les TS infectées par le VIH-1 ont démontré des niveaux d'expression de TNF- α , 17A et IL-22 et des pourcentages de femmes avec production détectable plus élevés que les TS VIH-1 HESN et que les femmes du groupe contrôle. Il a été démontré que les cellules épithéliales (génitales et intestinales) répondent directement aux glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1, augmentant l'expression de cytokines inflammatoires incluant TSLP (52), MIP-3 α (107) et TNF- α (417) qui mène à un dysfonctionnement de la barrière épithéliale.

Comme abordé précédemment, ce dysfonctionnement résulte en une perméabilité accrue de la barrière physique et pourrait être responsable du passage de virus et bactéries présents dans le lumen, vers la muqueuse dans la lamina propria et ensuite au niveau systémique. Ce phénomène est celui de la translocation microbienne et est un élément clé dans l'activation immunitaire chronique observée chez les individus infectés par le VIH-1 (417, 418). De plus, il a été observé que l'IL-22, combiné à l'IL-17A ou l'IL-17F, des cytokines pro-inflammatoires sécrétées par Th17 (linéage distinct des cellules T CD4⁺ effectrices), induit l'expression de métalloprotéinases, β -défensine 2 et d'autres peptides antimicrobiens (S100A9, S100A7 et S100A8) et participe à la régulation de gènes associés avec l'immunité innée de la peau. Ces cytokines sont immunoprotectrices de la muqueuse en conditions d'immunosurveillance mais pathogéniques en condition proinflammatoire (419). Finalement, comme dans notre étude, Kaul et al, ont trouvé que les TS VIH-1 HESN du Kenya démontrent une basse production d'IL-17/IL-22 et d'autres cytokines proinflammatoires dans les compartiments sanguins et génitaux en comparaison avec les TS infectées par le VIH-1 (396).

HLA-G

Pour ce qui est de HLA-G soluble, les femmes VIH-1 non-infectées HESN et les femmes contrôles ont eu des niveaux d'expression et des pourcentages de production détectable de cette molécule plus bas qu'il a été observé chez les femmes infectées par le VIH-1. Ce dernier résultat confirme ce qui avait été observé dans une cohorte (étude de cas) similaire de femmes TS béninoises étudiées auparavant dans notre laboratoire faisant d'ailleurs l'objet du premier article composant cette thèse. Dans l'article 1, HLA-G soluble génital a été associé à l'infection par le VIH-1. Les femmes de cette première cohorte avaient été caractérisées en ce qui a trait aux allèles de HLA-G. Les génotypes HLA-G*01 :01 :02 et HLA-G*01 :04 :04 ont

été associé avec l'expression de HLA-G soluble au TGF. Cependant, suite à un ajustement par une analyse de régression logistique multiple, il n'y avait plus d'association.

Contrairement à des études précédentes (127, 386, 420), le polymorphisme de HLA-G n'a pas été associé avec l'infection par le VIH-1 dans notre cohorte de femmes. HLA-G soluble joue un rôle crucial dans la régulation de l'immunité innée et adaptative en modulant les fonctions des APC (DC), des cellules NK et des cellules T (421-423). La régulation par HLA-G soluble est déterminée par les interactions entre des molécules de HLA-G avec des récepteurs inhibiteurs présents à la surface cellulaire. Le plus souvent, les cellules myéloïdes expriment les récepteurs ILT-3 et ILT-4, les cellules lymphoïdes expriment ILT-2 et les cellules NK expriment les KIR (*Killer Inhibitory Receptor*). Les réponses immunitaires résultantes dépendent donc de la nature de l'interaction entre HLA-G et un type de récepteur. La plupart du temps, la réponse engendrée par la liaison de HLA-G à son récepteur est suppressive et favorise la tolérance immunitaire.

Cependant, la liaison de HLA-G à KIR 2DL4 sur des monocytes du sang périphérique et sur des cellules NK favorise plutôt la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (424, 425). Enfin, l'étude décrite dans l'article 1 révèle qu'en absence du VIH-1 (chez les TS HESN et le groupe contrôle non-TS non-infecté), les niveaux de HLA-G, cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont bas dans la muqueuse génitale, suggérant le maintien de l'homéostasie dans ce compartiment. Inversement, en présence du VIH-1, a été observée une forte production des facteurs immunosuppresseurs et pro-inflammatoires, reflétant possiblement une stratégie d'évasion virale, supprimant certaines fonctions effectrices cellulaires induisant une tolérance immunitaire au VIH-1 tout en favorisant le recrutement de cellules cibles. De plus, ce qui a été intéressant de noter dans la première étude est que les niveaux élevés de HLA-G soluble ont été associés à la présence de vaginose bactérienne dans les échantillons de LCV des femmes de l'étude.

Même suite à un ajustement statistique tenant en compte la variable VIH-1, l'association entre HLA-G soluble et la vaginose bactérienne demeure, ce qui suggère que les niveaux de HLA-G soluble sont associés avec la vaginose bactérienne et avec l'infection par le VIH-1 indépendamment. La vaginose bactérienne étant un facteur de risque établie pour l'infection par le VIH-1 (426, 427). Les résultats de l'étude de la deuxième cohorte de femmes TS béninoises (voir article 2) vont dans le même sens et suggèrent que dans le contexte d'une

infection par le VIH-1, l'expression de HLA-G soluble dans le TGF est un processus complexe pouvant être modulé par plusieurs facteurs comme le VIH lui-même, la vaginose bactérienne, certains génotypes de HLA-G et certains patrons d'expression de cytokines/chimiokines. Ces facteurs peuvent tous contribuer, plus ou moins, à l'initiation d'un environnement immunologique favorisant la réplication virale et l'évasion des réponses immunitaires mucosales. La présence augmentée de HLA-G soluble à la muqueuse génitale est donc associée à l'infection par le VIH-1 et pourrait être un mécanisme potentiel d'évasion viral utilisé par le VIH-1 (126).

β-chimiokines (Réf. Annexe 5)

Cette section discute de nouveaux résultats qui ne font pas partis de l'article en préparation (chapitre 2). Pour ce qui est des β-chimiokines (type C-C) CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α) et CCL4 (MIP-1β), les femmes contrôles ont démontré des niveaux d'expression plus faibles que les femmes TS VIH-1 HESN et que les femmes TS VIH-1 infectées. Dans une étude précédente (404), utilisant des échantillons de LCV provenant de femmes TS ayant des caractéristiques socio-démographiques similaires aux femmes TS de l'étude présente, les niveaux de CCL3 génitaux étaient significativement plus élevés chez les femmes HESN que chez les femmes infectées par le VIH-1, suggérant que CCL3 pourrait être un facteur de protection contre l'infection par le VIH-1. Aussi, des niveaux génitaux plus élevés de CCL2 et de CCL4 ont été observés dans les LCV des TS infectées *versus* les TS HESN. Cette différence dans les résultats pourrait être attribuée au fait que les femmes de la cohorte précédente étaient atteintes de co-infections (IST) et pour cette raison il est difficile de comparer ces deux cohortes de femmes.

CCL3 (MIP-1α) et CCL4 (MIP-1β), produites par les cellules T CD8+ dans l'infection aiguë, ligands du corécepteur CCR5, ont été associées avec l'inhibition de l'infection par des souches virales R5 restreignant la dissémination virale (428). Cette observation suggère que chez les TS VIH-1 HESN les β-chimiokines pourraient être produites très tôt dès la rencontre avec le virus et entreraient en compétition avec le VIH-1 pour le corécepteur CCR5 en les bloquant, les rendant ainsi indisponibles pour l'attachement du VIH-1 à sa cellule cible. À l'opposé, chez les TS VIH-1 infectées, ces même β-chimiokines ont une expression augmentée

probablement parce qu'elles sont produites plus tard dans l'infection, que le virus a déjà franchi les premières lignes de défense, s'est répliqué et a engendré de l'inflammation. La conséquence d'un environnement génital hautement inflammatoire est l'attraction de plus de cellules cibles au site d'entrée virale. De plus, il a été démontré que l'infection par le VIH-1 et des protéines dérivées du virus comme gp120, Nef, la protéine de la matrice (p17) et Tat, *in vitro* et *in vivo*, augmentent significativement l'expression et la sécrétion de CCL2 et autres β -chimiokines (428).

Pour CCL5 (RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*)), les femmes TS VIH-1 infectées ont démontré des niveaux génitaux significativement plus élevés que les femmes TS HESN et que les femmes contrôles; ce même résultat avait été obtenu avec la cohorte précédente. En effet, une autre étude a aussi démontré que des niveaux génitaux de RANTES ont été corrélés avec l'augmentation du nombre de cellules cibles pour le VIH-1 (cellules TCD4+ et DC immatures) dans la muqueuse cervicale (402).

En bref, les cytokines/chimiokines pro-inflammatoires, dans le milieu extra-cellulaire du TGF des TS VIH-1 infectées pourraient favoriser la progression de l'infection par le recrutement continu de cellules cibles en vue d'augmenter la réplication et la dissémination virale au-delà du site initial de l'infection (205) tandis que les TS VIH-1 HESN démontrent la présence d'un environnement mucosal non-inflammatoire et en homéostasie lorsque comparé aux femmes contrôles de cette étude. Il est à noter que pour plusieurs cytokines/chimiokines, les niveaux de production sont plus bas dans le groupe contrôle comparativement aux deux autres groupes de TS. Ceci est probablement relié au travail du sexe lui-même. Les femmes du groupe contrôle pourraient démontrer une tolérance au liquide séminal de leur conjoint, par opposition aux femmes TS qui sont en contact avec différents liquides séminaux de différents partenaires sur une base régulière. Des études suggèrent que le liquide séminal a des propriétés inflammatoires qui pourraient de plus augmenter les risques de transmission du VIH-1 (429, 430).

IFN- α

Les TS VIH-1 HESN nous ont permis d'identifier la cytokine IFN- α comme étant un médiateur soluble important du milieu extracellulaire du TGF de ces femmes lorsque comparé au milieu extracellulaire du TGF des TS VIH-1 infectées.

Une étude précédente dans notre laboratoire, réalisée à l'aide d'échantillons de CVL et sanguins provenant d'une cohorte semblable de femmes TS VIH-1 HESN, TS VIH-1 infectées et non-TS non infectées de Cotonou au Bénin, nous avait permis, dans un premier temps de caractériser et comparer l'environnement génital et systémique dans un contexte de contrôle *versus* infection au VIH-1 (8, 126, 403, 404).

Aussi, à l'aide de ces échantillons, nous avons vérifié la présence de quelques polymorphismes génétiques (SNP ; *single nucleotide polymorphism*) chez les femmes de cette cohorte au niveau d'intermédiaires de signalisation faisant partie de la voie d'induction de l'IFN- α . Nous avons recherché des SNP dans les gènes de TLR-7, TLR-8, TLR-9, IRF-7 et IFN-A17, ayant déjà été répertoriés dans la littérature comme ayant un effet sur la production d'IFN- α (Réf. Annexe 2). La présence des SNP recherchés a été décelée chez les femmes de la cohorte sans toutefois qu'il n'y ait d'association avec les niveaux d'IFN- α , sauf pour l'IRF-7, où un SNP (rs 1061502) a pu être associé avec une diminution des niveaux d'IFN- α extra et intracellulaire dans le groupe des TS VIH-1 infectées. Ce SNP n'a cependant pas pu être associé à l'infection par le VIH-1. Ce résultat suggère que, les participantes infectées par le VIH-1 de l'étude actuelle possèdent possiblement ce SNP dans le gène de l'IRF-7 qui régulerait à la baisse leurs niveaux génitaux d'IFN- α . Ceci devra être vérifié dans une étude ultérieure (Réf. perspectives) (Résultats non-publiés, Annexe 3).

Par ailleurs, il pourrait être possible que les TS VIH-1 HESN soient capables de réagir normalement à une stimulation virale en contrôlant l'expression des IFN- α comme identifié dans leur TGF (production similaire aux contrôles). Ceci suggère qu'une production d'IFN- α de manière contrôlée et homéostatique comme vu chez les TS VIH-1 HESN, pourrait être critique dans l'induction des gènes antiviraux (ISG) pour soutenir une présence efficace de facteurs de restrictions à la porte d'entrée mucoale.

Une étude récente chez le macaque a démontré que le blocage des récepteurs IFNRI et II occasionne une baisse d'expression de gènes antiviraux, une augmentation de la grandeur des

réservoirs du VIS et une déplétion des cellules T CD4+ accélérée avec une progression de l'infection vers le SIDA. Contrairement, une administration initiale d' IFN- α 2 a augmenté l'expression de gènes antiviraux et a prévenu une infection systémique. Cependant, un traitement continu à l' IFN- α 2 a induit une désensibilisation et diminué l'expression des gènes antiviraux démontrant l'importance de la synchronisation dans la production des IFN I dans l'induction efficace d'une réponse immunitaire innée contre l'infection aiguë par le VIS (431). Le fait que les TS VIH-1 infectées démontrent l'absence d'un état antiviral adéquat est peut être une des causes de l'infection mais pourrait aussi en être la conséquence. Une combinaison d'ISG est requise pour obtenir un contrôle fort et complet de la réplication virale et une différence quantitative dans l'expression des ISG peut expliquer la variabilité d'efficacité des réponses antivirales dépendamment des contextes T auxiliaire. Par exemple, Touzot et al, ont observé que CCL20 était induite par la présence de l'IFN- α , dans un contexte Th17 (432). Par ailleurs, l'IFN- α est aussi apte à induire un phénotype régulateur, chez la souris, en présence d'IL-10 (433). IL est de plus rapporté que l'IFN- α était utilisé dans le traitement de maladies infectieuses (VHC) et néoplasique (mélanome malin) et chaque environnement inflammatoire spécifique à une maladie a induit une réponse IFN spécifique, démontrant la diversité des effets observés avec les IFN utilisés à des fins thérapeutiques (434). Des microenvironnements tissulaires inflammatoires complexes sont composés de combinaisons de cytokines qui caractérisent les processus inflammatoires. IFN- α est une cytokine pléiotropique, son récepteur étant exprimé d'une manière ubiquitaire dans plusieurs tissus. L'IFN- α agit dans une diversité de contextes inflammatoires caractérisant différentes conditions physiopathologiques comme vu dans l'infection par le VIH-1. Touzot et al. ont aussi démontré que, une seule cytokine, ici l'IFN- α , peut effectivement conduire à une multiplicité de signatures transcriptionnelles dans des cellules cibles dépendamment de l'environnement cytokinique spécifique. Ils proposent le concept de flexibilité combinatoire comme l'habileté de l'IFN- α à induire une grande diversité de réponses, et d'états fonctionnels associés, quand elle agit en combinaison avec d'autres cytokines (432). Par exemple, dans notre étude, chez les TS VIH-1 HESN, la présence d'IFN- α semble induire un environnement anti-viral qui favorise la résistance à l'infection par le VIH-1 comparé aux TS infectées par le VIH-1.

Les conclusions tirées de l'analyse de cette section sur les facteurs solubles immunologiques retrouvés dans le TGF doivent être prises en considération car les expériences ont été effectuées avec conscience et minutie, cependant, la méthode de prélèvement et de concentration des sécrétions vaginales, même suivant des protocoles rigoureux, introduisent un facteur de dilution (solution de PBS) qui est difficile à évaluer donc, un certain facteur d'incertitude même si un facteur de concentration est appliqué au niveau de l'analyse des résultats. La caractérisation et comparaison qualitative et quantitative des CVLs quant aux cytokines et chimiokines sont limitées en interprétation. Même considérant les différences sociales et démographiques entre les individus et la caractérisation cellulaire phénotypiques du TGF, une étude fonctionnelle sera nécessaire pour corroborer les conclusions énoncées dans cette thèse.

Aussi, il est important de mentionner que les types et niveaux de cytokines/chimiokines retrouvés solubles dans les CVLs sont le résultat de la sécrétion de plusieurs types cellulaires, c'est pourquoi il sera difficile d'associer un type cellulaire précis avec la présence d'un médiateur immunologique sécrété (Réf. Figures 10 et 11).

Caractérisation phénotypique des cellules épithéliales, myéloïdes et des cellules T mucoales génitales cervicales

Il est à noter que pour ce dernier volet de l'étude, il a été impossible d'obtenir des femmes contrôles non-TS non-infectées de la population générale du Bénin. Toutefois, ces échantillons contrôles sont en voie d'arriver à Montréal pour être analysés.

L'épithélium dans le col utérin des TS VIH-1 HESN *versus* les TS VIH-1 infectées

Notre modèle d'immunité naturelle contre le VIH associé aux TS VIH-1 non-infectées HESN nous a permis d'identifier IFN- α comme étant un facteur majeur sécrété dans le TGF. Il est cependant intéressant de noter que les cellules épithéliales endocervicales génitales (CEG) du TGF de ce groupe de femmes maintiennent un faible niveau d'expression de TLR-7, d'IFN- α , d'IL-10 et de HLA-G intracellulaire et des pourcentages augmentés de CEG exprimant l'IL-10 lorsque comparé aux TS VIH infectées. Ceci pourrait suggérer une réponse restreinte,

possiblement en relation avec un faible niveau inflammatoire et d'activation cellulaire des CEG. Concernant les résultats de HLA-G et d'IL-10 intracellulaire, il est très difficile aujourd'hui de pouvoir en discuter sans pouvoir comparer avec un groupe contrôle (ce résultat reste à discuter suite à l'analyse d'un groupe contrôle).

Les CEG de TS VIH-1 HESN, une des premières cellules à rencontrer le VIH-1, pourraient avoir la capacité de contrôler l'activation immunitaire mucoale et la migration des cellules cibles du VIH-1 en maintenant un phénotype régulateur. L'expression de facteurs intracellulaires suggère une sécrétion de ces facteurs, cependant, notre étude de caractérisation ne nous permet pas d'en être certains, il faudrait une étude fonctionnelle *in vitro* pour appuyer ce qui est observé au niveau cellulaire. À l'opposé, les CEG de TS infectées démontrent possiblement un niveau d'activation intracellulaire plus élevée étant donné les niveaux d'expression de TLR-7 et d'IFN- α plus élevés. De plus, la présence de l'IFN- β augmentée dans les LCV des TS infectées pourrait être associée à un niveau d'activation élevé des CEG qui sont aussi, productrices de cette cytokine.

Sachant que l'IL-10, produite par les CEG, les APC, les cellules B et les cellules T régulatrices, régule la prolifération et la production de cytokines par les cellules T, qu'elle diminue la production de cytokines pro-inflammatoires, l'expression de molécules de costimulation par les monocytes/macrophages (435) et qu'elle induit une anergie des cellules T antigène-spécifiques et une différenciation des cellules Tr1, il peut être assumé que cette cytokine est impliquée dans une boucle d'amplification régulatrice (436). En effet, l'IL-10 induit l'expression de HLA-G et du récepteur ILT-4 et l'expression de ces protéines augmentent l'expression de l'IL-10. Cependant, pour ce qui est des CEG chez les TS HESN, cette boucle d'amplification régulatrice semble être absente car le niveau de HLA-G observé dans ces cellules est quasi nul.

En bref, la population de CEG provenant des TS non infectées présente un statut d'activation cellulaire (faibles niveaux de TLR-7, d'IFN- α , d'IL-10 et de HLA-G) qui semble restreindre l'inflammation mucoale au site de l'exposition virale évitant le drainage de populations cibles vers le TGF.

Les cellules myéloïdes HLA-DR+ dans le col utérin des TS VIH-1 HESN *versus* les TS VIH-1 infectées

Au niveau de l'endocol utérin des femmes TS VIH-1 HESN, nous avons trouvé, en majorité des CEG (42%) ensuite, des cellules linéage HLA-DR- (35%) (composées d'une prédominance de granulocytes (CD66b)), des cellules lymphoïdes (17%) et finalement, des cellules myéloïdes HLA-DR+ CD11c⁺CD14⁺ (6%) (Réf. Annexe 6). Dans ces dernières, nous avons pu observer des niveaux d'expression élevés de TLR-7, IFN- α , IL-10, HLA-G et ILT-4 suggérant un profil tolérogénique/régulateur associé à une réponse antivirale efficace.

De plus, l'expression de CD1a et CD103 par la majorité des cellules myéloïdes HLA-DR+, retrouvées chez les femmes TS VIH-1 HESN suggère que cette population comporte probablement des DC, qui sont, des premières à rencontrer le VIH-1. Le fait que nous retrouvons, au sein de la population myéloïde HLA-DR+ des TS VIH-1 HESN des cellules qui expriment fortement les marqueurs CD14 et CD11c, suggère qu'elles pourraient dériver de monocytes. Toutefois, tel que mentionné précédemment, la nature exacte des cellules qui constituent la population myéloïde HLA-DR+ endocervicale des TS HESN ainsi que leur profil fonctionnel reste à être clarifié (Réf. perspectives).

Les populations myéloïdes, comme les DC qui échantillonnent le lumen vaginal à l'aide de leurs dendrites sont critiques à l'établissement d'une réponse immunitaire harmonisée. Sachant que les molécules CD1 sont homologues du CMH type I et sont importantes dans la présentation de molécules antigéniques lipidiques, la présence de mDC CD1a+ dans l'épithélium du TGF pourrait correspondre à leur fonction de cellules sentinelles qui répondent à un antigène microbien et le transfert à d'autres cellules immunitaires. Les cellules T de première ligne et d'autres cellules faisant partie de l'immunité innée et étant situées dans la lamina propria pourraient capter un peptide présenté par ces mDC CD1a+ (437). Dans notre étude, il est possible de croire que les cellules myéloïdes HLA-DR+ retrouvées (autant dans les échantillons provenant des TS VIH-1 HESN que dans ceux provenant des TS infectées) soient des DC intraépithéliales (décrit pour les marqueurs CD1a et CD103 (192)) qui auraient une fonction de présentation antigénique lipidique importante.

De plus, de façon similaire aux mDC CD103+ (intégrine αE) murines (438) les mDC CD103+ des nodules lymphatiques mésentériques (NLM) humaines ont été retrouvés dans la lamina propria de la muqueuse intestinale et ces cellules sont efficaces pour promouvoir la réponse cellulaire Treg jouant un rôle central dans le maintien de la tolérance et de l'homéostasie mucosale. Il apparaît, de surcroît que certains facteurs (acide rétinoïque, TGF- β , IL-10, TSLP) sécrétés par les cellules épithéliales intestinales favorisent fortement la différenciation des DC tolérogéniques, révélant l'existence d'un dialogue cellulaire épithélial/DC à la muqueuse intestinale (325, 326, 334). Il est alors possible de penser que les mDC HLA-DR+ CD1a+CD103+ retrouvées chez les TS VIH-1 HESN de notre étude pourraient bénéficier de propriétés tolérogéniques.

Il semble que les cellules à caractère DC, retrouvées dans notre étude chez les TS HESN, gardent un niveau efficace d'activation immunitaire innée de par leur niveau d'expression de TLR-7 et IFN- α qui pourrait induire un milieu antiviral efficace préservant un microenvironnement anti-inflammatoire et tolérogénique/régulateur. Il serait d'ailleurs très pertinent de caractériser les facteurs de restriction viraux se trouvant dans les cellules de ce microenvironnement cervical.

De plus, dernièrement, un nouveau type de DC, à profil tolérogénique, isolées de PBMC et aussi générées *in-vitro*, les DC-10 (HLA-DR+ CD14+ CD11c+), qui sécrètent un haut niveau d'IL-10, de HLA-G et d'ILT-4 a été découvert et serait efficace pour induire des Tr1 produisant de l'IL-10 et étant antigène-spécifique. L'induction de ces Tr1 par les DC-10 est IL-10 dépendant et requiert l'activation de la voie de signalisation ILT-4/HLA-G (282, 299). Il a aussi été décrit que les DC tolérogéniques sont caractérisées par une surexpression des récepteurs ILT-3 et ILT-4 et que la régulation de leur expression est augmentée par l'IL-10 sur des monocytes dans un contexte de VIH (295, 439) et aussi augmenté par HLA-G (304). Ces marqueurs spécifiques de tolérance (IL-10, HLA-G et ILT-4) sont retrouvés dans les cellules myéloïdes HLA-DR+ des échantillons cervicaux provenant des TS VIH-1 HESN de notre étude. Par conséquent, il est logique de penser que ces cellules myéloïdes HLA-DR+ pourraient tout autant avoir des propriétés tolérogéniques et donc la capacité d'induire la différenciation de cellules T régulatrices.

Inversement, les cellules du col utérin myéloïdes HLA-DR⁺ provenant des femmes TS infectées par le VIH-1, n'expriment pas majoritairement les marqueurs CD14, CD11c, et CD103. En effet, il a été rapporté que les DC CD103⁻ des nodules lymphatiques mésentériques (NLM) ont plutôt un profil immunogénique autant à l'état basal d'activation (440) que dans un contexte inflammatoire (441). Il semble que les mDC recrutées au TGF des femmes TS infectées par le VIH-1 de notre étude démontrent généralement un profil de différenciation en lien avec une activité antivirale régulée moindre comparé aux TS VIH-1 HESN et plutôt inflammatoire (plus faible expression d'IFN- α , d'IL-10 et de HLA-G).

Les cellules T CD8⁺ dans le col utérin des TS VIH-1 HESN *versus* les TS VIH-1 infectées

Par soucis d'homogénéité, de fiabilité et de cohérence des résultats, des échantillons des mêmes femmes (à des visites médicales subséquentes) ont été analysés, cependant, il ne restait plus que 5 femmes par groupe à explorer ; cette observation serait donc à confirmer avec un plus grand nombre d'échantillons.

La découverte de la présence de mDC possiblement tolérogéniques dans la muqueuse cervicale des femmes TS VIH-1 HESN de l'étude nous a amené à caractériser les populations cellulaires T qui se retrouvent aussi à la muqueuse du col utérin. En outre, nous avons pu observer deux populations phénotypiquement distinctes de cellules T CD8⁺, l'une exprimant IL-10 et l'autre exprimant TGF- β suggérant des fonctions différentes ; ces deux populations étant prédominantes chez les TS VIH-1 HESN *versus* les TS infectées par le VIH-1. Cette constatation devrait être précisée suite à des études fonctionnelles futures.

L'observation de ces populations cellulaires T CD8⁺ révèle que possiblement, la résultante du dialogue intercellulaire existant dans le microenvironnement de la muqueuse cervicale favorise la différenciation de populations cellulaires TCD8⁺ à potentiel régulateur. Pour connaître précisément les partenaires cellulaires impliqués dans ce dialogue, il serait important de faire une étude fonctionnelle *in vitro*. Cette induction de tolérance pourrait être conduite via la voie IL-10 dépendant ILT4/HLA-G, comme il a été mentionné auparavant. En effet, dans le TGF des TS HESN, un niveau inflammatoire faible et efficace semble être présent et maintenu suggérant une immunorégulation possiblement contrôlée par une voie de rétrosuppression

(boucle d'amplification régulatrice) décrite au préalable dans un modèle murin de transplantation (442) et dans un modèle de PBMC humain *in vitro* et *in vivo* (299, 306). Rappelons que HLA-G inhibe les activités cytolytiques des cellules NK, des CTL, la prolifération des cellules T allospécifiques et les fonctions des mDC (315, 421, 443). Ce mécanisme de suppression immunitaire pourrait être associé à la protection de l'infection par le VIH-1. Cet éventuel corrélat de protection devrait être considéré dans une étude future. Il a de plus été démontré que, tout comme pour l'IL-10, l'IFN- α peut promouvoir la différenciation des cellules Tr1, dans un système *in vitro* utilisant des PBMC humains et même, l'IFN- α agirait en synergie avec l'IL-10 pour exacerber la capacité de l'IL-10 à promouvoir la différenciation des Tr1 (436).

De surcroît, la muqueuse utérine, étant un compartiment immunitaire à part entière dû, principalement au phénomène de tolérance mucosale vraisemblablement induit par la flore microbienne présente. C'est-à-dire que les antigènes de la flore microbienne sont constamment présentés aux cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, ce mécanisme a toutefois été étudié dans le compartiment intestinale (444, 445). Il est connu que, dans la muqueuse utérine, il y a des agrégats lymphoïdes uniques constitués de cellules T CD8+ qui entourent un centre de cellules B, le tout étant encapsulé par des macrophages (199).

En effet, les mécanismes d'induction immunitaire au TGF sont encore mal compris, mais il serait possible que les DC migrent à la muqueuse du TGF et seraient associées à des structures lymphoïdes (agrégats lymphoïdes utérins) pour induire une réponse cellulaire B de première ligne et pour réguler des réponses adaptatives cellulaires (199, 247, 446). Comme vu chez les TS VIH-1 HESN, les cellules T CD8+ présentes dans l'environnement des mDC tolérogéniques/régulatrices, ont un phénotype suppresseur suggérant un mécanisme de modulation des fonctions cellulaires T pour assurer l'induction de la tolérance au VIH-1 à la muqueuse du TGF de ces femmes. Ceci est une hypothèse mais la tolérance mucosale ne fonctionne pas que de cette façon. Cette tolérance pourrait aussi être induite par le fait de rencontrer le virus régulièrement (d'une manière répétée) et ainsi accepter cet envahisseur et maintenir une niche cellulaire le repoussant dans le lumen vaginal, au même titre que les antigènes de la microbiota du TGF.

Un profil de cellules T CD8+ avec potentiel régulateur dans la muqueuse cervicale, qui ont habituellement pour fonction la suppression de l'activation de cellules T, était plus élevé chez les VIH-1 HESN et pourrait jouer un rôle essentiel dans la conduction d'un profil «tolérogénique/régulateur» à cette porte d'entrées mucosale.

Ainsi ces résultats nous permettent de suggérer que la muqueuse génitale des TS VIH-1 HESN présente un profil antiviral et à la fois « tolérogénique/régulateur» comparativement aux TS séropositives qui démontrent un profil génital mucosal pro-inflammatoire (réf. figures 11 et 12).

Tolerogenic/regulatory microenvironment in the female genital mucosa of Beninese HIV-1-uninfected CSWs

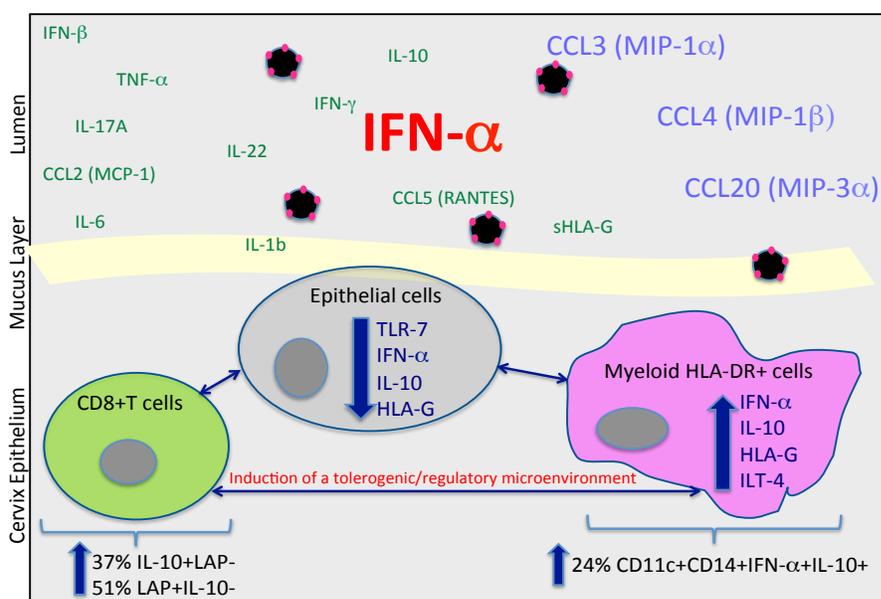


Figure 11. Représentation du microenvironnement «tolérogénique/régulateur» mucosal dans le TGF des TS VIH-1 HESN béninoises.

Tiré de : Thibodeau et al. (Characterisation of myeloid cells expressing high levels of IFN- α with a tolerogenic/regulatory phenotype in the Genital Mucosa of Highly-Exposed and HIV-1 seronegative (HESN) Beninese Female Commercial Sex Workers, en préparation).

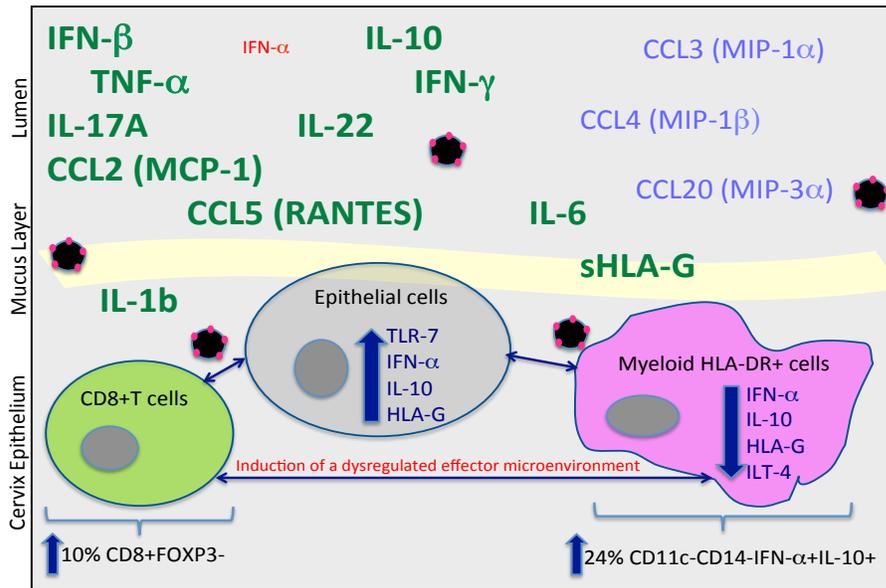


Figure 12. Représentation du microenvironnement inflammatoire mucosal dans le TGF des TS infectées par le VIH-1 béninoises.

Tiré de : Thibodeau et al. (Characterisation of myeloid cells expressing high levels of IFN- α with a tolerogenic/regulatory phenotype in the Genital Mucosa of Highly-Exposed and HIV-1 seronegative (HESN) Beninese Female Commercial Sex Workers, en préparation).

Le modèle représenté dans la figure 11 démontre la présence d'un milieu faiblement inflammatoire en étant de toute évidence efficace, reflété par une prédominance en IFN- α suggérant, vraisemblablement, la présence de facteurs de restriction antiviraux. Aussi, la présence de β -chimiokines pourrait conférer le maintien d'un certain blocage du co-récepteur CCR5 utilisé par le VIH-1 pour entrer dans les cellules cibles créant ainsi un phénomène de compétition pour le co-récepteur CCR5. Dans la muqueuse cervicale du TGF, l'induction d'un microenvironnement «tolérogénique/régulateur» est révélée par le phénotype des populations myéloïdes HLA-DR+ CD14+ CD11c+ et cellulaire T CD8+. Les CEG proposent un profil intracellulaire selon lequel l'expression des protéines étudiées est très faible par rapport au niveau d'expression de ces mêmes protéines dans les CEG des TS infectées par le VIH-1, suggérant un niveau d'activation possiblement en lien avec la tolérance des CEG. Le dialogue

intercellulaire entre les CEG, mDC et cellules T semble aboutir à l'établissement d'un milieu «tolérogénique/régulateur» maintenant l'homéostasie mucoale.

Le modèle évoqué par la figure 12 révèle la présence d'un milieu hautement inflammatoire et favorisant la réplication virale suggéré possiblement par un niveau trop bas de facteurs de restriction viraux ou bien, ces facteurs anti-viraux seraient inefficaces (très faible niveau d'IFN- α) et par des niveaux élevés en β -chimiokines entraînant la migration de cellules cibles du virus. Dans la muqueuse cervicale du TGF, au niveau intracellulaire, l'induction d'un microenvironnement effecteur dérégulé est démontré par le phénotype des populations cellulaires épithéliales, myéloïdes HLA-DR⁺ et cellulaires T CD8⁺ étudiées. Les CEG démontrent un profil intracellulaire selon lequel l'expression des protéines étudiées est très élevée par rapport au niveau d'expression de ces mêmes protéines dans les CEG des TS VIH-1 HESN, suggérant un niveau d'activation plus élevé des CEG. Le dialogue intercellulaire entre les CEG, mDC et cellules T semble être altéré, possiblement suite à l'établissement de l'infection par le VIH-1 provoquant une rupture de l'intégrité immunitaire mucoale et la perte de l'homéostasie du compartiment génital.

Les conclusions

Globalement, l'étude de la protection et/ou résistance et/ou contrôle de l'infection par le VIH-1 est d'une complexité immense et implique la compréhension de la synchronisation de plusieurs éléments ; cette étude est multiparamétrique et multifactorielle. Ceci dit, des informations exceptionnelles et précieuses ressortent de cette étude. Toutefois, connaissant les limites de faisabilité de ce projet de recherche, il est obligatoire de tirer des conclusions avec mesure et prudence.

Les résultats du projet de recherche présentés dans cette thèse supportent l'hypothèse centrale qui stipule que la résistance à l'infection par le VIH-1 chez les femmes béninoises pourrait être associée avec la capacité des cellules épithéliales et immunitaires du TGF de l'hôte à orchestrer/contrôler l'immunité du TGF à contrôler les conditions inflammatoires. De ce fait, le recrutement des cellules effectrices à la porte d'entrée mucosale génitale tout en limitant l'activation immune et préservant l'intégrité immune périphérique et centrale, est un processus qui pourrait impliquer la génétique de l'hôte et la coordination d'une réponse immunitaire puissante et efficace innée et adaptative reposant sur un concept de tolérance mucosale.

Rappelons qu'il y a un grand nombre de facteurs qui, individuellement ou en combinaison avec d'autres, pourraient fournir un certain niveau de protection contre l'infection par le VIH-1. Comme certains de ces facteurs sont incomplètement protecteurs ou ont une activité instable, les identifier avec certitude est très difficile. Cependant, clarifier et identifier l'existence de déterminants de protection contre l'infection par le VIH-1 reste une priorité d'étude qui nécessitera l'établissement de cohortes (minutieusement sélectionnée) HESN à haut risque, d'individus infectés par le VIH-1 ainsi que **plusieurs individus contrôles de la population générale**.

Dans l'ensemble, nous croyons que le microenvironnement immunitaire cervical de première ligne joue un rôle majeur dans la préservation de la résistance contre l'infection par le VIH-1. Les mDC mucosales, spécialement, pourraient représenter un type cellulaire candidat qui conserveraient des fonctions régulatrices capables de contrôler l'inflammation/activation cellulaire et pourraient contribuer à la résistance continue chez des TS HESN béninoises. Pour appuyer la notion de tolérance mucosale que nous proposons, je dois mentionner les résultats d'une étude faite grâce à des sujets TS VIH-1 HESN de Nairobi (Kenya). La conclusion de

cette étude stipule que la séroconversion tardive de femmes peut survenir même s'il y a préexistence d'une réponse CTL spécifique au VIH-1. Les auteurs rapportent que l'association entre la **séroconversion** tardive et l'**activité sexuelle réduite** et le fait que les réponses effectrices spécifiques pour le VIH-1 fluctuent dépendamment des niveaux d'exposition antigéniques suggèrent qu'une exposition régulière à l'antigène pourrait être nécessaire au maintien d'une réponse protectrice CTL (381). Ceci porte à penser que le développement d'un vaccin préventif devrait possiblement reposer sur le phénomène d'un état immunologique qui pourrait être induit suivant une stimulation antigénique adéquate à une fréquence régulière et persistante.

Le VIH-1 réussit à déjouer les mécanismes de défense de première ligne dans le cas de grand inoculum viral, de traumatismes mucosaux ou d'IST pouvant induire l'infiltration locale de cellules T activées. En conséquence, des stratégies augmentant l'efficacité des facteurs de résistance innée et induisant une «tolérance/régulation» ciblée et locale pourrait soutenir la barrière naturelle de défense à l'infection par le VIH-1 sans même se soucier des variations génotypiques individuelles. Des approches prophylactiques visant à favoriser l'efficacité du dialogue intercellulaire CEG/mDC/T à la porte d'entrée mucosale génitale qui pourra induire la différenciation des cellules T résidentes en cellules T CD4+/CD8+ régulatrices comme mécanisme de protection inné/adaptatif nécessite de plus amples investigations. Le but ultime de telles approches est de comprendre la meilleure manière pour recruter les facteurs élites innés et adaptatifs de façon à induire et maintenir un microenvironnement génital adéquat pour prévenir l'infection avant que le VIH-1 atteigne son but ultime de se disséminer et d'activer et de dépléter les cellules T. Une fois l'infection établie dans les nodules mésentériques et dans les autres organes lymphoïdes secondaires, durant l'infection aiguë, il est possiblement déjà trop tard pour intercéder avec des mécanismes de résistance médiés par l'immunité innée et adaptative critique au site d'exposition mucosal.

La compréhension de l'immunorégulation mucosal dans le TGF d'individus naturellement considérés résistants à l'infection par le VIH-1 a des implications fondamentales dans le développement d'interventions préventives qui moduleraient les conditions inflammatoires préexistantes pour établir une défense de première ligne rapide et durable contre le VIH-1.

Les limites de l'étude

1) La section de cette étude dans laquelle les cytokines/chimiokines sont analysées, dans le milieu extra-cellulaire (LCV), présente une limite car il est impossible, avec certitude, d'affirmer que les LCV des TS sont exempts de liquide séminal. Il aurait fallu soit quantifier la PSA (antigène prostatique spécifique) ou bien procéder à l'identification du gène SRY (*Sex determining Region Y*) par PCR, dans les échantillons. Ceci n'a pas pu être complété par manque de quantité de LCV.

2) Il est important de mentionner que puisqu'avec un tube de prélèvement de cytobrosse on obtient qu'un nombre restreint de cellules épithéliales et immunitaires viables après décongélation et que ces cellules vaginales humaines sont fragiles et il est très difficile de les analyser en cytométrie de flux après une congélation. Il est certain que pour répondre aux questions concernant les perspectives 4 et 7 (plus bas), il serait intéressant d'avoir accès à des biopsies génitales de femmes ou bien de tenter de mettre les cellules des femmes en culture pour pouvoir effectuer les analyses cytométriques et génétiques appropriées.

★ La difficulté d'obtenir de tels échantillons, le faible nombre cellulaire et la fragilité de ces cellules ne sont que quelques uns des facteurs qui démontrent le haut niveau de difficulté de l'étude présentée dans cette thèse (autant au niveau cellulaire protéique que transcriptionnel).

3) Finalement, une des faiblesses de la présente étude est l'impossibilité de déterminer si les facteurs observés chez les TS VIH-1 infectées sont l'effet ou la cause de la présence du VIH car nous ne connaissons pas la date d'infection des femmes. Pour répondre à cette question, une étude longitudinale ayant comme sujets des femmes TS VIH-1 HESN, avant séroconversion et après séroconversion, apporterait des informations précieuses sur l'environnement immunitaire vaginal à différents temps avant l'infection et suivant l'infection et donnerait des indications permettant de déterminer si ces facteurs (IFN- α , IL-10, HLA-G et autres cytokines/chimiokines) sont le résultat de la présence du VIH ou s'ils ont un impact sur

la tolérance/susceptibilité à l'infection. Il serait aussi pertinent et intéressant de pouvoir suivre des femmes TS non-infectées en début de travail du sexe pour déterminer l'impact de ce travail sur l'environnement inflammatoire génital des femmes.

Les perspectives reliées à l'étude

- i) Dans un premier temps, je propose l'étude des cellules du col utérin (CEG, DC et T avec les mêmes marqueurs utilisés dans le groupe TS VIH-1 non-infectées HESN et TS VIH-1 infectées) d'un groupe de femmes **contrôles** non TS VIH-1 non-infectées de la population générale béninoise afin de compléter l'étude présente en comparant le groupe contrôle au 2 autres groupes déjà étudiés. Suite à l'analyse d'un groupe contrôle, il sera possible de déterminer si les TS du group VIH-1 HESN possèdent des facteurs propres de résistance/protection à l'infection (phénotypes cellulaires différents de ceux du groupe contrôle) ou si ces femmes ont la capacité d'immunoréguler leur microenvironnement cervical pour conserver une homéostasie, une tolérance à l'antigène (phénotypes cellulaires similaires à ceux du groupe contrôle). Il serait aussi intéressant d'analyser les mêmes caractéristiques cellulaires avec des échantillons de LCV et de cellules de la cytobrosse de TS VIH-1 HESN ayant **7 ans et plus de prostitution active** pour pouvoir comparer les résultats avec le groupe 4 à 7 ans étudié dans la présente thèse. L'évolution phénotypique tolérogénique/régulateur cellulaire cervicale pourrait être évaluée, à savoir s'il y a une modulation différente dans le temps.
- ii) Ensuite, je propose d'effectuer des **études fonctionnelles** afin de confirmer et d'approfondir l'existence de paramètres et mécanismes potentiels de résistance énoncés dans cette thèse. Par exemple, l'existence d'une boucle de rétro-suppression à l'aide de cellulaires fraîches cervicales de femmes d'ici. Cette perspective au projet a été entamée en utilisant une lignée cellulaire (C33A provenant du laboratoire du Dr Jacques Archambault, IRCM). Une stimulation de TLR-7/8 avec un composé d'imidazoquinoline (In Vivogen) et de TLR-9 avec des oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG (In Vivogen) a été effectuée. Cette stimulation a été suivie d'un marquage phosflow (BD). Je n'ai pas donné

suite à cette expérience car je me suis aperçue que l'utilisation de cellules immortalisées (C33A) pour vérifier la phosphorylation (activation) de protéines n'était pas la bonne idée, c'est pourquoi je referais cette expérience à l'aide de cellules primaires fraîches.

- a. Dans un premier temps, il faudrait mettre les cellules de la cytobrosse en culture.
 - b. Ensuite, pour étudier l'impact de la composition cytokinique/chimiokinique (inflammatoire/régulatrice) sur l'activité cellulaire, il faudrait recréer le milieu extracellulaire observé chez les TS VIH-1 HESN (IFN- α et MIP-1 α et β ; peut-être en utilisant des LCV de ces femmes) et y ajouter des ligands des TLR endosomaux et de RIG-I et évaluer l'activité de voies de signalisation cellulaire menant à l'induction de l'IFN- α . Par exemple en observant la phosphorylation intracellulaire des partenaires comme IRAK1, IRF3, IRF7 (dépendamment de la voie d'étude choisie) dans les différentes populations cellulaires (CEG, mDC, cellules T CD8+) retrouvées dans le présent projet.
 - c. En troisième lieu, pour étudier l'impact du VIH-1 sur l'activité cellulaire, il faudrait ajouter, dans le milieu cellulaire, le virus (VIH-1) et évaluer l'activité cellulaire en observant la phosphorylation des partenaires de signalisation de la voie choisie, par exemple IRAK1, IRF3, IRF7 dans les différentes populations cellulaires (CEG, mDC, cellules T CD4+ et T CD8+).
- iii) Pour continuer avec des études fonctionnelles, afin de supporter l'affirmation que les femmes HESN de notre étude sont exposées et répondent au virus :
- a. Dans un premier volet, il faudrait démontrer la présence d'IgA et d'IgG dans le sérum et LCV des femmes HESN à l'aide d'immunoessais.
 - b. Dans un deuxième volet, il faudrait caractériser cette réponse IgA/IgG dans un système in vitro pour vérifier leurs fonctions de neutralisation, d'ADCC et d'inhibition de la transcytose.

- iv) Dans l'optique où il serait possible d'obtenir des échantillons de biopsies des femmes béninoises (TS HESN et infectées par le VIH), ce qui augmenterait grandement le nombre de cellules disponibles et ainsi pouvoir effectuer une analyse microarray (HTA) utilisant une assez grande quantité d'ARNm extrait de CEG, DC, cellules T et B.
 - a. Pour ce faire, il faudrait digérer les tissus à l'aide d'enzymes cytolitiques, purifier la solution cellulaire, trier les CEG, mDC et les cellules T CD4+ et T CD8+, extraire l'ARNm de chaque population cellulaire.
 - b. Procéder à l'envoi de l'ARNm à Génome Québec (M. Daniel Vincent) pour effectuer l'analyse HTA. Suite à l'analyse des résultats du HTA, l'étude de gènes ciblés, par qPCR, nous donnerait les informations convoitées par rapport aux facteurs génétiques impliqués dans la résistance/susceptibilité à l'infection par le VIH-1, par exemple l'étude de facteurs de restriction engendrés par IFN- α , IFN- ϵ et IFN- λ par qPCR.
- v) Effectuer une recherche exhaustive de polymorphismes génétiques (ADN génomique) qui pourraient être impliqués dans le résistance/susceptibilité à l'infection par le VIH-1 par séquençage. Je proposerais d'étudier dans un premier temps, les gènes de partenaires de signalisation menant à l'induction des IFN de type I (IFN- α , IFN- β et IFN- λ) tels que certains PRR (RIG-I, c-Gas et TLR), STING, IPS-1, TBK, TRAF3, Myd88, TRIF, IRAK4, IRAK1, TRAF6, IRF-3, IRF-7 et les IFN type I. Ensuite, les récepteurs des IFN type I, les intermédiaires de signalisation de la voie Jak Stat menant à l'induction des ISG et les ISG (MxA, OAS-1, APOBEC-3G, TRIM5/22, SAMHD1, BST-2, etc.) (Réf. Annexe7).
- vi) Déterminer la composition du microbiome vaginal des femmes TS VIH-1 non-infectées HESN, TS VIH-1 infectées et non TS de la population générale béninoises. Il serait très intéressant de caractériser la flore vaginale des femmes de l'étude mucosale puisqu'il est certain que l'environnement microbiologique génital à un impact majeur sur l'immunité innée et adaptative en place dans le TGF. Des écouvillons vaginaux pourraient être prélevés et l'ADN extrait à l'aide d'une

trousse QIAMP DNA stool mini kit (QIAGEN). Ensuite, une amplification (PCR) de l'ADN extrait pourrait être effectuée en vue du séquençage de prochaine génération de la microbiota qui serait fait par Génome Québec.

- vii) Étudier la possibilité de l'établissement de réservoirs mucosaux en détectant l'intégration d'ADN pro-viral dans les cellules épithéliales et myéloïdes mucoale des femmes TS HESN et infectées par le VIH-1 en utilisant un qPCR ultrasensible détectant un gène du VIH conservé comme par exemple *Gag* de plusieurs clades viraux (447). Dans cette étude, il sera aussi nécessaire de confirmer la nature féminine des cellules analysées en utilisant la détection du gène SRY (*Sex determining Region Y*) simultanément (ce projet est en cours).

Bibliographie

1. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2011;1(1):a006841.
2. UNAIDS, «Report on the global AIDS epidemic 2013» (unaids_global_report_2013_en.pdf).
3. CDC, MMWR HIV Surveillance 1981-2008 60, 689 (2011).
4. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.
5. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6588-92.
6. Pepin J. The expansion of HIV-1 in colonial Leopoldville, 1950s: driven by STDs or STD control? *Sexually transmitted infections*. 2012;88(4):307-12.
7. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 2014;346(6205):56-61.
8. Lajoie J, Massinga Loembe M, Poudrier J, Guedou F, Pepin J, Labbe AC, et al. Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. *Human immunology*. 2010;71(2):182-5.
9. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
10. Goulder PJ, Watkins DI. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):630-40.
11. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of virology*. 2011;85(3):1403-7.
12. Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science*. 2006;313(5786):462-6.
13. Ortiz M, Guex N, Patin E, Martin O, Xenarios I, Ciuffi A, et al. Evolutionary trajectories of primate genes involved in HIV pathogenesis. *Molecular biology and evolution*. 2009;26(12):2865-75.

14. Kajaste-Rudnitski A, Pultrone C, Marzetta F, Ghezzi S, Coradin T, Vicenzi E. Restriction factors of retroviral replication: the example of Tripartite Motif (TRIM) protein 5 alpha and 22. *Amino acids*. 2010;39(1):1-9.
15. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002;418(6898):646-50.
16. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 2004;427(6977):848-53.
17. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451(7177):425-30.
18. Kirchhoff F. Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell host & microbe*. 2010;8(1):55-67.
19. Malim MH, Bieniasz PD. HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(5):a006940.
20. Mous K, Jennes W, Camara M, Seydi M, Daneau G, Mboup S, et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. *PloS one*. 2012;7(3):e33934.
21. Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, et al. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(50):35060-72.
22. Pham QT, Bouchard A, Grutter MG, Berthoux L. Generation of human TRIM5alpha mutants with high HIV-1 restriction activity. *Gene therapy*. 2010;17(7):859-71.
23. Schellenberg JJ, Plummer FA. The Microbiological Context of HIV Resistance: Vaginal Microbiota and Mucosal Inflammation at the Viral Point of Entry. *International journal of inflammation*. 2012;2012:131243.
24. Tomescu C, Abdulhaqq S, Montaner LJ. Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN). *Clinical and experimental immunology*. 2011;164(2):158-69.
25. Sironi M, Biasin M, Cagliani R, Forni D, De Luca M, Saulle I, et al. A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *Journal of immunology*. 2012;188(2):818-23.
26. O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nature genetics*. 2004;36(6):565-74.

27. Bartha I, Carlson JM, Brumme CJ, McLaren PJ, Brumme ZL, John M, et al. A genome-to-genome analysis of associations between human genetic variation, HIV-1 sequence diversity, and viral control. *eLife*. 2013;2:e01123.
28. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:1-25.
29. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *The EMBO journal*. 2003;22(7):1707-15.
30. Zolla-Pazner S, Cardozo T. Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):527-35.
31. Solbak SM, Reksten TR, Hahn F, Wray V, Henklein P, Henklein P, et al. HIV-1 p6 - a structured to flexible multifunctional membrane-interacting protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1828(2):816-23.
32. Fiorentini S, Marini E, Caracciolo S, Caruso A. Functions of the HIV-1 matrix protein p17. *The new microbiologica*. 2006;29(1):1-10.
33. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(4):279-90.
34. Brigati C, Giacca M, Noonan DM, Albini A. HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS microbiology letters*. 2003;220(1):57-65.
35. Cullen BR. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(10):2361-8.
36. da Costa KS, Leal E, dos Santos AM, Lima e Lima AH, Alves CN, Lameira J. Structural analysis of viral infectivity factor of HIV type 1 and its interaction with A3G, EloC and EloB. *PloS one*. 2014;9(2):e89116.
37. Li G, Bukrinsky M, Zhao RY. HIV-1 viral protein R (Vpr) and its interactions with host cell. *Current HIV research*. 2009;7(2):178-83.
38. Landi A, Iannucci V, Nuffel AV, Meuwissen P, Verhasselt B. One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef. *Current HIV research*. 2011;9(7):496-504.
39. Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annual review of genetics*. 1999;33:133-70.
40. Kim B, Nguyen LA, Daddacha W, Hollenbaugh JA. Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human

primary monocyte-derived macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(26):21570-4.

41. Swanstrom R, Wills JW. Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.

42. Tremblay MJ, Fortin JF, Cantin R. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology today*. 1998;19(8):346-51.

43. Cantin R, Methot S, Tremblay MJ. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *Journal of virology*. 2005;79(11):6577-87.

44. Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, Wietgreffe S, Guadagnini S, Prevost MC, et al. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *Journal of virology*. 2009;83(12):6234-46.

45. Mammano FL, B. Évolution du tropisme des populations virales dans l'histoire naturelle de l'infection par le VIH. *Virologie*. 2007;11:95-106.

46. Lakomek NA, Kaufman JD, Stahl SJ, Wingfield PT. HIV-1 Envelope Protein gp41: An NMR Study of Dodecyl Phosphocholine Embedded gp41 Reveals a Dynamic Prefusion Intermediate Conformation. *Structure*. 2014.

47. Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, et al. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(5):2670-5.

48. Ji J, Sahu GK, Braciale VL, Cloyd MW. HIV-1 induces IL-10 production in human monocytes via a CD4-independent pathway. *International immunology*. 2005;17(6):729-36.

49. Alfsen A, Yu H, Magerus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(9):4267-79.

50. Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(6):447-57.

51. Bobardt MD, Chatterji U, Selvarajah S, Van der Schueren B, David G, Kahn B, et al. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. *Journal of virology*. 2007;81(1):395-405.

52. Fontenot D, He H, Hanabuchi S, Nehete PN, Zhang M, Chang M, et al. TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(39):16776-81.

53. Micsenyi AM, Zony C, Alvarez RA, Durham ND, Chen BK, Klotman ME. Postintegration HIV-1 infection of cervical epithelial cells mediates contact-dependent productive infection of T cells. *The Journal of infectious diseases*. 2013;208(11):1756-67.
54. Tang Y, George A, Nouvet F, Sweet S, Emeagwali N, Taylor HE, et al. Infection of female primary lower genital tract epithelial cells after natural pseudotyping of HIV-1: possible implications for sexual transmission of HIV-1. *PloS one*. 2014;9(7):e101367.
55. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *International immunology*. 2005;17(11):1367-78.
56. Demirkhanyan LH, Marin M, Padilla-Parra S, Zhan C, Miyauchi K, Jean-Baptiste M, et al. Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human alpha-defensin. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(34):28821-38.
57. Schaeffer E, Soros VB, Greene WC. Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *Journal of virology*. 2004;78(3):1375-83.
58. Harouse JM, Collman RG, Gonzalez-Scarano F. Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosyl ceramide-positive cell line. *Journal of virology*. 1995;69(12):7383-90.
59. Fortin JF, Cantin R, Tremblay MJ. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *Journal of virology*. 1998;72(3):2105-12.
60. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *Journal of virology*. 1997;71(5):3588-96.
61. Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology*. 2002;3(10):975-83.
62. Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, 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. *The Journal of experimental medicine*. 2001;193(6):671-8.
63. Fanibunda SE, Modi DN, Gokral JS, Bandivdekar AH. HIV gp120 binds to mannose receptor on vaginal epithelial cells and induces production of matrix metalloproteinases. *PloS one*. 2011;6(11):e28014.
64. Stoddard E, Cannon G, Ni H, Kariko K, Capodici J, Malamud D, et al. gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3126-32.

65. Cicala C, Arthos J, Fauci AS. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of translational medicine*. 2011;9 Suppl 1:S2.
66. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100(5):587-97.
67. Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B, Zhang Z, et al. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity*. 2003;18(1):27-39.
68. Singh R, Patel V, Mureithi MW, Naranbhai V, Ramsuran D, Tulsi S, et al. TRIM5alpha and TRIM22 are differentially regulated according to HIV-1 infection phase and compartment. *Journal of virology*. 2014;88(8):4291-303.
69. Yan N, Regalado-Magdos AD, Stigzelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nature immunology*. 2010;11(11):1005-13.
70. Esposito F, Corona A, Tramontano E. HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Molecular biology international*. 2012;2012:586401.
71. Mous K, Jennes W, De Roo A, Pintelon I, Kestens L, Van Ostade X. Intracellular detection of differential APOBEC3G, TRIM5alpha, and LEDGF/p75 protein expression in peripheral blood by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2011;372(1-2):52-64.
72. Krishnan L, Engelman A. Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(49):40858-66.
73. Freed EO MM. HIVs and their replication. 5th Edition Lippincott Williams & Wilkins ed2006.
74. Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends in microbiology*. 2010;18(9):388-96.
75. Kotler DP, Reka S, Clayton F. Intestinal mucosal inflammation associated with human immunodeficiency virus infection. *Digestive diseases and sciences*. 1993;38(6):1119-27.
76. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(6):761-70.

77. Shacklett BL, Cox CA, Sandberg JK, Stollman NH, Jacobson MA, Nixon DF. Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection. *Journal of virology*. 2003;77(10):5621-31.
78. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, et al. Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(10):1299-314.
79. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal immunology*. 2008;1(1):23-30.
80. Estes J, Baker JV, Brenchley JM, Khoruts A, Barthold JL, Bantle A, et al. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *The Journal of infectious diseases*. 2008;198(4):456-64.
81. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(9):655-66.
82. Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ, Reilly C, Pambuccian SE, Taylor J, et al. Lymphatic tissue fibrosis is associated with reduced numbers of naive CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2006;13(5):556-60.
83. Dion ML, Poulin JF, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity*. 2004;21(6):757-68.
84. Paiardini M, Muller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunological reviews*. 2013;254(1):78-101.
85. Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal immunology*. 2012;5(4):354-66.
86. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(11):859-68.
87. Mehraj V, Jenabian MA, Vyboh K, Routy JP. Immune Suppression by Myeloid Cells in HIV Infection: New Targets for Immunotherapy. *The open AIDS journal*. 2014;8:66-78.
88. McKinnon LR, Nyanga B, Chege D, Izulla P, Kimani M, Huibner S, et al. Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *Journal of immunology*. 2011;187(11):6032-42.
89. Moir S, Chun TW, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology*. 2011;6:223-48.

90. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine*. 2006;12(3):289-95.
91. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(4):235-45.
92. Shirai A, Cosentino M, Leitman-Klinman SF, Klinman DM. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *The Journal of clinical investigation*. 1992;89(2):561-6.
93. Malaspina A, Moir S, Orsega SM, Vasquez J, Miller NJ, Donoghue ET, et al. Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(9):1442-50.
94. Daniel V, Susal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, et al. Sequential occurrence of IgM, IgM/IgG, and gp120-IgM/IgG complement complexes on CD4+ lymphocytes in relation to CD4+ blood lymphocyte depletion in HIV+ hemophilia patients: results of a 10-year study. *Immunology letters*. 1995;47(1-2):97-102.
95. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. HIV and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2002;1(6):329-37.
96. Ho J, Moir S, Malaspina A, Howell ML, Wang W, DiPoto AC, et al. Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(51):19436-41.
97. Hart M, Steel A, Clark SA, Moyle G, Nelson M, Henderson DC, et al. Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *Journal of immunology*. 2007;178(12):8212-20.
98. Chagnon-Choquet J, Fontaine J, Poudrier J, Roger M, Montreal Primary HIVISG, Slow Progressor Study G. IL-10 and lymphotoxin-alpha expression profiles within marginal zone-like B-cell populations are associated with control of HIV-1 disease progression. *PloS one*. 2014;9(7):e101949.
99. Poudrier J, Thibodeau V, Roger M. Natural Immunity to HIV: a delicate balance between strength and control. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:875821.
100. Fontaine J, Coutlee F, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, Roger M, et al. HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(7):1007-18.

101. Liu J, Zhan W, Kim CJ, Clayton K, Zhao H, Lee E, et al. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PloS one*. 2014;9(2):e89236.
102. Poropatich K, Sullivan DJ, Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *The Journal of general virology*. 2011;92(Pt 2):247-68.
103. Zeng M, Southern PJ, Reilly CS, Beilman GJ, Chipman JG, Schacker TW, et al. Lymphoid tissue damage in HIV-1 infection depletes naive T cells and limits T cell reconstitution after antiretroviral therapy. *PLoS pathogens*. 2012;8(1):e1002437.
104. Sanchez JL, Hunt PW, Reilly CS, Hatano H, Beilman GJ, Khoruts A, et al. Lymphoid Fibrosis Occurs in Long-Term Nonprogressors and Persists With Antiretroviral Therapy but May Be Reversible With Curative Interventions. *The Journal of infectious diseases*. 2014.
105. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(6):749-59.
106. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 2005;79(14):9217-27.
107. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annual review of medicine*. 2011;62:127-39.
108. Dalmau J, Rotger M, Erkizia I, Rauch A, Reche P, Pino M, et al. Highly pathogenic adapted HIV-1 strains limit host immunity and dictate rapid disease progression. *Aids*. 2014;28(9):1261-72.
109. Gurdasani D, Iles L, Dillon DG, Young EH, Olson AD, Naranbhai V, et al. A systematic review of definitions of extreme phenotypes of HIV control and progression. *Aids*. 2014;28(2):149-62.
110. Kumar P. Long term non-progressor (LTNP) HIV infection. *The Indian journal of medical research*. 2013;138(3):291-3.
111. Buchbinder SP, Katz MH, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids*. 1994;8(8):1123-8.
112. Novembre J, Galvani AP, Slatkin M. The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele. *PLoS biology*. 2005;3(11):e339.
113. Pernas M, Casado C, Arcones C, Llano A, Sanchez-Merino V, Mothe B, et al. Low-replicating viruses and strong anti-viral immune response associated with prolonged disease control in a superinfected HIV-1 LTNP elite controller. *PloS one*. 2012;7(2):e31928.

114. Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, Mummidi S, Geevarghese R, Catano G, et al. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5199-204.
115. Kanya P, Boulet S, Tsoukas CM, Routy JP, Thomas R, Cote P, et al. Receptor-ligand requirements for increased NK cell polyfunctional potential in slow progressors infected with HIV-1 coexpressing KIR3DL1*h/*y and HLA-B*57. *Journal of virology*. 2011;85(12):5949-60.
116. al. DdUe. Progression of HIV to AIDS: a Protective Role for HLA-B27? *AIDS reviews*. 2004(6):89-96.
117. Lamine A, Caumont-Sarcos A, Chaix ML, Saez-Cirion A, Rouzioux C, Delfraissy JF, et al. Replication-competent HIV strains infect HIV controllers despite undetectable viremia (ANRS EP36 study). *Aids*. 2007;21(8):1043-5.
118. Walker BD, Yu XG. Unravelling the mechanisms of durable control of HIV-1. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(7):487-98.
119. Card CM, Keynan Y, Lajoie J, Bell CP, Dawood M, Becker M, et al. HIV controllers are distinguished by chemokine expression profile and HIV-specific T-cell proliferative potential. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2012;59(5):427-37.
120. Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, Hunt PW, et al. Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *Journal of virology*. 2009;83(1):329-35.
121. Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, et al. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *Aids*. 2010;24(8):1095-105.
122. Saez-Cirion A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, Urrutia A, Boufassa F, et al. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(16):6776-81.
123. Poudrier J, Roger M. Dendritic cell status modulates the outcome of HIV-related B cell disease progression. *PLoS pathogens*. 2011;7(8):e1002154.
124. Poudrier J, Chagnon-Choquet J, Roger M. Influence of dendritic cells on B-cell responses during HIV infection. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:592187.
125. Kelker HC, Seidlin M, Vogler M, Valentine FT. Lymphocytes from some long-term seronegative heterosexual partners of HIV-infected individuals proliferate in response to HIV antigens. *AIDS research and human retroviruses*. 1992;8(8):1355-9.

126. Thibodeau V, Lajoie J, Labbe AC, Zannou MD, Fowke KR, Alary M, et al. High level of soluble HLA-G in the female genital tract of Beninese commercial sex workers is associated with HIV-1 infection. *PloS one*. 2011;6(9):e25185.
127. Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ, Roger M. Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *Aids*. 2004;18(3):427-31.
128. Lajoie J, Juno J, Burgener A, Rahman S, Mogk K, Wachihi C, et al. A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal immunology*. 2012;5(3):277-87.
129. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, et al. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*. 1996;348(9038):1347-51.
130. Cheynier R, Langlade-Demoyen P, Marescot MR, Blanche S, Blondin G, Wain-Hobson S, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *European journal of immunology*. 1992;22(9):2211-7.
131. Liovat AS, Jacquelin B, Ploquin MJ, Barre-Sinoussi F, Muller-Trutwin MC. African non human primates infected by SIV - why don't they get sick? Lessons from studies on the early phase of non-pathogenic SIV infection. *Current HIV research*. 2009;7(1):39-50.
132. Mirmonsef P, Gilbert D, Veazey RS, Wang J, Kendrick SR, Spear GT. A comparison of lower genital tract glycogen and lactic acid levels in women and macaques: implications for HIV and SIV susceptibility. *AIDS research and human retroviruses*. 2012;28(1):76-81.
133. Paiardini M, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annual review of medicine*. 2009;60:485-95.
134. Chahroudi A, Bosinger SE, Vanderford TH, Paiardini M, Silvestri G. Natural SIV hosts: showing AIDS the door. *Science*. 2012;335(6073):1188-93.
135. Pandrea I, Sodora DL, Silvestri G, Apetrei C. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends in immunology*. 2008;29(9):419-28.
136. Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, Brenchley JM, Butler IF, Pattison M, et al. Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3035-46.
137. Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, Brenchley JM, Milush JM, Engram JC, et al. Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3026-34.

138. Bosinger SE, Li Q, Gordon SN, Klatt NR, Duan L, Xu L, et al. Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3556-72.
139. Jacquelin B, Mayau V, Targat B, Liovat AS, Kunkel D, Petitjean G, et al. Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3544-55.
140. Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, Kozyr N, Chavan R, Klucking S, et al. Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nature medicine*. 2008;14(10):1077-87.
141. Kelley CF, Kitchen CM, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, et al. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48(6):787-94.
142. Organization WH. Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents. Recommendations for a public health approach. Geneva: World Health Organization; 2006. 2006.
143. Anglemyer A, Rutherford GW, Easterbrook PJ, Horvath T, Vitoria M, Jan M, et al. Early initiation of antiretroviral therapy in HIV-infected adults and adolescents: a systematic review. *Aids*. 2014;28 Suppl 2:S105-18.
144. Wright K. AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature*. 1986;323(6086):283.
145. Jeffries DJ. Zidovudine resistant HIV. *Bmj*. 1989;298(6681):1132-3.
146. Brenner B, Wainberg MA, Roger M. Phylogenetic inferences on HIV-1 transmission: implications for the design of prevention and treatment interventions. *Aids*. 2013;27(7):1045-57.
147. Bhargava M, Cajas JM, Wainberg MA, Klein MB, Pant Pai N. Do HIV-1 non-B subtypes differentially impact resistance mutations and clinical disease progression in treated populations? Evidence from a systematic review. *Journal of the International AIDS Society*. 2014;17:18944.
148. Mesplede T, Osman N, Wares M, Quashie PK, Hassounah S, Anstett K, et al. Addition of E138K to R263K in HIV integrase increases resistance to dolutegravir, but fails to restore activity of the HIV integrase enzyme and viral replication capacity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014.
149. Xu HT, Colby-Germinario SP, Oliveira M, Rajotte D, Bethell R, Wainberg MA. Effects of the W153L Substitution in HIV Reverse Transcriptase on Viral Replication and

Drug Resistance to Multiple Categories of Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(8):4515-26.

150. Oliveira M, Mesplede T, Quashie PK, Moisi D, Wainberg MA. Resistance mutations against dolutegravir in HIV integrase impair the emergence of resistance against reverse transcriptase inhibitors. *Aids*. 2014;28(6):813-9.

151. Adolescents GftUoAAiH-IAa. US Department of Health and Human Services 5/1/2014. 2014.

152. Das K, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Current opinion in virology*. 2013;3(2):111-8.

153. Rathbun RC, Lockhart SM, Miller MM, Liedtke MD. Dolutegravir, a second-generation integrase inhibitor for the treatment of HIV-1 infection. *The Annals of pharmacotherapy*. 2014;48(3):395-403.

154. Wensing AM, van Maarseveen NM, Nijhuis M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral research*. 2010;85(1):59-74.

155. Mkhize NN, Gumbi PP, Liebenberg LJ, Ren Y, Smith P, Denny L, et al. Persistence of genital tract T cell responses in HIV-infected women on highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology*. 2010;84(20):10765-72.

156. Chun TW, Fauci AS. HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *Aids*. 2012;26(10):1261-8.

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

158. Piconi S, Parisotto S, Rizzardini G, Passerini S, Terzi R, Argentero B, et al. Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected, antiretroviral therapy-treated immunologic nonresponders. *Blood*. 2011;118(12):3263-72.

159. Petit NY, Dorgham K, Bault B, Burlion A, Gorochov G, Marodon G. Targeting both viral and host determinants of HIV entry using a new lentiviral vector co-expressing the T20 fusion inhibitor and a selective CCL5 intrakine. *Human gene therapy methods*. 2014.

160. Swartz TH, Esposito AM, Durham ND, Hartmann B, Chen BK. P2X-selective purinergic antagonists are strong inhibitors of HIV-1 fusion during both cell-to-cell and cell-free infection. *Journal of virology*. 2014.

161. Dow DE, Bartlett JA. Dolutegravir, the Second-Generation of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTIs) for the Treatment of HIV. *Infectious diseases and therapy*. 2014.

162. Quashie PK, Sloan RD, Wainberg MA. Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC medicine*. 2012;10:34.
163. Wainberg MA. The Need for Development of New HIV-1 Reverse Transcriptase and Integrase Inhibitors in the Aftermath of Antiviral Drug Resistance. *Scientifica*. 2012;2012:238278.
164. Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends in microbiology*. 2013;21(6):277-85.
165. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, de Ruiter A, Lyall H, Tookey PA. Low rates of mother-to-child transmission of HIV following effective pregnancy interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000-2006. *Aids*. 2008;22(8):973-81.
166. Jackson JB, Musoke P, Fleming T, Guay LA, Bagenda D, Allen M, et al. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: 18-month follow-up of the HIVNET 012 randomised trial. *Lancet*. 2003;362(9387):859-68.
167. Kourtis AP, Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV: pathogenesis, mechanisms and pathways. *Clinics in perinatology*. 2010;37(4):721-37, vii.
168. Baggaley RF, Boily MC, White RG, Alary M. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. *Aids*. 2006;20(6):805-12.
169. Routy JP, Vanhems P, Rouleau D, Tsoukas C, Lefebvre E, Cote P, et al. Comparison of Clinical Features of Acute HIV-1 Infection in Patients Infected Sexually or Through Injection Drug Use. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2000;24(4):425-32.
170. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(11).
171. Liu CM, Osborne BJ, Hungate BA, Shahabi K, Huibner S, Lester R, et al. The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. *PLoS pathogens*. 2014;10(7):e1004262.
172. O'Byrne P, MacPherson PA. Understanding HIV viral load: implications for counselling. *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique*. 2008;99(3):189-91.
173. Zuckerman RA, Whittington WL, Celum CL, Collis TK, Lucchetti AJ, Sanchez JL, et al. Higher concentration of HIV RNA in rectal mucosa secretions than in blood and seminal plasma, among men who have sex with men, independent of antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2004;190(1):156-61.

174. Gray RH, Li X, Kigozi G, Serwadda D, Nalugoda F, Watya S, et al. The impact of male circumcision on HIV incidence and cost per infection prevented: a stochastic simulation model from Rakai, Uganda. *Aids*. 2007;21(7):845-50.
175. Prodger JL, Hirbod T, Kigozi G, Nalugoda F, Reynolds SJ, Galiwango R, et al. Immune correlates of HIV exposure without infection in foreskins of men from Rakai, Uganda. *Mucosal immunology*. 2013.
176. Quinn TC. Circumcision and HIV transmission. *Current opinion in infectious diseases*. 2007;20(1):33-8.
177. Roberts L, Liebenberg L, Barnabas S, Passmore JA. Vaginal microbicides to prevent human immunodeficiency virus infection in women: perspectives on the female genital tract, sexual maturity and mucosal inflammation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2012;26(4):441-9.
178. Barnabas RV, Wasserheit JN, Huang Y, Janes H, Morrow R, Fuchs J, et al. Impact of herpes simplex virus type 2 on HIV-1 acquisition and progression in an HIV vaccine trial (the Step study). *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2011;57(3):238-44.
179. Powers KA, Poole C, Pettifor AE, Cohen MS. Rethinking the heterosexual infectivity of HIV-1: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2008;8(9):553-63.
180. Miller WC, Rosenberg NE, Rutstein SE, Powers KA. Role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(4):277-82.
181. El-Sadr WM, Mayer KH, Adimora AA. The HIV epidemic in the United States: a time for action. Introduction. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2010;55 Suppl 2:S63.
182. Data Collection on Adverse Events of Anti HIVDSG, Weber R, Sabin C, Reiss P, de Wit S, Worm SW, et al. HBV or HCV coinfections and risk of myocardial infarction in HIV-infected individuals: the D:A:D Cohort Study. *Antiviral therapy*. 2010;15(8):1077-86.
183. Carter RJ, Dugan K, El-Sadr WM, Myer L, Otieno J, Pungpapong N, et al. CD4+ cell count testing more effective than HIV disease clinical staging in identifying pregnant and postpartum women eligible for antiretroviral therapy in resource-limited settings. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2010;55(3):404-10.
184. Howard AA, El-Sadr WM. Integration of tuberculosis and HIV services in sub-Saharan Africa: lessons learned. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50 Suppl 3:S238-44.
185. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary

HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(21):7552-7.

186. Abrahams MR, Anderson JA, Giorgi EE, Seoighe C, Mlisana K, Ping LH, et al. Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *Journal of virology*. 2009;83(8):3556-67.

187. Quinn TC, Brookmeyer R, Kline R, Shepherd M, Paranjape R, Mehendale S, et al. Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence. *Aids*. 2000;14(17):2751-7.

188. Erbeding EJ, Stanton D, Quinn TC, Rompalo A. Behavioral and biologic evidence of persistent high-risk behavior in an HIV primary care population. *Aids*. 2000;14(3):297-301.

189. Fideli US, Allen SA, Musonda R, Trask S, Hahn BH, Weiss H, et al. Virologic and immunologic determinants of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Africa. *AIDS research and human retroviruses*. 2001;17(10):901-10.

190. Mujugira A, Baeten JM, Donnell D, Ndase P, Mugo NR, Barnes L, et al. Characteristics of HIV-1 serodiscordant couples enrolled in a clinical trial of antiretroviral pre-exposure prophylaxis for HIV-1 prevention. *PloS one*. 2011;6(10):e25828.

191. Marieb EN. *Anatomie et Physiologie humaine troisième édition*: Éditions du nouveau pédagogique Inc.; 2005 2005.

192. Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biology of reproduction*. 2005;73(6):1253-63.

193. Li Q, Estes JD, Schlievert PM, Duan L, Brosnahan AJ, Southern PJ, et al. Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature*. 2009;458(7241):1034-8.

194. Keller MJ, Guzman E, Hazrati E, Kasowitz A, Cheshenko N, Wallenstein S, et al. PRO 2000 elicits a decline in genital tract immune mediators without compromising intrinsic antimicrobial activity. *Aids*. 2007;21(4):467-76.

195. Janeway's. *Immunobiology*, 8th edition. 2012.

196. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *American journal of reproductive immunology*. 2010;63(6):544-65.

197. Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(1):43-9.

198. Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, Smith JM, Shen L, Wira CR, et al. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clinical immunology*. 2007;124(1):69-76.
199. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(2):185-94.
200. Kelly KA, Walker JC, Jameel SH, Gray HL, Rank RG. Differential regulation of CD4 lymphocyte recruitment between the upper and lower regions of the genital tract during *Chlamydia trachomatis* infection. *Infection and immunity*. 2000;68(3):1519-28.
201. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
202. Ochiel DO, Ghosh M, Fahey JV, Guyre PM, Wira CR. Human uterine epithelial cell secretions regulate dendritic cell differentiation and responses to TLR ligands. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(3):435-44.
203. Wira CR, Ghosh M, Smith JM, Shen L, Connor RI, Sundstrom P, et al. Epithelial cell secretions from the human female reproductive tract inhibit sexually transmitted pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal immunology*. 2011;4(3):335-42.
204. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update*. 2005;11(4):411-23.
205. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunological reviews*. 2005;206:306-35.
206. Farage MA, Miller, K.W. & Sobel, J.D. Dynamics of the vaginal ecosystem—hormonal influences. *Infect Dis Res Treat*. 2010;3:1-15.
207. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *American journal of reproductive immunology*. 2011;65(3):190-5.
208. Cole AM. Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;306:199-230.
209. Wira CR, Fahey JV. The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunology*. 2004;111(1):13-5.
210. Hafner LM, Cunningham K, Beagley KW. Ovarian steroid hormones: effects on immune responses and *Chlamydia trachomatis* infections of the female genital tract. *Mucosal immunology*. 2013;6(5):859-75.

211. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. 2010;464(7286):217-23.
212. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *Journal of reproductive immunology*. 2013;97(1):74-84.
213. Hardy MP, Owczarek CM, Jermin LS, Ejdeback M, Hertzog PJ. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. 2004;84(2):331-45.
214. Fung KY, Mangan NE, Cumming H, Horvat JC, Mayall JR, Stifter SA, et al. Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection. *Science*. 2013;339(6123):1088-92.
215. Rakasz E, Lynch RG. Female sex hormones as regulatory factors in the vaginal immune compartment. *International reviews of immunology*. 2002;21(6):497-513.
216. Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology*. 1995;136(10):4526-34.
217. Bengtsson AK, Ryan EJ, Giordano D, Magaletti DM, Clark EA. 17beta-estradiol (E2) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2004;104(5):1404-10.
218. Hughes GC, Clark EA. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2007;40(6):470-81.
219. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *Journal of immunology*. 2007;178(4):2572-8.
220. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, et al. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *Journal of cellular physiology*. 2008;214(2):456-64.
221. Polanczyk MJ, Hopke C, Vandembark AA, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *Journal of neuroscience research*. 2006;84(2):370-8.
222. Mestecky J, Moldoveanu Z, Russell MW. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *American journal of reproductive immunology*. 2005;53(5):208-14.
223. Russell MW, Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002;4(6):667-77.

224. Hel Z, Stringer E, Mestecky J. Sex steroid hormones, hormonal contraception, and the immunobiology of human immunodeficiency virus-1 infection. *Endocrine reviews*. 2010;31(1):79-97.
225. Gockel CM, Bao S, Holland MK, Beagley KW. Influence of the murine oestrous cycle on the induction of mucosal immunity. *American journal of reproductive immunology*. 2003;50(5):369-79.
226. Blanchet F, Moris A, Mitchell JP, Piguet V. A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4(+) T cells. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2011;6(5):391-7.
227. Haase AT. Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(10):783-92.
228. Kaushic C, Roth KL, Anipindi V, Xiu F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: the role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *Journal of reproductive immunology*. 2011;88(2):204-9.
229. Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal immunology*. 2012;5(6):670-80.
230. Nazli A, Kafka JK, Ferreira VH, Anipindi V, Mueller K, Osborne BJ, et al. HIV-1 gp120 Induces TLR2- and TLR4-Mediated Innate Immune Activation in Human Female Genital Epithelium. *Journal of immunology*. 2013;191(8):4246-58.
231. Broliden K, Haase AT, Ahuja SK, Shearer GM, Andersson J. Introduction: Back to basics: mucosal immunity and novel HIV vaccine concepts. *Journal of internal medicine*. 2009;265(1):5-17.
232. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(3):448-55.
233. Baba M, Imai T, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Hieshima K, et al. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(23):14893-8.
234. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *Journal of immunology*. 2010;184(3):1604-16.
235. Le Borgne M, Etchart N, Goubier A, Lira SA, Sirard JC, van Rooijen N, et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*. 2006;24(2):191-201.

236. Liao F, Shirakawa AK, Foley JF, Rabin RL, Farber JM. Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding. *Journal of immunology*. 2002;168(10):4871-80.
237. Sun B, Nasu K, Fukuda J, Mine S, Nishida M, Miyakawa I. Expression of macrophage inflammatory protein-3alpha in an endometrial epithelial cell line, HHUA, and cultured human endometrial stromal cells. *Molecular human reproduction*. 2002;8(10):930-3.
238. Verhoeven D, George MD, Hu W, Dang AT, Smit-McBride Z, Reay E, et al. Enhanced Innate Antiviral Gene Expression, IFN-alpha, and Cytolytic Responses Are Predictive of Mucosal Immune Recovery during Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of immunology*. 2014;192(7):3308-18.
239. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
240. Brichacek B, Vanpouille C, Kiselyeva Y, Biancotto A, Merbah M, Hirsch I, et al. Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PloS one*. 2010;5(9).
241. van der Vlist M, van der Aar AM, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling in HIV-1 infection of dendritic cells. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2011;6(5):348-52.
242. Goujon C, Moncorge O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, et al. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 2013;502(7472):559-62.
243. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;9(5):503-10.
244. Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(3):176-86.
245. Johansson SE, Rollman E, Chung AW, Center RJ, Hejdeman B, Stratov I, et al. NK cell function and antibodies mediating ADCC in HIV-1-infected viremic and controller patients. *Viral immunology*. 2011;24(5):359-68.
246. Moir S, Malaspina A, Pickeral OK, Donoghue ET, Vasquez J, Miller NJ, et al. Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(7):587-99.
247. Shacklett BL. Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: 'location, location, location'. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(2):128-34.
248. Tudor D, Yu H, Maupetit J, Drillet AS, Bouceba T, Schwartz-Cornil I, et al. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly

neutralizing 2F5 antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(31):12680-5.

249. Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, et al. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity*. 2011;34(2):269-80.

250. Jenabian MA, Patel M, Kema I, Vyboh K, Kanagaratham C, Radzioch D, et al. Soluble CD40-ligand (sCD40L, sCD154) plays an immunosuppressive role via regulatory T cell expansion in HIV infection. *Clinical and experimental immunology*. 2014;178(1):102-11.

251. Rouse BT, Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: detentes cordiale and contraire. *Journal of immunology*. 2004;173(4):2211-5.

252. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(6):889-901.

253. Petrovas C, Mueller YM, Dimitriou ID, Bojczuk PM, Mounzer KC, Witek J, et al. HIV-specific CD8+ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL. *Journal of immunology*. 2004;172(7):4444-53.

254. Petrovas C, Mueller YM, Katsikis PD. HIV-specific CD8+ T cells: serial killers condemned to die? *Current HIV research*. 2004;2(2):153-62.

255. Hladik F, Dezzutti CS. Can a topical microbicide prevent rectal HIV transmission? *PLoS medicine*. 2008;5(8):e167.

256. Dinh MH, Fahrback KM, Hope TJ. The role of the foreskin in male circumcision: an evidence-based review. *American journal of reproductive immunology*. 2011;65(3):279-83.

257. Shen R, Smythies LE, Clements RH, Novak L, Smith PD. Dendritic cells transmit HIV-1 through human small intestinal mucosa. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(4):663-70.

258. Saba E, Grivel JC, Vanpouille C, Brichacek B, Fitzgerald W, Margolis L, et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal immunology*. 2010;3(3):280-90.

259. Cummins JE, Jr., Guarner J, Flowers L, Guenther PC, Bartlett J, Morken T, et al. Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(5):1770-9.

260. Buffa V, Stieh D, Mamhood N, Hu Q, Fletcher P, Shattock RJ. Cyanovirin-N potently inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection in cellular and cervical explant models. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 1):234-43.

261. Mascola JR. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine*. 2002;20(15):1922-5.
262. Bonsignori M, Montefiori DC, Wu X, Chen X, Hwang KK, Tsao CY, et al. Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. *Journal of virology*. 2012;86(8):4688-92.
263. Liao HX, Bonsignori M, Alam SM, McLellan JS, Tomaras GD, Moody MA, et al. Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. *Immunity*. 2013;38(1):176-86.
264. Roederer M, Keele BF, Schmidt SD, Mason RD, Welles HC, Fischer W, et al. Immunological and virological mechanisms of vaccine-mediated protection against SIV and HIV. *Nature*. 2014;505(7484):502-8.
265. Hessel AJ, Hangartner L, Hunter M, Havenith CE, Beurskens FJ, Bakker JM, et al. Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature*. 2007;449(7158):101-4.
266. Hessel AJ, Poignard P, Hunter M, Hangartner L, Tehrani DM, Bleeker WK, et al. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nature medicine*. 2009;15(8):951-4.
267. Hessel AJ, Rakasz EG, Poignard P, Hangartner L, Landucci G, Forthal DN, et al. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS pathogens*. 2009;5(5):e1000433.
268. Ribeiro RM, Qin L, Chavez LL, Li D, Self SG, Perelson AS. Estimation of the initial viral growth rate and basic reproductive number during acute HIV-1 infection. *Journal of virology*. 2010;84(12):6096-102.
269. Abbas LaP. *Cellular and Molecular Immunology*. 2011;7th edition.
270. Steinman RM. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European journal of immunology*. 2007;37 Suppl 1:S53-60.
271. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(8):1039-49.
272. Proietto AI, van Dommelen S, Wu L. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunology and cell biology*. 2009;87(1):39-45.
273. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*. 2011;241(1):206-27.

274. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. 2012;380(9853):1590-605.
275. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2011;17(1):179-84.
276. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology*. 2010;11(1):7-13.
277. Lewis KL, Reizis B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(8):a007401.
278. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology*. 2008;29(3):125-32.
279. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(7):681-93.
280. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(3):369-95.
281. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood*. 2008;111(10):4862-70.
282. Carosella ED, Gregori S, LeMaoult J. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood*. 2011;118(25):6499-505.
283. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(7):503-13.
284. International HIVCS, Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science*. 2010;330(6010):1551-7.
285. Donaghy L, Gros F, Amiot L, Mary C, Maillard A, Guiguen C, et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology*. 2007;147(2):236-40.
286. Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *Aids*. 2002;16(3):347-51.

287. Cabello A, Rivero A, Garcia MJ, Lozano JM, Torre-Cisneros J, Gonzalez R, et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. *Human immunology*. 2003;64(11):1045-9.
288. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(5):1209-20.
289. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, et al. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1993;55(1):96-101.
290. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(2):523-7.
291. Aman MJ, Tretter T, Eisenbeis I, Bug G, Decker T, Aulitzky WE, et al. Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood*. 1996;87(11):4731-6.
292. Ziegler-Heitbrock L, Lotzerich M, Schaefer A, Werner T, Frankenberger M, Benkhart E. IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *Journal of immunology*. 2003;171(1):285-90.
293. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature immunology*. 2002;3(3):237-43.
294. Gros F, Cabillic F, Toutirais O, Maux AL, Sebti Y, Amiot L. Soluble HLA-G molecules impair natural killer/dendritic cell crosstalk via inhibition of dendritic cells. *European journal of immunology*. 2008;38(3):742-9.
295. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yarilina A, Cortesini R, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant immunology*. 2003;11(3-4):245-58.
296. Le Friec G, Gros F, Sebti Y, Guilloux V, Pangault C, Fauchet R, et al. Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. *Journal of leukocyte biology*. 2004;76(6):1125-33.
297. Lefebvre S, Berrih-Aknin S, Adrian F, Moreau P, Poeta S, Gourand L, et al. A specific interferon (IFN)-stimulated response element of the distal HLA-G promoter binds IFN-regulatory factor 1 and mediates enhancement of this nonclassical class I gene by IFN-beta. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6133-9.

298. Lefebvre S, Moreau P, Guiard V, Ibrahim EC, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. Molecular mechanisms controlling constitutive and IFN-gamma-inducible HLA-G expression in various cell types. *Journal of reproductive immunology*. 1999;43(2):213-24.
299. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010;116(6):935-44.
300. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *International immunology*. 1999;11(5):803-11.
301. Wagner SN, Rebmann V, Willers CP, Grosse-Wilde H, Goos M. Expression analysis of classic and non-classic HLA molecules before interferon alfa-2b treatment of melanoma. *Lancet*. 2000;356(9225):220-1.
302. Viillard JF, Pellegrin JL, Ranchin V, Schaefferbeke T, Dehais J, Longy-Boursier M, et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and experimental immunology*. 1999;115(1):189-95.
303. Bukur J, Seliger B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Seminars in cancer biology*. 2003;13(5):353-9.
304. LeMaout J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(6):662-4.
305. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(1):36-49.
306. Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue antigens*. 2011;77(2):89-99.
307. Wu J, Horuzsko A. Expression and function of immunoglobulin-like transcripts on tolerogenic dendritic cells. *Human immunology*. 2009;70(5):353-6.
308. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(15):8856-61.
309. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.

310. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*. 1995;155(3):1151-64.
311. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636-45.
312. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265(5176):1237-40.
313. Chen Y, Haines CJ, Gutcher I, Hochweller K, Blumenschein WM, McClanahan T, et al. Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. *Immunity*. 2011;34(3):409-21.
314. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nature immunology*. 2010;11(12):1093-101.
315. Huang YH, Zozulya AL, Weidenfeller C, Schwab N, Wiendl H. T cell suppression by naturally occurring HLA-G-expressing regulatory CD4+ T cells is IL-10-dependent and reversible. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(2):273-81.
316. Lozano JM, Gonzalez R, Luque J, Frias M, Rivero A, Pena J. CD8(+)HLA-G(+) regulatory T cells are expanded in HIV-1-infected patients. *Viral immunology*. 2009;22(6):463-5.
317. Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, et al. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood*. 2007;110(2):568-77.
318. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology*. 2011;32(1):19-25.
319. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem cells*. 2008;26(1):212-22.
320. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-41.
321. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002;16(2):219-30.

322. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*. 2012;491(7423):264-8.
323. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppas D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of immunology*. 2012;189(8):3925-35.
324. Rossetti M, Gregori S, Roncarolo MG. Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naive T cells. *European journal of immunology*. 2010;40(11):3097-106.
325. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature immunology*. 2005;6(5):507-14.
326. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(9):2441-50.
327. Russell MW, Mestecky J. Tolerance and protection against infection in the genital tract. *Immunological investigations*. 2010;39(4-5):500-25.
328. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014;157(1):121-41.
329. Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, Belkaid Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity*. 2011;35(1):13-22.
330. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*. 2005;115(2):153-62.
331. Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*. 2009;31(3):368-76.
332. Macpherson AJ, Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1029:36-43.
333. Iliiev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal immunology*. 2009;2(4):340-50.
334. Iliiev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*. 2009;58(11):1481-9.

335. Kaul R, Pettengell C, Sheth PM, Sunderji S, Biringer A, MacDonald K, et al. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. *Journal of reproductive immunology*. 2008;77(1):32-40.
336. Bonsignori M, Alam SM, Liao HX, Verkoczy L, Tomaras GD, Haynes BF, et al. HIV-1 antibodies from infection and vaccination: insights for guiding vaccine design. *Trends in microbiology*. 2012;20(11):532-9.
337. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2010;17(7):1055-65.
338. Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(5):428-34.
339. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, et al. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nature immunology*. 2004;5(3):233-6.
340. Plotkin SA. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(3):401-9.
341. Amanna IJ, Messaoudi I, Slifka MK. Protective immunity following vaccination: how is it defined? *Human vaccines*. 2008;4(4):316-9.
342. Gray ES, Madiga MC, Hermanus T, Moore PL, Wibmer CK, Tumba NL, et al. The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *Journal of virology*. 2011;85(10):4828-40.
343. Haynes BF, Kelsoe G, Harrison SC, Kepler TB. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study. *Nature biotechnology*. 2012;30(5):423-33.
344. Montefiori DC, Mascola JR. Neutralizing antibodies against HIV-1: can we elicit them with vaccines and how much do we need? *Current opinion in HIV and AIDS*. 2009;4(5):347-51.
345. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *The New England journal of medicine*. 2009;361(23):2209-20.
346. Montefiori DC, Karnasuta C, Huang Y, Ahmed H, Gilbert P, de Souza MS, et al. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(3):431-41.
347. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *The New England journal of medicine*. 2012;366(14):1275-86.

348. Raska M, Moldoveanu Z, Novak J, Hel Z, Novak L, Bozja J, et al. Delivery of DNA HIV-1 vaccine to the liver induces high and long-lasting humoral immune responses. *Vaccine*. 2008;26(12):1541-51.
349. Mestecky J, Russell MW, Elson CO. Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *Journal of immunology*. 2007;179(9):5633-8.
350. Mestecky J, Raska M, Novak J, Alexander RC, Moldoveanu Z. Antibody-mediated protection and the mucosal immune system of the genital tract: relevance to vaccine design. *Journal of reproductive immunology*. 2010;85(1):81-5.
351. Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for optimizing targeting and delivery of mucosal HIV vaccines. *European journal of immunology*. 2009;39(10):2657-69.
352. Liu MA. DNA vaccines: a review. *Journal of internal medicine*. 2003;253(4):402-10.
353. Emini EA, Koff WC. AIDS/HIV. Developing an AIDS vaccine: need, uncertainty, hope. *Science*. 2004;304(5679):1913-4.
354. Ho DD, Huang Y. The HIV-1 vaccine race. *Cell*. 2002;110(2):135-8.
355. McMichael AJ, Koff WC. Vaccines that stimulate T cell immunity to HIV-1: the next step. *Nature immunology*. 2014;15(4):319-22.
356. McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nature medicine*. 2003;9(7):874-80.
357. Reynolds MR, Rakasz E, Skinner PJ, White C, Abel K, Ma ZM, et al. CD8+ T-lymphocyte response to major immunodominant epitopes after vaginal exposure to simian immunodeficiency virus: too late and too little. *Journal of virology*. 2005;79(14):9228-35.
358. Andrieu JM, Chen S, Lai C, Guo W, Lu W. Mucosal SIV Vaccines Comprising Inactivated Virus Particles and Bacterial Adjuvants Induce CD8(+) T-Regulatory Cells that Suppress SIV-Positive CD4(+) T-Cell Activation and Prevent SIV Infection in the Macaque Model. *Frontiers in immunology*. 2014;5:297.
359. McElrath MJ. Standing guard at the mucosa. *Immunity*. 2011;34(2):146-8.
360. Leroux-Roels G, Maes C, Clement F, van Engelenburg F, van den Dobbelen M, Adler M, et al. Randomized Phase I: Safety, Immunogenicity and Mucosal Antiviral Activity in Young Healthy Women Vaccinated with HIV-1 Gp41 P1 Peptide on Virosomes. *PloS one*. 2013;8(2):e55438.
361. Ramjee G. Microbicides for HIV prevention. *The Indian journal of medical research*. 2011;134(6):930-8.

362. McGowan I. The development of rectal microbicides for HIV prevention. *Expert opinion on drug delivery*. 2014;11(1):69-82.
363. Dey B, Lagenaur LA, Lusso P. Protein-based HIV-1 microbicides. *Current HIV research*. 2013;11(7):576-94.
364. Hillier SL, Moench T, Shattock R, Black R, Reichelderfer P, Veronese F. In vitro and in vivo: the story of nonoxynol 9. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2005;39(1):1-8.
365. Skoler-Karpoﬀ S, Ramjee G, Ahmed K, Altini L, Plagianos MG, Friedland B, et al. Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9654):1977-87.
366. Grant RM, Hamer D, Hope T, Johnston R, Lange J, Lederman MM, et al. Whither or wither microbicides? *Science*. 2008;321(5888):532-4.
367. Sokal DC, Karim QA, Sibeko S, Yende-Zuma N, Mansoor LE, Baxter C, et al. Safety of tenofovir gel, a vaginal microbicide, in South African women: results of the CAPRISA 004 Trial. *Antiviral therapy*. 2013;18(3):301-10.
368. Karim QA et al. Effectiveness and safety of Tenofovir Gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science*. 2010;329:1168-74.
369. Valley-Omar Z, Sibeko S, Anderson J, Goodier S, Werner L, Arney L, et al. CAPRISA 004 tenofovir microbicide trial: no impact of tenofovir gel on the HIV transmission bottleneck. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(1):35-40.
370. Lagenaur LA, Sanders-Beer BE, Brichacek B, Pal R, Liu X, Liu Y, et al. Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*. *Mucosal immunology*. 2011;4(6):648-57.
371. Tomaras GD, Haynes BF. Advancing Toward HIV-1 Vaccine Efficacy through the Intersections of Immune Correlates. *Vaccines*. 2014;2(1):15-35.
372. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(1):11-23.
373. Fitzgerald DW, Janes H, Robertson M, Coombs R, Frank I, Gilbert P, et al. An Ad5-vectored HIV-1 vaccine elicits cell-mediated immunity but does not affect disease progression in HIV-1-infected male subjects: results from a randomized placebo-controlled trial (the Step study). *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(6):765-72.
374. Migueles SA, Rood JE, Berkley AM, Guo T, Mendoza D, Patamawenu A, et al. Trivalent adenovirus type 5 HIV recombinant vaccine primes for modest cytotoxic capacity

that is greatest in humans with protective HLA class I alleles. *PLoS pathogens*. 2011;7(2):e1002002.

375. Yates NL, Liao HX, Fong Y, deCamp A, Vandergrift NA, Williams WT, et al. Vaccine-induced Env V1-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination. *Science translational medicine*. 2014;6(228):228ra39.

376. Ranki A, Mattinen S, Yarchoan R, Broder S, Ghayeb J, Lahdevirta J, et al. T-cell response towards HIV in infected individuals with and without zidovudine therapy, and in HIV-exposed sexual partners. *Aids*. 1989;3(2):63-9.

377. Trabattoni D, Biasin M, Clerici M. Mucosal immunoglobulin A in HIV-exposed seronegative individuals. *Aids*. 2012;26(17):2247-50.

378. Choi RY, Levinson P, Guthrie BL, Lohman-Payne B, Bosire R, Liu AY, et al. Cervicovaginal HIV-1-neutralizing immunoglobulin A detected among HIV-1-exposed seronegative female partners in HIV-1-discordant couples. *Aids*. 2012;26(17):2155-63.

379. Horton RE, Ball TB, Wachichi C, Jaoko W, Rutherford WJ, McKinnon L, et al. Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS research and human retroviruses*. 2009;25(1):83-92.

380. Kaul R, Plummer F, Clerici M, Bomsel M, Lopalco L, Broliden K. Mucosal IgA in exposed, uninfected subjects: evidence for a role in protection against HIV infection. *Aids*. 2001;15(3):431-2.

381. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, et al. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(3):341-9.

382. Montoya CJ, Velilla PA, Chougnat C, Landay AL, Rugeles MT. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clinical immunology*. 2006;120(2):138-46.

383. Scott-Algara D, Truong LX, Versmisse P, David A, Luong TT, Nguyen NV, et al. Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *Journal of immunology*. 2003;171(11):5663-7.

384. Martin MP, Qi Y, Gao X, Yamada E, Martin JN, Pereyra F, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nature genetics*. 2007;39(6):733-40.

385. Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007;317(5840):944-7.

386. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E

and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(2):298-301.

387. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.

388. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-5.

389. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*. 2005;307(5714):1434-40.

390. Burns JC, Shimizu C, Gonzalez E, Kulkarni H, Patel S, Shike H, et al. Genetic variations in the receptor-ligand pair CCR5 and CCL3L1 are important determinants of susceptibility to Kawasaki disease. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(2):344-9.

391. Ball TB, Ji H, Kimani J, McLaren P, Marlin C, Hill AV, et al. Polymorphisms in IRF-1 associated with resistance to HIV-1 infection in highly exposed uninfected Kenyan sex workers. *Aids*. 2007;21(9):1091-101.

392. Yao XD, Omange RW, Henrick BM, Lester RT, Kimani J, Ball TB, et al. Acting locally: innate mucosal immunity in resistance to HIV-1 infection in Kenyan commercial sex workers. *Mucosal immunology*. 2013.

393. Card CM, Ball TB, Fowke KR. Immune Quiescence: a model of protection against HIV infection. *Retrovirology*. 2013;10(1):141.

394. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96(1):456-64.

395. Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202 Suppl 3:S377-81.

396. Chege D, Chai Y, Huibner S, Kain T, Wachih C, Kimani M, et al. Blunted IL17/IL22 and pro-inflammatory cytokine responses in the genital tract and blood of HIV-exposed, seronegative female sex workers in Kenya. *PloS one*. 2012;7(8):e43670.

397. Fogli M, Costa P, Murdaca G, Setti M, Mingari MC, Moretta L, et al. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *European journal of immunology*. 2004;34(8):2313-21.

398. Vieillard V, Fausther-Bovendo H, Samri A, Debre P, French Asymptomatics a Long Terme A-COSG. Specific phenotypic and functional features of natural killer cells from HIV-infected long-term nonprogressors and HIV controllers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2010;53(5):564-73.
399. Boulet S, Bernard NF. [Carrying certain KIR3DL1 alleles with HLA-B*57 is associated with protection from HIV infection]. *Medecine sciences : M/S*. 2008;24(12):1030-2.
400. Boulet S, Sharafi S, Simic N, Bruneau J, Routy JP, Tsoukas CM, et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *Aids*. 2008;22(5):595-9.
401. Iqbal SM, Ball TB, Levinson P, Maranan L, Jaoko W, Wachihi C, et al. Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *Aids*. 2009;23(13):1669-77.
402. Kaul R, Rebbapragada A, Hirbod T, Wachihi C, Ball TB, Plummer FA, et al. Genital levels of soluble immune factors with anti-HIV activity may correlate with increased HIV susceptibility. *Aids*. 2008;22(15):2049-51.
403. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guedou F, Agossa-Gbenafa C, Labbe AC, et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal immunology*. 2008;1(4):309-16.
404. Lajoie J, Poudrier J, Massinga Loembe M, Guedou F, Leblond F, Labbe AC, et al. Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(1):90-8.
405. Hertzog PJ, Williams BR. Fine tuning type I interferon responses. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013;24(3):217-25.
406. Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity*. 2007;8(6):492-502.
407. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The oncologist*. 2001;6(1):34-55.
408. Deonarain R, Verma A, Porter AC, Gewert DR, Plataniias LC, Fish EN. Critical roles for IFN-beta in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(23):13453-8.

409. de Weerd NA, Vivian JP, Nguyen TK, Mangan NE, Gould JA, Braniff SJ, et al. Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nature immunology*. 2013;14(9):901-7.
410. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *Journal of virology*. 2008;82(1):538-45.
411. Abel K, Rocke DM, Chohan B, Fritts L, Miller CJ. Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. *Journal of virology*. 2005;79(19):12164-72.
412. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T, et al. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *Journal of immunology*. 2000;164(3):1602-11.
413. Beaurepaire C, Smyth D, McKay DM. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(3):133-44.
414. Orsilles MA, Pieri E, Cooke P, Caula C. IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2006;114(1):55-60.
415. Contreras X, Bennasser Y, Bahraoui E. IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004;6(13):1182-90.
416. Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood*. 2009;114(2):346-56.
417. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS pathogens*. 2010;6(4):e1000852.
418. Pandrea I, Gaufin T, Brenchley JM, Gautam R, Monjure C, Gautam A, et al. Cutting edge: Experimentally induced immune activation in natural hosts of simian immunodeficiency virus induces significant increases in viral replication and CD4+ T cell depletion. *Journal of immunology*. 2008;181(10):6687-91.
419. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(10):2271-9.

420. Fabris A, Catamo E, Segat L, Morgutti M, Arraes LC, de Lima-Filho JL, et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *Aids*. 2009;23(2):177-82.
421. Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *Journal of immunology*. 2001;166(8):5018-26.
422. Naji A, Durrbach A, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways. *Human immunology*. 2007;68(4):233-9.
423. Carosella ED, Gregori S, Rouas-Freiss N, LeMaout J, Menier C, Favier B. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(3):353-68.
424. van der Meer A, Lukassen HG, van Cranenbroek B, Weiss EH, Braat DD, van Lierop MJ, et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Molecular human reproduction*. 2007;13(2):123-33.
425. Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Molecular human reproduction*. 2001;7(2):195-200.
426. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *Aids*. 2008;22(12):1493-501.
427. Schellenberg JJ, Card CM, Ball TB, Mungai JN, Irungu E, Kimani J, et al. Bacterial vaginosis, HIV serostatus and T-cell subset distribution in a cohort of East African commercial sex workers: retrospective analysis. *Aids*. 2012;26(3):387-93.
428. Ansari AW, Heiken H, Meyer-Olson D, Schmidt RE. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. *European journal of immunology*. 2011;41(12):3412-8.
429. Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular human reproduction*. 2007;13(7):491-501.
430. Gutsche S, von Wolff M, Strowitzki T, Thaler CJ. Seminal plasma induces mRNA expression of IL-1beta, IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro. *Molecular human reproduction*. 2003;9(12):785-91.
431. Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*. 2014;511(7511):601-5.

432. Touzot M, Grandclaudon M, Cappuccio A, Satoh T, Martinez-Cingolani C, Servant N, et al. Combinatorial flexibility of cytokine function during human T helper cell differentiation. *Nature communications*. 2014;5:3987.
433. Dikopoulos N, Bertoletti A, Kroger A, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J. Type I IFN negatively regulates CD8+ T cell responses through IL-10-producing CD4+ T regulatory 1 cells. *Journal of immunology*. 2005;174(1):99-109.
434. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature genetics*. 2009;41(10):1100-4.
435. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine*. 1991;174(4):915-24.
436. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *Journal of immunology*. 2001;166(9):5530-9.
437. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, et al. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *Journal of immunology*. 2006;177(11):7784-93.
438. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(9):2139-49.
439. Vlad G, Piazza F, Colovai A, Cortesini R, Della Pietra F, Suciuc-Foca N, et al. Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Human immunology*. 2003;64(5):483-9.
440. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1757-64.
441. Siddiqui KR, Laffont S, Powrie F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity*. 2010;32(4):557-67.
442. Min WP, Zhou D, Ichim TE, Strejan GH, Xia X, Yang J, et al. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *Journal of immunology*. 2003;170(3):1304-12.

443. Huang J, Burke P, Yang Y, Seiss K, Beamon J, Cung T, et al. Soluble HLA-G inhibits myeloid dendritic cell function in HIV-1 infection by interacting with leukocyte immunoglobulin-like receptor B2. *Journal of virology*. 2010;84(20):10784-91.
444. Macpherson AJ, McCoy KD. Stratification and compartmentalisation of immunoglobulin responses to commensal intestinal microbes. *Seminars in immunology*. 2013;25(5):358-63.
445. Slack E, Balmer ML, Macpherson AJ. B cells as a critical node in the microbiota-host immune system network. *Immunological reviews*. 2014;260(1):50-66.
446. Pala P, Gomez-Roman VR, Gilmour J, Kaleebu P. An African perspective on mucosal immunity and HIV-1. *Mucosal immunology*. 2009;2(4):300-14.
447. Vandergeeten C, Fromentin R, Merlini E, Lawani MB, DaFonseca S, Bakeman W, et al. Cross-Clade Ultrasensitive PCR-Based Assays To Measure HIV Persistence in Large-Cohort Studies. *Journal of virology*. 2014;88(21):12385-96.

Annexes

Annexe 1

	HIV-1-uninfected CSWs	HIV-1-infected CSWs	HIV-1-uninfected non- CSWs	P-value
	N=22	N=24	N=13	
Age, mean (SD), years	37 (3)	44 (8)	34 (7)	0,0002a
Duration of sex work, mean (SD), years	5 (1)	6 (1)	NA	NSb
Number of clients last week, mean (SD)	15 (13)	23 (22)	NA	NSb
Menstrual cycle phase (follicular)	16/22 (73%)	24/24 (100%)	13/13 (100%)	NSc
Condom always used last week	21/22 (95%)	21/24 (88%)	11/13 (85%)	NSc

Table 1. Distribution of demographic, sexual behaviour and menstrual cycle phase characteristics in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW women.

ap-value for the comparison across all groups was calculated with one-way ANOVA analysis of variance for the age

bp-values for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs were calculated with an unpaired t test for the duration of sex work and number of clients last week.

cp-values for the comparison across all groups were calculated with a Fisher exact test.

* Commercial sex worker women selected for this study are in their 4th to 7th years of sex work, ART naive, are between 20 to 60 years old, are negative for HSV-2 in the Cervicovaginal lavage (qPCR), are not taking any oral contraceptive, are free of co-sexual transmitted infection or any clinical sign or symptom and they are all in the same menstrual cycle phase (follicular).

Annexe 2

Allèles SNP	TS VIH-1 HESN		TS VIH-1 infectées		Contrôles	
	N	Niveau IFN- α (pg/mL)	N	Niveau IFN- α (pg/mL)	N	Niveau IFN- α (pg/mL)
TLR 7						
rs179008						
AA	40	12,7 (13,2)	38	26 (34,5)	61	25,1 (23,8)
AT/TT	15	13,7 (18,1)	7	35,1 (30)	8	24,4 (21,2)
p-values		0,8197		0,5137		0,0001
TLR 8						
rs3764880						
AA	31	11,4 (12,8)	24	25,7 (25,3)	36	23,1 (22,8)
AG/GG	18	14,6 (13,7)	18	23,2 (23,9)	22	25,1 (24,8)
p-values		0,4124		0,7505		0,0001
TLR 9						
rs5743836						
TT	29	11,8 (11,7)	20	23,1 (26)	34	26,1 (26,1)
TC/CC	25	12,3 (14,3)	24	31,5 (39,7)	35	23,1 (23,1)
p-values		0,903		0,4206		0,0001
rs5743836						
TT	22	11,7 (10,2)	16	26,7 (27,6)	29	23,1 (23,1)
TC/CC	32	12,5 (15,5)	27	22,9 (22,6)	39	26,1 (26,1)
p-values		0,823		0,6228		0,0001
rs352139						
AA	12	12,6 (11,1)	12	13,7 (16,9)	15	28,1 (28,1)
AG/GG	43	13,1 (15,5)	33	32,4 (37)	54	24,1 (24,1)
p-values		0,9261		0,1004		0,0001
rs352140						
GG	27	11,2 (10,9)	24	23 (19)	33	28,1 (28,1)
GA/AA	26	14,5 (17,4)	20	25 (29,7)	35	23,1 (23,1)
p-values		0,4088		0,7889		0,0001
IRF-7						
rs702966						
GG	16	12,3 (14,5)	7	41,4 (36,9)	15	22,1 (22,1)
GC/CC	30	14 (16)	37	22,4 (21,6)	45	24,1 (24,1)

p-values		0,7858		0,066		7839
rs3178010						
AA	38	14,3 (15,7)	29	18,6 (18,3)	44	26,8 (24,4)
AG/GG	10	13,4 (12,7)	13	25,2 (22,2)	16	18 (22,4)
p-values		0,8737		0,3222		0,2106
rs1061502						
AA	16	12,8 (14,7)	7	41,4 (36,9)	13	20,3 (15,7)
AG/GG	34	14 (15,1)	36	21 (20,1)	44	25 (25,3)
p-values		0,7837		0,0407		0,5292
rs12290989						
GG	16	12,8 (14,7)	7	41,4 (36,9)	12	20,1 (16,3)
GT/TT	35	13,6 (15,1)	36	21 (20,1)	41	24,3 (26)
p-values		0,8495		0,0407		0,5976
IFNA17						
TT	19	15,77 (23,12)	11	27,95 (27,96)	14	20,26 (21,81)
TG/GG	28	14,5 (14,11)	27	23,92 (23,59)	42	22,01 (21,07)
p-values		0,8169		0,6538		0,7902

Table 2. Répertoire des SNP étudiés dans le cadre de la première partie du projet avec l'aide des échantillons provenant de la première cohorte de femmes établie à Cotonou, Bénin.

Les p-values pour la comparaison entre la forme allélique type sauvage et le SNP (sous la forme homozygote et hétérozygote) pour chaque gène étudié ont été calculé à l'aide d'un t test non-pairé.

Deux SNP liés (en rouge), dans le gène de l'IRF-7 ont été associé avec des niveaux d'IFN- α cervicaux significativement diminués.

Annexe 3

Niveaux IFN- α	TS VIH-			TS VIH+		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD
Niveau extracellulaire						
WT	16	12,8	14,7	7	41,4	36,9
SNP	34	14	15,1	36	21	20,1
p-value		0,784			0,0407	
Niveau intracellulaire						
Pourcentage de cellules positives (%)						
WT	8	4	4,4	5	16,8	23,1
SNP	10	0,7	2,2	13	1,2	2,3
p-value		0,053			0,022	
Expression intracellulaire (GeoMFI)						
WT	8	53,7	59,7	5	31,9	43,8
SNP	10	7,8	24,8	13	16,5	31,4
p-value		0,042			0,413	

Table 3. Impact des mutations de l'IRF-7 sur les niveaux d'IFN- α intra/extracellulaires.

Les p-values pour la comparaison entre la forme allélique type sauvage et le SNP (sous la forme homozygote et hétérozygote) pour chaque gène étudié ont été calculé à l'aide d'un t test non-pairé.

Un des SNP lié (rs1061502) dans le gène de l'IRF-7 a de plus été associé avec des niveaux d'IFN- α cervicaux intracellulaires significativement diminués (en rouge), chez les TS VIH-1 infectées (% de cellules positives) et chez les TS VIH-1 HESN (GeoMFI (niveau d'expression cellulaire)).

Annexe 4

Association entre les facteurs immunologiques (solubles et intracellulaires) et génétiques chez les TS béninoises

Cette section ne pourra pas être discutée en détail car pour cause de manque de matériel cellulaire et donc aussi génétique, l'objectif 4, qui portait sur l'évaluation de l'association entre les facteurs immunologiques (solubles et intracellulaires) et génétiques des TS, de ce projet de recherche n'a pas pu être atteint.

Nous avons étudié 3 femmes TS VIH-1 non-infectées HESN et 3 femmes TS VIH-1 infectées pour lesquelles nous avons les résultats du volet immunologique (environnement extracellulaire et microenvironnement intracellulaire) afin de pouvoir vérifier s'il y avait des corrélations entre les données immunologiques et génétiques transcriptionnelles. En premier lieu, un marquage a été effectué dans le but de trier par cytométrie en flux les CEG et les cellules myéloïdes HLA-DR⁺ pour chaque femme (6). Ce tri cellulaire a été effectué par M. Eric Massicotte à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM) en confinement P3. Par la suite, une extraction d'ARN total a été effectuée (12 échantillons). Cependant, étant donné le nombre très faible de cellules (en moyenne 500 à 1000 pour chaque type cellulaire) obtenues suite au tri, la quantité d'ARN total obtenue a été aussi très faible, de l'ordre de 10ng/14ul d'éluat. Suite à des analyses préliminaires faites avec environ la même quantité d'ARN, nous avons pu apprécier une belle qualité de cet ARN (RIN ; *RNA Integrity Number* entre 8-10), c'est pourquoi nous avons poursuivi l'analyse. L'idée de faire un microarray HTA (GeneChip *Human Transcriptome Array 2.0, Affimetrix*) a été obligatoirement exclue (50ng d'ARN minimum), nous avons alors choisi des gènes d'importance à la lumière des résultats immunologiques préalablement obtenus.

Nous avons analysé les gènes de l' IL-10, HLAG1, IFN- α 2, IFN- β 1, IFN- ϵ , IL-28b, APOBEC3G, BST-2, SAMHD1, ILT-4, ISG15, MX2, TRIM5, Gag (VIH), RIG-1, MDA5, OAS-1, TLR-3/7/9. Ces analyses ont été effectuées par Mme Raphaëlle Lambert à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC). Même après une pré-amplification de 14 cycles, nous avons pu observer la présence de seulement 6 gènes d'intérêt et ce, que dans les populations cellulaires myéloïdes; les CEG n'ayant malheureusement rien données.

Nous avons trouvé que chez les TS VIH-1 non-infectées HESN, le gène OAS1 est exprimé et est absent chez les TS VIH-1 infectées. Chez les TS VIH-1 infectées, MX2 est exprimé et est absent chez les TS VIH-1 non-infectées HESN. Les gènes TLR-7, BST-2, SAMHD1 et Gag sont exprimés autant chez les TS VIH-1 non-infectées HESN que chez les femmes infectées. Pour être discutés, ces résultats devront être reproduits avec plus d'échantillons et de matériel génétique.

Ce qui est très intéressant de noter est que le gène Gag (Pr55) du VIH semble être exprimé autant dans les cellules myéloïdes des TS VIH-1 non-infectées HESN que dans celles des TS VIH-1 infectées et ceci pourrait indiquer la présence de Gag du VIH dans les cellules des femmes prouvant bel et bien que les femmes de l'étude sont en contact avec le virus. Cependant, un facteur reste à être contrôlé, qui est la vérification de la provenance cellulaire de l'ARNm Gag, à savoir qu'il provient bien de nos cellules de femmes ou de cellules d'hommes qui auraient pu être présentes dans les échantillons analysés et ainsi suggérer la présence éventuelle de réservoirs mucosaux (Réf. Perspectives).

Oligo ID	Gene	UPL Probe	Oligo FWD	Oligo REV	RefSeq
IR0715	IL10	30	tgggggagaacctgaagac	acagggagaatcgatgaca	NM_002127.5
IR2678	IFNb1	25	cgacactgttcgtgtgtca	gaagcacaacaggagagcaa	NM_004030
IR2919	ISG15	76	gccaactcatcttccagct	ttcagctctgacaccgacat	ENSG00000187608
IR2923	RIG-1	50	gaacagcagaaatctgtattctaaa	ttgttctcaacaatctgttccact	ENSG00000107201
IR2970	IFIH1 (MDA5)	36	aggcaccatgggaagtgat	ggtaaggcctgagctggag	NM_022168
IR3954	HLA-G	12	ggagtggctccacagatacc	gggtggcctcatagtcaaag	
IR3956	OAS-1	37	ggtggagtccgatgtgctg	aggtttatagccgagcagca	NM_000572.2
IR4698.2	TLR3	89	gaaaggctagcagctcatccaa	gcacttggtggtggaggat	NM_003265.2
IR4699	TLR7	81	ttaaccaattgctccgtgtc	ggtgccacactcaatctg	NM_016562.3
IR4700	TLR9	56	tgtgaagcatcctccctgtga	gagagacagcgggtgcag	NM_017442.3
IR4701	IFNA2	64	caagtcaagctgctctgtgg	gcatcaaggctcctcctgct	NM_000605.3
IR4702	IFNE	73	ggaaaaactttctgcttctca	tggccagagtgtgtcctttt	NM_176891.4
IR4703	IL28B (IFNL3)	17	gcccgattcaagtcctgt	tccttcagcagaagcgactc	NM_172139.2
IR4704	APOBEC3G	18	gagcgcagcacaatgac	gcctcaaggaaaccgtgt	NM_021822.3
IR4705	BST-2	15	agtgagatcccaggaagctg	gggaatgttcaagcgaagaa	NM_004335.2
IR4706	SAMHD1	41	cccaaagtattgctagacgtga	tgcatccataatccatgttg	NM_015474.3
IR4707	LILRB2	66	tgaaggacacacagcctgaa	agctgggcgtaggtcatat	NM_001080978.2
IR4708	MX2	34	ctggaggcactgtcaggagt	cggacacctggttacgattc	NM_002463.1
IR4709	TRIM5	82	gtcatttgctggcttctgga	agctgcctggagcttact	NM_033093.2
IR4710	VIH Gag	26	gcatgggtaaaagtagtagaagaga	aatgctgaaaacatgggtatcac	NC_001802.1
IR3663	ACTB	11	attggcaatgagcgggtc	tgaaggtagttctgtggatgc	NM_001101.3
IR3024	GAPDH	60	agccacatcgctcagacac	gccaatacagacaaatcc	NM_002046.3
IR3657	HPRT	22	tgatagatccattctatgactgtaga	caagacattcttccagttaaagttg	NM_000194.2
IR3658	TBP	87	gaacatcatggatcagaacaaca	atagggattccgggagtcac	NM_003194.3

Table 4. Gènes étudiés dans les cellules triées de la table 4 ci-dessus (Annexe 4). Étude génomique préliminaire réalisée à l'IRIC (avec l'aide de Raphaëlle Lambert).

Sample Name	Target Name		Ct Mean	ΔCt Mean	RQ	RQ Min	RQ Max
1_328m	GAPDH	GAPDH					
2_331m	GAPDH	GAPDH	35,934				
3_348m	GAPDH	GAPDH	33,871				
4_622m	GAPDH	GAPDH	29,144				
5_665m	GAPDH	GAPDH	34,401				
6_677m	GAPDH	GAPDH	34,254				
1_328m	IR3956	OAS1					
2_331m	IR3956	OAS1					
3_348m	IR3956	OAS1					
4_622m	IR3956	OAS1	28,546	-0,597999			
5_665m	IR3956	OAS1					
6_677m	IR3956	OAS1					
1_328m	IR4699	TLR7					
2_331m	IR4699	TLR7	34,573	-1,361	1,000	1,000	1,000
3_348m	IR4699	TLR7	34,834	0,963	0,200	0,055	0,722
4_622m	IR4699	TLR7	34,196	5,053	0,012	0,006	0,022
5_665m	IR4699	TLR7					
6_677m	IR4699	TLR7					
1_328m	IR4705	BST2					
2_331m	IR4705	BST2	36,487	0,553	1,000	1,000	1,000
3_348m	IR4705	BST2	35,173	1,302	0,595	0,595	0,595
4_622m	IR4705	BST2	31,551	2,407	0,277	0,161	0,476
5_665m	IR4705	BST2					
6_677m	IR4705	BST2	34,618	0,364	1,140	0,209	6,212
1_328m	IR4706	SAMHD1					
2_331m	IR4706	SAMHD1	37,455	1,520	1,000	1,000	1,000
3_348m	IR4706	SAMHD1	37,755	3,883	0,194	0,144	0,262
4_622m	IR4706	SAMHD1	33,419	4,275	0,148	0,099	0,222
5_665m	IR4706	SAMHD1					
6_677m	IR4706	SAMHD1	37,844	3,590	0,238	0,007	8,097
1_328m	IR4708	MX2					
2_331m	IR4708	MX2	35,060	-0,874	1,000	1,000	1,000
3_348m	IR4708	MX2	33,911	0,040	0,531	0,389	0,725
4_622m	IR4708	MX2					

5_665m	IR4708	MX2					
6_677m	IR4708	MX2					
1_328m	IR4710	VIH Gag					
2_331m	IR4710	VIH Gag	32,006	-3,929	1,000	1,000	1,000
3_348m	IR4710	VIH Gag	34,454	0,583	0,044	0,033	0,058
4_622m	IR4710	VIH Gag					
5_665m	IR4710	VIH Gag	34,680	0,278	0,054	0,003	1,123
6_677m	IR4710	VIH Gag	32,347	-1,907	0,246	0,056	1,081

Table 5. Résultats génomiques préliminaires.

Présence d'ARNm Gag dans des cellules myéloïdes triées provenant de femmes TS VIH-1 infectées (2/3) et HESN (2/3).

Annexe 5

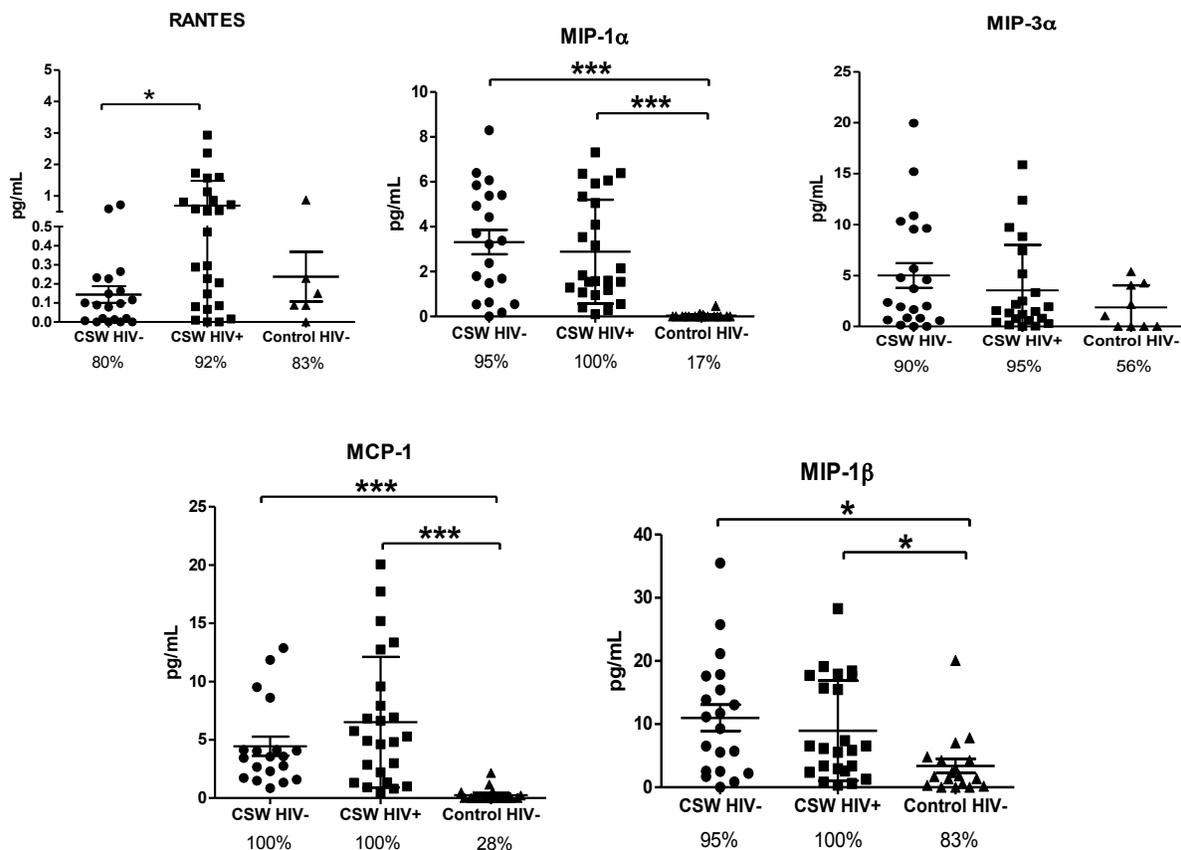


Figure 1. Chemokine distribution. CCL2 (MCP-1), MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α and CCL5 (RANTES) CVL levels according to the study groups.

CVL chemokine levels were quantified by ProcartaPlex immunoassay (Affimetrix/eBioscience). Sample measurements below the LDL for each assay were assigned a value of 0. Values are expressed in pg/mL. Chemokine levels were also dichotomized as detectable and undetectable in all analysis and are represented in percentage of producing women.

P-values for the comparison across all groups were calculated with the Kruskal-Wallis test. P-values for the comparison between two groups were calculated with a Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0001$.

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; MIP, Macrophage Inflammatory Proteins; MCP-1, Monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

Annexe 6

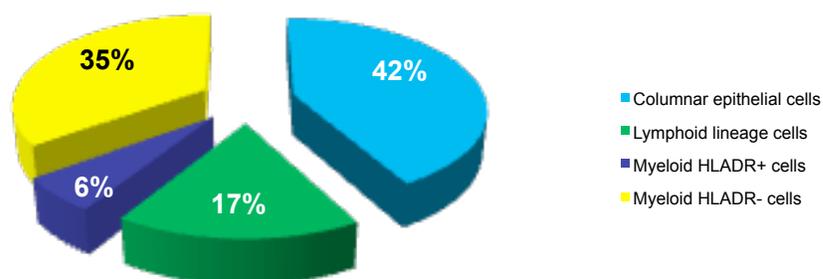


Figure 2. Distribution cellulaire (moyenne des fréquences relatives) dans un échantillon de cytobrosse par rapport aux populations cellulaires étudiées. Il est à noter que des résultats similaires ont été obtenus pour les femmes TS VIH-1 HESN et pour les femmes TS VIH-1 infectées de l'étude.

Annexe 7

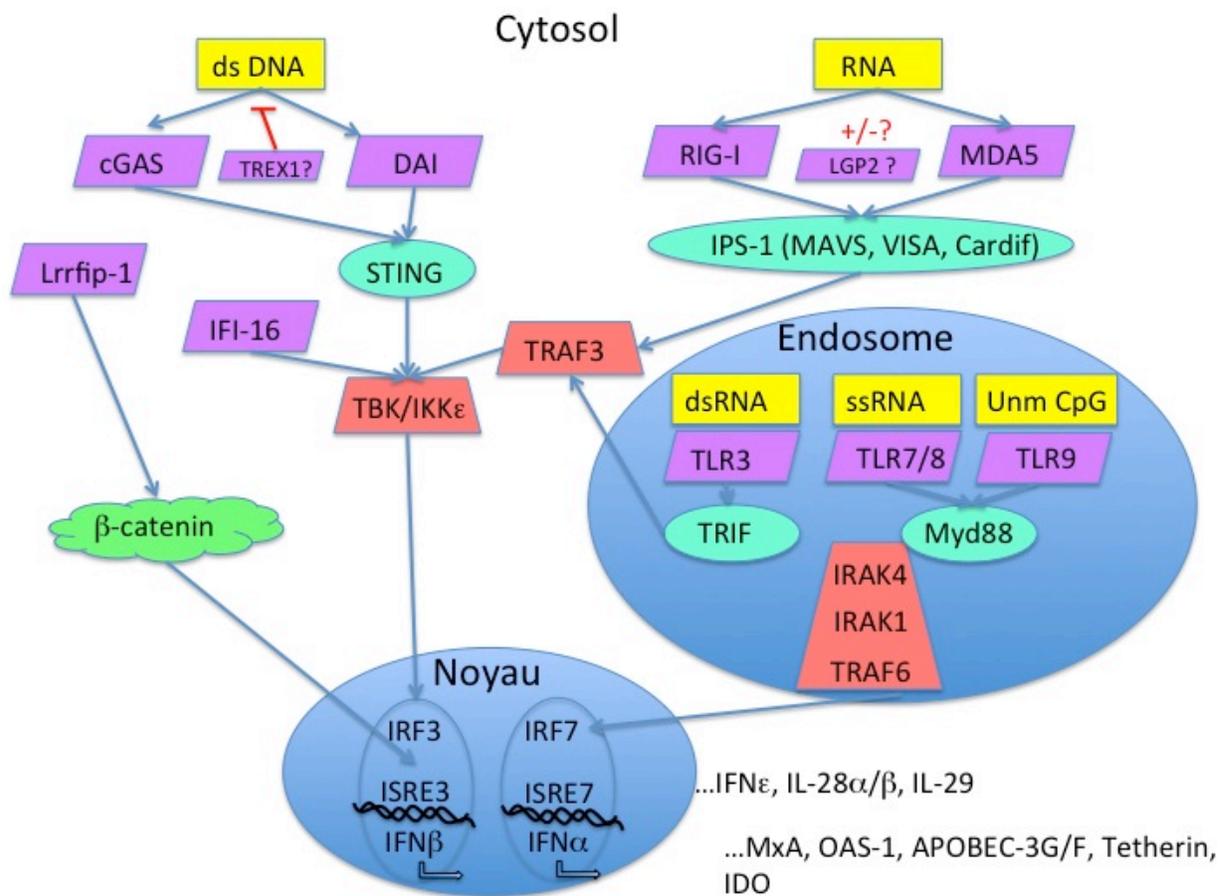


Figure 3. Les voies de signalisation menant à l'induction de l'expression des interférons de type I.

Annexe 8

Natural immunity to HIV: a delicate balance between strength and control

Johanne Poudrier*, Valérie Thibodeau and Michel Roger*

Laboratoire d'immunogénétique, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

*Johanne Poudrier and Michel Roger are senior co-authors

[REDACTED]

Financial support: This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (#MOP-119406) and the Réseau SIDA et Maladies Infectieuses, Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Abstract

Understanding how the mucosal immune system in the human female reproductive tract might prevent or facilitate HIV infection has important implications for the design of effective interventions. We and others have established cohorts of highly-exposed, HIV-seronegative individuals, such as HIV-uninfected commercial sex workers, who have remained HIV-negative after more than 5 years of active prostitution. Observations obtained in studies of such individuals, who represent a model of natural immunity to HIV, indicate that HIV resistance may be associated with the host's capacity to preserve systemic integrity by constraining immune activity and controlling inflammatory conditions at the mucosal point of entry. This likely necessitates the orchestration of balanced, first-line and adaptive immune responses.

Abstract word count: 112

Text word count: 3,207

Running title: Natural immunity to HIV

Key words: HIV transmission; female genital tract; mucosal immunity; susceptibility vs resistance

1-Introduction

At the end of 2010, 34 million people were living with HIV/AIDS world-wide. In that year, a total of 2.7 million people were infected by HIV, mostly through heterosexual intercourse, and 60% of new HIV infections affected women in sub-Saharan Africa [1]. Needless to say, the design of effective vaccines and microbicides to prevent HIV infection remains a global priority. High levels of anti-inflammatory and neutralizing proteins, such as antiproteases and HIV-specific immunoglobulins (Ig), are found in the genital mucosa of highly-exposed HIV-seronegative (HESN) individuals, such as HIV-uninfected, “resistant” commercial sex workers (CSWs) [2, 3]. This suggests that efforts to develop effective microbicides and vaccines should aim at mimicking and/or soliciting innate and adaptive immune responses, such as those seen in the context of natural immunity to HIV. From such a viewpoint, vaccine approaches to specifically-induced mucosal responses seem very promising. Indeed, genital IgA and IgG, elicited through combined intra-muscular and intra-nasal vaccination against HIV-gp41, delivered via virosome in non-human primates, prevented systemic HIV invasion by blocking transcytosis and by mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [4]. These animals lacked serum-neutralizing antibody activity, highlighting the role of effector antibodies at the mucosal point of entry, and their importance in preventing the dissemination of HIV infection [5]. In humans, the RV144 vaccine regimen (canarypox prime, HIV gp120 envelope (Env) glycoprotein boost) elicits protective responses, the nature of which remains to be defined in terms of generation and effector mechanisms [6]. Reduced rates of HIV acquisition without significant effects on initial viral loads or CD4 T-

cell counts have led to the hypothesis of a transient, protective B-cell response. Moreover, binding of IgG antibodies to variable regions 1 and 2 (V1,V2) of Env has been shown to be inversely correlated with HIV infection rates [7]. Unfortunately, mucosal samples were not collected during the RV144 trial to assess mucosal Env-specific Ig levels, which we predict may constitute better correlates of protection. Success in conceiving effective vaccines most likely relies on their capacity to establish rapid, first-line immune responses at the mucosal point of entry as well as long-term protection, which operates both at the mucosal and systemic levels.

A better understanding of the mechanisms of transmission and HIV-specific immune responses at the initial site of infection is therefore pivotal to the design of preventive strategies. Most observations relating to these events have been obtained with simian immunodeficiency virus (SIV) infection in non-human primates [reviewed in 8, 9]. In humans, findings in HESN individuals, such as HIV-uninfected CSWs, who represent a model of natural immunity to HIV, may thus yield important clues to the development of preventive approaches. As such, the current perspective on cumulative data, reported by us and others, supports the notion that HIV “resistance” in these highly-exposed CSWs may be associated with their capacity to control genital inflammatory conditions and recruitment of HIV target cells at the initial site of infection. This could be achieved by locally constraining immune activity to mucosal sites and preserving peripheral integrity, a process that likely involves genetic factors and orchestration of strong innate and adaptive immune responses.

2-Immunology of the female genital tract (FGT)

FGT immunology has been reviewed recently [10] and will only be summarized here briefly. The FGT is subdivided into 3 major areas presenting distinct phenotypic profiles: the non-sterile vagina and ecto-cervix colonized by commensal microflora, the sterile endometrium and fallopian tubes, and the endo-cervix in which sterility may be temporally related to menstrual cycle phase. Thus, FGT immunity is tightly regulated by a hormonal/inflammatory process throughout the menstrual cycle, having to deal with the pressure of procreation and microbial control. The innate immune compartment of the FGT involves the mucous lining of a tight epithelial cell (EC) barrier, stratified at the vaginal and ecto-cervical levels, as well as dendritic cells (DCs), Langherans cells (LCs), macrophages, natural killer (NK) cells and neutrophils, which confer protection through the production of antimicrobial agents, chemokines and cytokines [10, 11] (Figure 1). Control of flora and invading pathogens is modulated via pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors, which recognise specific common microbial/pathogen-associated molecular patterns. As such, genital ECs form an uninterrupted barrier between the lumen and underlying cells and express PRRs, such as TLR-1 to -9, indicating the potential to respond to a wide range of microbes/pathogens [10-14]. DCs also express a large spectrum of PRRs, and the interaction between ECs and sub-mucosal DCs likely modulates the maintenance of homeostatic balance between tolerance and inflammation in the FGT [10-15]. FGT-associated lymphoid organs are part of mucosal-associated lymphoid tissue, (MALT) which also includes gastrointestinal lymphoid tissue (GALT). Unlike GALT, the FGT does not contain M cells or organised lymphoid crypts or follicles in the sub-mucosa. Rather, the upper FGT contains unique lymphoid aggregates constituted of CD8⁺ T cells that

surround a central B cell core, which are encapsulated by macrophages [10] (Figure 1). Immunisation at the FGT level has been shown to elicit local CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL), IgG and IgA responses. Although immune induction mechanisms in the FGT remain poorly understood, it is likely that DCs migrate to FGT mucosal-associated lymphoid structures to induce first-line B cell responses and to regulate adaptive lymphocyte responses [10, 16-18]. Interestingly, detailed characterisation of the Ig repertoire of cervical and systemic B cells from a HESN individual in Kenya disclosed that site-specific responses occur with unique regulation of tolerance and recruitment into local memory or blast B cell compartments. Also, the infusion of systemic post-germinal center B cells to the human cervix seems to be a common event [19]. These findings suggest that cervical B cell populations largely contribute to protection against HIV, by producing first-line and mature mucosal HIV-specific IgG and IgA, which are correlates of control “resistance” to HIV infection in the FGT of HESN women. Understanding how B cell populations are recruited and maintained in the FGT is crucial for the design of preventive approaches, to block infection by HIV at its main point of entry.

3-HIV transmission in the FGT

Until now, the cascade of events leading to HIV infection after heterosexual transmission remains unclear. Several reports in humans and rhesus macaques suggest that LCs and DCs on mucosal surfaces are the earliest cell types to be exposed, and possibly infected by HIV or SIV, and migrate to the lamina propria and draining lymphoid tissues to facilitate transmission of the virus to permissive cells [reviewed in 8, 9, 20-23]. The most likely scenario has been proposed recently by the group of Haase [9, 24]. After genital

administration to macaques, SIV establishes foci of infection in the vaginal sub-mucosa within a matter of days through a scheme involving macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3 α) (CCL20) production by ECs and early recruitment of interferon-alpha (IFN- α) producing plasmacytoid DC (pDC) as well as DC and CD4⁺ T cell effectors, rapidly accessing draining lymph nodes and establishing systemic invasion by days 10-14. Recent studies with genital explants indicate that LCs can elaborate protrusions across the stratified epithelium into the lumen of the FGT to capture HIV mainly through the surface expression of langerin (CD207) [8, 20-23]. LCs may then enable HIV transmission to sub-mucosal DCs that express PRRs, such as DC-SIGN (CD209), and to CD4⁺ CCR5⁺ effector target T lymphocytes and/or migrate to draining lymphoid tissues. DCs are also thought to have the capacity to establish protrusions across the epithelium, enabling direct HIV transmission to permissive populations in the lamina propria or after their migration to draining lymphoid compartments [8, 20-23].

Although HIV does not productively infect ECs, it can be transcytosed, reaching sub-mucosal DC populations and effector target T lymphocytes in the lamina propria [25-30]. Furthermore, HIV likely facilitates its incursion through the genital epithelium by inducing a pro-inflammatory milieu that affects tight junction proteins and enhances microbial translocation [31]. HIV has also been shown to be internalized by FGT ECs via gp340, a scavenger receptor, subsequently promoting the production of pro-inflammatory thymic stromal lymphopoietin (TSLP) via TLR-7 signalling, which then activates DCs and promotes HIV transmission to CD4⁺ T cells [32, 33]. The galactosyl ceramide receptor induces HIV endocytosis in ECs and DCs, allowing transcytosis and transfer to susceptible CD4⁺ T cells [34].

HIV acquisition may depend on the level of inflammation and availability/permissiveness of target populations, such as activated CD4⁺ T cells expressing CCR5 and $\alpha 4\beta 7$ [35, 36]. In human peripheral blood, CD4⁺ T cells expressing CCR6⁺ are most permissive to HIV infection [37, 38]. In the gut, which represents a major viral reservoir, mucosal Th17 effectors are the main targets of HIV/SIV [39-42]. These mucosal Th17 cells are mostly $\alpha 4\beta 7^+$ CD103⁺, express ROR γ t⁺ and have been reported to require factors, such as transforming growth factor-beta (TGF- β), interleukin (IL)-1, IL-6, IL-21 and IL-23, for their differentiation [43]. They express CCR6, a major ligand of MIP-3 α , which is mainly secreted by mucosal ECs and is known to also attract immature LCs and DCs [44, 45]. It has been determined that homeostatic balance between mucosal T effector vs T regulatory (Treg) populations in the gut is modulated by EC and DC cross-talk, and is highly influenced by factors, such as retinoic acid (RA) and TGF- β [46, 47] (Figure 1). TGF- β is also known to influence FGT integrity [48, 49], and RA is involved in the regulation of ovarian function and FGT immune status by its modulatory effect on sexual hormones [50]. Also, oestrogen can up-regulate RA and TGF- β production and signalling in the human endometrium [51, 52].

Thus, ECs and DCs appear to play a critical role in HIV infection by sensing through PRRs and orchestrating the dynamics of cellular populations, inflammatory conditions and adaptive immune responses. The fact that TLR expression and responsiveness are increased in viraemic HIV infections suggests that TLR modulation is likely to influence HIV infection [53]. From this viewpoint, modulation of inflammatory responses through TLR agonists is a promising therapeutic approach in diseases with an imbalance in T cell responses, such as allergy and asthma, and could be seen as impacting inflammatory conditions and immune status in the FGT, the mucosal point of entry for the virus.

4-Non-pathogenic SIV infections provide novel insights into the pathogenesis of human HIV infection

Similar to pathogenic HIV and SIV infections in susceptible hosts, SIV infections in the natural host Sooty mangabeys result in high viral replication and massive depletion of gut mucosal effector CD4⁺ T cells [54]. However, a major distinction from pathogenic infection is the rapidly-developing anti-inflammatory milieu that prevents chronic activation, apoptosis and proliferation of T cells in SIV-infected Sooty mangabeys. This contributes to the maintenance of mucosal barrier integrity, preventing microbial translocation from the gut, which is the hallmark of pathogenic infections [55]. The control of disease progression appears to be linked to better management of aberrant immune activation caused by SIV infection. Indeed, the early onset of anti-inflammatory IL-10 production and Treg activity seems to be favoured in SIV non-pathogenic infections [54]. Furthermore, it was recently demonstrated that Sooty mangabeys generated less Th17 effector target cells than highly-susceptible macaques [40]. Importantly, the capacity to manage inflammatory conditions in Sooty mangabeys is associated with a low type I IFN gene profile. The latter appears to be linked to genetic polymorphisms in the type I IFN regulatory factor-7 (IRF-7) gene involved in the regulation of IFN production downstream of TLR-7 and -9 signalling, which are intracellular ligands for lentiviral ssRNA viruses, such as SIV and HIV, and CpG DNA, respectively [56]. Moreover, early blocking of MIP-3a and pro-inflammatory cytokines in the FGT of SIV-susceptible macaques prevented cellular recruitment, establishment of an inflammatory milieu, and infection despite repeated intra-vaginal exposure to high SIV doses [24]. Therefore, low inflammatory conditions are beneficial to the host in the context of HIV/SIV, and we believe that preventive approaches, such as microbicides, should be designed to induce and maintain a low inflammatory milieu.

5-Factors associated with susceptibility/resistance to HIV infection

The number of sexual partners and failure to use condoms are the best documented behavioural risk factors for sexual HIV transmission. Among the most compelling biological

risk factors are the presence of vaginosis and sexually-transmitted infections, high viral load and low CD4⁺ T lymphocyte counts in infectious contact, and possibly viral virulence and tropism [reviewed in 57]. Host factors associated with susceptibility/resistance to HIV infection and disease progression (Table 1) have been shown to involve qualitative and quantitative modulation of mucosal innate factors, such as defensins, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and other antiproteases, as well as variations in relative DC and NK cell frequencies and activities [2, 58] (Figure 1). NK cells represent a critical component of the host innate immune response against viral infections. The killing inhibitory receptor (KIR)3DL1/S1 locus has been linked with both slow progression to AIDS and resistance to HIV infection in a high-risk cohort of i.v. drug users from Montreal [59], and the KIR2DL2/DL3 locus has also been associated with resistance to HIV infection among African CSWs [60]. Functional modulation of NK cell responses (IFN- γ), NK activation (CD69) and degranulation (CD107a) markers has been correlated with resistance to HIV infection in several independent cohorts of HESN individuals [58]. Human leukocyte antigen (HLA) alleles, which are KIR ligands, are also associated with susceptibility/resistance to HIV infection and disease progression [61-65]. Other factors include IRF-1 [66], TLR-9 [67] and chemokine receptor/ligand polymorphisms, such as CCR5 [68-76], CCR2b [77, 78], CCL3 (MIP-1 α) [79] and CCL4 (MIP-1 β) [80]. Viral restriction factors, such as apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like (APOBEC) 3G, tripartite motif (TRIM) 5 α , tetherin, and sterile alpha motif and HD domain 1 (SAMHD1), exert anti-HIV activity. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) may also contribute to HIV resistance [81, 82]. Indeed, relatively low levels of LEDGF/p75 occurred in blood CD4⁺ T lymphocytes of HESN subjects enrolled in a Senegalese cohort of HIV-serodiscordant couples [83].

In a prospective cohort study of female CSWs in Nairobi, Kenya, over a 13-year period, a small group of women were found to be persistently IgG-seronegative and resistant to infection [84]. HIV resistance in this cohort has been associated with factors, such as trappin-2/elafin [85-87], serpins and cystatins in genital samples [88], certain HLA class I and II alleles [62], IRF-1 polymorphisms [66] and HIV-specific immune responses. Indeed, HIV-specific CD4⁺ T cell and CD8⁺ CTL responses as well as cross-clade neutralizing IgA have been encountered in both the blood and genital tract of resistant women [2, 89-95]. HIV-resistant CSWs from the Kenyan cohort had increased cervical CD4⁺ T cell counts compared to HIV-infected CSWs [93]. Moreover, CD4⁺ T cells in HIV-resistant women had a low activation profile but a much greater ability to proliferate in response to HIV p24 peptides than HIV-infected CSWs [94]. Also, in resistant women, higher levels of HIV-specific CTLs were noted in the cervix than in blood [90]. Recent studies have demonstrated that the quality of T cell responses in the context of HIV may be a major determinant of disease progression [96-98]. In a cohort of HESN women from the Ivory Coast, HIV-specific mucosal IgA was shown to block viral transcytosis through tight epithelial barriers [99, 100]. Thus, HIV-specific immune responses in CSWs prevail in the FGT and may be important in preventing heterosexual HIV infection. Interestingly, there is a clear indication of clustering of both resistance and HIV-specific CTL responses among HIV-resistant CSWs, suggesting that genetic factors could be involved in “protective” immune responses [101]. However, the durability and protective efficacy of CTL responses in these subjects are not absolute. Late seroconversion occurred in some HIV-resistant CSWs despite HIV-specific CTL responses [102]. Seroconversion happened in the absence of detectable CTL escape mutations and was related to the waning of HIV-specific CD8⁺ CTL responses due to reduced sexual activity and

thus renewed antigenic exposure. These findings suggest that production and maintenance of HIV-specific effector responses and low-level immune activation may depend on genetically-determined genital HIV-specific immune responses induced upon initial contact with HIV and low ongoing viral exposure.

The recent finding that the frequency of immunosuppressive Treg lymphocytes was increased in the blood of HIV-resistant women [103] is consistent with the notion that the host's capacity to control and/or maintain low levels of immune activation may contribute to protection against infection. According to this view, in a cohort of highly HIV-exposed Beninese CSWs, we found that HIV-uninfected CSWs had significantly lower genital levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and IFN- γ than HIV-infected CSWs [104] (Table 2). These observations suggest that the capacity to maintain a low-key inflammatory profile at the initial site of exposure is associated with protection against HIV infection in HESN individuals. In contrast, serum IL-2, IL-10 and TNF- α levels were significantly higher in HIV-uninfected CSWs than in HIV-infected CSWs. Importantly, when assessing the serum effector (IL-6) to regulatory (IL-10) ratio, we determined that it was lower in HIV-uninfected CSWs (0.9) than in HIV-infected CSWs (1.5). Moreover, the relatively normal cytokine levels found in the serum of HIV-uninfected CSWs (similar to non-exposed women from the general population) may be reflective of their capacity to maintain integrity of the systemic immune compartment by stopping HIV dissemination beyond the genital tract. In contrast, the low levels of cytokines observed in the serum of HIV-infected CSWs could reflect active recruitment of cytokine-producing cells to the genital mucosa in response to HIV infection. In this respect, HIV-infected CSWs had significantly higher blood and genital levels of monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3) and monokine induced by gamma interferon (MIG) compared to both HIV-uninfected CSW and non-CSW groups [105]. In the HIV-infected group, MCP-3 and MIG levels were significantly higher in the genital mucosa than in blood, indicating a chemotactic gradient favouring the recruitment of immune cells contributing to the mucosal inflammatory response observed in these women. However, HIV-uninfected CSWs had significantly higher MIP-1a levels in the genital mucosa than both HIV-infected CSWs and HIV-uninfected non-CSW women. Moreover, serum MIP-1a (CCL3) and MIP-1b (CCL4)

levels were higher in HIV-uninfected CSWs than the other groups. Interestingly, MIP-1a and MIP-1b are natural ligands of the HIV co-receptor CCR5, and high copy numbers of CCL3 and CCL4 genes have been previously associated with lower risk of HIV infection [79, 80], possibly by competing/blocking viral entry mediated by the co-receptor CCR5 [9]. Finally, recent evidence indicates that local microflora may also play a pivotal role in shaping host immune responses [2, 106], and thus may be a potential ally in the modulation of a mucosal immune compartment favourable to the maintenance of low inflammatory conditions. Thus, the immune events involved in natural immunity “resistance” to HIV may share some similarities with those associated with the control of the mucosal commensal microflora, which are thought to involve mucosal Igs and balanced Treg/Teffector responses in absence of inflammation, and which cellular niches are maintained by repeated antigenic exposure, such as likely encountered by HESN individuals.

6-Conclusion

Overall, resistance in the context of HIV infection may be associated with the host’s capacity to induce a strong innate and HIV-specific immune response and, at the same time, control/maintain low inflammatory conditions and fewer HIV target cells at the initial exposure site (Figure 1). Understanding how the mucosal immune system in the human FGT might prevent or facilitate HIV infection has important implications for the design of effective interventions, and may help develop strategies to modulate mucosal inflammatory conditions, to establish quick, long-lasting, first-line mucosal defence against HIV.

Acknowledgements

We are thankful to Mr. Christian Charbonneau for his graphic arts expertise and to Mr. Ovid Da Silva for medical editing.

References

- [1] http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm
- [2] J.J. Schellenberg and F.A. Plummer, “The microbiological context of HIV resistance: vaginal microbiota and mucosal inflammation at the viral point of entry”, *International Journal of Inflammation*, Vol. 2012, Article ID 131243, 10 pages doi:10.1155/2012/131243.
- [3] S. Moir, and A.S. Fauci, “B cells in HIV infection and disease”, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 9, pp. 235-245, 2009.
- [4] M. Bomsel, D. Tudor, A.S. Drillet et al., “Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges”, *Immunity*, Vol. 34, pp. 269-280, 2011.
- [5] M.J. McElrath, “Standing guard at the mucosa”, *Immunity*, Vol. 34, pp. 146-148, 2011.
- [6] G.D. Tomaras, and B.F. Haynes, “Strategies for eliciting HIV inhibitory antibodies”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 5, pp. 421-427, 2010.
- [7] B.F. Haynes, P.B. Gilbert, M.J. McElrath et al., “Immune-correlates analysis of an HIV vaccine efficacy trial”, *New England Journal of Medicine*, Vol. 366, pp.1275-1286, 2012.
- [8] F. Hladik, and M.J. McElrath, “Setting the stage: host invasion by HIV”, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 8, pp. 447-457, 2008.
- [9] A.T. Haase, “Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions”, *Annual Review of Medicine*, Vol. 62, pp. 127-139, 2011.

- [10] D.K. Hickey, M.V. Patel, J.V. Fahey, and C.R. Wira, "Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections", *Journal of Reproductive Immunology*, Vol. 88, pp. 185-194, 2011.
- [11] A.J. Quayle, "The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells", *Journal of Reproductive Immunology*, Vol. 57, pp. 61-79, 2002.
- [12] A.W. Horne, S.J. Stock, and A.E. King, "Innate immunity and disorders of the female reproductive tract", *Reproduction*, Vol. 135, pp. 739-749, 2008.
- [13] R.T. Trifonova, G.F., and R.N. Fichorova, "Polyanionic microbicides modify Toll-like receptor-mediated cervicovaginal immune responses", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53, pp. 1490-1500, 2009.
- [14] S.C. Gribar, W.M. Richardson, C.P. Sodhi, and D.J. Hackam, "No longer an innocent bystander: epithelial Toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation", *Molecular Medicine*, Vol. 14, pp. 645-659, 2008.
- [15] J. denDunnen, S.I. Gringhuis, and T.B. Geijtenbeek, "Innate signalling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses", *Cancer Immunology and Immunotherapy*, Vol. 58, pp. 1149-1157, 2009.
- [16] P. Pala, V.R. Gomez-Roman, J. Gilmour, and P. Kaleebu, "An African perspective on mucosal immunity and HIV", *Mucosal Immunology*, Vol. 2, pp. 300-314, 2009.
- [17] B.L. Shacklett, "Immune responses to HIV and SIV in mucosal tissues: location, location, location", *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 5, pp. 128-134, 2010.

- [18] A. Cerutti, I. Puga, and M. Cols, “Innate control of B cell responses”, *Trends in Immunology*, Vol. 32, pp. 202-211, 2011.
- [19] R.G. Gaudet, F. Breden, F. Plummer, and J.D. Berry, “Molecular characterization of the cervical and systemic B-cell repertoire: unique, yet overlapping, immune compartments of an HIV resistant individual”, *MAbs*, Vol. 3, pp. 181-191, 2011.
- [20] N. Derby, E. Martinelli, and M. Robbiani, “Myeloid dendritic cells in HIV infection”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 6, pp. 379-384, 2011.
- [21] M. van der Vlist, A.M.G. van der Aar, S.I. Gringhuis, and T.B.H. Geijtenbeek, “Innate signalling in HIV infection of dendritic cells”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 6, pp. 348-352, 2011.
- [22] A. Smed-Sørensen, and K. Loré, “Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 6, pp. 405-410, 2011.
- [23] F. Blanchet, A. Moris, J.P. Mitchell, and V. Piguet, “A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4R T cells”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 6, pp. 391-397, 2011.
- [24] Q. Li, J.D. [Estes](#), P.M. [Schlievert](#) et al., “Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission”, *Nature*, Vol. 458, pp. 1034-1038, 2009.
- [25] M. Bouschbacher, M. Bomsel, E. Verronèse et al., “Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa”, *AIDS*, Vol. 22, pp. 1257-1266, 2008.
- [26] C.H. Fox, D. Kotler, A. Tierney et al., “Detection of HIV RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 159, pp. 467-471, 1989.

- [27] S.N. Asin, M.W. Fanger, D. Wildt-Perinic et al., “Transmission of HIV by primary human uterine epithelial cells and stromal fibroblasts”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 190, pp. 236-245, 2004.
- [28] H. Hocini, P. Becquart, H. Bouhlal et al., “Active and selective transcytosis of cell free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells”, *Journal of Virology*, Vol. 75, pp. 5370-5374, 2001.
- [29] C.S. Dezzutti, P.C. Guenther, J.E. [Cummins Jr.](#) et al., “Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 183, pp. 1204-1213, 2001.
- [30] Z. Wu, Z. Chen, and D.M. Phillips, “Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ cells: implications for mechanisms of sexual transmission”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 188, pp. 1473-1482, 2003.
- [31] A. Nazli, O. Chan, W.N. Dobson-Belaire et al., “Exposure to HIV directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation”, *PLoS Pathogens*, 6, 1000852, 2010.
- [32] D. Fontenot, H. Hea, S. Hanabuchia et al., “TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4 T cells”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 106, pp. 16776-16781, 2009.
- [33] D. Fontenot, “The role of mucosal epithelial cells in HIV infection”, *UT Graduate School of Biomedical Sciences at Houston: Dissertations and Theses*. Paper 28. http://digitalcommons.library.tmc.edu/utgsbs_dissertations/28, 2010.

- [34] H. Yu, D. Tudor, A. Alfsen et al., “Peptide P5 (residues 628-683), comprising the entire membrane proximal region of HIV gp41 and its calcium-binding site, is a potent inhibitor of HIV infection”, *Retrovirology*, Vol 5, pp. 1-12, 2008.
- [35] L.R. McKinnon, and R. Kaul, “Quality and quantity: mucosal CD4+ T cells and HIV susceptibility”, *Current Opinion in HIV and AIDS*, Vol. 7, pp. 195-202, 2012.
- [36] L.R. McKinnon, B. Nyanga, D. Chege et al., “Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility”, *Journal of Immunology*, Vol. 187, pp. 6032-6042, 2011.
- [37] A. Gosselin, P. Monteiro, N. Chomont et al., “Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV infection”, *Journal of Immunology*, Vol. 184, pp. 1604-1616, 2010.
- [38] P. Monteiro, A. Gosselin, V.S. Wacleche et al., “Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of Integrin $\beta 7$ ”, *Journal of Immunology*, Vol. 186, pp. 4618-4630, 2011.
- [39] M. Kader, X. Wang, M. Piatak, J. Lifson, et al., “ $\alpha 4 + \beta 7$ hiCD4 memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection”, *Mucosal Immunology*, Vol. 2, pp. 439-449, 2009.
- [40] J.M. Brenchley, M. Paiardini, K.S. Knox et al., “Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and non-pathogenic lentiviral infections”, *Blood*, Vol. 112, pp. 2826-2835, 2008.
- [41] D. Favre, S. Lederer, B. Kanwar et al., “Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection”, *PloS Pathogens*, Vol. 5, e1000295, 2009.

- [42] J. Arthos, C. Cicala, E. Martinelli et al., “HIV envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells”, *Nature Immunology*, Vol. 9, pp. 301-309, 2008.
- [43] N. Manel, D. Unutmaz, and D. R. Littman, “The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma”, *Nature Immunology*, Vol. 9, pp. 641-649, 2008.
- [44] E. Schutyser, S. Struyf, and J. Van Damme. “The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6”, *Cytokine Growth Factor Reviews*, Vol. 14, pp. 409-426, 2003.
- [45] M. Cremel, W. Berlier, H. Hamzeh et al., “Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement of Langherans cell precursor attraction”, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 78, pp. 158-166, 2005.
- [46] I.D. Iliev, E. Mileti, G. Matteoli et al., “Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning”, *Mucosal Immunology*, Vol. 2, pp. 340-350, 2009.
- [47] M. Rescigno, and A. Disabatino, “Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease”, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 119, pp. 2441-2450, 2009.
- [48] Q. Li, J.E. Agno, M.A. Edson et al. “Transforming growth factor β receptor type 1 is essential for female reproductive tract integrity and function”, *PLoS Genet* Vol. 7, e1002320, 2011.

[49] D.J. Sharkey, A.M. Macpherson, K.P. Tremellen et al., “TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells”, *Journal of Immunology*, Vol.189, pp. 1024-1035, 2012.

[50] Y. Irnidayanti, “Effect of retinoic acid on fetus reproductive organ mice (*Mus musculus*) SwissWebster”, *International Journal of Medical and Biological Sciences*, Vol. 6, pp. 223-225, 2012.

[51] L. Ei Deng, G.L. Shipley, D.S. Loose-Mitchell et al., “Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium”, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 88, pp. 2157-2163, 2003.

[52] T. Takahashi, B. Eitzman, N.L. Bossert et al., “Transforming growth factors beta 1, beta 2, and beta 3 messenger RNA and protein expression in mouse uterus and vagina during estrogen-induced growth: a comparison to other estrogen-regulated genes”, *Cell Growth Differentiation*, Vol. 5, No. 9, pp. 919-935, 1994.

[53] R.T. Lester, X.D. Yao, T.B. Ball et al., “Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV infection”, *AIDS*, Vol. 22, pp. 685-694, 2008.

[54] I. Pandrea, D.L. Sodora, G. Silvestri, and C. Apetrei, “Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts”, *Trends in Immunology*, Vol. 29, pp. 419-428, 2008.

[55] J.M. Brenchley, D.A. Price, T.W. Schacker et al., “Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection”, *Nature Medicine*, Vol. 12, pp. 1365-1371, 2006.

[56] J.N. Mandl, A.P. Barry, T.H. Vanderford et al., “Divergent TLR7 and TLR9 signalling and type I interferon production distinguish pathogenic and non-pathogenic AIDS virus infections”, *Nature Medicine*, Vol. 14, pp. 1077-1087, 2008.

[57] S.H. Vermund, P.B. Tabereaux, and R. Kaslow, *Textbook of AIDS Medicine*, pp. 101-109, 1999.

[58] C. Tomescu, S. Abdulhaqq and L.J. Montaner, “Evidence for the innate immune response as a correlate of protection in human immunodeficiency virus (HIV)-1 highly exposed seronegative subjects (HESN)”, *Clinical and Experimental Immunology*, Vol. 164, pp. 158-169, 2011.

[59] S. Boulet, M. Kleymana, J.Y.J. Kima et al., “A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-BM57 is associated with a reduced risk of HIV infection”, *AIDS*, Vol. 22, pp.1487-1491, 2008.

[60] W. Jennes, S. Verheyden, C. Demanet et al., “Resistance to HIV infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands”, *Journal of Immunology*, Vol. 177, pp. 6588-6592, 2006.

[61] C. Matte, J. Lajoie, J. Lacaille et al., “Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV infection in African women”, *AIDS*, Vol. 18, pp. 427-431, 2004.

[62] K.S. MacDonald, K.R. Fowke, J. Kimani et al., “Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 181, pp. 1581-1589, 2000.

[63] S.F. Lockett, J.R. Robertson, R.P. Brettelle et al., “Mismatched human leukocyte antigen alleles protect against heterosexual HIV transmission”, [*Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*](#), Vol. 27, pp. 277-280, 2001.

- [64] C. Liu, M. Carrington, R.A. Kaslow et al., “Association of polymorphisms in human leukocyte antigen class I and transporter associated with antigen processing genes with resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 187, pp. 1404-1410, 2003.
- [65] M.T. Dorak, J. Tang, A. Penman-Aguilar et al., “Transmission of HIV and HLA-B allele-sharing within serodiscordant heterosexual Zambian couples”, *Lancet*, Vol. 363, pp. 2137-2139, 2004.
- [66] T.B. Ball, H. Ji, J. Kimani et al., “Polymorphisms in IRF-1 associated with resistance to HIV infection in highly exposed uninfected Kenyan sex workers”, *AIDS*, Vol. 21, pp. 1091-1101, 2007.
- [67] P.Y. Bochud, M. Hersberger, P. Taffé et al., “Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV infection”, *AIDS*, Vol. 21, pp. 441-446, 2007.
- [68] M. Dean, M. Carrington, C. Winkler et al., “Genetic restriction of HIV infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study”, *Science*, Vol. 273, pp. 1856-1862, 1996.
- [69] Y. Huang, W.A. Paxton, S.M. Wolinsky et al., “The role of a mutant CCR5 allele in HIV transmission and disease progression”, *Nature Medicine*, Vol. 2, pp. 1240-1243, 1996.
- [70] J. Eugen-Olsen, A.K. Iversen, P. Garred et al., “Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals”, *AIDS*, Vol. 11, pp. 305-310, 1997.

[71] A.M. de Roda Husman, M. Koot, M. Cornelissen et al., “Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV infection”, *Annals of Internal Medicine*, Vol. 127, pp. 882-890, 1997.

[72] L. Meyer, M. Magierowska, J.B. Hubert et al., “Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV disease progression: relationship with viral load. The SEROCO study group”, *AIDS*, Vol. 11, pp. F73-F78, 1997.

[73] P.A. Zimmerman, A. Buckler-White, G. Alkhatib et al., “Inherited resistance to HIV conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk”, *Molecular Medicine*, Vol. 3, pp. 23-36, 1997.

[74] N.L. Michael, G. Chang, L.G. Louie et al., “The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV transmission and disease progression”, *Nature Medicine*, Vol. 3, pp. 338-340, 1997.

[75] M. Misrahi, J.P. Teglas, N. N'Go et al., “CCR5 chemokine receptor variant in HIV mother-to-child transmission and disease progression in children. French pediatric HIV infection study group”, *Journal of the American Medical Association*, Vol. 279, pp. 277-280, 1998.

[76] S.S. Bakshi, L. Zhang, D. Ho et al., “Distribution of CCR5delta32 in human immunodeficiency virus-infected children and its relationship to disease course”, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Vol. 5, pp. 38-40, 1998.

[77] M.W. Smith, M. Dean, M. Carrington et al., “Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV 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*, Vol. 277, pp. 959-965, 1997.

- [78] L.G. Kostrikis, Y. Huang, J.P. Moore et al., “A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation”, *Nature Medicine* Vol. 4, pp. 350-353, 1998.
- [79] E. Gonzalez, H. Kulkarni, H. Bolivar et al., “The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV/AIDS susceptibility”, *Science*, Vol. 307, pp. 1434-1440, 2005.
- [80] R. Colobran, P. Adreani, Y. Ashhab et al., “Multiple products derived from two CCL4 loci: high incidence of a new polymorphism in HIV+ patients”, *Journal of Immunology*, Vol. 174, pp. 5655-5664, 2005.
- [81] M.H. Malim, and P. D. Bieniasz, “HIV restriction factors and mechanisms of evasion”, *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine* Vol. 2, a006940, 2012.
- [82] N. Laguette, and M. Benkirane, “How Samhd1 changes our view of viral restriction”, *Trends in Immunology*, Vol. 33, pp. 26-33, 2012.
- [83] K. Mous, W. Jennes, M. Camara et al., “Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals”, *PLoS One*, Vol. 7, p. e33934. doi:10.1371/journal.pone.0033934, 2012.
- [84] K.R. Fowke, N.J. Nagelkerke, J. Kimani et al., “Resistance to HIV infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya”, *Lancet*, Vol. 348, pp. 1347-1351, 1996.
- [85] M. Ghosh, Z. Shen, J.V. Fahey et al., “Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract”, *Immunology*, Vol. 129, pp. 207-219, 2009.

- [86] M. Ghosh, J.V. Fahey, Z. Shen et al., “Anti-HIV activity in cervical-vaginal secretions from HIV-positive and -negative women correlate with innate antimicrobial levels and IgG antibodies”, *PLoS One*, Vol. 5, p. e11366, 2010.
- [87] A.G. Drannik, K. Nag, X.D. Yao et al., “Anti-HIV activity of elafin is more potent than its precursor’s, trappin-2, in genital epithelial cells”, *Journal of Virology*, Vol. 86, pp. 4599-4610, 2012.
- [88] A. Burgener, S. Rahman, R. Ahmad et al., “Comprehensive proteomic study identifies serpin and cystatin antiproteases as novel correlates of HIV resistance in the cervicovaginal mucosa of female sex workers”, *Journal of Proteome Research*, Vol. 19, pp. 5139-5149, 2011.
- [89] S.L. Rowland-Jones, T. Dong, K.R. Fowke et al., “Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi”, *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 102, pp. 1758-1765, 1998.
- [90] R. Kaul, F.A. Plummer, J. Kimani et al., “HIV-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-resistant prostitutes in Nairobi”, *Journal of Immunology*, Vol. 164, pp. 1602-1611, 2000.
- [91] R. Kaul, D. Trabattoni, J.J. Bwayo et al., “HIV-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-resistant Kenyan sex workers”, *AIDS*, Vol. 13, No. 1, pp. 23-29, 1999.
- [92] K.R. Fowke, R. Kaul, K.L. Rosenthal et al., “HIV-specific cellular immune responses among HIV-resistant sex workers”, *Immunology and Cell Biology*, Vol. 78, pp. 586-595, 2000.

- [93] S.M. Iqbal, T.B. Ball, J. Kimani et al., “Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-resistant Kenyan commercial sex workers”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 192, pp. 728-738, 2005.
- [94] J.B. Alimonti, S.A. Koesters, J. Kimani et al., “CD4+ T cell responses in HIV-exposed seronegative women are qualitatively distinct from those in HIV-infected women”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 191, pp. 20-24, 2005.
- [95] C. Devito, J. Hinkula, R. Kaul et al., “Cross-clade HIV-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-exposed, persistently seronegative subjects”, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, Vol. 30, pp. 413-420, 2002.
- [96] J.R. Almeida, D.A. Price, L. Papagno et al., “Superior control of HIV replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover”, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 204, pp. 2473-2485, 2007.
- [97] M.R. Betts, M.C. Nason, S.M. West et al., “HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells”, *Blood*, Vol. 107, pp. 4781-4789, 2006.
- [98] F. Pereyra, M.M. Addo, D.E. Kaufmann et al., “Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 197, pp. 563-571, 2008.
- [99] L. Bélec, P.D. Ghys, H. Hocini et al., “Cervicovaginal secretory antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV) that block viral transcytosis through tight epithelial barriers in highly exposed HIV-seronegative African women”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 184, pp. 1412-1422, 2001.
- [100] H. Hocini, and M. Bomsel, “Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins”, *Journal of Infectious Disease*, Vol. 179, Suppl. 3, pp. S448-S453, 1999.

- [101] F.A. Plummer, T.B. Ball, J. Kimani, and K.R. Fowke, "Resistance to HIV infection among highly exposed sex workers in Nairobi: what mediates protection and why does it develop?", *Immunology Letters*, Vol. 66, pp. 27-34, 1999.
- [102] R. Kaul, S.L. Rowland-Jones, J. Kimani, and T. Dong, "Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses", *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 107, pp. 341-349, 2001.
- [103] C.M. Card, P.J. McLaren, C. Wachihi et al., "Decreased immune activation in resistance to HIV infection is associated with an elevated frequency of CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells", *Journal of Infectious Disease*, Vol. 199, pp. 1318-1322, 2009.
- [104] J. Lajoie, J. Poudrier, M. Massinga-Loembe et al., "Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-infected commercial sex workers in Benin", *Mucosal Immunology*, Vol. 1, pp. 309-316, 2008.
- [105] J. Lajoie, J. Poudrier, M. Massinga Loembe et al., "Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV infection in women from Benin", *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 30, pp. 90-98, 2010.
- [106] N. Ahmed, T. Hayashi, A. Hasegawa et al., "Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating Toll-like receptor 4", *Journal of General Virology*, Vol. 91, pp. 2804-2813, 2010.

Table 1 Genetic and genital mucosa host factors associated with resistance to HIV-1 infection in several HESN cohorts

HIV-resistant host factors	
Genetic	Genital mucosa
KIR3D L1/S1 [59]	Protease inhibitors (SLPI, lactoferrin, serpins, cystatins, trappin-
KIR2D L2/L3 [60]	2/elafin) [2, 85-88]
HLA class 1 alleles [61-65]	Defensins (α , β) [2]
IRF-1 [66]	CC- β chemokines [9, 79, 80]
TLR 9 [67]	APOBEC3G, TRIM5 α , tetherin, SAMHD1, LEDGF/p75 [81-83]
CCR5 Δ 32 [68-76]	Elevated DC and NK cell frequencies/activities [58]
CCR2b [77, 78]	CD4+- and CD8+-specific immune responses and reduced T cell
MIP-1 α [79]	activation [2, 89-98]
MIP-1 β [80]	Cross-clade neutralizing specific IgA (transcytosis inhibition and
	ADCC activities) [2, 89-95, 99, 100]

ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; APOBEC, apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DC, dendritic cell; HESN, highly-exposed HIV-seronegative; HLA, human leucocyte antigen; IRF, interferon-regulating factor; KIR, killing inhibitory receptor; LEDGF, Lens epithelium-derived growth factor; MIP, macrophage inflammatory protein; NK, natural killer; SAMHD, sterile alpha motif and HD domain; SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor; TLR, Toll-like receptor; TRIM, tripartite motif.

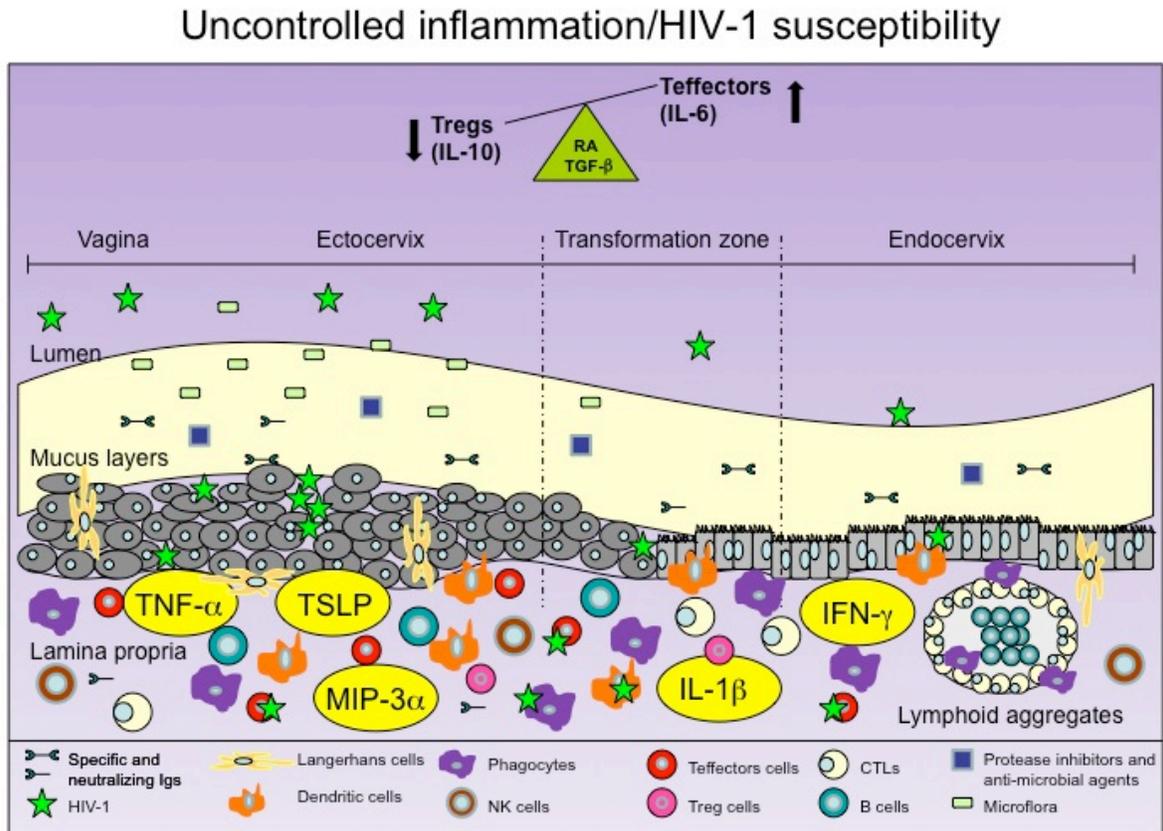
Table 2 Cytokines and chemokines significantly associated with resistance to HIV-1 infection in the Beninese HIV-1-uninfected and infected CSW cohort

Cytokines/chemokines	HIV-resistant CSWs	HIV-infected CSWs
Genital mucosa		
TNF- α	↓	↑
IFN- γ	↓	↑
MIP-1 α	↑↑	↓
MCP-3	↓	↑↑
MIG	↓	↑↑
Blood		
IL-2	↑	↓
IL-10	↑	↓
TNF- α	↑	↓
MIP-1 α	↑	↓
MIP-1 β	↑	↓
MCP-3	↓	↑
MIG	↓	↑

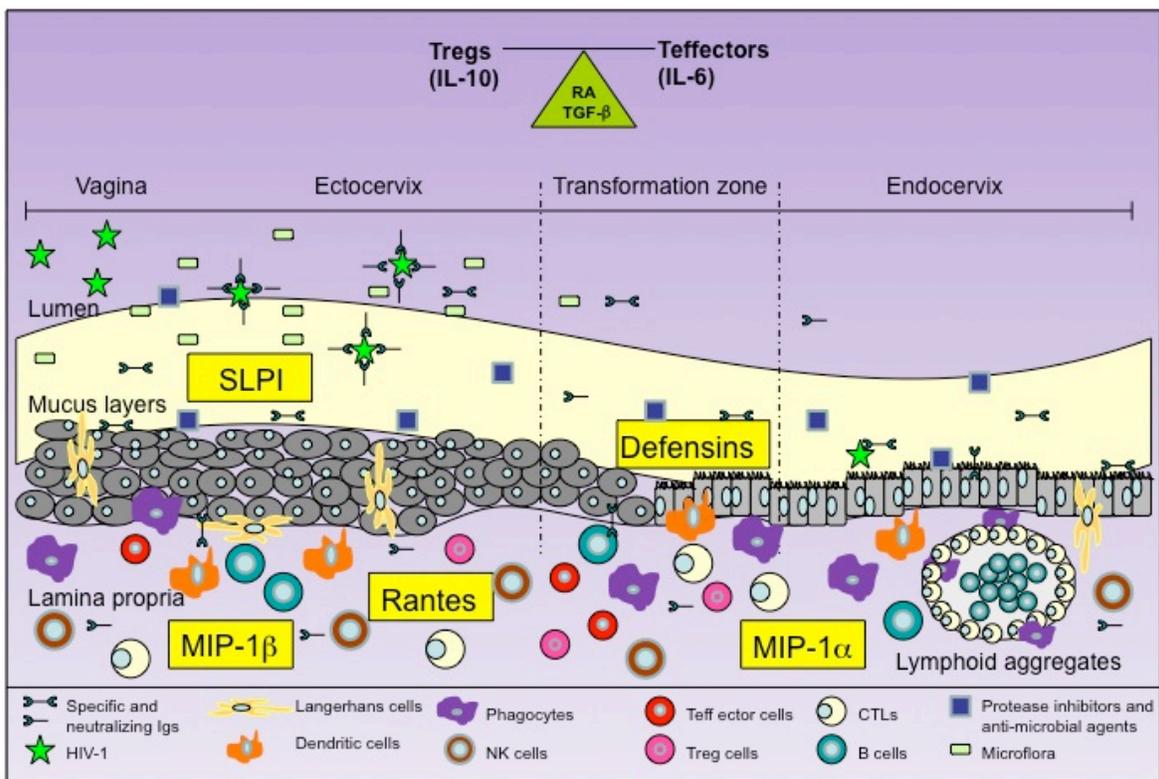
[104, 105]

CSW, commercial sex worker; IL, interleukin; IFN, interferon; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; TNF, tumour necrosis factor

Figure 1 Qualitative and quantitative differences in mucosal innate and adaptive immune components are associated with the outcome of HIV infection in the female genital tract (FGT).



Controlled immune homeostasis/HIV-1 resistance



Top panel: Controlled immune homeostasis results in resistance to HIV infection at the mucosal point of entry. Homeostatic balance between mucosal T effector vs T regulatory (Treg) populations is modulated by epithelial cell (EC) and dendritic cell (DC) cross-talk, and is influenced by factors, such as retinoic acid (RA) and transforming growth factor-beta (TGF- β). Host factors associated with resistance to HIV infection involve the modulation of mucosal innate factors, such as defensins, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and other antiproteases as well as variations in frequencies and activities of DC, B, T and natural killer (NK) cell populations. HIV-specific mucosal IgA blocks viral transcytosis through the epithelium, and IgG is involved in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). High levels of β -chemokines, such as macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1 α), MIP-1 β

and regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), which are natural CCR5 (major HIV co-receptor) ligands, can block cell viral entry to the FGT mucosa.

Bottom panel: Uncontrolled inflammation results in susceptibility to HIV infection at the mucosal point of entry. Unbalanced ratios between mucosal T effector vs Treg populations favouring high levels of T effectors are the hallmark of an inflammatory environment. Established vaginal inflammation can facilitate HIV infection through epithelium damage and recruitment of CD4⁺ T effectors, prime targets of HIV. The virus can also bind to ECs, be captured by Langerhans cells or DCs, and subsequently transcytosed and transferred to productively infect CD4⁺ target cells. Host factors associated with susceptibility to HIV infection are inflammatory markers, such as tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), IFN- α , interleukin-1beta (IL-1 β), as well as thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and MIP-3 α secreted primarily by ECs after downstream HIV signalling, favouring the recruitment of plasmacytoid DC (pDC) and CD4⁺ target cells. The promotion of an inflammatory milieu will contribute to infection and dissemination of HIV across the genital tract.

