

Université de Montréal

Étude des facteurs influençant la susceptibilité à l'infection au VIH chez des femmes
africaines.

Par : Julie Lajoie

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade du Doctorat en virologie et immunologie

Décembre 2009

Copyright Julie Lajoie, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des facteurs influençant la susceptibilité à l'infection au VIH chez
des femmes africaines.

Présentée par :
Julie Lajoie

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hugo Soudeyns
Président-rapporteur

Dr Michel Roger
Directeur de recherche

Dr Annie-Claude Labbé
Co-directrice

Dr Naglaa Shoukry
Membre du jury

Dr Nicole Bernard
Examinatrice externe

Dr Daniel Lamarre
Représentant du doyen

Sommaire

Chez la femme, la majorité des cas d'infection au VIH sont acquis lors de relations hétérosexuelles. Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant l'immunité locale naturelle du tractus génital féminin, les facteurs influençant la susceptibilité à l'infection au VIH dans ce compartiment, ainsi que la réponse immunitaire de la muqueuse enclenchée après l'infection.

Le but de notre projet est donc d'étudier certains facteurs pouvant être impliqués dans la susceptibilité à l'infection au VIH, afin de mieux comprendre l'immunité du tractus génital féminin. Nous avons, dans un premier temps, analysé le rôle du polymorphisme des gènes HLA-G et HLA-E sur la susceptibilité au VIH dans une population de femmes zimbabwéennes. La présence de l'allèle HLA-G*0105N, en combinaison avec le génotype HLA-E^G/HLA-E^G, était associée avec une diminution du risque d'infection. Puis, dans une étude cas-contrôle de travailleuses du sexe (TS) du Bénin, nous avons mesuré l'expression de HLA-G soluble au niveau du plasma. Nous avons observé une différence significative dans l'expression de HLA-G soluble, celle-ci étant plus faible dans le groupe des TS VIH positives comparé aux groupes de TS VIH négatives et de femmes VIH négatives de la population générale.

Nous avons aussi analysé l'expression de cytokines et chimiokines dans le sérum et le tractus génital des participantes de l'étude du Bénin. Nous avons constaté que chez les TS VIH positives il y avait une expression plus élevée des chimiokines MPC-3, IP-10 et MIG dans le tractus génital et le sérum comparativement aux deux autres groupes. Les patrons d'expression des cytokines variaient selon les compartiments : le niveau de TNF- α et IFN- γ était plus élevé dans le tractus génital des TS VIH positives, alors que le niveau d'IL-2, d'IL-10 et de TNF- α était plus faible dans le sang des TS VIH positives, comparativement aux deux autres groupes. Ainsi, au niveau du tractus génital des femmes VIH positives, il semble y avoir une activation chronique du système immunitaire dans le but de favoriser la dissémination/perpétuation du virus. Les patrons d'expression différents entre le milieu systémique et génital nous montrent que l'immunité présente dans un compartiment n'est pas nécessairement le reflet de l'autre.

Nous avons aussi observé une augmentation significative des niveaux d'IL-4, de MIP-1 α , de MIP-1 β et de MCP-1 dans le sérum des TS VIH négatives. Ces personnes, hautement exposées mais non infectées, semblent démontrer une plus grande capacité à enclencher une réponse immunitaire précoce pour empêcher la dissémination du

virus. Notre étude a donc permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'immunité du tractus génital féminin en relation avec l'infection au VIH.

Mots clés : VIH, HLA-G, immunologie, muqueuse, sang, afrique, cytokines, chimiokines.

Summary

Initial exposure to HIV during heterosexual transmission occurs in the female genital tract. However, little is known about the local immunity, the factors influencing the susceptibility to HIV infection and the immune response in the female genital tract against HIV infection.

The aim of this study is to analyse some factors that could be implicated in the susceptibility to HIV infection and to analyse, in part, the immunity present in the female genital tract. We investigated the role of HLA-G and HLA-E in the susceptibility to HIV infection in a cohort of Zimbabwean women. We found that the presence of HLA-G*0105N allele in combination with the genotype HLA-E^G/HLA-E^G was associated with a decrease in the risk of HIV infection. We also measured the expression of soluble HLA-G in a study of commercial sex workers (CSW) in Benin. Levels of soluble HLA-G were lower in the HIV-1-infected CSWs compared to those observed in both the HIV-1-uninfected CSWs and the HIV-1-uninfected women from the general population at low risk of infection.

We also analysed the chemokine and cytokine expression patterns in the serum and female genital tract of the three groups of women. HIV-1-infected CSWs had significantly higher blood and genital levels of the chemokines IP-10, MCP-3 and MIG compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups. HIV-1-infected CSWs had significantly higher genital mucosal levels of the cytokines TNF- α and IFN- γ compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. In contrast, the serum levels of the cytokines IL-2, IL-10 and TNF- α were lower in HIV-1-infected CSWs compared with those in the other groups. This suggests the presence of a constant immune cells recruitment and immune activation in the female genital tract in order to favour perpetuation and dissemination of the virus. Our results also demonstrate the important difference between the systemic and the mucosal immunity.

We also observed a significant increase in the levels of IL-4, MIP-1 α , MIP-1 β and MCP-1 in the serum of the HIV-1-uninfected CSWs. It seems that these highly-exposed and yet uninfected women can have a better capacity to mount an early immune response against HIV. This study gives us new insights of the mucosal immunology of HIV infection.

Key words: HIV, HLA-G, mucosal immunology, Africa, cytokines, chemokines.

Table des matières

SOMMAIRE	I
SUMMARY	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des figures :	VII
Liste des abréviations :	VIII
AVANT-PROPOS :	1
REVUE DE LITTÉRATURE:.....	3
1.1 Tissus inductibles et effecteurs	3
1.2 Le MALT	4
1.2.1 Le GALT	4
1.2.2 Le GU.....	4
2.1 Structure et anatomie du tractus génital féminin.....	7
2.1.1 Les trompes de Fallope.....	7
2.1.2 L'utérus.....	7
2.1.3 Le vagin.....	7
2.2 La flore commensale présente au niveau du tractus génital féminin inférieur	8
2.3 Le cycle menstruel et hormonal.....	9
2.4 La muqueuse : une barrière naturelle	10
2.4.1 La microflore.....	10
2.4.2 Le mucus cervical et les sécrétions vaginales.....	10
2.4.2.1 Les cytokines et chimiokines dans les sécrétions vaginales	13
2.4.3 Les cellules épithéliales du tractus génital féminin	15
2.5 Immunité innée et adaptative du tractus génital féminin.....	18
2.5.1 Les macrophages et les cellules dendritiques.....	19
2.5.2 Les cellules tueuses naturelles.....	20
2.5.3 Les cellules T	21
2.5.4 Les cellules B et les immunoglobulines.....	22
3.1 Le VIH et les femmes.....	23
3.2 Les autres infections transmissibles sexuellement	24
3.3 Les déterminants génétiques influençant la susceptibilité au VIH.....	27
3.3.1 Les récepteurs des chimiokines et leurs ligands.....	27
3.3.2 Les lectines.....	29
3.3.3 Les gènes des cytokines	31
3.3.4 Autres gènes associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH	33
3.3.5 Les gènes du CMH de classe I et de classe II	34
3.3.6 Les gènes non classiques du CMH de classe I (HLA-E et HLA-G)	35
3.4 Mécanismes d'évasion virale utilisés par le VIH.....	39
3.5 Immunité et VIH.....	40
3.5.1 Survol de l'impact du VIH sur l'immunité systémique	40
3.5.2 Immunité, VIH et MALT.....	41
3.5.2.1 Les études chez l'humain dans le GALT	41
3.5.2.2 Les études chez le singe	44
3.5.3 Immunité et VIH dans la muqueuse du tractus génital chez l'humain.....	46
3.6 Les personnes hautement exposées mais non infectées au VIH	50
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	54
DESCRIPTION DES POPULATIONS	56
ÉTUDE AU ZIMBABWE:	56
ÉTUDE AU BÉNIN:	56
ARTICLES:.....	59

GENETIC VARIANTS IN NON-CLASSICAL MHC CLASS I HLA-E AND HLA-G MOLECULES ARE ASSOCIATED WITH RISK OF HETEROSEXUAL HIV-1 INFECTION	61
BLOOD SOLUBLE HLA-G LEVELS ARE ASSOCIATED WITH HIV-1 INFECTION IN BENINESE COMMERCIAL SEX WORKERS	74
DIFFERENCES IN IMMUNOREGULATORY CYTOKINE EXPRESSION PATTERNS IN THE SYSTEMIC AND GENITAL TRACT COMPARTMENTS OF HIV-1-INFECTED COMMERCIAL SEX WORKERS IN BENIN.....	93
CHEMOKINE EXPRESSION PATTERNS IN THE SYSTEMIC AND GENITAL TRACT COMPARTMENTS ARE ASSOCIATED WITH HIV-1 INFECTION IN WOMEN	116
DISCUSSION :	142
ANALYSE GÉNÉTIQUE DE HLA-G AU ZIMBABWE EN RELATION AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH	142
TYPAGE HLA-G ET HLA-E AU BÉNIN.....	147
L'EXPRESSION DE HLA-G	147
L'EXPRESSION DE CYTOKINES ET DES CHIMIOKINES	151
CONCLUSION :	158
PERSPECTIVES.....	160
RÉFÉRENCES.....	163
REMERCIEMENTS	I
DÉDICACE.....	III
ANNEXES.....	IV
CHARACTERISATION OF FIVE NOVEL HLA-G ALLELES WITH CODING DNA BASE CHANGES.....	VI
IDENTIFICATION OF SIX NEW HLA-G ALLELES WITH NON-CODING DNA BASE CHANGES	XI
PERSISTENCE OF HIGH LEVELS OF BLOOD SOLUBLE HLA-G IS ASSOCIATED WITH RAPID PROGRESSION OF HIV INFECTION	XV

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES POLYMORPHISMES DES CHIMIOKINES ET DE LEURS RÉCEPTEURS ASSOCIÉS AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.....	30
TABLEAU 2 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES POLYMORPHISMES DES LECTINES ASSOCIÉS AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.....	32
TABLEAU 3 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES POLYMORPHISMES DES CYTOKINES ASSOCIÉS AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.....	32
TABLEAU 4 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES ALLÈLES HLA ASSOCIÉS AVEC L'INFECTION AU VIH.....	36
TABLEAU 5 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES POLYMORPHISMES HLA-G ASSOCIÉS AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.....	39
Article 1:	
TABLE 1: THE DISTRIBUTION OF HLA-E GENOTYPES AND SOCIO-DEMOGRAPHIC RISK FACTORS FOR HIV-1 INFECTION AMONG 397 ZIMBABWEAN WOMEN	71
TABLE 2: LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS OF THE RISK FACTORS FOR HIV-1 INFECTION AMONG 397 ZIMBABWEAN WOMEN.....	72
ARTICLE 2:	
TABLE 1 DISTRIBUTION OF DEMOGRAPHIC, SEXUAL BEHAVIOUR AND GENITAL TRACT INFECTION CHARACTERISTICS IN HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED CSWs, AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.	88
TABLE 2. PLASMA SOLUBLE HLA-G LEVELS IN HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED CSWs, AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS ACCORDING TO THE HLA-G GENE POLYMORPHISM.	90
Article 3:	
TABLE 1. DISTRIBUTION OF DEMOGRAPHIC, SEXUAL BEHAVIOUR AND GENITAL TRACT INFECTION CHARACTERISTICS IN HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED COMMERCIAL SEX WORKERS (CSW), AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.....	109
TABLE 2. CYTOKINE LEVELS IN CERVICOVAGINAL LAVAGE SAMPLES FROM HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED COMMERCIAL SEX WORKERS (CSW), AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.	111
TABLE 3. CYTOKINE LEVELS IN SERUM FROM HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED COMMERCIAL SEX WORKERS (CSW), AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.....	112
Article 4:	
TABLE 1 DISTRIBUTION OF DEMOGRAPHIC, SEXUAL BEHAVIOUR AND GENITAL TRACT INFECTION CHARACTERISTICS IN HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED CSWs, AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.	136
TABLE 2 CHEMOKINE LEVELS IN CERVICOVAGINAL LAVAGE SAMPLES FROM HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED CSWs, AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.....	138
TABLE 3 CHEMOKINE LEVELS IN SERUM FROM HIV-1-UNINFECTED AND HIV-1-INFECTED CSWs, AND HIV-1-UNINFECTED NON-CSW CONTROL SUBJECTS.....	140

Liste des figures :

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION DE L'ANATOMIE DU SYSTÈME URO-GÉNITAL DE LA FEMME ET DE L'HOMME.....	6
FIGURE 2 : DISTRIBUTION DES PROTÉINES DU MUCUS ET DES SÉCRÉTIONS VAGINALES DANS LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ	17
FIGURE 3 : RÉPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA TRANSMISSION VAGINALE DU VIH ET DES ÉTAPES SUIVANT L'INFECTION	42
FIGURE 4 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES DIFFÉRENCES ENTRE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ENTRE LE TRACTUS GÉNITAL ET LE COMPARTIMENT SYSTÉMIQUE DANS LES PREMIERS JOURS APRÈS L'INFECTION À SIV	47
FIGURE 5 : COURBE DE LA RÉPLICATION DU VIH DANS LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ DANS LES PREMIERS JOURS POST INFECTION.....	48
FIGURE 6 : CIBLES CELLULAIRES DU VIH LORS DE LA TRANSMISSION SEXUELLE AU NIVEAU DU TRACTUS GÉNITAL FÉMININ.	51
FIGURE 7 : CARTE DU CONTINENT AFRICAIN	58
 <u>ARTICLE 2:</u>	
FIGURE 1 MEAN PLASMA SOLUBLE HLA-G LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.....	87
 <u>ARTICLE 3:</u>	
FIGURE 1. DISTRIBUTION OF IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α AND IFN- γ CVL LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.....	108
FIGURE 2. DISTRIBUTION OF IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α AND IFN- γ SERUM LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.	108
 <u>ARTICLE 4:</u>	
FIGURE 1. DISTRIBUTION OF IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1a, MIP-1b AND RANTES CVL LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.	131
FIGURE 2. DISTRIBUTION OF IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1a, MIP-1b AND RANTES SERUM LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.	131
FIGURE 1. SUPPLÉMENTAIRE FIGURE: CHEMOTACTIC GRADIENT BETWEEN THE BLOOD AND FEMALE GENITAL TRACT COMPARTMENTS ACCORDING TO THE HIV STATUS.	132
 <u>DISCUSSION</u>	
FIGURE 8: MODÈLES MÉCANISTIQUES PROPOSÉS POUR LA FONCTION DE HLA-G ET HLA-E DANS LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.....	146

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique

APC : Cellules présentatrices d'antigènes

APOBEC : « Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G »

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BALT : Tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires inférieures

CCR5 : Récepteur de chimiokine avec motif CC

CD : Classes de différenciation (« cluster of differentiation »)

CLA : Antigène lymphocytaire cutané (« cutaneous lymphocyte antigen »)

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMV: Cytomegalovirus

CSW: Commercial sex workers

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

CVL : Lavage cervico-vaginal; cervico-vaginal lavage

CXCR4 : Récepteur de chimiokine avec motif CXC

DC : Cellules dendritiques

DC-SIGN : « Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin »

DEFB1 : Gène bêta-défensine-1

ELISA : Dosage d'immunosorption liée à une enzyme « Enzyme-linked immunosorbent assay »

ESN : Individus hautement exposés mais non infectés au VIH-1 (« exposed seronegative individuals »)

Fc : Fragment cristallisable

GALT : Tissu lymphoïde associé au tractus digestif

G-CSF : Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes

GM-CSF : Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes et de macrophages

GU : Tractus urogénital

HBD : Bêta défensine humaine (« human beta defensine »)

HLA : Antigène leucocytaire humain

HNP : peptide neutrophile humain («human neutrophil defensine »)

IFN: Interféron

Ig : Immunoglobulines

IL : Interleukine

ILT : « Human inhibitory receptors Ig-like transcripts »

IP-10 : Protéine inductible par l'interféron-10

IRF-1 : Facteur de régulation de l'interféron 1

ITS : Infections transmissibles sexuellement

KIR : récepteur « killer Ig-Like »

LPS : Lipopolysaccharide

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses («mucosa associated with lymphoid tissue»)

MBD : Protéine liant le mannose

MCP: Facteur chimiotactique des monocytes

mDC : Cellule dendritique myéloïde

MIG : Monokine induite par l'interféron-gamma (« Monokine induced by interferon-gamma »)

MIP : « Macrophage inflammatory protein »

MRP : Protéine reliée à la myéloïde « myeloid related protein »

NALT : Muqueuse du nasopharynx associée aux tissus lymphoïde

NK : Cellules tueuses naturelles

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONU : Organisation des Nations Unies

OR : Facteur de cote « Odds ratio »

PAMP: Patron moléculaire associé à un pathogène (« pathogens associated molecular pattern »)

pb : Paire de bases

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes

pIgR : récepteur Ig polymérique

PPR : Récepteur reconnaissant patron des pathogènes (« pathogen pattern recognition receptor »)

RANTES : « regulated upon activation normal T cell expressed and secreted »

RT-PCR : Transcription inverse suivi d'une réaction chaîne par polymérase

SDF-1: « Stromal derived factor 1 »

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

S-Ig : Anticorps sécrétés

S-IgA : Immunoglobuline d'isotype A sécrétée

SIV : Virus de l'immunodéficience simienne

SLP1 : Inhibiteur de protéase sécrété par les leucocytes

TAP : Transporteur associé avec les antigènes apprêtés

TGF : Facteur de croissance transformant

TLR : Récepteur de la famille des Toll « Toll-like receptor »

TNF : Facteur de nécrose tumoral

TS : Travailleuses du sexe

uNK : Cellules tueuses naturelles utérines

UTR : Région non traduite

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VPH : Virus du papillome humain

VHS : Virus Herpès simplex

AVANT-PROPOS :

Découvert il y a maintenant vingt-cinq ans, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est considéré comme l'un des plus grands fléaux de ce siècle. En 2008, on estimait à 33.2 millions le nombre de personnes vivant avec le VIH/syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et ce, malgré tous les efforts, à l'échelle mondiale, pour combattre l'épidémie. Au cours des vingt-cinq dernières années, l'épidémiologie de l'infection a énormément changé. Aujourd'hui, selon le dernier rapport de l'organisation mondiale de la santé et de l'organisation des nations unies sur le SIDA (OMS/ONUSIDA), la moitié des personnes infectées par le VIH sont des femmes, l'ayant contracté lors d'une relation hétérosexuelle non protégée. Selon les dernières statistiques, il y aurait donc 17.7 millions de femmes vivant avec le VIH/SIDA.(1) La féminisation rapide de la maladie, ainsi que la vulnérabilité accrue des femmes, sont le résultat de plusieurs facteurs biologiques, sociaux et culturels. Le statut de la femme dans certains pays, ainsi que son impuissance à exiger le port du condom dans certaines conditions, augmentent leur susceptibilité à l'infection au VIH. Il y a un urgent besoin de créer des technologies préventives permettant à la femme de se protéger par elle-même. Le développement d'un vaccin ou d'un gel microbicide est donc essentiel pour contenir l'épidémie du VIH. Malheureusement, jusqu'à présent, les diverses études cliniques portant sur le développement et la commercialisation de ces composés se sont avérées infructueuses.(2) Dans certains cas, les études cliniques ont dû être abandonnées puisque l'utilisation des produits testés augmentait les risques d'acquisition du virus. Jusqu'à présent, la majeure partie des études portant sur le VIH a été focalisée sur la réponse immunitaire systémique contre le VIH. Seulement quelques groupes ont mis l'accent sur l'impact du VIH sur l'immunité des muqueuses qui constituent pourtant la principale porte d'entrée du virus chez l'humain. De récentes études sur le VIH et le virus d'immunodéficience simienne (SIV) démontrent que l'impact du virus sur le système immunitaire « mucosal » semble beaucoup plus important que ce qui est observé au niveau systémique. Ainsi, l'immunité « mucosale » est actuellement considérée comme l'un des sujets prioritaires dans la recherche sur le VIH. (3) Une meilleure compréhension de l'immunité présente aux portes d'entrée du virus, des événements qui surviennent à travers celles-ci suite à la transmission du virus et des liens entre l'immunité « mucosale » et systémique est essentielle au développement de stratégies préventives efficaces tels un vaccin ou un microbicide.

Chez la femme, la principale porte d'entrée du VIH est le tractus génital féminin. Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant la séquence des

événements qui se produisent immédiatement après l'acquisition du virus et sur l'immunité « mucosale » locale naturelle et en réponse au virus.

Certains individus ayant des comportements à haut risque d'acquérir le VIH demeurent séronégatifs. C'est, entre autres, le cas de certaines travailleuses du sexe (TS) et des couples discordants. L'étude de ces individus démontrant une protection naturelle à l'infection au VIH peut fournir d'importantes informations sur les facteurs modulant la susceptibilité à l'infection au VIH. Ainsi, notre projet porte sur l'étude de facteurs pouvant influencer la prévalence de l'infection à VIH chez des femmes TS. Dans le but de comprendre l'immunité présente au niveau vaginal et les modulations de l'immunité vaginale qui peuvent favoriser l'acquisition du virus ainsi que sa progression/perpétuation, nous avons caractérisé les cytokines et chimiokines présentes dans le tractus génital féminin et le sérum de TS VIH-1 négatives, de TS VIH-1 positives et de femmes VIH-1 négatives à faible risque, que nous considérons ici comme population contrôle. Nous avons également étudié l'impact d'HLA-G et HLA-E sur le risque d'infection au VIH chez ces femmes. Ces deux protéines sont impliquées dans l'activation ou l'inhibition de l'immunité innée enclenchée par les cellules tueuses naturelles (NK).

Avant d'aborder le travail de recherche lui-même, nous réviserons d'abord l'immunité des muqueuses et les facteurs influençant l'immunité dans le tractus génital féminin. Nous aborderons ensuite le sujet du VIH. La première partie de cette section portera sur l'épidémiologie, les femmes et le VIH. La deuxième partie fera une révision des facteurs génétiques de l'hôte qui influencent la susceptibilité à l'infection au VIH et la dernière partie portera sur nos connaissances de l'immunité au niveau des muqueuses et son impact sur la susceptibilité à l'infection au VIH. Ceci nous conduira aux hypothèses et objectifs de cette étude. Vous trouverez ensuite une description des populations étudiées dans cette étude, puis les résultats, présentés ici sous forme d'articles démontrant les facteurs que nous avons associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Le tout sera suivi d'une discussion et d'une conclusion.

REVUE DE LITTÉRATURE:

1. LES MUQUEUSES

L'immunité reliée aux muqueuses constitue une impressionnante première ligne de défense qui protège l'humain sur une surface de près de 400 m². Bien que représentant une importante proportion des activités immunitaires se déroulant chez l'humain, le système immunitaire relié aux muqueuses était, jusqu'à récemment, peu étudié. Aux cours des dernières années, l'intérêt pour le système immunitaire relié aux muqueuses n'a cessé de croître. Le fléau humanitaire qu'a entraîné l'épidémie du VIH a, entre autres, été un des éléments marquant dans la recrudescence de l'intérêt pour l'étude des muqueuses. L'échec des vaccins traditionnels et l'urgent besoin d'une vaccination dite « mucosale » a donc permis de réaliser qu'il y avait de grandes lacunes quant aux connaissances que nous possédions sur les muqueuses et l'immunité qui s'y rattache. Désormais, acquérir de nouvelles connaissances sur les muqueuses et leur immunité représente un enjeu de première importance dans la compréhension globale du système immunitaire humain.

Le système immunitaire relié aux muqueuses semble être plus complexe que son pendant systémique et ce, autant en terme d'anatomie (tissus effecteurs et inductibles) qu'en terme des effecteurs qui y sont présents (cellules et substances présentes). La difficulté d'obtenir et d'analyser des échantillons provenant des muqueuses est également un facteur qui contribue à accroître cette complexité. Les différents compartiments tissulaires impliqués dans l'immunologie mucosale sont catégorisés selon leurs principales fonctions.

1.1 Tissus inductibles et effecteurs

Les compartiments tissulaires des muqueuses peuvent être divisés en deux parties: sites inductibles et sites effecteurs. Les sites inductibles sont constitués des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (« *mucosa associated lymphoid tissue* »; MALT), des muqueuses locales et régionales, ainsi que des ganglions drainants environnants. Les sites effecteurs consistent en plusieurs compartiments distincts les uns des autres selon leurs caractéristiques histologiques. Les sites inductibles sont l'endroit où les antigènes provenant de la surface de la muqueuse stimulent les cellules T naïves et les lymphocytes B. Les compartiments effecteurs, quant à eux, représentent les sites où les cellules effectrices (après extravasation, rétention et différenciation) vont remplir leur fonction, telle que la production des IgA solubles. Ces compartiments comprennent la lamina propria des diverses muqueuses, les glandes exocrines du stroma et la surface épithéliale. (4)

1.2 Le MALT

Le MALT se subdivise selon la région anatomique où il se trouve : le tractus digestif (GALT) (œsophage, estomac, intestin), la muqueuse du nasopharynx associée aux tissus lymphoïdes (NALT), les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires inférieures (BALT) et le système urogénital (GU). (4) La distribution et la composition des structures lymphoïdes varient grandement d'une espèce à l'autre. Toutes les structures du MALT ressemblent aux ganglions. Ils ont un nombre variable de zones de cellules T interagissant entre des follicules de lymphocytes B, et contenant une panoplie de cellules présentatrices d'antigène (APC) tel que les macrophages et les cellules dendritiques (DC). L'âge et l'état du tissu (normal ou en inflammation chronique) ont une grande importance sur l'apparence du MALT. (5) En général, le MALT est relativement sous-développé chez le nouveau-né. Avec l'exposition à différents antigènes suite au développement des flores commensales, il y a expansion des zones des cellules T, maturation puis développement de centres germinaux folliculaires. Les centres germinaux sont fréquents dans le GALT mais pratiquement absents dans le NALT, le BALT et le GU.

1.2.1 Le GALT

Le GALT est le plus large et le mieux défini des compartiments du MALT. La surface mucoale du système gastro-intestinal forme une structure anatomique et physiologique unique, qui sert de barrière physique et immunologique contre les microorganismes du monde extérieur. Il contient plus de 40% des lymphocytes du corps humain (6). Plusieurs types de nodules lymphoïdes ont été décrits dans l'intestin, où on retrouve, entre autres, les plaques de Peyer, des follicules lymphoïdes isolés et, dans le côlon, des complexes lymphoglandulaires. Les plaques de Peyer et les complexes lymphoglandulaires sont les sites inductibles principaux. On y retrouve également des cellules épithéliales hautement spécialisées que l'on nomme cellules M. Ce sont elles qui vont préférentiellement capturer les antigènes avant de les transférer aux APC dans les tissus lymphoïdes. (Revue par: (7))

1.2.2 Le GU

Le GU est impliqué dans les fonctions de la reproduction et de l'élimination de l'urine. Le GU est constamment exposé à une variété de pathogènes, dont plusieurs sont transmissibles sexuellement. Le système immunitaire du GU doit, en plus de protéger contre des agents infectieux potentiels, s'adapter pour permettre des événements physiologiques reliés à la reproduction. Chez la femme, cela signifie devoir

tolérer la fertilisation (présence du sperme), l'implantation du fœtus et la grossesse (présence d'un corps semi-allogène). Pour remplir ses fonctions de protection contre les pathogènes, le système immunitaire du GU doit donc être très bien régulé.

Bien que considéré comme une partie intégrante du système mucosal, le système immunitaire génital possède des caractéristiques qui le distinguent des autres muqueuses. C'est au niveau du tractus génital féminin que l'on dénote l'une de ces principales caractéristiques. À cet endroit, le système immunitaire est soumis à un puissant contrôle hormonal. Les hormones contrôlent ainsi le transport des immunoglobulines, le niveau de cytokines, la distribution des différentes populations cellulaires et la présentation des antigènes. Un équilibre doit être maintenu par les hormones tout au long du cycle menstruel pour répondre à l'invasion par les pathogènes (levures, bactéries, virus), sans interférer avec les événements menant à la conception. Plusieurs cellules immunitaires se retrouvent au niveau du tractus génital féminin. Les cellules épithéliales contribuent également à l'immunologie et ont des fonctions critiques à remplir dans l'immunité mucosale. (8)

2. LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ

Le tractus génital féminin est composé de trois structures anatomiques distinctes: les trompes de Fallope, l'utérus et le vagin (voir figure 1). Chacune de ces trois parties joue un rôle bien précis dans le processus de reproduction. On peut diviser le tractus génital féminin en deux sections qui permettent de définir l'environnement. La première partie, dite "stérile", est constituée des trompes de Fallope et de l'utérus (aussi appelée région supérieure). La deuxième partie dite non stérile englobe, quant à elle, le vagin et l'exocol de l'utérus (région inférieure). Cette distinction est primordiale puisqu'elle différencie le tractus génital féminin des autres muqueuses du corps qui, à l'exception de l'œil, ne sont pas stériles. De plus, cela a une grande importance pour la régulation du système immunitaire dans le tractus génital féminin.

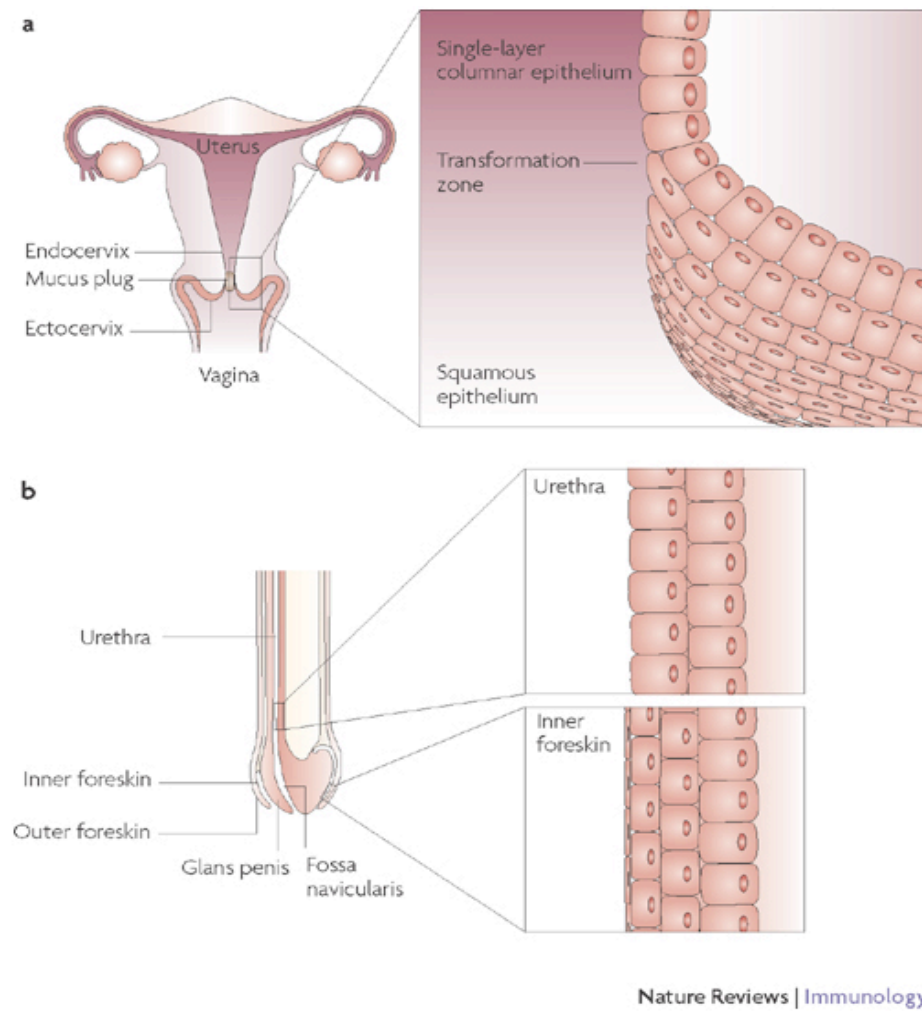


FIGURE 1 : REPRÉSENTATION DE L'ANATOMIE DU SYSTÈME URO-GÉNITAL DE LA FEMME ET DE L'HOMME
Tirée de Hladik et coll., Nature reviews immunology vol 8 June 2008
Avec l'autorisation de Nature publishing

2.1 Structure et anatomie du tractus génital féminin

2.1.1 Les trompes de Fallope

Les deux trompes de Fallope sont situées de part et d'autre de l'utérus et le relient aux ovaires. Leur fonction est de recueillir l'ovocyte expulsé par l'ovaire et leur pavillon constitue le lieu de la fécondation. Les trompes de Fallope sont constituées intérieurement d'un épithélium cylindrique simple et cilié et à l'extérieur de deux couches musculaires lisses qui permettent le déplacement de la trompe.

2.1.2 L'utérus

L'utérus représente une poche dont l'intérieur est hautement vascularisé. Sa base reçoit latéralement les trompes de Fallope et le corps utérin communique avec le col de l'utérus. Ce dernier comprend deux parties : l'endocol, dont la lumière étroite et cylindrique constitue le canal endocervical, et l'exocol, qui forme une protusion au fond du vagin.

La paroi utérine est constituée de l'endomètre. Celle-ci est composée d'un épithélium prismatique simple avec des cellules sécrétrices de glycogène, des cellules basales et des cellules ciliées. Le corps utérin, appelé myomètre, est composé de trois plans de fibres musculaires lisses.

La muqueuse endocervicale est caractérisée par un épithélium simple comprenant des cellules basales, des cellules ciliées et des cellules sécrétant du mucus. La muqueuse de l'exocol est, quant à elle, définie par la présence d'un épithélium pluristratifié pavimenteux non kératinisé qui est identique à celui de l'épithélium vaginal.

2.1.3 Le vagin

Le vagin est un tube fibromusculaire à la paroi mince, mesurant de 8 à 10 cm de long. Il est localisé entre la vessie et le rectum et s'étend du col jusqu'à l'extérieur du corps au niveau de la vulve. Sa paroi se compose de trois couches : l'*adventice*, la couche fibroélastique externe (la *musculeuse*, formée de muscle lisse) et la *muqueuse*, dotée de plis transversaux appelés rides du vagin. L'épithélium de la muqueuse, pavimenteux stratifié para-kératinisé, est capable de supporter la friction. Les cellules épithéliales présentes dans le vagin emmagasinent de grandes quantités de glycogène, que les bactéries résidentes transforment en acide lactique au cours d'un

métabolisme anaérobie. Le vagin fait partie de la section non stérile du tractus génital féminin et on y observe la présence d'une flore commensale. (9)

2.2 La flore commensale présente au niveau du tractus génital féminin inférieur

Comme c'est le cas pour les autres muqueuses, le vagin peut être colonisé par plusieurs microorganismes, incluant des bactéries et des champignons qui peuvent s'avérer être des pathogènes. La flore microbiologique présente dans le tractus génital féminin est un exemple complexe de colonisation toujours en dynamique changement mais les mécanismes qui la régulent sont peu connus. Généralement, une flore vaginale normale est principalement composée d'espèces de *Lactobacillus*. Les lactobacilles diminuent le pH du milieu vaginal grâce à leur production d'acide lactique, transformé en H₂O₂, et leur production de bactéricine. La perte des *Lactobacillus* est associée avec une augmentation du pH vaginal, et avec une réduction des protéines mucosales. Certaines de ces protéines, dont les inhibiteurs de protéases sécrétés par les leucocytes (« *secretory leukocyte protease inhibitor* », SLP), ont un rôle antimicrobien et participent à l'immunité innée contre le VIH. (10) Des études quantifiant les bactéries dans des lavages vaginaux ont démontré qu'il y a environ 10⁷ lactobacilles par gramme de sécrétions vaginales. Les plus fréquemment retrouvées étaient : *L. acidophilus* (la plus abondante chez les femmes non ménopausées), *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. iners* et *L. gasseri*, alors que les moins abondantes étaient *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii* et *L. salivarius*. Plusieurs espèces peuvent être présentes en même temps, et avec le temps on observe également une variabilité dans les combinaisons. (11;12) Chez certaines femmes en bonne santé, les lactobacilles sont remplacés par d'autres bactéries productrices d'acide lactique telles que des espèces d'*Atopodium*, *Megaspaera* et/ou *Leptotrichia*. L'environnement acide du vagin est un important mécanisme de défense contre le développement d'infection. La perte ou la réduction des bactéries productrices d'acide lactique permet l'établissement de pathogènes ou une augmentation de certaines bactéries commensales habituellement présentes en faible nombre. Ainsi, sous certaines conditions, des bactéries endogènes commensales comme *Gardnerella vaginalis* et *Streptococcus agalactiae* (Streptocoque du groupe B) peuvent participer au développement d'infections.

Des relations sexuelles fréquentes, la grossesse, l'utilisation du tampon, l'utilisation de contraceptifs, la pratique de douches vaginales et le cycle menstruel sont quelques-uns des facteurs qui peuvent avoir une influence sur la flore bactérienne vaginale. (13) Durant le cycle menstruel, le taux d'hormones et de glycogène varie, menant à une modification du pH vaginal. Ainsi, bien que le niveau de *Lactobacillus* semble constant tout au long du cycle menstruel, la présence d'autres espèces augmente durant la

phase de prolifération, alors que les concentrations de *Candida albicans* sont plus hautes durant les menstruations. (12) Tous ces changements au niveau de la flore sont importants et la présence d'une flore anormale est un facteur important dans la susceptibilité à une infection transmise sexuellement (voir section 3.2.1).

2.3 Le cycle menstruel et hormonal

Le cycle menstruel représente une série de modifications cycliques subies par l'endomètre, mois après mois, en réponse aux variations des concentrations sanguines des hormones ovariennes. Les modifications de l'endomètre sont liées aux taux d'œstrogène et de progestérone libérés au cours du cycle ovarien. Les trois phases du cycle menstruel sont : 1) la phase menstruelle, 2) la phase proliférative, 3) la phase sécrétoire. La phase menstruelle est la desquamation de l'endomètre alors que sa reconstitution se fait durant la phase proliférative. Le cycle hormonal est également divisé en trois phases. La phase folliculaire, qui s'étend du jour 1 (début de la phase menstruelle) au jour 10, correspond à la période de croissance du follicule. Elle est caractérisée par la sécrétion d'œstrogène. S'ensuit la phase ovulatoire (du jour 11 au jour 14) puis la phase lutéale, qui est la période d'activité du corps jaune (s'étend du jour 14 au jour 28). Lors de cette dernière, il y a une forte diminution de la sécrétion d'œstrogène et une augmentation de la sécrétion de progestérone.

L'épaisseur de l'épithélium varie selon la phase du cycle. Il est plus épais au début du cycle menstruel et s'amincit vers la fin du cycle. En moyenne, lors des 5 premiers jours du cycle, on compte environ 30 couches de cellules épithéliales, alors qu'il y en a 26 à la fin du cycle. (14) Le pH vaginal varie également durant le cycle. Normalement situé aux alentours de 4-4.5, il augmente pendant les règles en raison de la présence de sang (15).

La période des menstruations représente également le moment où un recrutement intense de lymphocytes se produit. Les hormones sécrétées tout au long du cycle menstruel ont aussi une influence sur certains gènes exprimés dans le tractus génital féminin. Par exemple, l'expression des récepteurs de la famille des Toll (« Toll-like receptor », TLR) au niveau des cellules épithéliales et stromales varie selon la phase du cycle. (16) D'autres molécules impliquées dans l'immunité innée sont également régulées par le cycle menstruel. Les défensines sont de petites molécules qui possèdent des fonctions antimicrobiennes. Ainsi, l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) des β -défensines-3 est beaucoup plus élevée durant la phase sécrétoire que durant les autres phases, alors que celle des β -défensines-4 est plus élevée durant la phase proliférative. La concentration de l'inhibiteur de protéases sécrétées par les leucocytes (SLP-1) est, quant à elle, plus élevée au milieu et à la fin

de la phase sécrétrice. (17;18) Le cycle menstruel a donc un impact important sur l'immunité présente au niveau du tractus génital féminin.

2.4 La muqueuse : Une barrière naturelle

La barrière offerte par les muqueuses représente la frontière qui sépare l'hôte de son environnement. Elle offre, à elle seule, plusieurs mécanismes protégeant l'intégrité de l'hôte. En plus d'être une barrière physique, le tractus génital féminin possède plusieurs moyens pour se protéger contre l'attaque de pathogènes.

2.4.1 La microflore

Comme nous l'avons vu précédemment, la flore commensale présente dans le tractus génital féminin peut agir sur son environnement pour le rendre hostile à des pathogènes. Le pH acide du milieu vaginal généré par sa présence en est un exemple. Les microorganismes de la flore ont également un rôle crucial à jouer dans le développement de l'organisation des tissus lymphoïdes au niveau des muqueuses. La colonisation par des espèces en général non pathogènes entraîne l'établissement d'une société stable qui maintient sa composition, malgré les fluctuations environnementales. La microflore est ainsi capable d'influencer les programmes de différenciation des cellules épithéliales, créant des niches favorables pour la mise en forme de défenses adaptatives. Les microorganismes de la flore peuvent également moduler la migration des APC et des lymphocytes au travers de l'épithélium, ainsi que la composition des sécrétions qui recouvrent l'épithélium. (19) En effet, certains antigènes de la microflore favorisent le recrutement des lymphocytes vers la muqueuse. (20) De plus, des composés bactériens tels le lipopolysaccharide (LPS) et le peptidoglycane augmentent la sécrétion de défensines et de lysozyme.(21)

2.4.2 Le mucus cervical et les sécrétions vaginales

Bien que souvent ignoré, le mucus formé de mucines, est destiné à une multitude de fonctions immunes. Il permet de supporter et réguler la flore commensale, ainsi que de contrôler et sélectionner ce que le système immunitaire cellulaire rencontre. De plus, ses propriétés physiques et chimiques protègent la surface épithéliale (voir figure 2).

Le mucus cervical correspond à une substance de couleur habituellement blanchâtre, ayant des propriétés très adhésives et élastiques qui le rendent très difficile à traverser. La viscosité du mucus est contrôlée par le cycle hormonal. Ainsi, en période d'ovulation, la faible concentration en mucine rend le mucus moins visqueux. Cette

propriété permet probablement aux spermatozoïdes de nager plus facilement vers les régions supérieures du tractus génital féminin. (22)

Les études portant sur l'analyse de la composition du mucus du col de l'utérus ou des sécrétions vaginales ont démontré la présence de plusieurs protéines aux activités antimicrobiennes. Comme il est impossible de faire une analyse du mucus ou des sécrétions vaginales séparément, les protéines peuvent se retrouver dans l'une ou l'autre de ces sécrétions.

La calprotectine, aussi appelée MRP8/MRP14 (« myeloid related protein »), est une protéine produite par les neutrophiles et les monocytes. Présente normalement en faible quantité dans les sécrétions, sa concentration augmente de façon considérable lors d'inflammation. *In vitro*, il a été démontré que cette protéine peut inhiber la croissance des champignons et de certaines bactéries. Récemment, Hashemi et coll. ont démontré qu'une grande concentration de MRP8 entraînait l'activation de la réplication du VIH dans les monocytes latents infectés. (23)

Une autre protéine présente dans le mucus est SLP1. La production de cette protéine est régulée par le système endocrinien. Il a d'ailleurs été démontré que la quantité de SLP1 produite chez les femmes pré-ménopausées était significativement plus élevée que la quantité retrouvée chez les femmes ménopausées. (24) SLP1 peut être produit par les cellules épithéliales et par les macrophages. Cette protéine a la capacité d'inhiber plusieurs protéases telle l'élastase des neutrophiles et la trypsine. SLP1 aurait également une activité antivirale et pourrait bloquer l'entrée du VIH et du virus de l'herpès simplex humain (VHS). (25)

Le lysozyme, protéine contenue dans toutes les sécrétions humaines, est reconnu pour ses propriétés bactériolytique. Sa concentration au niveau vaginal est relativement faible mais augmente au niveau du bouchon cervical. À ce niveau, sa concentration pourrait être suffisante pour que le lysozyme ait une activité anti VIH. (26)

La lactoferrine est un composé abondamment sécrété par l'épithélium et qui est également contenu dans les granules des neutrophiles. Cette protéine a une activité antibactérienne qu'elle exerce de façon « fer-dépendante ». Elle séquestre le fer qui est essentiel pour la survie des bactéries. Elle peut inhiber directement ou indirectement plusieurs virus tels que le VIH-1, VHS et le cytomegalovirus (CMV). Son mécanisme d'action antiviral aurait lieu au niveau de la fusion et de l'entrée des virus. (22)

Les défensines sont de petits polypeptides cationiques ayant une activité antimicrobienne. Ce sont les peptides du mucus humain les plus étudiés. Près de 100 différents types de défensines sont produits par les cellules épithéliales et les leucocytes. Chez l'humain, ce groupe de protéines peut être divisé en deux catégories : les α - et les β - défensines. Les α -défensines (peptides neutrophiles humains « *human neutrophil peptide* », HNP)-1 à 3 sont le principal composé antibactérien retrouvé dans les granules des neutrophiles et sont donc relâchés par ceux-ci. En termes de quantité, elles représentent l'une des protéines les plus retrouvées au niveau du tractus génital féminin. En plus de leur importante activité contre les bactéries et champignons, les α -défensines peuvent inactiver certains virus enveloppés tels que VHS-1, VHS-2, VIH, CMV et l'influenza. (Revue par (22)) Les β -défensines (bêta défensines humaine « *human beta defensine* », HBD) sont, quant à elles, principalement produites par les cellules épithéliales. Certaines sont produites de façon constitutive (HBD-1), alors que d'autres (HBD-2 à 4) sont produites par la stimulation de médiateurs d'inflammation. Bien que les β -défensines soient exprimées au niveau d'autres muqueuses, la concentration de HBD-1 observée au niveau du tractus génital féminin est de loin la plus élevée. En effet, la concentration biologique de HBD-1 dans ce compartiment est, à elle seule, suffisante pour contribuer de façon importante à la défense antimicrobienne de l'hôte. L'activation de la voie des TLR des cellules épithéliales induit également l'expression des β -défensines. Récemment, il a aussi été démontré que l'expression des β -défensines induit une diminution de la régulation de l'expression du récepteur de chimiokines avec motif CXC (CXCR4). Ce récepteur peut être utilisé par le VIH pour son entrée dans les cellules. Au niveau de la muqueuse buccale, il a été démontré que la présence du VIH induisait l'expression de HBD-2 et HBD-3 par les cellules épithéliales orales. Par contre, on ne sait toujours pas si cette induction est aussi présente au niveau du tractus génital féminin. (27)

Les sécrétions présentes dans le tractus génital féminin contiennent également des histones. Celles-ci attirent de façon électrostatique les surfaces anioniques des bactéries, ce qui a pour conséquence d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire. On pense que les neutrophiles activés relâchent de longues élaborations de chromatine et d'élastase de façon indépendante de l'apoptose. Ces facteurs pourraient se lier et inactiver les bactéries Gram-positif et Gram-négatif et empêcher leur dissémination. On ne sait toujours pas si ce relâchement d'histone est associé à un mécanisme de défense de l'hôte ou s'il est dû à un bris de l'intégrité cellulaire. (Revue par : (22))

La cathélicidine LL-37 est une autre protéine retrouvée au niveau des sécrétions du tractus génital féminin. Cette protéine est sécrétée par les cellules épithéliales et les neutrophiles. Au niveau des neutrophiles, elle est contenue dans les granules de ces derniers et est majoritairement destinée à l'exocytose. Dans le tractus génital féminin, on retrouve environ 1µg/ml de cette protéine. En condition d'inflammation ou de dysplasie du col, un patron d'expression en bande de LL-37 apparaît sur la couche superficielle de l'épithélium. Après les relations sexuelles, une protéase retrouvée uniquement dans le sperme entraîne une modification du LL-37 qui la transforme en un peptide ayant une activité antimicrobienne. On pense que cette activité enzymatique serait un mécanisme d'action visant à prévenir les infections transmissibles sexuellement (ITS). (28)

Les sécrétions vaginales contiennent également différentes cytokines et chimiokines. Ainsi, le mucus du col et des sécrétions vaginales, grâce à sa composition protéique, offre donc une bonne protection chimique.

2.4.2.1 Les cytokines et chimiokines dans les sécrétions vaginales

À l'intérieur du mucus et des sécrétions vaginales, on retrouve également des cytokines et chimiokines. Ce sont des protéines solubles, de faible poids moléculaires, impliquées dans la communication entre les cellules. Au niveau du tractus génital féminin, elles peuvent être produites par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires.

Les cytokines sont subdivisées en 3 grands groupes : les cytokines pro-inflammatoires/anti-inflammatoires, les cytokines immunorégulatrices et les cytokines chimioattractantes nommées chimiokines. Les cytokines pro-inflammatoires (par exemple, l'interleukine (IL)-1b, l'IL-6, l'IL-17 et facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)) et anti-inflammatoires (l'IL-1 α , l'IL-10, facteur de croissance transformant bêta (TGF- β)) ont pour principales fonctions de gérer l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire, stimuler le système immunitaire et réguler les fonctions essentielles d'adhérence à l'endothélium. Les cytokines immunorégulatrices (type 1 : IL-2, interféron (IFN)- γ ; type 2 : IL-4, IL-5, IL-13) interviennent, quant à elles, dans la susceptibilité/résistance aux agents infectieux, dans les mécanismes allergiques et la régulation des cytokines inflammatoires. (revue par : (29;30)) Enfin, les chimiokines ont pour but général d'attirer et de contrôler l'apport en cellules du système immunitaire vers un site d'infection ou un tissu précis. Toutes les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant à un récepteur couplé aux protéines G. Elles sont caractérisées

par la présence de quatre résidus cystéines en position conservées nécessaires à la formation de leur structure tridimensionnelle. Il existe quatre sous-familles de chimiokines qui sont déterminées en fonction de l'espacement entre deux de leurs cystéines en position N-terminale : (31)

- la famille CXC (alpha) possède un acide aminé entre les deux premières cystéines;
- la famille CC (bêta) a deux cystéines adjacentes;
- la famille CX3C (delta) est caractérisée par la présence de trois acides aminés entre les deux premières cystéines. La seule protéine connue dans ce groupe est la Fractalkine;(32)
- la famille C (gamma) possède une seule cystéine.

Le niveau et l'expression des cytokines et des chimiokines ainsi que celui des récepteurs des chimiokines varient selon le cycle menstruel. Durant la phase proliférative du cycle menstruelle l'expression des récepteurs des chimiokines de motif CC-5 (CCR5) et CXCR4 augmente à la surface des cellules épithéliales. Normalement, le niveau des cytokines proinflammatoires dans le tractus génital féminin est plus élevé que celui des cytokines immunorégulatrices. Le niveau de cytokines est influencé par la présence des d'ITS et par des facteurs environnementaux comme l'usage de la cigarette. Les relations sexuelles augmentent le taux IL-5 et l'utilisation de contraceptifs oraux augmente l'expression d'IFN- γ , d'IL-10 et d'IL-12. (33) Une étude effectuée auprès de femmes âgées de 13 à 22 ans a permis d'observer la présence de IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et IFN- γ dans les sécrétions vaginales.(34) La présence d'IL-1 β , IL-6 et IL-10 dans le tractus génital féminin a un rôle important dans la maturation des lymphocytes B qui produisent des immunoglobulines (Ig) alors qu'IL-6 augmente la présentation des antigènes par les cellules épithéliales. (35) La présence d'IFN- γ induit l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II à la surface des cellules épithéliales du col de l'utérus. IFN- α et TNF- α peuvent également induire l'expression du CMH de classe I sur les cellules épithéliales du tractus génital féminin. (36)

Des chimiokines telles que RANTES (« regulated upon activation normal T cell expressed and secreted »), les protéines inflammatoires des macrophages (« macrophage inflammatory protein », MIP) -1 α et MIP-1 β ont également été observé au niveau des sécrétions vaginales. Celles-ci vont attirer les cellules immunitaires exprimant le récepteur CCR5. (37-41) Crane-Godreau et coll. ont aussi démontré que les cellules épithéliales du tractus génital féminin pouvaient exprimer la chimiokine MIP-3 α . (42) Cette dernière possède une activité microbicide contre les bactéries et est sécrétée en réponse à la présence de LPS. Sa présence attire les cellules dendritiques

immatures au niveau du tractus génital. (43) Plusieurs études ont démontré que, de façon basale ou en réponse à différents stimulus, les cellules épithéliales du tractus génital étaient capables de sécréter plusieurs des chimiokines et cytokines observées dans les sécrétions vaginales dont l'IL-8, le facteur -1 chimiotactique des monocytes (MCP-1), MIP-1 β , CCL21, RANTES, l'IFN- α , l'IFN- β , l'IL-1 β , l'IL-6 et TNF- α ainsi que certains facteurs de croissance tel que le facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) et le facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes (G-CSF). Cette sécrétion se fait, en général, du coté apical des cellules épithéliales polarisées.(44-46)

2.4.3 Les cellules épithéliales du tractus génital féminin

L'épithélium stratifié et multi couches du tractus génital féminin offre une barrière physique aux passages des antigènes. L'épaisseur de l'épithélium varie selon le cycle hormonal ainsi que l'activité endocytaire des cellules épithéliales. L'épithélium du tractus génital féminin est constitué de cellules épithéliales polarisées qui peuvent internaliser des macromolécules par leur coté apical, latéral ou basal. Les minces jonctions qui relient les pôles apicaux des cellules épithéliales offrent une barrière de diffusion et préviennent la diffusion latérale des glycolipides et des protéines entre les domaines apicaux et basolatéraux de la membrane. Pour pouvoir interagir avec les cellules immunitaires, les antigènes doivent traverser la barrière formée par les cellules épithéliales, soit par voie transcellulaire, soit par voie paracellulaire. La voie transcellulaire s'effectue par des vésicules alors que la route paracellulaire se déroule à travers les jonctions étroites entre les cellules épithéliales. La grandeur de la jonction peut être modulée par des facteurs environnementaux solubles (tels que des produits bactériens et des facteurs de l'hôte comme les cytokines et les hormones). Ainsi, TNF- α , l'IL-4, l'IL-13 et l'IFN- γ augmentent la perméabilité de l'épithélium, alors que le TGF- β et l'IL-15 augmentent son imperméabilité.(19)

Les cellules épithéliales présentes dans le tractus génital féminin représentent, premièrement, une barrière physique contre les pathogènes et, deuxièmement, agissent comme sentinelles qui initient la réponse innée. Elles font également le lien avec la réponse adaptative, produisent plusieurs protéines ayant une activité microbicide qui sont présentes dans le mucus ainsi que plusieurs cytokines et chimiokines dans le but d'initier la réponse immunitaire (tel que discuté dans la section précédente). Des brisures au niveau des jonctions étroites entre les cellules épithéliales ou des dommages à la couche de l'épithélium peuvent entraîner d'importantes conséquences.

Les cellules épithéliales ont été caractérisées comme étant des cellules immunitaires dites non conventionnelles, dues à leur capacité à sécréter des cytokines et à exprimer les molécules du CMH de classe I et II, leur permettant d'agir comme des APC. Elles ont aussi la capacité de reconnaître des patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). La reconnaissance de ces PAMP se fait via les TLR. L'expression des TLR par les cellules épithéliales permet l'initiation et la communication entre la réponse innée et la réponse adaptative. Plusieurs groupes ont investigué la présence et le rôle des TLR dans le tractus génital féminin. Sur les dix TLR pouvant être exprimés chez l'humain, Fichorova et coll. ont démontré la présence de TLR-1,-2,-3,-5 et -6 au niveau du col et du vagin, par une rétro transcription suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) et par cytométrie de flux. (47) Herbst-Kralovetz et coll. ont montré que les cellules épithéliales du tractus génital féminin exprimaient les TLR 1 à 3 et 5 à 9. Le TLR4 semble, quant à lui, être exprimé au niveau des cellules épithéliales de l'endocol et du vagin. Son expression ainsi que celle des TLR7/9, se fait uniquement de façon minimale et ces trois TLR ne sont pas continuellement actifs. Herbst-Kralovetz et coll. ont aussi montré qu'il n'y avait pas de changement dans l'expression des TLR selon l'âge de la femme. (48) Ainsi, si presque toutes les études réalisées convergent sur les TLR exprimés au niveau du tractus génital féminin, la distribution de ceux-ci ne fait pas consensus. Par exemple, Fazeli et coll. ont observé que TLR4 était présent uniquement au niveau de l'endocol et de l'endomètre, alors que Herbst-Kralovetz et coll. ont constaté qu'il était exprimé au niveau du vagin. (49)

Bien que les TLR soient exprimés tout au long du cycle menstruel, il semblerait qu'il y ait une plus faible expression de ces gènes durant la phase proliférative et menstruelle. Ceci suggère une influence de la progestérone sur l'expression des TLR au niveau du tractus génital féminin. (50) Le niveau d'expression de TLR2, TLR3, TLR4 et TLR9 semble être plus élevé durant la période menstruelle que durant la phase ovulatoire. L'ARNm du TLR2 est plus élevé au milieu de la phase proliférative que dans les autres périodes du cycle. Les ARNm de TLR3 et TLR4 sont plus élevés au début de la phase proliférative et à la fin de la phase sécrétrice alors que l'ARNm de TLR9 est uniquement augmenté au début de la phase proliférative et chute par la suite.(16) Une étude a aussi montré que l'expression des TLR3, TLR7 et TLR9 peut être augmentée par l'administration intra-vaginale de leurs ligands et que cette induction entraîne l'augmentation de l'expression du CMH de classe I à la surface des cellules épithéliales, qui peuvent ainsi agir comme des APC. (51) Cette capacité à présenter les antigènes diminue au fur et à mesure que le niveau d'oestrogène augmente. (52)

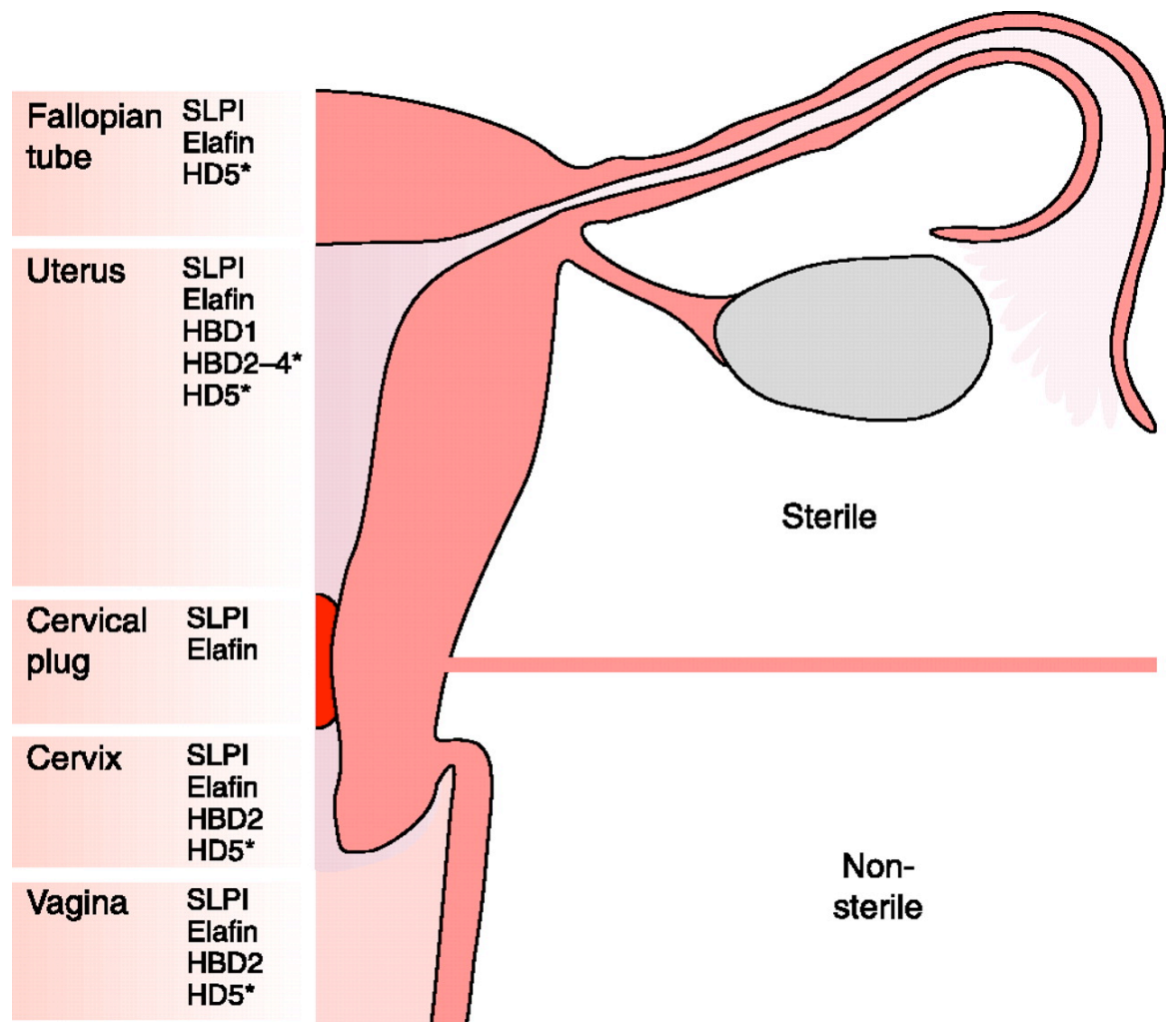


FIGURE 2 : DISTRIBUTION DES PROTÉINES DU MUCUS ET DES SÉCRÉTIONS VAGINALES DANS LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ

Tiré de: Horne AW et coll. Reproduction 2008 vol 135 p739-749

Avec l'autorisation Society for Reproduction and Fertility (SRF)

Les cellules épithéliales jouent un rôle indispensable au niveau de l'immunité des muqueuses. L'homéostasie de la muqueuse est, en effet, régulée par une interaction bidirectionnelle (« crosstalk ») entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires, dont principalement les cellules dendritiques (DC). Le phénotype des DC présentes dans les muqueuses semble être relié à la présence de cellules épithéliales polarisées, ce qui crée un environnement tolérogénique. La présence de bactéries invasives mène à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales et cela induit la maturation des DC de la muqueuse. (53-55)

2.5 Immunité innée et adaptative du tractus génital féminin

Le système immunitaire des muqueuses au niveau du tractus génital féminin est principalement sous le contrôle du système hormonal. Malgré plusieurs années d'investigation, les mécanismes qui régulent le système immunitaire des muqueuses au niveau du tractus génital féminin ne sont pas complètement clarifiés. Cela est en partie dû à la complexité du système immunitaire et du système endocrinien, mais aussi à la grande difficulté de mener des expériences dans les tissus touchant à ces deux systèmes.

Au niveau du GALT, les plaques de Peyer forment des structures lymphoïdes organisées. Ce type de structures lymphoïdes organisées n'a pas encore été retrouvé au niveau du tractus génital féminin. Les cellules immunitaires y sont présentes sous forme d'agrégats dont le nombre varie selon le cycle hormonal. La distribution des populations cellulaires retrouvées dans ces agrégats varie selon la région du tractus génital féminin. Au niveau de l'ouverture du vagin, on observe quelques lymphocytes et macrophages. Au niveau de la lamina propria du vagin, se retrouvent des agrégations de lymphocytes T de classe de différenciation (CD) 4^+ et $CD8^+$ ainsi que des macrophages $CD68^+$. C'est au niveau de l'épithélium que la concentration des lymphocytes T $CD8^+ CD45RO^+$ (cellules mémoires) est la plus importante. Cette population cellulaire représente la majorité des lymphocytes du vagin. Les cellules T $CD4^+$ sont pratiquement absentes de l'épithélium vaginal mais sont retrouvées en nombre important au niveau de la lamina propria. De plus, bien qu'au niveau du vagin la majorité des lymphocytes retrouvés soient des cellules mémoires, une petite population de lymphocytes naïfs y est également observée. (56)

Dans la région du col de l'utérus, les populations cellulaires observées sont plus nombreuses, en termes de quantité, comparativement à ce qui est observé au niveau vaginal. Au niveau de l'exocol, la population de lymphocytes $CD8^+ CD45RO^+$ est encore la population de cellules T la plus représentée. Toutefois, la distribution de cette

population, entre l'épithélium et la lamina propria, varie grandement d'une personne à l'autre. La population des $CD8^+ CD45RA^+$ est, quant à elle, peu représentée et est limitée à la lamina propria. (56) Une importante population de DC $CD1a^+$ est observée au niveau de l'exocol. La zone de transformation entre l'exocol et l'endocol contient une très forte concentration de macrophages, de cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que de granulocytes. Au niveau de l'endocol, la population de lymphocytes T est beaucoup plus faible que celle observée dans les autres régions du tractus génital inférieur. La population de granulocytes (particulièrement des cellules NK) y est, par contre, beaucoup plus élevée. C'est aussi au niveau de l'endocol que se retrouve principalement la population des lymphocytes B. (56)

2.5.1 Les macrophages et les cellules dendritiques

Cellules importantes de l'immunité innée, les macrophages sont largement distribués dans le tractus génital féminin. Ces cellules représentent environ 10% du nombre total des leucocytes présents dans ce compartiment. Ils sont particulièrement abondants au niveau de l'endomètre de l'utérus et les fluctuations hormonales régissent leur migration. (24) Différents types de macrophages et de monocytes sont retrouvés dans le tractus génital féminin. Au niveau du vagin et du col de l'utérus, on retrouve principalement la population $CD14^+CD68^+$. Comparativement à ce qui est observé au niveau du GALT, la majorité des macrophages du col et du vagin sont des cellules effectrices ($D7^+$) avec seulement une très faible proportion de cellules inductibles ($D1^+$) ou suppressives ($D1^+D7^+$). Au niveau vaginal, les macrophages sont situés dans la lamina propria et ils se différencient par leur expression des marqueurs $CD68$ et $CCR5$. (57)

Faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative, les DC sont des APC qui sont spécialement requises pour l'initiation des fonctions des cellules T. En condition normale, on retrouve deux populations de DC. Les DC demeurant dans l'épithélium (couche superficielle) sont principalement des cellules de Langerhans alors que la population retrouvée sous l'épithélium est caractérisée par les DC $DC-SIGN^+$ (« Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin ») (« DC submucosale $DC-SIGN^+$ »). Les cellules de Langerhans expriment le marqueur d'antigène leucocytaire cutané (CLA) et la langerhine. Par contre lors d'une infection, on observe une infiltration des DC plasmacytoïdes (pDC) et des DC dérivées des monocytes (mDC) provenant du sang périphérique. Dans l'épithélium vaginal et celui de l'exocol, la population principale de DC est caractérisée par un phénotype Langerhine⁺ $HLA-DR/DP/DQ^+$. On retrouve aussi, à ce niveau, une petite population de DC qui est $CD1a^+CCR5^+$. Au niveau du col de l'utérus la population de DC peut être divisée en deux catégories: les DC $CD1a^+$ (~20%) et les cellules $CD1a^-$. Au niveau de l'endocol,

tous les DC retrouvées expriment CCR5 et CXCR4, ce dernier étant le récepteur le plus abondant. (58) Comme les autres cellules immunitaires présentes dans le tractus génital féminin, les DC sont également sujettes à l'action du cycle hormonal. Ainsi, durant la phase menstruelle, on retrouve beaucoup plus de DC immatures au niveau du col de l'utérus que durant le reste du cycle et la progestérone augmente le nombre de cellules de Langerhans (Langerhine⁺CHM-II⁺) au niveau de l'épithélium vaginal. (59-61) Ce sont principalement les défensines HBD-1 à -3 qui conduisent la migration des DC vers l'épithélium vaginal et vers celui du col. Cette migration des DC se fait via le récepteur CCR6 présent à la surface des DC. HBD-2, qui est continuellement exprimé dans le tractus génital féminin, peut promouvoir la différenciation et l'activation des DC ainsi que celles des macrophages. Cela démontre bien le double rôle que peuvent jouer ces constituants du mucus en agissant directement sur les pathogènes, grâce à leur activité antimicrobienne, mais également en activant les cellules immunitaires dans les tissus locaux environnants. La majorité des DC au niveau vaginal expriment le récepteur du fragment cristallisable (Fc), un récepteur pour les immunoglobulines. Les DC peuvent ainsi capter les complexes immuns pour les présenter aux cellules T. (57)

2.5.2 Les cellules tueuses naturelles

Les NK jouent un rôle important dans l'immunité innée. Elles agissent comme des cellules sentinelles qui préparent les attaques contre les pathogènes et induisent les défenses immunitaires de l'hôte.

La présence et l'activité des NK au niveau du tractus génital féminin ont principalement été étudiées en relation avec la procréation et le rejet fœtal. Une forte activité des NK a été associée avec des avortements à répétition, alors qu'une trop faible activité des NK au niveau du tractus génital augmente les risques d'endométriose, de cancer utérin et ovarien.

Au niveau de l'endomètre utérin, 70% des leucocytes présents sont des cellules NK. À ce niveau, les NK portent le nom de NK utérine (uNK). Ce sont les cellules NK les plus étudiées du tractus génital féminin. Elles sont principalement immunorégulatrices (productrices de cytokines) et sont CD56^{bright}. Elles peuvent produire de grande quantité d'IL-8, d'IFN- γ et de GM-CSF. Comme chez les NK périphériques, la présence de TGF- β a un effet inhibiteur sur la sécrétion de cytokines par les uNK. Les cellules NK présentes au niveau de l'endomètre utérin proviennent du sang et de la prolifération locale. Elles sont recrutées vers l'endomètre utérin par les ligands de CXCR4. Les uNK expriment également certains TLR soient les TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 et TLR10, le plus présent étant le TLR2. (62)

Il y a très peu d'information disponible quant à la répartition et l'activité des NK dans le reste du tractus génital féminin. Par contre, Sentman et coll. ont démontré la présence de cellules $CD56^+$, $CD45^+$ et $CD3^-$ tout au long du tractus génital. (62) Ces cellules représentent environ 16% des leucocytes présents. (63) Ils ont aussi démontré que les NK présentes au niveau de l'endocol n'expriment pas $CD16$ alors que celles de l'exocol et du vagin l'expriment. Les NK $CD16^+$ ayant une activité cytolytique, cela laisse croire que la distribution des différents types de cellules NK, tout au long du tractus génital féminin, peut contribuer à une différence dans la réponse immune entre la région supérieure et la région inférieure du tractus génital féminin. Autre différence observée au niveau de la distribution des NK : les NK de l'endomètre utérin et de l'endocol sont influencées par le cycle menstruel alors que les NK du vagin ne semblent pas être sous cette influence. (56)

Il semblerait également qu'il y ait une relation inverse entre l'activité des NK et celle des cellules $T CD8^+$ au niveau du tractus génital féminin. Ainsi, lorsqu'une femme est ménopausée, l'activité des NK est plus faible que celle des cellules $T CD8^+$ alors que l'inverse s'observe chez les femmes ayant un cycle hormonal actif. (64)

2.5.3 Les cellules T

Les cellules T représentent près de 50% des leucocytes présents dans le tractus génital féminin. Au niveau de l'endomètre, les cellules T se retrouvent dans la région intra-épithéliale et de manière isolée. Au niveau du vagin et du col de l'utérus, les cellules T ($CD3^+$) sont retrouvées tout au long de la lamina propria. Directement sous l'épithélium, on peut observer des bandes de cellules $CD3^+$ bien distinctes. Ces bandes sont constituées de cellules $T CD3^+CD8^+$ et de cellules $T CD3^+CD4^+$. Cette population de cellules $T CD4^+$ est majoritairement constituée de cellules de type mémoire $CD45RO^+$. Elle exprime beaucoup plus fortement le récepteur $CCR5$ comparativement aux cellules $T CD4^+$ provenant du sang périphérique. La population de cellules $T CD3^+CD8^+$ représente la population de cellules T prédominante avec environ 360 cellules par mm^2 . Au niveau de l'épithélium, cette population cellulaire peut également être observée à l'extérieur de ces bandes. (65)

Comme c'est le cas pour plusieurs des cellules immunitaires présentes dans ce compartiment, les cellules T du tractus génital féminin subissent l'influence du cycle hormonal. L'activité cytotoxique des cellules $T CD8^+$ augmente lorsque le niveau hormonal est bas. Ainsi, lorsque le taux de progestérone et d'œstrogène est élevé dans le sang, l'activité cytotoxique des cellules $T CD8^+$ au niveau du tractus génital féminin est pratiquement indétectable. (65)

2.5.4 Les cellules B et les immunoglobulines

Au niveau du tractus génital féminin, les cellules B sont retrouvées uniquement à l'intérieur de denses agrégats lymphoïdes qui ressemblent à des structures folliculaires. Au niveau de ces agrégats, on retrouve des cellules CD19⁺ et des cellules CD20⁺. Des cellules exprimant le marqueur d'activation CD38⁺ (environ 30 cellules par mm²) et des plasmocytes sont retrouvées dans la lamina propria du col de l'utérus et du vagin, mais n'ont jamais été observées au niveau de l'épithélium. (65)

L'immunité des muqueuses constitue une impressionnante première ligne de défense. Les anticorps sécrétés (S-Ig) par des plasmablastes et des plasmocytes sont l'un de ses composants les plus importants et les mieux définis. Ils sont habituellement produits localement par les cellules B activées au niveau des muqueuses et des glandes exocrines associées aux muqueuses. La sécrétion active des Ig dépend de la relation entre les cellules B des muqueuses et de la présence d'une glycoprotéine transmembranaire, présente à la surface des cellules épithéliales, nommée récepteur Ig polymérique (pIgR). Cette glycoprotéine coordonne le transport trans-épithélial des IgA vers la lumière. Au niveau des muqueuses, la majorité des cellules vont produire des dimères IgA (nommé pIgA). Les fonctions principales des S-IgA sont de contrôler la flore commensale et de neutraliser les pathogènes et les toxines. (66)

Au niveau du tractus génital féminin, les anticorps retrouvés dans les sécrétions vaginales et le mucus sont en partie produits localement par les plasmocytes résidents mais également par les cellules B du sang périphérique. Comparativement à ce qui est observé dans le reste du MALT, d'importantes variations sont observées au niveau du tractus génital féminin. Le niveau des anticorps ainsi que les isotypes sont fortement régulés par les hormones féminines : le compte total d'immunoglobulines dans le mucus du col augmente rapidement dans les stades pré-ovulatoires et décroît durant l'ovulation. (67) De plus, comparativement à ce qui est observé dans les autres muqueuses, ce sont les IgG qui prédominent et non les IgA. Cette différence démontre encore une fois le caractère unique du tractus génital féminin. Le taux des IgG dans le tractus génital féminin étant souvent beaucoup plus élevé que celui observé dans le sérum, cela permet de dire qu'au moins une partie de ceux-ci sont produits localement. On possède très peu d'information sur le transport et l'activité des IgG au niveau du tractus génital féminin. La majorité des IgA retrouvée dans le mucus du col sont des IgA sécrétés (S-IgA). Il existe deux sous classes d'IgA soit IgA1 et IgA2. Ceux-ci diffèrent l'un de l'autre par leur structure protéinique et carbohydrate, leur distribution dans les fluides corporels et leur fonction effectrice. Les anticorps plus spécifiques aux virus sont habituellement des IgA1. Ils sont, en général, prédominant dans le sérum et les sécrétions respiratoires et intestinales. Au niveau du tractus génital féminin, on les

retrouve en nombre égal. Dans le mucus du col, ces derniers sont constitués à 70% d'IgA polymérique alors qu'au niveau des sécrétions vaginales on retrouve en proportion égale les IgA polymérique et monomérique. (Revue par :(68;69;69))

3. LE VIH

Le VIH/SIDA se classe parmi les maladies les plus dévastatrices au monde en raison de sa propagation rapide. Près de trois décennies après le début de l'épidémie, on estimait à 2.7 millions le nombre de nouvelles infections au VIH en 2008. Selon le dernier rapport de l'ONUSIDA, il y aurait environ 33 millions de personnes vivant avec le VIH/SIDA et 67% d'entre elles vivent en Afrique subsaharienne. Les femmes représentent la moitié de toutes les infections dans le monde. La voie de transmission la plus fréquente demeure les rapports sexuels non protégés. (1)

3.1 Le VIH et les femmes

Bien que dans la plupart des pays, le VIH touche de manière disproportionnée les consommateurs de drogues injectables et les hommes qui ont des relations sexuelles avec d'autres hommes, en Afrique subsaharienne, les femmes et les filles âgées entre 15 à 24 ans courent un risque d'infection au VIH trois fois plus grand que leurs homologues masculins et représentent plus de 60% des cas d'infection par le VIH. (1) La vulnérabilité accrue des femmes devant le VIH découle d'une combinaison de facteurs biologiques, sociaux et culturels.

La différence individuelle au niveau de la susceptibilité à l'infection au VIH et les variations dans la vitesse de progression de la maladie sont multifactorielles. L'âge, le statut marital, un historique de prostitution, la voie d'entrée du virus, l'utilisation du condom, le nombre de partenaires différents et la fréquence de rapports sexuels non protégés avec des partenaires séropositifs sont tous des facteurs qui ont été associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH. (70-72)

Les déterminants biologiques qui influencent la susceptibilité des femmes incluent l'exposition à une plus grande quantité de sperme contenant le VIH au moment de la relation sexuelle, un dérèglement de la flore microbienne, une modification du pH vaginal vers un milieu moins acide, la présence d'ulcères, la présence d'une ITS, la prise de contraceptif oraux et les fluctuations hormonales dues au cycle menstruel. À cela s'ajoutent des facteurs sociaux et culturels comme l'inégalité entre les sexes, la pauvreté et les normes culturelles et sexuelles. De plus, les pratiques vaginales

(comme le « dry sex ») et les produits utilisés pour assécher, resserrer et nettoyer le vagin (par exemple : savon, vinaigre, citron, produits ménagers, tissus, papiers, produits commerciaux pour les douches vaginales etc.) sont des éléments influençant également la susceptibilité à l'infection au VIH. (73)

D'autres facteurs biologiques ou viraux indépendants de la femme, reliés à l'infektivité du partenaire, sont aussi à prendre en considération pour la susceptibilité à l'infection au VIH : le stade d'infection du partenaire, la charge virale de celui-ci, la circoncision, la présence d'ITS, la souche du virus, les quasi-espèces présentes ainsi que l'utilisation d'une thérapie antirétrovirale. Revue par : (74;75)

Il y a un urgent besoin de développer des technologies préventives comme un microbicide ou un vaccin pour pouvoir réduire et éventuellement endiguer la propagation du VIH chez les femmes. Malgré une telle urgence et la forte incidence du VIH chez les femmes, il y a encore très peu d'information sur la dynamique de la transmission au niveau vaginal, l'immunité naturelle du tractus génital féminin et les facteurs génétiques influençant la susceptibilité à l'infection au VIH chez la femme au niveau de la porte d'entrée du virus.

3.2 Les autres infections transmissibles sexuellement

La contribution des ITS dans l'infection au VIH a maintes fois été démontrée.(76-79) Les infections génitales, avec ou sans ulcère, qui causent une inflammation de la muqueuse peuvent augmenter les risques d'acquisition du VIH et faciliter l'infection. Les infections génitales vont entraîner l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse et ainsi augmenter le nombre de cellules cibles potentielles pour le VIH. Alors que dans une muqueuse normale, les DC sont localisées immédiatement sous l'épithélium, des DC myéloïdes et des pDC provenant du sang sont recrutées vers la muqueuse en présence d'un processus inflammatoire. Des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont produites localement, ce qui signifie que des macrophages, des cellules T CD4 et des cellules T CD8 seront également recrutées au niveau vaginal. La présence d'une infection aura donc pour résultat d'augmenter le nombre de cellules DC DC-SIGN+ et de cellules CD4 CCR5+, qui sont les principales cibles du virus.

L'infection à VHS-2 est la principale cause d'infection ulcéreuse, tant dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. Le VHS-2 infecte environ 70% des adultes dans les pays en développement et sa prévalence augmente à près de 90% chez les personnes VIH positives. Plusieurs évidences épidémiologiques démontrent que l'infection à VHS-2 augmente de deux à quatre fois les risques d'acquisition du VIH. (80) Les mécanismes possibles reliés à l'augmentation du risque

d'acquisition du VIH en lien avec la présence de VHS-2 incluent non seulement un bris dans la membrane de la muqueuse facilitant l'entrée du VIH mais également l'augmentation du nombre de cellules cibles du VIH dans la muqueuse génitale. Tout comme le VIH, le VHS-2 est transmis lors de relations sexuelles et une forte synergie existe entre les deux virus lors d'une co-infection. Même si la réactivation de VSH-2 au niveau génitale est souvent cliniquement non visible, la présence du virus réactivé induit, tout de même, l'augmentation de la réplication du VIH dans les muqueuses. (81) Rebbapragada et coll. ont montré que, lors d'une co-infection VIH/VHS-2, la présence de VHS-2 était associée avec une augmentation des DC immatures exprimant DC-SIGN et avec une augmentation des cellules T CD4⁺ CCR5⁺ au niveau du col de l'utérus. La présence de l'infection à VIH était, quant à elle, associée avec une diminution des DC immatures et une augmentation de la réactivation de VHS-2 qui, en retour, augmentait le relargage du VIH. (78) Certains groupes ont étudié l'effet de l'administration d'une thérapie suppressive pour VHS-2 sur la charge virale du VIH. Ainsi, l'administration d'une thérapie anti-VHS-2 est associée avec une diminution de la charge virale du VIH dans le plasma et le compartiment génital mais l'impact d'une telle thérapie sur l'incidence de l'infection n'est toujours pas définie. (82;83) Des protéines du VHS-2 (ICPO, ICP27 et Us11) peuvent également induire l'expression du VIH. Ainsi, la présence de VHS-2 joue un rôle important dans la propagation du VIH en augmentant le caractère infectieux de la personne VIH positif et en accentuant la réplication virale ainsi que le relargage du VIH. (76;78;84)

Le *Treponema pallidum* est l'agent causal de la syphilis. Environ 12 millions d'ITS y sont attribuables dans le monde par année. Sa présence a été associée à une augmentation de la transmission et des risques d'acquisition du VIH. L'infection par *T. pallidum* entraîne des ulcérations qui brisent l'intégrité de l'épithélium de la muqueuse. La présence d'ulcère augmente l'influx local de cellules T CD4⁺ et induit l'expression de CCR5 sur les monocytes, ce qui augmente le nombre de cellules pouvant être infectées par le VIH. (79;85)

L'infection par le virus du papillome humain (VPH) a été associée avec une augmentation d'IL-2, d'IL-10 et de l'IFN- γ dans le tractus génital féminin. Sa présence cause des lésions intra-épithéliales et dans certaines conditions, l'infection par un VPH oncogène entraîne un cancer du col de l'utérus. Une activation immunitaire est observée, au niveau vaginal, chez les femmes porteuses du VPH, et cela augmente les risques d'acquisition du VIH. Lorsqu'une personne est co-infectée avec le VPH et le VIH, une augmentation de l'expression d'IL-4 est observée dans le tractus génital féminin. (86)

Les infections non ulcéreuses causées par *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* peuvent aussi recruter et activer les cellules cibles du VIH. *N. gonorrhoeae* inhibe la maturation des DC et leur habilité à établir une réponse immunitaire spécifique anti-VIH. L'infection à *N. gonorrhoeae*, même lorsqu'asymptomatique, est associée avec une augmentation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α par les cellules épithéliales au niveau des sécrétions vaginales. (87) *C. trachomatis* est une bactérie intracellulaire et est l'une des causes majeures d'ITS dans le monde. Environ 90 millions des nouvelles ITS y seraient attribuables chaque année.(88) Sa présence a été associée avec une augmentation d'IL-1 β et de MCP-1 au niveau du tractus génital féminin. (89)

Trichomonas vaginalis est un protozoaire qui peut causer une vaginite. Cette infection est caractérisée par une augmentation d'IL-8 qui attire les neutrophiles et une augmentation de MIP-3 α , un chimioattractant pour les cellules immunitaires et servant à la maturation des DC. Ainsi, l'augmentation de MIP-3 α augmente probablement le nombre de cellules cibles infectables par le VIH et contribue donc à augmenter la susceptibilité à l'infection au VIH.(90)

Candida albicans est une levure commensale normalement présente dans le tractus gastro-intestinal et le tractus reproducteur. Il arrive que *C. albicans* prenne le dessus sur le reste de la flore commensale et cela cause une candidose. Cet état est associé avec une augmentation des cytokines et des cellules associées avec une réponse de type Th2. (91)

Les vaginoses bactériennes ont été associées avec une augmentation des risques d'acquisition du VIH, possiblement en modulant l'immunité innée du vagin. La vaginose bactérienne est le résultat d'une croissance anormale des bactéries anaérobiques (principalement *Gardnella vaginalis*) au détriment de la flore normale des lactobacilles. Elle a pour résultat une augmentation du pH des fluides vaginaux. Les sécrétions vaginales des femmes avec une vaginose bactérienne sont déficientes en peptides antimicrobiens tels que les lysozymes, les lactoferrines et les défensines. Tout comme les ITS, la vaginose bactérienne recrute des cellules inflammatoires dans la muqueuse vaginale. Des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β et TNF- α sont augmentées dans les sécrétions vaginales des femmes avec une vaginose bactérienne. Le niveau de RANTES est également plus élevé. *In vitro*, ces cytokines peuvent augmenter la réplication virale du VIH. Généralement, les femmes avec une vaginose bactérienne produisent peu d'IL-8 et de β -défensine. L'IL-8 est une chimiokine qui entraîne un apport de neutrophiles au site d'infection. Bien que certaines études aient montré une augmentation d'IL-8 dans le milieu vaginal des femmes porteuses d'une vaginose

bactérienne, la présence des neutrophiles demeure quand même diminuée par rapport aux femmes sans vaginose bactérienne. Un autre mécanisme de la synergie entre la vaginose bactérienne et le VIH inclut la stimulation de l'expression du VIH via TLR-2. De plus, en cas de co-infection avec le VIH, la présence de la vaginose bactérienne augmente le relargage du virus.(77;92;93)

3.3 Les déterminants génétiques influençant la susceptibilité au VIH

En plus, des facteurs mentionnés dans les sections précédentes, plusieurs marqueurs génétiques jouent un rôle dans la susceptibilité à l'infection au VIH.

3.3.1 Les récepteurs des chimiokines et leurs ligands

Plusieurs types de cellules inflammatoires et immunorégulatrices sont influencés par la relation entre les récepteurs des chimiokines et la présence de leurs ligands. Deux familles de récepteurs des chimiokines sont particulièrement importantes dans l'infection au VIH. La famille des récepteurs C-C (CCR), comprenant CCR2 et CCR5, et les membres de la famille des récepteurs C-X-C (CXCR), dont CXCR4.

L'entrée du VIH dans les cellules cibles requiert plusieurs étapes qui mènent à la fusion de la membrane virale et cellulaire. Le VIH utilise le récepteur CD4 comme récepteur primaire. (94;95) Sa liaison avec le récepteur CD4 entraîne un changement de conformation de l'enveloppe virale qui permet au virus de se lier à un co-récepteur (principalement CCR5 ou CXCR4). (96;97) Certains polymorphismes dans les gènes codant pour CCR5 et CXCR4 ont été associés avec la susceptibilité à l'infection et la progression de la maladie (tableau 1). L'allèle CCR5 Δ 32 est caractérisé par une délétion de 32 paires de bases (pb) qui mène à l'expression d'un récepteur tronqué. Celui-ci n'est pas transporté à la surface cellulaire. La présence de cet allèle, sous sa forme homozygote, est associée avec une protection contre l'infection, le co-récepteur principal du virus n'étant pas présent. Cet allèle est surreprésenté dans les cohortes d'individus caucasiens exposés mais non infectés (ESN) mais il est absent chez les Africains. (98-101) D'autres mutations dans le gène CCR5 ont également été associées avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Bien que très rares, trois autres mutations (C20S, m303 et T303A) sont retrouvées avec une fréquence élevée dans les cohortes d'ESN. La présence de la mutation C20S affecte la formation des ponts disulfures et altère ainsi l'expression de surface du récepteur. Les deux autres mutations entraînent l'inhibition de l'expression du récepteur à la surface. (102;103) D'autres mutations dans CCR5 ou la présence d'anticorps anti-CCR5 ont été associées avec la progression de la maladie vers la phase SIDA. Des mutations dans CCR2 et CX3CR1 ont aussi été associées, par certaines études, avec la progression du VIH. Cependant, aucune étude

n'a relié la présence de polymorphismes dans ces gènes avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Revue par : (104)

L'intérêt pour l'étude des β -chimiokines en relation avec l'infection au VIH a commencé lorsque des chercheurs ont observé une augmentation significative des taux de RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β dans le surnageant de culture de cellules CD8 ayant une activité suppressive sur le VIH. (105) Les β -chimiokines MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) et RANTES (CCL5) sont les ligands naturels de CCR5. Ces chimiokines peuvent diminuer directement la propagation du virus en entrant en compétition avec le co-récepteur du virus ou, de façon indirecte, en modulant l'expression de surface des récepteurs. (98;106-110) Lorsque les β -chimiokines se lient au récepteur CCR5, cela entraîne l'internalisation du récepteur et élimine ainsi la capacité du VIH de tropisme R5 à entrer dans les cellules. Des niveaux élevés de RANTES ont été observés dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'hommes hautement exposés mais non infectés. (111) Quelques polymorphismes dans les gènes de ces chimiokines ont été associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Ainsi, deux études ont démontré que trois polymorphismes [ss46566437 (exon3), ss46566439 (promoteur) et ss46566438 (intron1)] situés dans le gène CCL3 étaient associés avec une protection envers le VIH chez les Africains-Américains. (69;112) CCL3L1, un des isoformes de MIP-1 α nommé MIP-1 α P, est un puissant agoniste de CCR5. Le niveau de CCL3L1 est déterminé principalement par le nombre de copies du gène qu'un individu possède. Ce nombre peut varier de 2 à 10 copies. En général, les caucasiens possèdent environ 2 copies du gène alors que les Africains en possèdent 5 copies. On ne sait toujours pas quel est l'impact individuel du nombre de copies sur la susceptibilité à l'infection au VIH, une étude ayant démontré un effet alors qu'une autre n'a observé aucune relation entre les deux. (113;114) Par contre, il semblerait que de posséder moins de copies que la moyenne de la population augmente de façon importante la susceptibilité à l'infection au VIH. (115) MIP-1 β est, quant à lui, codé par deux gènes (CCL4 et CCL4L1). En plus, d'avoir un nombre de copies variant d'un individu à l'autre, deux polymorphismes (L1 et L2) ont été décrits. Les individus homozygotes pour le polymorphisme L2 ont un niveau réduit des transcrits de CCL4 comparativement à celui des individus L1/L1. Une fréquence plus élevée de L2 a été observée chez des patients VIH positifs comparativement aux personnes VIH négatives, suggérant un rôle dans la susceptibilité à l'infection au VIH. (116) Des polymorphismes dans le gène codant pour RANTES ont aussi été décrits. Deux polymorphismes situés dans le promoteur (-28G et -403A) semblent moduler la transcription de RANTES. Une étude a montré que le polymorphisme -28G était associé avec une diminution du risque d'acquisition du VIH. (117) La mutation -403A a été associée avec une augmentation du risque d'infection. (118) L'effet de ces deux polymorphismes est assez controversé, les différentes études

qui ont analysé la présence de ces mutations ayant observé soit des résultats complètement opposés ou soit aucun effet sur la susceptibilité à l'infection au VIH (voir tableau 1). (117-121)

SDF-1 (« stromal derived factor-1 », aussi appelé CXCL12) est le seul ligand connu de CXCR4. Tout comme le font les β -chimiokines pour CCR5, la liaison de SDF-1 avec CXCR4 mène à l'internalisation du récepteur. Un polymorphisme dans une région non codante de SDF-1 (SDF1-3'A) est associé avec une protection contre l'acquisition du VIH ainsi qu'un ralentissement de la progression de la maladie (voir tableau 1). (122)

D'autres chimiokines ont également un impact sur le VIH. C'est le cas de MCP-1 (aussi appelé CCL2). CCL2 est le ligand principal de CCR2. CCR2 peut, dans certaines conditions, être utilisé comme co-récepteur par le VIH. La présence de l'allèle MCP-1 -2578G de façon homozygote a été associée avec une diminution de 50% des risques d'acquisition du VIH (voir tableau 1). (123)

3.3.2 Les lectines

La protéine liant le mannose (« mannose binding protein », MBP) est une lectine calcium dépendante qui a un rôle important dans l'immunité innée en activant le complément et la phagocytose. Trois polymorphismes dans l'exon 1 (allèles B,C et D) et des substitutions nucléotidiques dans le promoteur ont été associés avec de faibles concentrations sériques de la protéine et des problèmes dans le phénomène d'opsonisation. (124-127) La présence homozygote des trois polymorphismes dans l'exon 1 a été associée de façon indépendante avec une augmentation de la susceptibilité à l'infection au VIH. (128) Deux polymorphismes dans le promoteur du gène MBP2 ont aussi été associés avec une augmentation du risque de transmission du VIH de la mère à l'enfant. (129)

DC-SIGN est une lectine de type C qui a été impliquée dans la transmission de cellule à cellule du VIH, des DC vers les cellules T, via un phénomène nommé trans-infection.(130) Le rôle important joué par les DC dans l'infection suggère un rôle potentiel des variants de DC-SIGN dans la susceptibilité à l'infection au VIH. Un polymorphisme en position -336 du promoteur a été identifié par Martin et coll. Les personnes portant l'allèle -336C sont plus susceptibles d'acquérir le VIH que celles portant le variant -336T. Par contre, cette association a été uniquement démontrée pour la transmission parentérale et n'a pas été observée lors de transmission sexuelle. (131)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des polymorphismes des chimiokines et de leurs récepteurs associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Gènes et polymorphismes	Association avec susceptibilité à l'infection au VIH	Références
CCR5 Δ 32 (homozygote)	Protection	(98-101)
C20S, m303, T303A		(102;103)
CCL3		
ss46566437(exon 3)	Protection	(69;112)
ss46566438 (promoteur)		
ss46566438 (intron 1)		
CCL3L1		
Nombre de copies du gène élevé	Protection	(115)
CCL4L1		
L2	Susceptibilité	(116)
RANTES		
-28G	Protection	(117)
-403A	Susceptibilité	(118)
SDF-1-3'A	Protection	(122)
MCP-1 2578G	Protection	(123)

En plus de cette mutation, une région répétée dans le gène a aussi été associée avec la susceptibilité à l'infection au VIH. En effet, le fait d'être hétérozygote pour le nombre de régions répétées dans l'exon 4 est associé avec une diminution du risque d'acquisition du VIH chez les ESN.(132)

DC-SIGNR est une autre lectine qui joue un rôle dans la transmission du VIH. Présent à la surface des cellules endothéliales, il est aussi impliqué dans la transmission en trans du VIH. Tout comme pour DC-SIGN, l'exon 4 de DC-SIGNR est caractérisé par la présence de régions répétées. Lors d'une étude auprès d'une cohorte d'ESN, des chercheurs ont observé que la présence homozygote de cinq régions répétées était liée à une diminution du risque d'infection à VIH. (133) Une autre étude, auprès de couples discordants a permis d'associer la présence hétérozygote de 5/7 régions répétées avec la protection (voir tableau # 2). (134)

3.3.3 Les gènes des cytokines

Les cytokines sont d'importants modulateurs de la réponse immunitaire. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés et plusieurs d'entre eux ont été associés avec diverses maladies. Certains polymorphismes ont été associés avec la progression de la maladie causée par le VIH et avec la susceptibilité à l'infection au VIH (voir tableau #3).

L'IL-1 α est une cytokine pro-inflammatoire connue pour augmenter la réplication du VIH. Des niveaux élevés d'IL-1 α ont été rapportés chez les individus infectés par le VIH et considérés comme étant des progresseurs rapides. Dans cet ordre d'idée, il a été démontré que l'allèle IL-1 α -889T (associé avec une augmentation de l'expression) est significativement plus élevé chez les personnes VIH positives que chez les personnes VIH négatives, suggérant un rôle dans la susceptibilité à l'infection au VIH. (135)

L'IL-4 est une cytokine qui possède plusieurs fonctions. Elle induit la production d'IgE par les cellules B, diminue l'expression de CCR5 et augmente l'expression de CXCR4. La présence du polymorphisme IL-4-590T augmente la production de cette cytokine. Ce polymorphisme a été associé avec une augmentation du risque de l'infection au VIH dans une population indienne. (135) Des études génétiques, portant sur le gène de la chaîne alpha du récepteur de l'IL-4, ont montré que l'haplotype U était associé avec la susceptibilité à l'infection. L'haplotype U est caractérisé par la présence de polymorphismes dans l'exon 12 (A375 et /ou R406 et/ou L411 et/ou P478 et/ou R551 et/ou I554). (136)

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des polymorphismes des lectines associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Lectines	Association avec susceptibilité à l'infection au VIH	Références
MBP		
Allèles B,C et D	Susceptibilité	(128)
-500 et -328 (promoteur)	Susceptibilité	(129)
DC-SIGN		
-336C	Susceptibilité	(131)
Nombre élevé de région répétée dans l'exon 4	Protection	(132)
DC-SIGNR		
5/5 régions répétées dans l'exon 4	Protection	(133)
5/7 régions répétées dans l'exon 4	Protection	(134)

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des polymorphismes des cytokines associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Cytokines	Association avec susceptibilité à l'infection au VIH	Références
IL-1 α -889T	Susceptibilité	(135)
IL-4		
-590T	Susceptibilité	(135)
Haplotype U	Susceptibilité	(136)
IL-10		
-1082G	Susceptibilité	(135)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et son gène est très polymorphe. L'allèle IL-10-1082G résulte en une élévation du niveau de la protéine et est associé avec une augmentation du risque d'infection le VIH. (135)

3.3.4 Autres gènes associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Les β -défensines ont un rôle important à jouer dans l'immunité innée. Il a été démontré que plusieurs d'entre elles ont une activité antivirale et sont capables d'inhiber le VIH. Trois substitutions nucléotidiques au niveau du promoteur du gène des β -défensines (*DEFB1*) (le génotype -52GG, et l'haplotype -44G et -52G) ont été associées avec une protection contre l'infection au VIH dans la transmission verticale du VIH.(137) Aucune étude n'a encore démontré de lien entre des polymorphismes dans *DEFB1* et la susceptibilité à l'infection au VIH lors de relation sexuelle.

La protéine « Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G » (APOBEC3G) est une désoxycytidine désaminase codée par le génome humaine et qui interfère avec la réplication du VIH. Durant la rétrotranscription du virus, APOBEC3G induit des mutations en désaminant les résidus cytidines en uridines sur le brin négatif nouvellement synthétisé, ce qui conduit à l'introduction de mutations létales dans le génome des particules virales en formation. (138) Quelques polymorphismes ont été associés avec la vitesse de progression de la maladie et le polymorphisme C40693T a été hautement associé avec une augmentation du risque d'infection dans une population caucasienne. (139)

Étant considéré comme les sentinelles du système immunitaire, les NK sont l'une des premières cellules à être impliquées dans la réponse immunitaire. Les cellules NK sont régulées, en partie, par la présence des récepteurs « killer Ig-like » (KIR), inhibiteurs ou activateurs, interagissant avec les protéines d'antigènes leucocytaires humains (HLA). Les gènes KIR et HLA sont hautement polymorphes et certaines combinaisons ont été associées avec le VIH. Une première étude a démontré que chez des TS de la Côte d'Ivoire, celles qui étaient séronégatives possédaient plus souvent les gènes inhibiteurs des KIR mais n'exprimaient pas leurs ligands HLA, empêchant ainsi l'activation des récepteurs KIR. Ainsi, la présence de KIR2DL2/KIR2DL3, en l'absence du ligand HLA-C1, et la présence homozygote de KIR3DL1, en l'absence de son ligand HLA-Bw4, sont associées avec la protection. Par contre, la combinaison KIR2DL3 et HLA-C1 a été associée de façon significative avec la susceptibilité à l'infection au VIH. (140) D'autres études ont montré que chez les ESN, il y avait un patron d'activation des NK. En effet, chez ces individus, le ratio KIR3DS1/KIR3DL1 était

élevé (c'est-à-dire favorisant le récepteur activateur KIR3DS1) et il y avait une diminution des transcrits de KIR3DL1. De plus, ces personnes exprimaient significativement plus le récepteur activateur NKG2C par rapport au NKG2A. (141;142)

3.3.5 Les gènes du CMH de classe I et de classe II

La région du CMH situé sur le chromosome 6 comprend, entre autre, les gènes codant pour les HLA de classe I et de classe II, ainsi que les gènes du transporteur associé avec les antigènes apprêtés (TAP). L'importance centrale des gènes du CMH dans l'infection au VIH ne fait plus de doute. Les HLA de classe I lient les peptides qui seront présentés aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et interagissent avec les cellules NK via les récepteurs activateurs ou inhibiteurs de celles-ci. Par ces deux mécanismes, les protéines HLA de classe I régulent de façon cruciale la réponse immunitaire face à une infection.

Le fait d'être homozygote pour les allèles du HLA, donc de reconnaître un moins grand répertoire d'antigènes, a été plus d'une fois associé avec un faible contrôle de l'infection à VIH. Or, aucune association n'a encore été faite sur la présence homozygote des allèles HLA et la susceptibilité à l'infection au VIH. Cependant, une hétérogénéité d'allèles entre le donneur et le receveur diminue les risques d'acquisition du virus. En absence de thérapie antirétrovirale, le partage de même allèle dans le locus des gènes HLA de classe I entre une mère et son fœtus augmente les risques de transmission verticale du VIH. (143;144) La concordance des allèles du locus HLA-B, chez des couples discordants du Zambie, a également été associée avec une augmentation du risque de transmission. (145)

Le tableau 4 indique les différents allèles des gènes HLA qui ont été associé avec le VIH. Dans une étude portant sur des TS du Kenya, la présence du super-type HLA-A*02/A*6802 a été associée avec une protection contre l'acquisition du VIH ainsi qu'avec une diminution de la transmission verticale du virus. La présence de HLA-A*2301 a été associée avec la susceptibilité à l'infection au VIH. (146) Chez des TS en Thaïlande, la protection a été associée avec la présence de l'allèle HLA-B18. (147) Dans une étude portant sur des couples discordants, il a été démontré que HLA-B53 était associé avec une protection, alors que HLA-Cw7 était associé avec une augmentation de la susceptibilité à l'infection. (148) Dans une autre étude, la présence de HLA-A*0205 a été associée avec la résistance à l'infection au VIH. Cette étude a aussi permis de relier l'allèle B*354 Px avec la susceptibilité à l'infection. De plus, un polymorphisme dans le gène TAP2 (Alanine en position 665) était associé avec la résistance. Cette dernière association peut être due à une meilleure efficacité à transporter les peptides ou à un déséquilibre de liaison. (149) Au niveau des gènes HLA

de classe II, Winchester et coll. ont montré que HLA-DRB1*03 était associé avec une augmentation du risque pour la transmission verticale, alors que DRB1*15 était associé avec une réduction du risque de la transmission de la mère à l'enfant. (150)

D'autres allèles HLA ont été associés avec la progression de la maladie. Deux haplotypes, soit HLA-A1-Cw7-B8-DR3-DQ2 et HLA-A11-B35-C4BQ0-DR1, ont été associés avec une progression rapide de la maladie. D'autres allèles, tels que HLA-A23, -A24, A-26, -B21, B35, -B38, -B53 ont aussi été associés avec une progression rapide. La présence de HLA-B27 et celle de HLA-B57 est associée avec un meilleur pronostic de la maladie. En effet, leur présence semble induire une réponse CTL plus efficace contre le VIH. (143;159)

3.3.6 Les gènes non classiques du CMH de classe I (HLA-E et HLA-G)

HLA-E et HLA-G font partie des molécules non classiques du CMH de classe I. HLA-E et HLA-G sont appelés gènes non classique de classe I car, comparativement aux autres HLA de classe I, ces deux gènes sont très peu polymorphes et sont situés sur le chromosome 6. Ces deux molécules ayant des propriétés immuno-modulatrices peuvent donc avoir un rôle important à jouer dans l'infection au VIH.

HLA-E est exprimé de façon ubiquitaire chez l'humain mais son niveau d'expression est relativement bas. (165) Bien que quelques polymorphismes aient été répertoriés dans la littérature, seuls deux allèles entraînent un changement au niveau de l'expression et de la fonction de HLA-E. L'allèle sauvage est HLA-E*0101. Celui-ci est caractérisé par la présence d'une arginine au codon 107 alors que l'allèle HLA-E*0103 est déterminé par une glycine au codon 107. Une étude de Strong et al. a étudié l'impact de cette substitution sur la protéine. Fait surprenant, la comparaison de la structure tri-dimensionnelle, par cristallographie, de la protéine HLA-E*0103 comparé à celle de HLA-E*0101 démontre que les deux protéines ont une structure similaire. En effet, il semble que la présence de la substitution d'une arginine pour une glycine n'ait qu'un effet très limité sur la structure de HLA-E, malgré cette substitution les résidus 104-109 sont à la même distance l'un de l'autre et la rotation et la conformation de la protéine est la même. Cependant, la présence de la substitution entraîne de véritables différences au niveau de l'affinité peptique de la chaîne lourde et de l'expression cellulaire. L'allèle HLA-E*0103 code pour une protéine qui démontre une plus grande affinité peptidique et qui est plus fortement exprimée à la surface cellulaire. (161) HLA-E lie les récepteurs CD94/NKG2 présents à la surface des cellules NK et sur certaines cellules T. CD94 forme un hétérodimère avec les glycoprotéines NKG2A/B, NKG2C, NKG2E et NKG2H. Une interaction entre HLA-E et un de ces hétérodimères mène à

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des allèles HLA associés avec l'infection au VIH

Allèle HLA	Association avec le VIH	Références
HLA-A*02/A*6802	Protection	(149)
HLA-B*1302		(146)
HLA-B18		(151)
HLA-B53		(148)
HLA-DRB1*15		(150)
HLA-Cw7	Susceptibilité	(148)
HLA-B354 Px		(149)
HLA-DRB1*03		(150)
HLA-DR1, -DR4	Progression lente	(152)
HLA-DRB1*0702-DQA1*0201		(153)
HLA-B17, -B27, -B57		(154-156)
HLA-DRB1*0101-DQA1*0101/	Progression rapide	(153)
HLA-DRB1*1401-DQA1*0101		(148)
HLA-DR3, -DR5		(157)
HLA-A1-B8-DR3		(158)
HLA DR3-DQ2		(159)
HLA-A1-B8-DR3/HLA A1-Cw7-B8-DR3		(152;158;160)
HLA-A23, -A24, -A26		(155;156)
HLA-B21, -B35, -B38, -B53		(161;162)
HLA-DQB1*0201		(163)
HLA-A1-Cw7-B8-DR3-DQ2		(160)
HLA-A11-B35-C4BQ0-DR1		(164)

l'activation, l'inhibition ou n'a aucun effet sur l'activité cytolytique ou cytotoxique des NK. Par exemple, la liaison avec NKG2A aura un effet inhibiteur, alors que la liaison avec NKG2C aura un effet activateur sur la fonction des NK. (166) Pour être exprimé à la surface cellulaire, HLA-E doit lier des séquences hautement conservées de signaux peptidiques provenant d'autres molécules des HLA de classe I (HLA-A, -B, -C et -G). Une fois cette liaison établie, le complexe migre à la surface cellulaire où il peut interagir avec les récepteurs CD94/NKG2. (167) La capacité de HLA-E à lier les récepteurs NK est donc en grande partie régulée par la disponibilité de peptides signaux et par le type de peptides qui se sera lié dans la niche peptidique de HLA-E. Le rôle de HLA-E dans la susceptibilité à l'infection au VIH n'a pas encore été pleinement élucidé. Certaines études ont démontré que, dans les premiers moments de l'infection, il y avait une augmentation de HLA-E à la surface des cellules T CD4⁺ causée par la présence du VIH et que cela inhibait l'action des cellules NK. (168)

HLA-G est très peu polymorphe et son expression est restreinte. En condition normale, son expression est limitée aux cellules trophoblastes du placenta, aux cellules épithéliales du thymus, aux cellules épithéliales du tractus génital féminin et à la surface des monocytes activés. Son expression peut être induite lors de certaines pathologies telles que des infections virales, des cancers, des maladies auto-immunes et lors de transplantation. Durant certaines infections virales, HLA-G est exprimé à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. (169) Son expression est également induite à la surface de certaines tumeurs comme les carcinomes ovariens. (170) L'expression de HLA-G est également régulée par les hormones féminines et son expression est plus élevée chez la femme que chez l'homme. (171;172) HLA-G peut être exprimé sous une forme membranaire (isoformes G1 à G4) ou sous une forme soluble (isoformes G5 à G7 et sG1). Les isoformes solubles sont générés par épissage alternatif (G5 à G7) et par clivage par une métalloprotéinase de l'isoforme complet HLA-G1 (sG1). (169) Il a été observé que la forme soluble de HLA-G peut être sécrétée par les cellules T CD4⁺ allo-spécifiques, les DC, les cellules du placenta et les cellules endothéliales. (173;174) En condition physiologique normale, la présence de certains polymorphismes influence l'expression de HLA-G. Ainsi, les personnes porteuses des allèles HLA-G*010103 et HLA*0105N (qui code pour une protéine tronquée) expriment moins de HLA-G soluble que les autres. La présence d'une insertion de 14pb au niveau de l'exon 8 diminue, elle aussi, l'expression de HLA-G soluble. (175-177) HLA-G, autant sous forme membranaire que soluble, est un important modulateur de la réponse immunitaire. HLA-G module l'action des NK. De façon directe, il inhibe l'activité cytolytique des NK en interagissant avec les récepteurs ILT (« human inhibitory receptors Ig-like transcripts »)-2 et -4. De façon indirecte, il peut moduler la fonction des NK en étant utilisé par HLA-E comme séquence peptide signal. HLA-G peut également supprimer la prolifération des cellules T CD4⁺. (178) Les APC qui expriment HLA-G1 à leur surface, (i) inhibent la prolifération des cellules T CD4⁺ (ii) présentent un relargage élevé de HLA-G1, (iii) induisent l'anergie des cellules T CD4⁺ et (iv) causent la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules immunosuppressives. (179) De plus, la forme soluble de HLA-G supprime la réponse allo-proliférative des cellules T CD4⁺ (173), inhibe la lyse par les NK (180) et induit la production de cytokines de type Th1 (IL-6, IL-8, TNF- α et IFN- γ) par les NK périphériques (181-183).

HLA-G joue un rôle important dans l'infection par le VIH. Pour survivre dans l'hôte qu'il infecte, le VIH a développé plusieurs mécanismes qui lui permettent d'échapper au système immunitaire. Un de ces mécanismes est la modulation spécifique des HLA de classe I. Le VIH diminue l'expression des molécules HLA-A et -B pour échapper à la lyse par les CTL et laisse intact ou augmente l'expression de HLA-E et HLA-G pour éviter la cytolyse par les NK. (184)(revue par : (185)) Lors de l'infection par le VIH, il a

été démontré que les monocytes et les lymphocytes T exprimaient à leur surface HLA-G et que l'expression de HLA-G était augmentée par l'administration d'une thérapie antirétrovirale qui incluait un inhibiteur de la transcriptase inverse. (186-188) Donaghy et coll. ont démontré que l'expression de HLA-G soluble était augmentée chez les personnes VIH positives. (189) Par contre, deux études ont démontré que le VIH pouvait diminuer l'expression de HLA-G à la surface cellulaire et que ce phénomène était VPU dépendant. (190;191) Du point de vue génétique, plusieurs études ont fait des associations entre HLA-G et la susceptibilité à l'infection au VIH. Aikhionbare et coll., ont montré qu'une discordance au codon 57 de l'exon 2 entre la mère et son fœtus et/ou la présence d'une substitution nucléotidique dans la région non traduite (UTR) 3' (Cytidine3743 Thymidine) diminuait de façon considérable et indépendante les risques de transmission du virus. (192) (193) Fabris et coll. ont eux démontré que des enfants brésiliens, exposés mais non infectés par le VIH, possédaient plus souvent une délétion de 14pb dans l'exon 8 que les enfants qui étaient infectés par le VIH. (194) Cette délétion est associée avec une augmentation de l'expression de HLA-G soluble comparativement aux personnes qui ont l'insertion de 14pb. (195;196) Au niveau de la transmission sexuelle, Matte et coll. ont démontré que l'allèle HLA-G*010108 était associé avec un risque d'acquisition du VIH, alors que la présence de l'allèle HLA-G*0105N diminuait les risque d'acquisition du virus chez des femmes du Zimbabwe. L'allèle HLA-G*0105N code pour une protéine qui ne produit pas les isoformes principaux HLA-G1 et -G5. Ces deux isoformes sont les principaux ligands pour les récepteurs NK; l'absence de ceux-ci pourrait augmenter la cytolysse des cellules infectées et empêcher l'infection. (197) Toutes ces études démontrent bien le rôle important que peut jouer HLA-G dans l'infection au VIH (voir tableau #5).

Ainsi, de nombreux facteurs ont été associés avec la susceptibilité ou la protection à l'infection par le VIH. Malgré cela, il y a encore un manque de connaissance important en ce qui concerne la contribution de la génétique et des facteurs immunologiques impliqués dans la protection contre le VIH.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des polymorphismes HLA-G associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Facteurs génétiques	Association avec susceptibilité à l'infection au VIH	Références
Transmission verticale :		
Codon 57 G→ a (exon 2) Discordance mère-enfant	Protection	(192) (193)
Thymidine en position 3743 du 3'UTR	Protection	(192) (193)
Présence del 14 pb de l'exon 8	Protection	(194)
Transmission sexuelle		
HLA-G*010108	Susceptibilité	(197)
HLA-G*0105N	Protection	(197)

3.4 Mécanismes d'évasion virale utilisés par le VIH

Pour survivre dans l'hôte qu'il infecte, le VIH a développé une myriade de moyens lui permettant d'échapper au système immunitaire. Le VIH échappe à l'action des CTL par plusieurs moyens : (1) le VIH réduit le nombre de CTL activés en induisant l'apoptose de ces cellules; (198) (2) la forte production virale et le niveau élevé de mutations engendrées par la transcriptase affectent, soit la présentation des épitopes par les HLA, soit la reconnaissance de ces épitopes par les CTL; (199;200)(3) il interfère de façon spécifique avec la synthèse et le trafic intracellulaire des molécules du CHM de classe I. La protéine Nef, exprimée de façon précoce, est responsable de la diminution de l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire. (201) Cette protéine induit l'internalisation, la rétention et la dégradation des molécules HLA-A et HLA-B. Les cellules infectées ne sont donc pas reconnues par les CTL. (184) Comme le virus n'affecte pas l'expression des molécules HLA-C et HLA-E, cela lui permet en même temps d'éviter l'activation des cellules NK. De plus, en phase tardive de l'infection, la protéine Vpu induit la dégradation des molécules de classe I nouvellement synthétisées.(202)

Les protéines accessoires du virus lui permettent aussi d'échapper au système immunitaire et de favoriser la progression de la maladie de plusieurs façons. Vpu induit la dégradation du récepteur CD4. (203;204) Vif se lie à la protéine APOBEC3G et induit sa dégradation. (205;206) Cela permet au virus de contrer un mécanisme l'empêchant de pouvoir se répliquer dans les cellules. En plus de diminuer l'expression des molécules HLA-A et HLA-B, la protéine Nef du virus diminue l'expression des molécules CD4, CD8 et CD28. De plus, lorsque cette protéine est exprimée dans les macrophages, elle interagit avec la voie de signalisation de CD40/CD40L, ce qui induit l'expression de chimiokines. Cette expression active les cellules T et ceci augmente l'infection. Tous ces mécanismes permettent au VIH d'échapper à l'action du système immunitaire. Revue par : (184;207;208)

3.5 Immunité et VIH

L'infection par le VIH est associée avec le développement d'une déficience immunitaire progressive, tant innée qu'adaptative. Les premières cellules à être affectées par la présence du VIH sont les cellules immunitaires des muqueuses. Au fur et à mesure que l'infection progresse, on observe entre autre un déclin des lymphocytes T CD4+, l'activation chronique du système immunitaire, une translocation microbienne et le changement du profil d'expression des cytokines.

3.5.1 Survol de l'impact du VIH sur l'immunité systémique

L'infection directe des cellules T CD4⁺ mène à leur destruction et cela, à une grande influence sur le système immunitaire qui a donc plus de difficulté à élaborer une réponse immunitaire efficace contre le virus. Cette déplétion massive des CD4⁺ est l'une des principales caractéristiques de l'infection par le VIH et est l'une des causes de l'activation chronique du système immunitaire. L'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation sur les cellules T périphériques (par exemple, HLA-DR, CD38 et Ki67) des personnes VIH positives (209;210) et la présence élevée de LPS au niveau sanguin sont également des marqueurs de l'infection observés au niveau systémique. (211) Chez les personnes VIH positives, on observe une perte des NK CD56⁺ et les NK des personnes VIH positives produisent beaucoup moins, sinon pas, d'IFN- γ . (212) Le patron d'expression des cytokines est également modifié et cela contribue à la progression de la maladie. En effet, il a été démontré que les personnes VIH positives, dont les cellules T produisent deux ou trois cytokines parmi l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ , réussissent à mieux contrôler l'infection que les individus dont les cellules T sont mono-productrices. (213;214) Chez les personnes VIH positives, une diminution de l'expression du récepteur IL-7 α sur les cellules T est associée avec la progression de la maladie. (215) Une augmentation de la production d'IL-10 produite par les monocytes

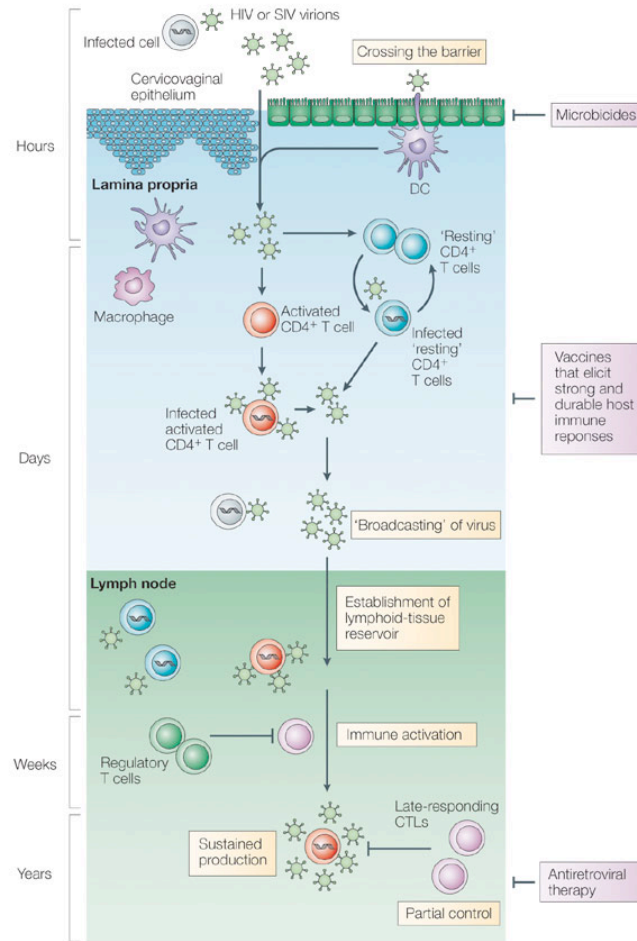
est aussi observée dans le sérum des personnes VIH positives. (216) Au niveau des chimiokines, une augmentation de l'expression de MIP-1 α a été associée avec une diminution de la charge virale chez des femmes d'Afrique du Sud (217) et l'augmentation des β -chimiokines dans le sérum des personnes suivant une thérapie antirétrovirale est associée avec un succès de la thérapie.(218) L'étude du système immunitaire systémique a l'avantage d'être facilement accessible et permet d'observer une séquence d'évènements qui ont lieu dans le corps humain. Cependant, il semble de plus en plus évident que cela ne donne qu'une vague image ou même une image trompeuse de ce qui se passe au niveau des tissus, principalement dans les premiers moments suivant l'infection.

3.5.2 Immunité, VIH et MALT

Pendant longtemps, on a pensé que les problèmes observés au niveau des muqueuses des personnes VIH positives étaient le résultat de la destruction du système immunitaire par le VIH plutôt que le problème central initiateur. Depuis quelques temps, il est devenu évident que le système immunitaire des muqueuses joue un rôle de premier plan dans la pathogénèse et dans les évènements critiques de l'infection (transmission, réplication virale, déclin des cellules T CD4⁺). L'analyse du système immunitaire des muqueuses est particulièrement laborieuse, principalement parce qu'il est difficile d'obtenir des tissus et des échantillons des muqueuses, contrairement aux échantillons du sang périphérique. Dans les premiers jours de l'infection, plusieurs évènements critiques ont lieu au niveau des muqueuses, alors que la personne ne sait même pas qu'elle a été infectée. À cette étape, aucune manifestation immunitaire n'est observée au niveau périphérique (voir figure 3). Tous ces facteurs rendent l'étude de l'immunité des muqueuses très ardue mais appuie sont importance. (revue par : (219;220))

3.5.2.1 Les études chez l'humain dans le GALT

Chez l'humain, la muqueuse la plus étudiée est le GALT. Le site primaire de la transmission au niveau du GALT est la muqueuse ano-rectale. Tout comme au niveau du tractus génital féminin, l'infection peut être facilitée par la présence de lésions qui donnent un accès direct aux cellules cibles du virus. L'infection d'une muqueuse intacte n'est cependant pas impossible. Comme c'est le cas pour la transmission au niveau du



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Immunology

FIGURE 3 : RÉPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSMISSION VAGINALE DU VIH ET DES ÉTAPES SUIVANT L'INFECTION

Tiré de : Ashley T.Haase, Nature review immunology; vol 5; oct 2005; 783

Avec l'aimable autorisation de Nature publishing group

tractus génital féminin, les mécanismes d'entrée du virus, ainsi que les cellules impliquées dans les premiers moments de la transmission, demeurent encore inconnus. La plupart des cellules T CD4⁺ au niveau des muqueuses expriment CCR5 et ont un phénotype mémoire activé. Des études menées indépendamment par les groupes de Dandekar, Markowitz et Douek ont démontré que près de 60% des cellules T CD4⁺ au niveau du GALT devenaient infectées et ce, dès les premiers jours suivant l'infection. Ils ont aussi démontré que cette déplétion touchait principalement les cellules T CD4⁺CCR5⁺ mémoire, que la déplétion se poursuivait tout au long de l'infection et que la déplétion semblait être irréversible. (221-224) De plus, le groupe de Douek a démontré que les cellules TH17, importantes pour l'homéostasie des entérocytes, la production des défensines et le maintien de l'intégrité de la barrière mucosale, étaient déplétées encore plus dramatiquement que les cellules T CD4⁺.(225) En ce qui concerne les cellules T CD8⁺, Shacklett et coll. ont montré que la fréquence des cellules T CD8⁺ gag spécifique était 5 fois plus élevée dans le GALT que dans le sang chez les personnes VIH positives. (226)

La forte déplétion des CD4⁺ est corrélée avec une diminution de l'expression des marqueurs régulant la barrière mucosale et des fonctions métaboliques et digestives de l'intestin. Ce changement coïncide avec l'augmentation de la transcription des gènes associés avec l'activation immune et l'inflammation. La perte de l'intégrité de la barrière mucosale est également associée avec une augmentation du LPS dans le sang et avec l'activation chronique du système immunitaire que l'on observe au niveau du système sanguin périphérique. (227)

La comparaison du profil d'expression des cytokines entre le GALT et le sang a permis de constater que l'expression de l'ARNm de TNF- α , d'IFN- γ , d'IL-4, d'IL-6 et d'IL-10 était beaucoup plus élevée au niveau de la muqueuse du GALT qu'au niveau sanguin chez les personnes VIH positives avec ou sans traitement. Les niveaux d'ARNm de CCL3 (MIP-1 α) et CCL5 (RANTES) étaient plus élevés avant le traitement mais redevaient normaux lorsqu'une thérapie antirétrovirale était administrée. Le changement d'expression du profil de cytokines dans les muqueuses peut contribuer à la destruction du GALT. Une surproduction de certaines cytokines et des chimiokines peut être le premier évènement de l'activation des cellules T ainsi que l'élément déclencheur pour la réplication virale et l'activation du provirus dans les cellules latentes. (228)

Il semble de plus en plus évident que les tissus des muqueuses sont les sites primaires de l'infection par le VIH lors de transmission sexuelle et les sites majeurs de

la déplétion des cellules T CD4⁺. L'impact de l'infection par le VIH dans le GALT est très important tout au long de l'infection. Comme l'obtention de spécimens des muqueuses humaines est très difficile, plusieurs études ont tenté d'analyser le système immunitaire des muqueuses chez le singe afin d'accroître nos connaissances dans ce domaine.

3.5.2.2 Les études chez le singe

Deux modèles sont utilisés chez le singe. Les singes « du nouveau monde » comprennent les macaques et sont considérés comme le modèle pathogénique, c'est-à-dire qu'après une infection par le SIV, ils progressent vers le SIDA. La pathogénèse de la maladie est d'ailleurs très semblable à ce qui est observé chez l'humain. Le second modèle, considéré non pathogénique, est celui des singes du « vieux monde ». On retrouve dans cette catégorie les Mangabeys cendrés et les Vervets (« africains greens monkeys »). Ils sont les hôtes naturels du SIV et, malgré des charges virales élevées tout au long de l'infection, ils ne développent pas le SIDA. Ils sont principalement étudiés pour leur absence de pathogénèse. (revue par : (229;230)

Il existe quelques différences entre le modèle pathogénique (humain compris) et le modèle non pathogénique. Premièrement, comme dans le modèle pathogénique, chez les Mangabeys cendrés il y a un déclin des CD4 durant la primo-infection. Cependant, ce déclin se stabilise beaucoup plus rapidement que chez les macaques/humains et ce, malgré des charges virales extrêmement élevées tout au long de l'infection. (231) De plus, au niveau des muqueuses, on constate une restauration des cellules T et une conservation de l'intégrité de la barrière mucoale.(232) Deuxièmement, chez les Mangabeys cendrés, il n'y a pas d'activation chronique du système immunitaire. (211;233) D'ailleurs, une récente étude de Brenchley et coll. a montré que cette différence pouvait, entre autre, s'expliquer par la différence d'expression d'IFN- α par les pDC. En effet, une fois activées, les voies des TLR7 et TLR9 chez ces animaux n'entraînent qu'une très faible production d'IFN- α et donc une diminution de l'activation du système immunitaire.(234;235)

Le modèle du singe pathogénique, quant à lui, est caractérisé par un déclin des cellules T CD4⁺ important en phase aiguë tant au niveau systémique qu'au niveau des muqueuses. Dans le GALT, ce déclin est tout aussi important que celui observé chez l'humain. (236;237) Comme chez l'humain, cette perte massive des cellules T CD4⁺ est irréversible à moins qu'une thérapie antirétrovirale soit administrée extrêmement tôt en primo-infection. (238) De plus, les cellules T régulatrices et les cellules TH17 du GALT font parties des cellules T les plus affectées par l'infection, ce qui mène à la perte de l'intégrité de la muqueuse et à l'activation chronique du système immunitaire.(239;240)

Au niveau du tractus génital féminin, le modèle pathogénique permet d'étudier les événements reliés à la transmission du virus, ce qui est très difficile à faire chez l'humain. Une étude de Veazey et coll. a démontré que l'expression de CCR5 sur les cellules T est plus élevée au niveau du vagin comparativement au niveau du sang et des ganglions et ce, autant chez des singes non infectés que chez les singes infectés par SIV. De plus, chez les singes infectés, cette différence se perpétue tout au long de l'infection. Chez les singes infectés (par voie intraveineuse ou vaginale), il y a une perte rapide des cellules T CD4⁺, particulièrement des cellules T CD4⁺CCR5⁺, au quatorzième jour de l'infection. Ce groupe a également démontré que cette diminution est constante tout au long de l'infection.(241) Stevcava et coll. ont démontré que, dans les six premières semaines suivant l'infection à SIV, la fréquence des cellules T CD8⁺ gag spécifique est beaucoup plus importante dans le tractus génital que dans le sang ou les ganglions lymphatiques drainant. (242) Une étude portant sur l'expression des cytokines a également permis de constater les différences importantes entre le tractus génital, le sang et les ganglions dans les premiers jours post-infection (voir figure 4). La sécrétion des cytokines après l'infection vaginale est rapide et très robuste dans le tractus génital comparativement aux tissus lymphoïdes systémiques. La réponse précoce dans ce compartiment est dominée par l'induction de cytokines proinflammatoires, alors que l'induction des cytokines antivirales (IFN- α/β) arriverait trop tard pour prévenir la réplication virale et la dissémination. Dans les cinq premiers jours suivant l'infection, la réplication virale est confinée dans le tractus génital. Le virus commence à être détecté au niveau des tissus lymphoïdes uniquement 6 jours post-infection et ce, en très faible quantité (voir figure 5). Le déclin des cellules CD4⁺ au niveau du GALT commence, quant à lui, 10 jours après l'infection. Dans les premiers jours de l'infection (3-5 jours), l'expression des cytokines proinflammatoires (TNF- α et IL-6) dans le tractus génital féminin est importante, alors qu'aucun changement n'apparaît encore au niveau systémique. Il faut attendre entre le jour 6 et 10 après l'infection pour voir un changement dans l'expression des cytokines apparaître au niveau des tissus lymphoïdes périphériques. Les niveaux obtenus sont alors similaires à ce qui fût observé dans les 3 à 5 premiers jours suivant l'infection dans le tractus génital. L'expression d'IFN- γ et d'IL-8 commence aussi dans les 5 premiers jours suivant l'infection au niveau du tractus génital. Cependant, comparativement aux autres cytokines proinflammatoires, leur expression reste plus élevée dans ce compartiment que dans les tissus lymphoïdes périphériques. Cette augmentation peut être jusqu'à 100 fois plus grande que celle observée au niveau périphérique. Un pic de l'expression des cytokines proinflammatoires, correspondant à une charge virale élevée, est observé au jour 10 post infection. Au niveau du tractus génital féminin, l'expression de MIP-1 α suit le même processus que l'expression de TNF- α . L'expression d'IFN- α/β dans le tractus génital féminin apparaît 6 jours post-infection au moment où la charge virale est

déjà en expansion. Ainsi, au cinquième jour de l'infection, il y a déjà une activation immunitaire importante au niveau du tractus génital féminin alors qu'aucune manifestation n'a encore eu lieu au niveau périphérique. (243)

3.5.3 Immunité et VIH dans la muqueuse du tractus génital chez l'humain

L'étendue mondiale de l'infection au VIH est principalement due à la transmission sexuelle via les muqueuses rectales ou vaginales. Ces voies de transmission sont les plus fréquentes et sont responsables de la majorité des nouvelles infections.

Même si la probabilité d'infection lors d'une relation sexuelle vaginale est très faible, cela représente de nos jours la majorité des nouveaux cas d'infection au VIH. (244) La contribution du vagin, de l'ectocol ou de l'endocol dans l'infection au VIH n'est pas encore clairement définie, mais la pénétration du VIH suivie d'une infection a été démontrée dans les trois sites. La muqueuse vaginale et de l'ectocol offre une meilleure protection que l'endocol lorsque l'épithélium squameux multicouche de ceux-ci est intact. L'épithélium simple de l'endocol laisse croire que la majorité des cas de transmission aurait lieu à ce niveau. La surface couverte par le vagin et l'exocol étant 15 fois plus grande que celle de l'endocol, elle offre cependant plus d'opportunité au virus pour la pénétrer. De plus, les études démontrant que des femmes portant un diaphragme (ce qui empêche le contact du virus avec l'endocol) pouvaient être infectées par le virus montrent que le vagin et l'exocol sont des sites possibles d'infection. (Revue par : (60;245))

Suite au relargage du virus dans le tractus génital féminin, le virus doit traverser la muqueuse de l'épithélium pour établir une infection. À cette étape, le virus est très vulnérable en raison de l'environnement inhospitalier, de sa fragilité et du peu de cellules cible présentes. Plusieurs des cellules pouvant être ciblées par le virus tapissent la muqueuse du tractus génital féminin mais l'établissement d'une infection productive semble nécessiter la présence de cellules T CD4⁺ CCR5⁺. Ainsi, tout facteur pouvant augmenter l'apport en ces cellules cible favorisera l'infection. Plusieurs mécanismes ont été décrits *in vitro* pour comprendre les moyens utilisés par le virus pour traverser la muqueuse du tractus génital féminin afin d'établir une infection persistante (voir figure 6). En utilisant des cellules épithéliales dérivées du tractus génital inférieur, plusieurs études ont démontré que le virus pouvait se lier et entrer à l'intérieur des cellules épithéliales. Ces études ont également démontré l'habilité des cellules épithéliales à permettre au virus de les traverser et de présenter le virus aux cellules T CD4⁺. (246) À l'aide d'une lignée cellulaire de cellules épithéliales de

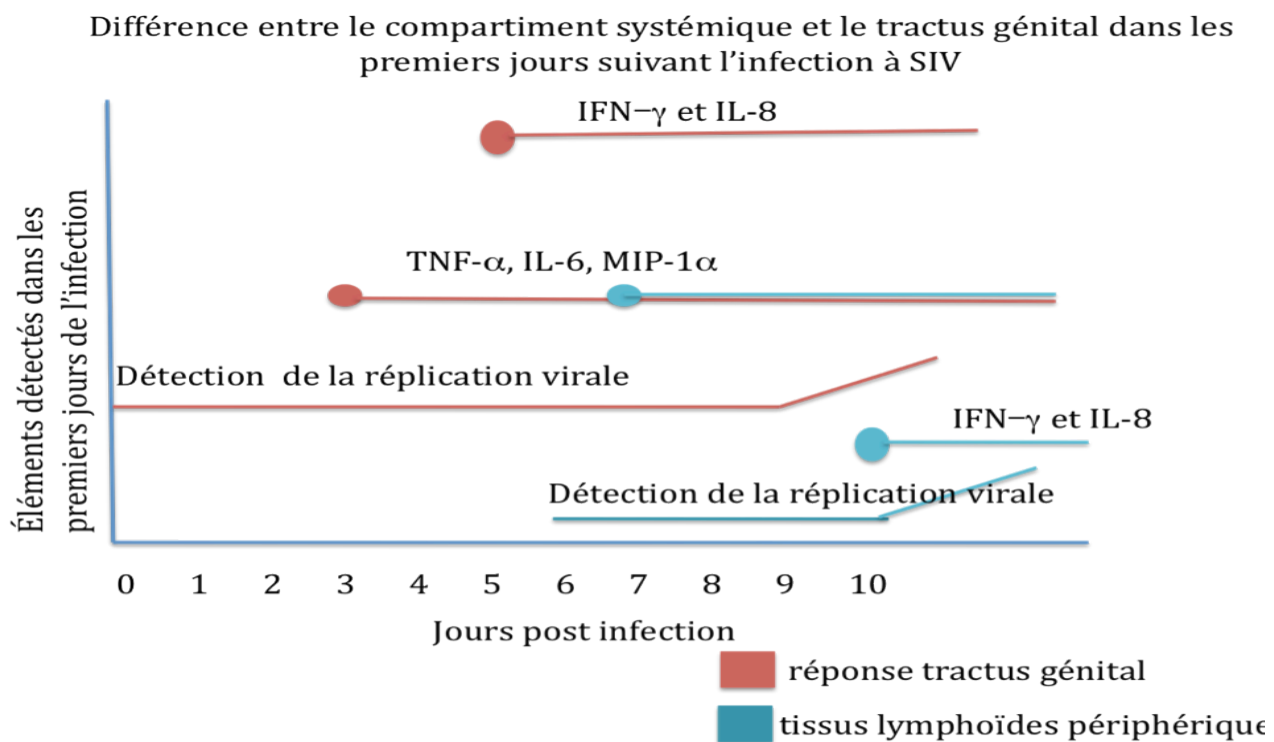
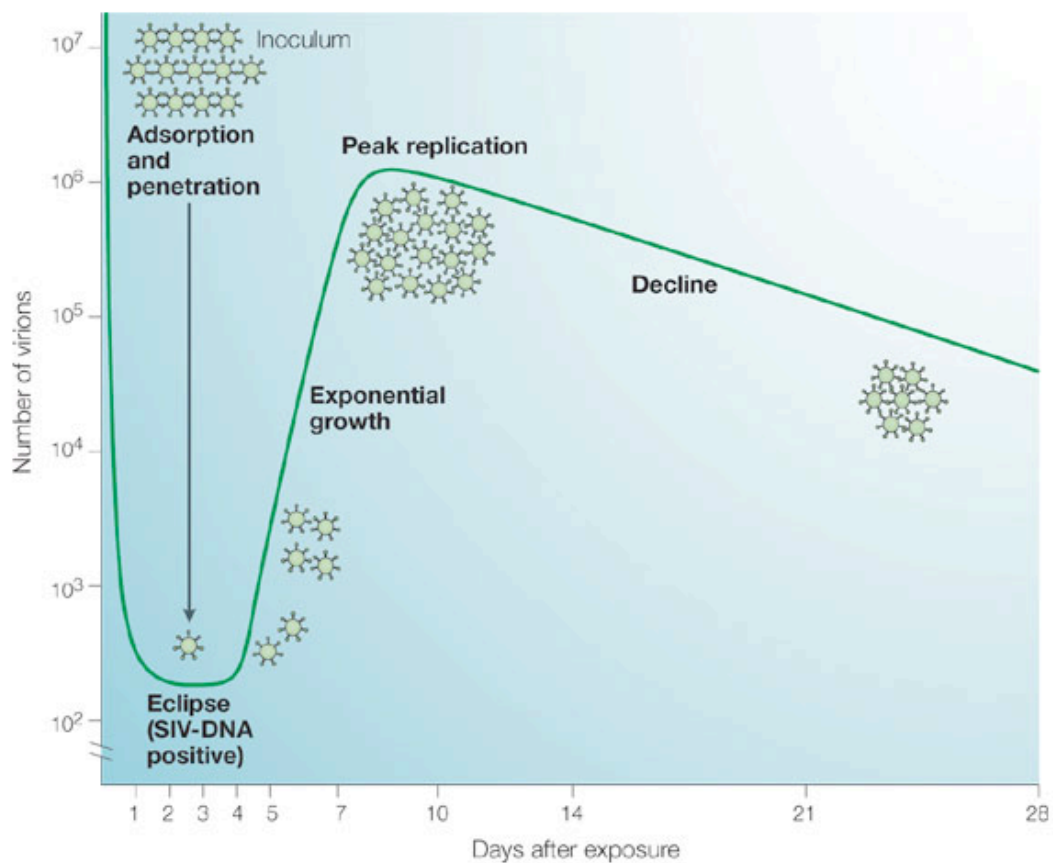


FIGURE 4 : REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES DIFFÉRENCES ENTRE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ENTRE LE TRACTUS GÉNITAL ET LE COMPARTIMENT SYSTÉMIQUE DANS LES PREMIERS JOURS APRÈS L'INFECTION À SIV
 Représentation libre des résultats tirés de Abel et coll. J. Virol. 2002; Jan 76 (1) 9-



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

FIGURE 5 : COURBE DE LA RÉPLICATION DU VIH DANS LE TRACTUS GÉNITAL FÉMININ DANS LES PREMIERS JOURS POST INFECTION

Tiré de : Ashley T.Haase, Nature review immunology; vol 5; oct 2005; 783

Avec l'aimable autorisation de Nature publishing group

l'ectocol, Wu et coll. ont montré que les cellules épithéliales du tractus génital féminin pouvaient séquestrer le virus, et qu'une fois à l'intérieur de celles-ci, il demeurait infectieux pour une période de plus de 6 jours. Les cellules épithéliales infectées pouvaient, en tout temps, transférer directement le virus aux cellules T CD4⁺. (247) Certaines études ont également démontré qu'une infection productive pouvait avoir lieu dans les cellules épithéliales. (248) D'autres études ont, par contre, rapporté que le rôle des cellules épithéliales n'est peut être pas aussi important dans l'acquisition du virus. Selon ces études, le virus traverse l'épithélium par transcytose pour, ensuite, aller infecter les cellules T CD4⁺CCR5⁺, les macrophages (249), les NK ou les cellules de Langerhans présents au niveau des couches supérieures de la muqueuse du tractus génital féminin. (250) Si l'infection des cellules T au niveau du tractus génital féminin a été clairement démontrée, le rôle joué par les autres cellules dans l'établissement de l'infection n'est pas encore très bien compris. C'est particulièrement le cas des cellules de Langerhans. En effet, certaines études ont montré que le virus est capable d'infecter ces cellules (251) alors que d'autres groupes ont démontré que le virus pouvait entrer à l'intérieur de celles-ci mais que cela n'était pas suivi d'une infection productive (252). Il reste donc encore beaucoup d'éléments inconnus sur le processus d'infection du virus au niveau du tractus génital féminin. Tout comme c'est le cas dans le GALT, on observe une déplétion des leucocytes et des CD4⁺ au niveau de l'endocol des femmes VIH positives dans les premiers moments suivant l'infection. (253) Ahmed et coll. ont montré qu'au niveau du tractus génital des femmes VIH positives, le nombre de cellules T CD8⁺ était significativement plus élevé que chez les personnes VIH négatives. De plus, chez les femmes VIH positives, on observe une augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ HLA-DR⁺ et CD8⁺HLA-DR⁺ activées ainsi que du nombre de macrophages (CD68⁺). (151)

L'analyse de la présence des cytokines dans le tractus génital féminin, en présence d'infection par le VIH, a permis de constater que chez les femmes ayant une charge virale élevée au niveau vaginal, les sécrétions vaginales contenaient significativement plus de lactoferrines et de protéines reliées à la myéloïde (MRP) -8 et -14, d'IL-6, d'IL-1 β , d'IL-8 et de TNF- α . (254-257). Une production d'IFN- γ , en réponse à la stimulation des cellules T CD8 gag spécifique, est présente au niveau du tractus génital et le niveau de cette réponse n'a pas d'équivalent dans le compartiment systémique. (256) La présence d'IL-1 β a également été corrélée avec la présence d'acide désoxyribonucléique (ADN) proviral au niveau vaginal. Zara et coll. ont aussi montré que l'administration d'une thérapie antirétrovirale diminue l'expression de TNF- α dans le tractus génital des femmes VIH positives (258). En phase aiguë de l'infection,

Bebell et coll. ont observé une augmentation significative du niveau d'IL-6, d'IL-10 et d'IL-12 dans les lavages cervico-vaginal (CVL) et une augmentation d'IL-1 β , d'IL-8 et d'IL-10 dans le plasma (259). Chez des femmes africaines, on a observé que la présence de LL-37 et des α -défensines dans le tractus génital féminin était associée avec une augmentation de l'acquisition du VIH et ce, malgré l'activité antivirale de ces deux protéines. (260) Ainsi, l'immunité du tractus génital féminin est grandement affectée par la présence du VIH.

3.6 Les personnes hautement exposées mais non infectées au VIH

Il existe une minorité de personnes qui, malgré des expositions répétées au VIH, ne développent pas d'infection productive (négatif pour la présence IgG anti-VIH et négatif pour présence ARN/ADN VIH-1 dans le sang). Ces individus dit ESN ont été identifiés dans plusieurs cohortes : TS, couples discordants et enfants exposés *in utero*. (261-263) Bien qu'aucun mécanisme unique et précis puisse à ce jour expliquer cette protection, plusieurs observations donnent des pistes sur les facteurs impliqués.

Le principal mécanisme de protection identifié est la présence de la délétion CCR5 Δ 32. Par contre, cette mutation n'est pas présente dans les populations africaines et ne peut donc pas expliquer tous les cas associés à la protection envers le VIH. Dans les populations où cette délétion circule, un autre mécanisme de protection associé à ce récepteur a été observé : la présence d'anticorps anti-CCR5 et anti-CD4, qui favorisent l'internalisation des récepteurs utilisés par le VIH. Ces anticorps, présents uniquement chez les ESN, ont été associés à la protection dans des cohortes caucasiennes et asiatiques, mais n'ont jamais été retrouvés dans les cohortes d'ESN africaines. (264;265)

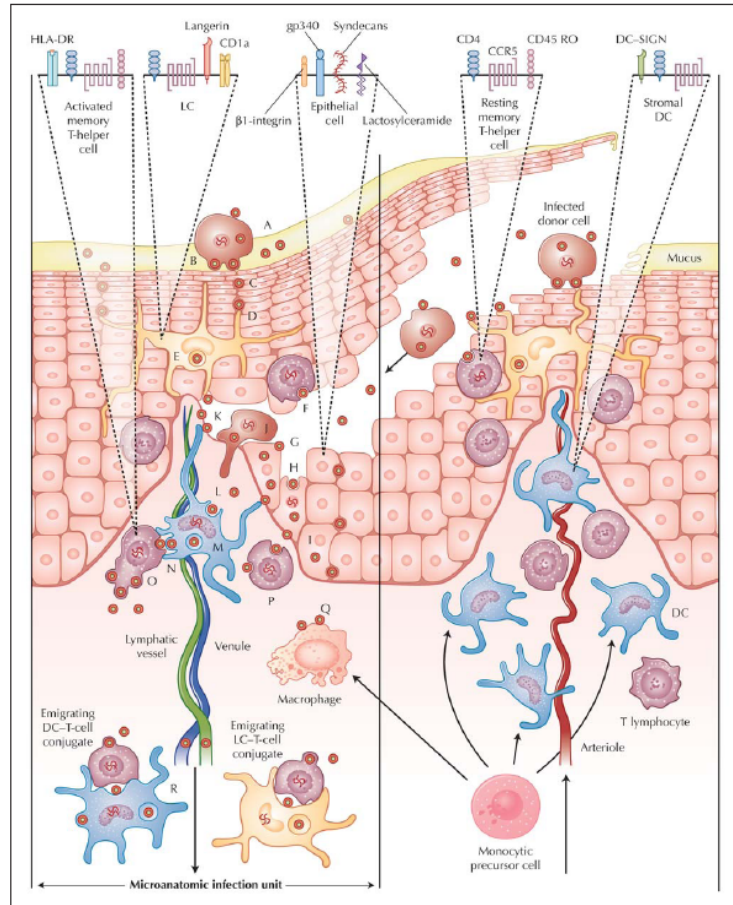


FIGURE 6 : CIBLES CELLULAIRES DU VIH LORS DE LA TRANSMISSION SEXUELLE AU NIVEAU DU TRACTUS GÉNITAL FÉMININ.

Tiré de Hladik et coll., Current HIV/AIDS reports 2009; 6 :20-28

Avec l'aimable autorisation de Springerlink

Étonnamment, plusieurs études portant sur les ESN ont démontré la présence de cellules T CD4⁺ et de cellules T CD8⁺ spécifiques au VIH tant au niveau systémique qu'au niveau du tractus génital. La présence d'anticorps IgA neutralisant spécifique au VIH au niveau des muqueuses a aussi été observée dans certaines cohortes de ESN. Par contre, leur présence et leur utilité dans la protection contre le VIH reste encore controversée. (261;262;266-271) Chez les ESN, malgré l'absence d'une dissémination du virus et l'établissement d'une infection productive, il semble donc y avoir une induction du système immunitaire adaptatif. Plusieurs explications ont été mises de l'avant pour comprendre ce phénomène. L'une d'elles est la présence continue d'une très faible réplication virale au niveau du site d'exposition, mais sans que le virus ne soit acheminé au niveau des ganglions. Cette hypothèse est appuyée par Zhu et coll. qui ont démontré que chez certains ESN il y avait une persistance extraordinairement faible du VIH dans les cellules T CD4⁺ (0.05 copies par millions de cellules) (272) Deux autres hypothèses ont également été élaborées pour comprendre ce phénomène : (i) la réalisation d'un cycle de réplication viral local, suivi par l'élimination du virus de l'organisme; (ii) le traitement de fragments du virus présentés au système immunitaire, sans infection active, permettant de stimuler la réponse immunitaire adaptative. Comme il semble que la présence d'une immunité active contre le VIH, chez les ESN, nécessite une exposition continue (les cellules CD4⁺ VIH spécifiques disparaissent entre 6 à 9 mois après l'arrêt d'exposition et les IgA VIH spécifiques diminuent de façon drastique dans les mêmes temps), les deux dernières hypothèses semblent être équiprobables. (revue par : (273;274))

La comparaison entre les réponses T spécifiques des ESN et celles des personnes VIH positives suggère que la différence dans la susceptibilité à l'infection serait liée à la qualité de la réponse et à sa magnitude. En effet, les cellules T CD8⁺ VIH spécifiques des ESN reconnaissent des épitopes différents de ceux reconnus par les cellules T CD8⁺ provenant de personnes VIH positives. (275) De plus, les cellules T CD4⁺ isolées chez les ESN sont capables de proliférer après stimulation avec des peptides VIH et sont de grandes productrices d'IL-2. Elles ne produisent qu'une très faible quantité d'IL-10, comparativement aux personnes VIH positives. Chez les ESN, les cellules T CD4⁺ spécifiques contre l'enveloppe du virus expriment une plus grande quantité de RANTES et MIP-1β. (37;276) Au niveau du tractus génital féminin, le compte cellulaire des cellules T CD4⁺ et des cellules T CD8⁺ est plus élevé chez les ESN que chez les personnes séropositives. (277) Leurs cellules NK produisent une quantité plus grande d'IFN-γ que celles des personnes VIH positives. (278) De plus, une plus grande expression d'ARN de TNF-α est également observée chez les ESN. (279) L'étude de TS au Kenya a également démontré que les PBMC stimulés de ces femmes ne produisaient qu'une infime quantité d'IL-4 mais une grande quantité d'IFN-γ

contrairement à ce qui est observé dans les cultures de PBMC de personnes VIH positives. (280) Ball et coll. ont aussi montré que trois polymorphismes dans le gène du facteur de régulation d'interféron-1 (IRF-1) étaient associés avec la protection dans cette même cohorte. IRF-1 est situé près du gène de l'IL-4 sur le chromosome 5. L'IRF-1 joue un rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire de l'hôte. Ces trois polymorphismes (l'allèle 179 caractérisé par une répétition de 12 GT dans l'intron 7, A619C et G6516T) sont associés avec une diminution de l'expression protéique d'IRF-1. Cette protéine peut se lier au VIH pour initier une réplication virale primaire de façon indépendante. Une faible production d'IRF-1 peut donc réduire la réplication virale dans les premiers moments de l'infection.(281)

Au niveau du tractus génital féminin, des niveaux plus élevés de RANTES, d'IFN- α , de lactoferrines et d'ARNm de β -défensine ont été observés dans les sécrétions vaginales des ESN comparativement à celles des personnes VIH positives et des personnes VIH négatif à faible risque d'infection. (37-41) Une étude de protéomique du milieu vaginal de TS du Kenya a permis d'identifier certaines protéines qui pourraient expliquer la protection à l'infection au VIH. Un peu de plus de 15 protéines sont surexprimées dans les sécrétions des ESN comparativement au groupe des femmes contrôles. Les ESN surexpriment plusieurs anti-protéases, incluant celles de la famille des serpine B et la cystatine A. Les Serpines sont des inhibiteurs de la cathepsine G, une protéase inflammatoire présente en grande quantité dans les sécrétions vaginales et qui inhibe l'action anti-VIH de RANTES. La cystatine A empêche les interactions entre les cellules épithéliales et les lymphocytes, ce qui peut contribuer à inhiber l'infection. (282) Bien que ces facteurs semblent être associés avec une certaine protection contre l'acquisition du VIH, il faut mentionner que cette protection est probablement le résultat d'un contrôle très pointu : la réponse immunitaire doit être à la bonne place au bon moment. Les mêmes éléments associés à la protection peuvent avoir un tout autre effet et peuvent stimuler la réponse inflammatoire, augmenter l'expression de CCR5, et favoriser le recrutement des cellules cibles pour la réplication du virus. (283) Par exemple, lorsque MCP-1 est présent en grande quantité avant l'infection, cela contribue à la protection observé des ESN mais, produit en grande quantité dans les premiers moments suivant l'infection, MCP-1 augmente la vitesse de progression de la maladie. (284)

L'étude des ESN permet de réaliser que plusieurs mécanismes, tant au niveau sanguin qu'au niveau du tractus génital féminin, sont impliqués dans la protection ou susceptibilité à l'infection au VIH. Une meilleure compréhension de ces mécanismes est requise pour le développement de thérapies préventives tel un microbicide.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

En Afrique subsaharienne, on estime que près de 61% des adultes vivant avec le VIH sont des femmes. La principale porte d'entrée du virus chez la femme est le tractus génital féminin. Malheureusement, l'immunité dans ce compartiment, ainsi que les facteurs qui la régulent, sont encore peu connus. Il y a donc un urgent besoin d'acquérir une meilleure connaissance de l'immunité « mucoale » naturelle du tractus génital féminin ainsi que de l'immunité du tractus génital face au VIH.

En dépit des récents progrès réalisés au niveau de la compréhension du cycle de vie du VIH et de la manière dont il envahit la cellule hôte, il reste encore d'importantes lacunes au niveau de la compréhension de la manière exacte dont le VIH est transmis au cours des rapports sexuels et des facteurs qui influencent cette transmission. Pour établir une infection persistante, le VIH a développé plusieurs mécanismes d'évasion afin d'échapper au système immunitaire. La régulation spécifique des CMH de classe I en est un bon exemple. En effet, le VIH diminue l'expression des molécules HLA-A et HLA-B pour échapper à l'action cytotoxique des CTL. Le VIH a élaboré une stratégie lui permettant également d'échapper à l'action des NK. Pour se faire, il laisse ou augmente l'expression des molécules HLA-C et HLA-E à la surface de la cellule infectée. Le virus interfère également avec l'expression de HLA-G. Comme HLA-G est exprimé au niveau du tractus génital féminin, qu'il est un important modulateur de la réponse immunitaire innée et que le VIH peut moduler son expression, nous avons émis l'hypothèse que **HLA-G pouvait jouer un rôle important dans la susceptibilité à l'infection au VIH**. Pour tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps effectué une analyse génétique par séquençage direct des gènes HLA-E et HLA-G dans des populations africaines (femmes du Zimbabwe et du Bénin). Dans un deuxième temps, nous avons vérifié l'expression de HLA-G soluble par ELISA pour vérifier l'impact de l'expression de la protéine sur la susceptibilité à l'infection au VIH (étude au Bénin).

Plusieurs autres facteurs peuvent également influencer la susceptibilité à l'infection au VIH. Jusqu'à récemment, la majorité des études tentant de comprendre l'immunité face au VIH étudiaient l'immunité systémique. Or, plusieurs études ont démontré que l'immunité présente au niveau systémique diffère de la réponse immunitaire au site d'infection. Les ESN semblent avoir une protection naturelle contre le virus. L'étude de ces personnes peut permettre de mieux comprendre les mécanismes liés à la susceptibilité à l'infection par le VIH. **Nous pensons que le milieu immunitaire dans le tractus génital féminin entre des ESN, des femmes VIH positives et des femmes séronégatives à faible risque d'infection au VIH sera**

différent selon les groupes. Ainsi, dans la deuxième partie de notre étude nous voulons caractériser le milieu immunitaire environnant du tractus génital féminin. Nous proposons donc de faire l'analyse qualitative et quantitative des cytokines et chimiokines présentes dans le tractus génital féminin et le sérum dans nos trois groupes de femmes béninoises soit : un groupe constitué de TS hautement exposées mais non infectées, un groupe de TS infectées par le VIH et un groupe de femmes à faible de risque d'infection. Nous allons également comparer les patrons d'expression entre nos trois groupes de femmes dans un même compartiment et comparer l'expression des cytokines et chimiokines entre le compartiment systémique et celui du tractus génital féminin afin de vérifier si le système immunitaire présent dans les deux compartiments est similaire ou non. Cette analyse se fera de deux façons : les cytokines seront principalement analysées par la technologie « BDTM Cytometric Bead Array (CBA) » et les chimiokines par « Bio-Plex assay ».

Notre étude permettra de mieux comprendre l'immunité présente dans le tractus génital féminin ainsi que les facteurs pouvant réguler la susceptibilité à l'infection au VIH.

DESCRIPTION DES POPULATIONS

Étude au Zimbabwe:

La première partie de cette étude s'est effectuée dans une population de femmes zimbabwéennes recrutées dans le projet Zvitambo (article 1). Le projet Zvitambo est une étude clinique qui a enrôlé environ 14 000 couples mères-enfants avec l'objectif d'analyser l'impact d'un supplément en vitamine A sur la transmission post-partum du VIH. Les femmes étaient recrutées immédiatement après l'accouchement dans l'un des sept centres (hôpital/clinique de maternité) affiliés avec le projet dans la région d'Harare. Le statut VIH était déterminé par ELISA et par immunobuvardage. Pour notre étude, nous avons obtenu l'ADN d'environ 200 femmes VIH négatives et de 200 femmes VIH positives sans lien de parenté et recrutées de façon consécutive.

Les femmes recrutées dans notre étude étaient toutes d'ethnie Shona. Ce groupe est considéré comme une population ancestrale au Zimbabwe et représente environ 75% de la population. Les premières traces officielles du peuple Shona en Afrique sont apparues durant le 11^{ième} siècle. Au 15^{ième} siècle, la dynastie des Shonas se sépara des autres ethnies présentes en Afrique du sud et forma l'état autonome du Rozwi qui est séparé par les rivières Zambezi et Limpopo. Cet état représente aujourd'hui le Zimbabwe. (285)

Le Zimbabwe est limité au sud par l'Afrique du Sud, à l'ouest par le Botswana, au nord par la Zambie et à l'est par le Mozambique (voir figure 7). Harare est la capitale du pays. Ce pays est l'un des plus touché par l'épidémie du VIH. Bien que l'on ait observé un déclin dans le nombre de nouvelles infections au cours des dernières années, la prévalence du VIH dans ce pays demeure encore tout de même très élevée à 15.6%.(1)

Étude au Bénin:

Pour la deuxième partie du projet, nous avons démarré une nouvelle étude cas-contrôle au Bénin. Le recrutement s'est déroulé sur une période de deux années et sur deux sites différents. La ville principale où a eu lieu la majeure partie du recrutement était Cotonou. Une partie du recrutement a également eu lieu à Porto Novo. Le Bénin est un petit pays d'environ 112 000 km² (voir figure 7), bordé à l'est par le Nigéria, à l'ouest par le Togo, au nord par le Niger et le Burkina-Faso et au sud par l'océan Atlantique. Cotonou est le principal centre urbain du pays et possède un port

commercial maritime important. Porto Novo est la capitale du pays. Le taux de prévalence du VIH au Bénin est d'environ 2%. (1)

La prostitution au Bénin, illégale mais tolérée, prend deux formes : ouverte (affichée) ou clandestine. La majorité des femmes affichées comme TS sont des femmes provenant de pays avoisinants, alors que les clandestines sont plus souvent des Béninoises d'origine. Au Bénin, les données fournies par différentes études indiquent que l'incidence du VIH chez les clients des TS varie entre 9 et 12%. (1) Chacune des femmes recrutées dans notre étude devait d'abord avoir fourni un consentement éclairé puis répondre à un questionnaire portant sur les facteurs sociodémographiques et comportementaux. Un examen gynécologique était ensuite réalisé pour le dépistage des ITS et pour procéder à des prélèvements cervico-vaginaux (CVL et cytobrosse). Un prélèvement sanguin était aussi effectué pour les analyses génétiques. Chez les femmes refusant le prélèvement sanguin par ponction veineuse, une goutte de sang était prélevée au bout du doigt. Dans notre étude, les TS recrutées étaient toutes d'origine africaine et avaient, en moyenne, plus de trois ans d'histoire de prostitution. Deux groupes de TS ont ainsi été formés : 57 femmes séronégatives et 52 femmes séropositives, recrutées de façon consécutive.

Ensuite, nous avons procédé au recrutement de 73 femmes séronégatives de la population générale. Ces femmes n'ont pas histoire de prostitution. Leur participation à l'étude est importante puisque ces échantillons servent de groupe contrôle. Chacune des femmes recrutées dans ce groupe a également dû répondre à un questionnaire et subir un examen gynécologique. Les prélèvements effectués chez ces femmes sont les mêmes que ceux effectués dans les groupes de TS.

Toutes les informations recueillies dans les questionnaires (données sociodémographiques, comportementales et présence d'ITS) ainsi que les échantillons recueillis (sérum, plasma, PBMC, CVL, cytobrosse), nous permettent d'avoir une étude exceptionnelle pour l'analyse des facteurs pouvant être impliqués dans la susceptibilité à l'infection au VIH et mieux comprendre l'immunologie naturelle du tractus génital féminin. Nos trois groupes sont bien établis et répartis selon le statut VIH et la pratique du travail du sexe. Cela nous permet d'ailleurs une analyse plus précise des résultats. En effet, nous pouvons ainsi faire la différence entre ce qui est attribuable à l'action du virus (différence entre le groupe des TS VIH positives versus celui des VIH négatives) mais également ce qui pourrait être due à la prostitution (différence entre le groupe de TS VIH négatives et groupe de femmes non TS VIH négatives). De plus, grâce aux données sociodémographiques et comportementales recueillies nous pouvons

considérer le groupe des TS VIH négatives comme étant un groupe de ESN. En effet, puisque nous possédons les données relatives au nombre de clients par semaine (en moyenne 17), le pourcentage d'utilisation du condom (85.5%), l'incidence du VIH chez les clients (entre 9 et 12%) cela nous permet de pouvoir évaluer le nombre d'exposition au VIH par année chez ces femmes. Ainsi, nous pouvons estimer que le groupe des TS VIH négatives a en moyenne 130 relations sexuelles non protégées par an avec leurs clients et menant à environ 14 expositions au VIH par an. Ce groupe étant en moyenne TS depuis 4 ans, on peut estimer qu'elles ont été exposées au VIH au moins 55 fois au cours des dernières années. Ce groupe nous permet d'étudier certains facteurs pouvant être associés avec une protection contre l'acquisition du virus et qui pourraient être, par la suite, plus profondément examinés lors d'une étude longitudinale.



FIGURE 7 : CARTE DU CONTINENT AFRICAIN
Les flèches indiquent la position du Bénin et du Zimbabwe

Source : <http://gbgm-umc.org/umcor/emergency/pdf/africa1999.pdf> (domaine publique)

ARTICLES:

Article 1:

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

Julie Lajoie, John Hargrove, Lynn S. Zijenah, Jean H Humphrey, Brian J Ward, Michel Roger

Publié dans: Journal infectious disease 2006; Jan 15; 193(2) p298-301

Contribution des co-auteurs :

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études menant à la publication de cet article. Julie Lajoie a participé à l'élaboration du devis de l'étude, a effectué les analyses génétiques sur les spécimens et les analyses statistiques des résultats. Lynn Zijenah a fait l'extraction de l'ADN sur les spécimens et est l'une des co-investigateurs du projet Zvitambo. Jean H Humphrey et Brian J Ward sont des co-investigateurs du projet Zvitambo. Michel Roger est le chercheur principal du projet. L'article fût rédigé par Julie Lajoie et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

GENETIC VARIANTS IN NON-CLASSICAL MHC CLASS I HLA-E AND HLA-G MOLECULES ARE ASSOCIATED WITH RISK OF HETEROSEXUAL HIV-1 INFECTION

Julie Lajoie^{a,b}, John Hargrove^c, Lynn S. Zijenah^d, Jean H. Humphrey^e, Brian J. Ward^f, and Michel Roger^{a,b}

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

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

^cZVITAMBO Study Group (Harare, Zimbabwe)

^dDepartment of Immunology, College of Health Sciences, University of Zimbabwe (Harare, Zimbabwe)

^eDepartment of International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (Baltimore, MA, USA)

^fResearch Institute of the McGill University Hospital Complex (Montreal, Canada)

Running head: HLA-E and HLA-G modulate HIV infection

Word counts: Abstract:101; Text:1916

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest

Sponsorship:

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

ABSTRACT and KEY WORDS

HLA-E and HLA-G molecules act as powerful modulators of the innate immune response. The present study shows that HLA-E^G genetic variant alone is significantly ($P= 0.001$) associated with a 4.0-fold reduced risk of HIV-1 infection in Zimbabwean women. Furthermore, women carrying the combined protective HLA-E^G homozygote/HLA-G*0105N heterozygote genotypes had a 12.8-fold reduced risk of HIV-1 infection ($P= 0.03$) compared with those harboring neither genotype. These associations remained significant after adjusting for other significant socio-demographic risk factors for HIV prevalence in this population. In conclusion, HLA-E and HLA-G polymorphisms can independently and synergistically influence susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1 infection.

Keywords: HIV-1, HLA-E, HLA-G, heterosexual transmission, virus-cell interaction

INTRODUCTION

Viruses that infect humans have evolved a myriad of mechanisms for evading the immune system. HIV differentially down-regulates the expression of HLA-A and -B but not of HLA-C, -E or -G molecules on the surface of infected cells via the action of Nef protein [1,2]. Moreover, HIV infection leads to increased HLA-E and -G expression resulting in reduced susceptibility to natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity [3,4]. HLA-A and -B molecules are mainly used for presenting peptides to cytotoxic T lymphocytes (CTLs) while HLA-C, -E and -G serve primarily as recognition molecules for inhibitory receptors on NK cells. Bonaparte and Baker [5] recently demonstrated that NK cells lacking inhibitory receptors to HLA-C and -E killed HIV-infected CD4⁺ T cells. The capacity of NK cells to destroy HIV-infected cells depended on the ability of the virus to down-regulate the expression of HLA-A and -B molecules. Thus, the differential regulation of HLA class I molecule expression may enable HIV-infected cells to evade both CTL- and NK cell-mediated killing.

HLA-E and HLA-G are non-classical MHC class I genes (class Ib). These molecules have only a limited role in the presentation of peptides to immune effectors cells but can act as powerful modulators of the innate immune response through their interactions with NK cells. We recently reported a highly significant correlation between HLA-G*0105N allele and protection from HIV-1 infection [6]. HLA-G*0105N allele does not encode functional HLA-G1 proteins [7]. Since HLA-G1 is the major ligand by which HLA-G inhibits NK cell-mediated lysis [8], we thus postulated that the absence or reduced expression of HLA-G1 molecules in individuals carrying the HLA-G*0105N allele would allow NK cells to destroy HIV-infected cells, leading to protection from infection. Because the HLA-E and -G interaction is an important determinant of NK cell activity, we now report the genetic association between HLA-E variants, either alone or in combination with HLA-G polymorphism, and susceptibility to HIV-1 infection in African women.

METHODS

Participants

DNA extracts were obtained from 397 unrelated women enrolled in the ZVITAMBO trial in Zimbabwe, Africa. This was a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial that enrolled 14,400 mother-child pairs with the main objective of investigating the impact of postpartum vitamin A supplementation on vertical transmission of HIV-1. All eligible participants were recruited immediately postpartum from fourteen maternity clinics and hospitals in greater Harare. Written informed consent was obtained from all mothers who participated in this study. Our samples were drawn consecutively, at the time of enrolment and prior to any intervention, from two groups: 231 HIV-1 seropositive women and 166 HIV-1 seronegative women as controls. The women's serological status was determined using enzyme-linked immunosorbent assay and confirmed by Western blot. Information on socio-demographic factors that could be associated with HIV prevalence was collected through questionnaires. The majority (90%) of the subjects in our study is of the Shona ethnic group. HIV-1 infection in this population is restricted almost entirely to heterosexual exposure.

Protocol

Genomic DNA was obtained from whole blood using a standard phenol-chloroform extraction procedure or by the Qiagen DNA extraction kit (Mississauga, Ont. Canada). The known HLA-E alleles differ at only one amino acid position, with either an arginine (HLA-E*0101 or E^R) or a glycine (HLA-E*0103 or E^G) at position 107. This mutation was detected by amplification refractory mutation system (ARMS) as described previously [9]. HLA-G polymorphism in the same patient population has been reported in a previous study [6]. HLA-G and HLA-E genotypic frequencies as well as socio-demographic factors were compared between the HIV seropositive and HIV seronegative groups using the chi-square test. Logistic regression was used to estimate odds ratios (ORs) for each genotype and socio-demographic risk factors. ORs and 95% confidence intervals (CI) were calculated with the exact method.

RESULTS

The distribution of HLA-E genotypes and selected socio-demographic risk factors for HIV-1 infection among 397 Zimbabwean women are shown in Table 1. There was a significant difference in the distribution of HLA-E genotypes between the HIV-positive and HIV-negative groups. The mutation at codon 107 (HLA-E^G), in the homozygous state, was observed less frequently in HIV-positive women (13,8 %) than in HIV-negative women (30.7%; $P= 0.001$). In the unadjusted regression analysis, women who were homozygous for the HLA-E^G allele had a 3.5-fold reduced risk of HIV-1 infection compared to women who were heterozygous or homozygous for the HLA-E^R allele (OR, 0.29; 95% CI, 0.16-0.51) (Table 2). HIV-positive women were somewhat a little bit older than HIV-negative women (Table 1). In contrast, women who were married or who stated that they had a religion were more likely to be HIV-negative. All of these demographic variables, except for the religious status, had a highly significant effect on HIV-1 prevalence in unadjusted regression models (Table 2). In the multivariate analysis including HLA-E and HLA-G genotypes, and all of the significant demographic risk factors in the model, the protective effect of HLA-E^G homozygote genotype remained highly significant ($P= 0.001$) and had even a slightly greater effect with point estimates of the odds ratio going from 0.29 (unadjusted) to 0.26 (adjusted) (Table 2). Age and marital status remained highly significant in the multivariate model. Religious status was not significantly associated with protection from HIV-1 infection in the unadjusted analysis ($P= 0.12$) but became significant ($P= 0.04$) after adjusting for all other variables (Table 2). The distribution of HLA-G alleles among the same cohort of HIV-positive and HIV-negative women was reported previously [6]. The HLA-G*0105N or null allele, in the heterozygous state, was significantly associated with protection from HIV-1 infection (OR, 0.45; 95% CI, 0.26-0.79; $P=0.005$). When adjustment was made for other all significant factors, the point estimate increased slightly from 0.45 to 0.46 but the effect remained highly significant ($P= 0.01$) (Table 2). In both univariate and multivariate analyses, there was a clear trend of the point estimates of the odds ratio decreasing with increasing number of protective genotypes (data not shown). In the adjusted regression analysis, the combined protective HLA-E^G homozygote/ HLA-G*0105N heterozygote genotypes was associated with a 12.8-fold reduced risk of HIV-1 infection (OR: 0.078; 95% CI, 0.008-0.73; $P=0,03$) compared with the absence of both of these genotypes.

DISCUSSION

HIV enhances the cell surface expression of HLA-E and -G while down-regulating the expression of other HLA class I proteins resulting in reduced susceptibility to both CTL- and NK cell-mediated killing [1-5]. This differential regulation of HLA molecule expression may modulate the mucosal immune response to HIV by facilitating or preventing the establishment of the infection in the female genital tract. The results of the present study showed that HLA-E polymorphism is significantly associated with risk of HIV-1 infection in Zimbabwean women. Women who are homozygous for the HLA-E^G allele have a 4-fold reduced risk of HIV-1 infection compared to those heterozygous or homozygous for the wild-type allele HLA-E^R. The genetic effect of HLA-E^G was independent of significant socio-demographic risk factors associated with HIV-1 infection in this population. In agreement with previous studies conducted in sub-Saharan Africa, age, religion and marital status were identified as risk factors for HIV infection in our study. We have previously reported a highly significant correlation between HLA-G*0105N allele and protection from HIV-1 infection in this cohort [6]. Women homozygous or heterozygous for the HLA-G*0105N allele had a 2.2-fold reduced risk of HIV-1 infection ($P=0.005$) compared to those not harboring this allele. In the present study, we determined that the observed effect of HLA-G was independent of HLA-E and other significant socio-demographic risk factors. Furthermore, there was a synergistic interaction between HLA-E and -G genetic variants for protection from HIV-1 infection. Women carrying the combined protective HLA-E^G homozygote/ HLA-G*0105N heterozygote genotypes had a 12.8-fold reduced risk of HIV-1 infection ($P=0.03$) compared with those harboring neither genotype after adjusting for other significant risk factors. The precise mechanism of how the combined genotypes lead to this highly significant reduction in HIV acquisition remains to be established.

NK cells play a crucial role in the very early stages of viral infections by virtue of their ability to kill virus-infected cells and to produce cytokines and chemokines. The functional activities of NK cells are regulated by a balance between the engagement of their inhibitory and activating receptors. Two major types of class I MHC protein-binding receptors are expressed on human NK cells: the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) killer and the HLA-E-specific C-type lectin-like CD94/NKG2 molecule. An epistatic interaction between KIR3DS1 activating receptor and a subset of HLA-Bw4 alleles, bearing the Ile-80 epitope, is associated with delayed progression to AIDS in HIV-infected Caucasians [10]. This synergistic interaction has not been found in African Americans and Zambians, corresponding to the low frequency of KIR3DS1 allele in these populations [10,11]. In the Zambian population, the combination of the inhibiting

receptor KIR3L1 with HLA-B*57 supertype (which includes B*57, B*58 alleles that contained the Bw4-Ile 80 epitope) is associated with delayed progression to AIDS [19]. It has been proposed that peptide-specific recognition by activating KIRs is responsible for these effects. However, it is extremely unlikely that self/nonself discrimination is achieved by KIRs. The extensive polymorphism of HLA class I and the very limited repertoire of KIR are not compatible with peptide-specific binding to HLA class I in the context of diseases or infections.

In contrast to KIRs, the binding of HLA-E to its NK cell receptor CD94/NKG2 is governed by peptide specificity [8]. HLA-E normally binds peptides derived from signal sequences of HLA-G and other class I molecules [12], and recognition by CD94/NKG2 is lost when HLA-E instead binds a peptide derived from the signal sequence of heat shock protein 60 [13]. This in turn, could induce the killing of cells undergoing a stress response by NK cells that are normally inhibited by HLA-E. The same situation could apply for HIV. The downregulation HLA-A and/or –B signal peptide production by HIV may diminish or block the inhibition of NK cells by loss of recognition through the HLA-E-specific inhibitory receptor. It has also been reported that HLA-E can recognize virus-derived peptides including HIV leading to stimulation of NK cell-mediated lysis [4, 14]. Therefore, it is tempting to speculate that, in the absence of or at reduced levels of HLA class I signal peptides, HLA-E would instead bind available viral peptides and induce a stress response resulting in cell killing. We observed that HLA-E^G allele confers protection from HIV-1 infection in Zimbabwean women. HLA-E^G allele expresses not only high level of HLA-E molecules at the cell surface but these molecules have greater binding affinity for peptides than those produced by the wild type HLA-E^R allele [15]. In those individuals with the HLA-E^G phenotype, the high levels of HLA-E molecule with great affinity for viral peptides might further enhanced NK lysis of HIV infected cells leading to protection from infection.

Understanding the basis for the observed genetic association is complicated by strong linkage disequilibrium within the HLA gene complex. Although our analysis clearly demonstrated that the effect of HLA-E is synergistic but independent to that of HLA-G, we cannot rule out the possibility that another linked gene is responsible for the observed effect. Nevertheless, given the increasing evidence supporting the proposed mechanism by which HIV modulates the expression of HLA molecules to escape cell-mediated lysis, the demonstration that functionally active HLA-E and HLA-G polymorphisms are associated with susceptibility to heterosexual transmission of HIV-1 infection provides strong evidence to support both the role of these non-classical MHC molecules in such mechanism and it's implication in heterosexual HIV transmission.

Further studies are needed to determine the direct impact of HLA-E and –G molecules on the mucosal immune system in the female genital tract.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- 1 Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex protein by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, 1999, 10:661-71.
- 2 Pizzato N, Derrien M, Lenfant F. The short cytoplasmic tail of HLA-G determines its resistance to HIV-1 Nef-mediated cell surface downregulation. *Hum Immunol*, 2004, 65:1385-96.
- 3 Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1 positive patients express HLA-G molecule. *AIDS*, 2002, 16:347-51.
- 4 Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, et al. HIV-1 leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antiviral Ther*, 2005, 10:95-107.
- 5 Bonaparte MI, Barker E. Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood*, 2004, 104:2087-94.
- 6 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, 18:427-31.
- 7 Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, et al. HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta* 1998, 19:127-32.
- 8 Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty D, Lopez-Botet M.. The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29: 277-83.
- 9 Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, the ZVITAMBO Study Group, Roger M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Hum. Immunol.* 2000, 61:1150-6.
- 10 Martin MP, Gao XJ, Lee JH et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature Gen.* 2002, 31:429-34.

- 11 Lopez-Vazquez A, Mina-Blanco A, Marinez-Borra J et al. Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influences the progression of HIV-1 in a Zambian population. *Hum. Immunol.* 2005, 66:285-9.
- 12 Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE. HLA-E surface expression depends on the binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J. Immunol.* 1998, 160:4951-60.
- 13 Michaelsson J, Texeira de Matos C, Achour A et al. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 2002, 196: 1403-14.
- 14 Pietra G, Romagnani C, Mazzarino P, et al. HLA-E-restricted recognition of cytomegalovirus-derived peptides by human CD8+ cytolytic T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2003, 100:10896-901.
- 15 Strong RK, Holmes MA, Li P, et al. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J. Biol. Chem.* 2003, 278:5082-90.

Table 1: The distribution of HLA-E genotypes and socio-demographic risk factors for HIV-1 infection among 397 Zimbabwean women

HLA-E genotypes or demographic risk factors	HIV positive (n= 231) ^a	HIV negative (n= 166) ^a
HLA-E ^R /HLA-E ^R (%)	87 (37.7)	40 (24.1)
HLA-E ^R /HLA-E ^G (%)	112 (48.5)	75 (45.2)
HLA-E ^G /HLA-E ^G (%)	32 (13.8)	51 (30.7)
Age (Years) (mean SD)	25.8 (5.0)	23.4 (5.0)
Marital status (Proportion married SD) ^b	0.89 (0.02)	0.95 (0.02)
Religion (Proportion stating religious faith SD) ^c	0.93 (0.02)	0.96 (0.01)

^an= nb of women.

^bValue 1 if woman was married at the time of recruitment, value 0 otherwise.

^cValue 0 if woman says she has no religion, value 1 otherwise.

Abbreviation, SD; standard deviation

Table 2: Logistic regression analysis of the risk factors for HIV-1 infection among 397 Zimbabwean women.

Variables	Unadjusted		Adjusted	
	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> value ^b	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> value ^b
HLA-G*0105N ^c	0.45 (0.26-0.79)	0.005	0.46 (0.25-0.83)	0.01
HLA-E ^R /HLA-E ^G	0.69 (0.43-1.10)	0.12	0.76 (0.46-1.27)	0.29
HLA-E ^G /HLA-E ^G	0.29 (0.16-0.51)	0.001	0.26 (0.14-0.49)	0.001
Age – linear	1.99 (1.38-2.88)	0.001	2.03 (1.37-2.99)	0.001
Age – quadratic	0.99 (0.98-0.99)	0.001	0.99 (0.98-0.99)	0.002
Marital status ^d	0.42 (0.18–0.95)	0.04	0.39 (0.16-0.97)	0.04
Religion ^e	0.47 (0.18–1.22)	0.12	0.33 (0.12-0.94)	0.04

^aOdds ratio (OR) 95% confidence interval (CI) calculated with the exact method.

^b*P* value was calculated using Chi-square test.

^cHeterozygous state

^dMarried vs separated or divorced or widowed or never married.

^eAny religion vs none

Article 2 :**Blood soluble HLA-G level is associated with risk of HIV-1 infection in Beninese commercial sex workers**

Julie Lajoie, Marguerite Massinga-Loembe, Johanne Poudrier, Fernand Guédou, Jacques Pépin, Annie-Claude Labbé, Michel Alary and Michel Roger

Article accepté : Human Immunology 2009**Contribution des co-auteurs :**

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études menant à la publication de cet article. Julie Lajoie a participé à l'élaboration du devis de l'étude, a effectué les analyses génétiques et d'expression de la protéine sur les spécimens, ainsi que les analyses statistiques. Marguerite Massinga Loembe a coordonné et supervisé l'ensemble des activités au Bénin (recrutement, prélèvements, saisie de données, assurance de la qualité) et a procédé à la préparation des échantillons. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration du devis de l'étude et est un co-investigateur de l'étude. Fernand Guédou, Michel Alary et Annie-Claude Labbé sont des co-investigateurs de l'étude. Annie-Claude Labbé et Michel Alary ont participé au devis de l'étude. Jacques Pépin a collaboré aux analyses statistiques. Michel Roger est l'investigateur principal du projet. L'article fût rédigé par Julie Lajoie et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

BLOOD SOLUBLE HLA-G LEVELS ARE ASSOCIATED WITH HIV-1 INFECTION IN BENINESE COMMERCIAL SEX WORKERS

Julie Lajoie^{1,2}, Marguerite Massinga Loembe^{3,4}, Johanne Poudrier^{1,2}, Fernand Guédou⁴, Jacques Pépin⁵, Annie-Claude Labbé^{2,6}, Michel Alary⁴ and Michel Roger^{1,2,*}

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

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

³ Laboratory of immunology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

⁴ Unité de Recherche en Santé des Populations, Centre hospitalier affilié universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada.

⁵ Département de Microbiologie et Infectiologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

⁶ Département de Microbiologie de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada

Word count (excluding abstract, acknowledgments, references, tables and figures): 1537

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

Key words: HLA-G, systemic levels, susceptibility, HIV-1 infection

Number of figures and tables: Figure: 1, table: 2

FOOTNOTE PAGEConflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

Financial support

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). Julie Lajoie and Marguerite Massinga Loembe hold Student Research awards from the CIHR. Marguerite Massinga Loembe additionally held a fellowship from the AUF (Agence Universitaire de la Francophonie). Michel Alary and Michel Roger are recipients of Research Scholar awards from the FRSQ.

Abstract

Objective: 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 is associated with HIV-1 infection.

Design: HLA-G genotypes and sHLA-G plasma levels were determined in 49 HIV-1-uninfected and 20 HIV-1-infected female commercial sex workers (CSWs), as well as 67 HIV-1-uninfected non-CSW women at low risk for exposure, recruited in Cotonou, Benin.

Methods: HLA-G polymorphism was determined by direct DNA sequencing analysis and sHLA-G plasma levels were measured by commercial immunoenzymatic assay.

Results: HIV-1-infected CSWs had significantly lower levels of plasma sHLA-G compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups. The presence of HLA-G*010101, HLA-G*010404, and the 3'-untranslated region (3'UTR) variant at position 3952 were all significantly associated with lower plasma sHLA-G levels in the HIV-1-infected CSWs, whereas the HLA-G 3'UTR 14-bp sequence insertion was also associated with lower plasma sHLA-G levels in the overall population. When adjustment was made for all significant variables, the reduced expression of sHLA-G in the plasma remained significantly associated with HIV-1 infection and HLA-G 3'UTR 14-bp insertion homozygote genotype.

Conclusion: This study demonstrates that low levels of plasma sHLA-G are associated with HIV-1 infection.

Word count: 195

Keywords: African; HIV-1; HLA-G; level of expression; genetic variant; immune regulator.

Introduction

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 (169). 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 expression is associated with gender and HLA-G genetic variants. The level of sHLA-G is higher in women than in men (286). Healthy individuals carrying the HLA-G*010103 and HLA-G*0105N alleles have lower plasma sHLA-G levels than subjects carrying the more frequent HLA-G*010101 allele. In addition, individuals with the latter allele have lower plasma sHLA-G levels than those with the HLA-G*010401 allele (175). 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 (176;177). HLA-G expression can be induced during pregnancy and in pathological conditions such as autoimmune diseases, cancers, transplantations and viral infections (287). sHLA-G molecules inhibit natural killer and CD8⁺ T lymphocytes cytotoxic activity, as well as CD4⁺ T cell functions (173;288;289). The immunosuppressive properties of HLA-G might contribute to the susceptibility of HIV-1 infection. Recent studies have shown that HLA-G polymorphisms are associated with altered risk of heterosexual acquisition (197;290) and vertical transmission (193;194) of HIV-1. However, no data are available on the possible association between HLA-G expression, at the protein level, and susceptibility to HIV-1 infection. We have therefore measured the plasma 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.

Subjects, materials and methods

Female CSWs were recruited consecutively from a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin and were divided into two groups: HIV-1-uninfected CSWs (n = 49) and HIV-1-infected CSWs (n = 20). The HIV-1-uninfected non-CSW women (n = 67) were enrolled from a general health clinic in Cotonou. Written informed consent was obtained from all subjects and this study was approved by the Ministère de la Santé du Bénin and by the CHUM human research ethics board. Women were excluded from the study if < 18 years old, menstruating, or pregnant. All study participants were antiretroviral therapy naïve at the time of recruitment. Full methods for recruitment, baseline characteristics collection, and diagnostic laboratory procedures have been described elsewhere (291). sHLA-G plasma levels were measured using a Human sHLA-G Immunoassay kit (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), which allows simultaneous detection of HLA-G1 and -G5 soluble proteins without discrimination. DNA extraction was performed on PBMC or dried blood spots by Masterpure DNA extraction KIT (Epicentre, Madison, WI, USA). HLA-G polymorphism was determined by direct DNA sequencing analysis as described previously (197). Statistical analysis was performed using the GraphPad PRISM 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant at $P \leq 0.05$ or $P \leq 0.015$ when comparing two or three groups, respectively.

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 vaginosis, candidiasis, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection (Table 1). The average numbers of clients during the past week was higher in HIV-1-uninfected CSWs than in HIV-1-infected CSWs ($P=0.05$), whereas the duration of sex work, and condom use were equivalent between the two CSW groups.

Plasma sHLA-G levels were associated with HIV-1 infection. Indeed, HIV-1-infected CSWs had significantly lower levels of plasma sHLA-G (107 ± 102 units/ml) than did the HIV-1-uninfected CSWs (284 ± 213 units/ml) ($P=0.002$) and the HIV-1-uninfected non-CSW women (245 ± 166 units/ml) ($P<0.0001$) (Figure 1). There was no significant correlation between the HIV-1 viral load and the sHLA-G level in the plasma of the HIV-1-infected CSWs as determined by the Spearman's rank test ($r^2= 0.048$, $P= 0.935$).

Since sHLA-G expression can also be associated with HLA-G polymorphism (175;292), 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). HLA-G*010101 and G*010404 genotypes, in the heterozygous or homozygous states, were associated with reduced expression of sHLA-G in HIV-1-infected CSWs compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW ($P=0.018$ and $P=0.0007$, respectively) and non-CSW ($P=0.006$ and $P=0.015$, respectively) groups. Similarly, the homozygote genotype for the HLA-G 3'UTR variant at nucleotide position 3952 was also associated with reduced expression of sHLA-G in HIV-1-infected CSWs compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW ($P=0.0003$) and non-CSW ($P=0.0002$) groups. Although the 3'UTR 14-bp polymorphism was not associated with the sHLA-G expression patterns observed between the study groups, the homozygote genotype was associated with reduced

expression of sHLA-G in the overall population ($P=0.042$). Multiple logistic regression was used to define independent predictors of sHLA-G expression levels identified as significant in the crude analysis (HIV-1 infection, presence of HLA-G*010101, HLA-G*010404, HLA-G 3'UTR 14-bp sequence insertion and variant at position 3952). When adjustment was made for all significant variables, the reduced expression of sHLA-G in the plasma remained significantly associated with HIV-1 infection ($P=0.012$) and HLA-G 3'UTR 14-bp insertion homozygote genotype ($P= 0.03$).

Since HLA-G polymorphisms can be associated with HIV-1 infection [10-13], we also looked at the distribution of the HLA-G genetic variants among the study groups and found no significant association between HLA-G polymorphism and HIV-1 infection (data not shown).

Discussion

We found that low level of plasma sHLA-G was associated with HIV-1 infection in Beninese CSW. This is in sharp contrast with the study of Donaghy et al showing elevated levels of sHLA-G in the blood of HIV-1-infected French subjects (189). Most of the HIV-1-infected individuals analysed in the latter study were on antiretroviral therapy whereas all of our study participants were naïve to treatment. Antiretroviral therapy can induce surface expression of HLA-G on blood peripheral monocytes from HIV-1-infected patients (187;188). Hence, the relatively high blood levels of HLA-G observed in the French subjects could be due to antiretroviral therapy and not HIV-1 infection per se. Moreover, the previous study (189) did not control for potential confounding factors such as gender (286), pregnancy (293) and HLA-G polymorphism (175-177;292) that could influence HLA-G expression. In the present study, all subjects were non-pregnant women and reduced expression of sHLA-G in the plasma was associated with certain HLA-G genotypes. However, most of the differences in sHLA-G expression attributable to the HLA-G genotype were observed between the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected groups and the association between sHLA-G levels and HIV-1 infection remained significant when adjustment was made for the HLA-G genotype in the multivariate analysis. HIV-1 can down-regulate cell surface expression of HLA-G1 molecule through a Nef-independent and Vpu-dependent mechanism (190;191). sHLA-G molecules are generated by cleavage of membrane-bound HLA-G1 isoform and by secretion of a soluble form (HLA-G5). Thus, it is possible that HIV-1 down-regulation of membrane-bound HLA-G1 could reduce the number of available molecules for cleavage and consequently leading to the decreased plasma sHLA-G level observed in the HIV-1-infected CSW. However, the difference in HLA-G expression may partly be genetically determined. Indeed, the HLA-G 3'UTR 14-bp sequence insertion homozygote genotype was independently associated with significantly reduced expression of plasma sHLA-G in the overall population. The insertion of the 14-bp sequence in the 3'UTR of HLA-G has been associated with significantly reduced HLA-G mRNA levels (292) and lower levels of sHLA-G in the serum of healthy subjects (176;177)

In contrast to previous studies in Zimbabwean women (197) there was no significant difference in the distribution of HLA-G polymorphism among the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected groups in the present study. The relatively small number of subjects analysed in each groups may have limited the power of the present study to reproduce our previous findings. Therefore, we can not exclude the possibility that an HLA-G polymorphism such as the 3'UTR 14-bp sequence insertion could be associated with HIV infection by way of lowering sHLA-G.

Cytokines production could influence HLA-G expression and vice-versa. Interleukin (IL)-10 has been shown to induce HLA-G expression (294) and HLA-G can also stimulate IL-10 expression in peripheral blood monocytes [24]. Numerous studies have shown that sHLA-G induces a shift towards a Th1-type cytokines pattern. sHLA-G promotes the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, interferon- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α by decidual and peripheral blood natural killer cells (181;183;295). Interestingly, we have previously measured the cytokine levels in the plasma samples of our study subjects and found that HIV-1-infected CSWs had significantly lower levels of IL-2, IL-10, and TNF- α compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups. The same observation was made for IL-6 although the differences were not statistically significant (291)

Altogether, these results suggest that the expression of sHLA-G in the context of HIV-1 is a complex process modulated by many factors such as HIV-1, HLA-G genotypes, and cytokine expression patterns, which may contributes to an immunological environment promoting the infection.

Acknowledgment

We are indebted to Nassirou Geraldo, Aina Gabin, Carmelle Assogba and Clémence Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to Gérard Ahotin, Laurette Djossou, and Ella Goma for their technical assistance and to Georges Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers.

Authors' contribution

M. Roger is the lead investigator of this study and with J. Lajoie and J. Poudrier designed the experiments, performed the analysis and wrote the manuscript. J. Lajoie performed the experiments. M. Massinga Loembe, A-C Labbé, F. Guédou and M. Alary were responsible for the participants' recruitment and provided clinical and laboratory data. M. Massinga Loembe was also responsible for the sample processing and data collection. J. Pépin contributed expertise in statistical analysis. All authors edited and approved the final version of the manuscript.

References

1. Ishitani A and Geraghty DE. 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* 1992; 89:3947-51.
2. Rudstein-Svetlicky N, Loewenthal R, Horejsi V, and Gazit E. HLA-G levels in serum and plasma. *Tissue Antigens* 2007; 69 Suppl 1:140-2.
3. Rebmann V, van d, V, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, and Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001; 57:15-21.
4. Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, and Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 2004; 64:66-9.
5. Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, and Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004; 56:135-41.
6. Pistoia V, Morandi F, Wang X, and Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:469-79.
7. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999; 11:1351-6.
8. Park GM, Lee S, Park B et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313:606-11.
9. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, and Carosella ED. 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* 2001; 98:12150-5.

10. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, and 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. *J Infect Dis* 2006; 193:298-301.
11. Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ, and Roger M. Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *AIDS* 2004; 18:427-31.
12. Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, and Bond VC. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Res Ther* 2006; 3:28.
13. Fabris A, Catamo E, Segat L et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 2009; 23:177-82.
14. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M et al. Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1-infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol* 2008; 1:309-16.
15. Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, and Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; 55:63-79.
16. Donaghy L, Gros F, Amiot L et al. Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leukocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2007; 147:236-40.

17. Cabello A, Rivero A, Garcia MJ et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. *Hum Immunol* 2003; 64:1045-9.
18. Rivero A, Lozano JM, Gonzalez R et al. 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* 2007; 68:303-6.
19. Hackmon R, Hallak M, Krup M et al. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2004; 19:404-9.
20. Derrien M, Pizzato N, Dolcini G et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* 2004; 85:1945-54.
21. Pizzato N, Derrien M, and Lenfant F. The short cytoplasmic tail of HLA-G determines its resistance to HIV-1 Nef-mediated cell surface downregulation. *Hum Immunol* 2004; 65:1389-96.
22. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999; 11:803-11.
23. Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* 2006; 4:e9.
24. van der MA, Lukassen HG, van Cranenbroek B et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 2007; 13:123-33.
25. Li C, Houser BL, Nicotra ML, and Strominger JL. 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* 2009; 106:5767-72.

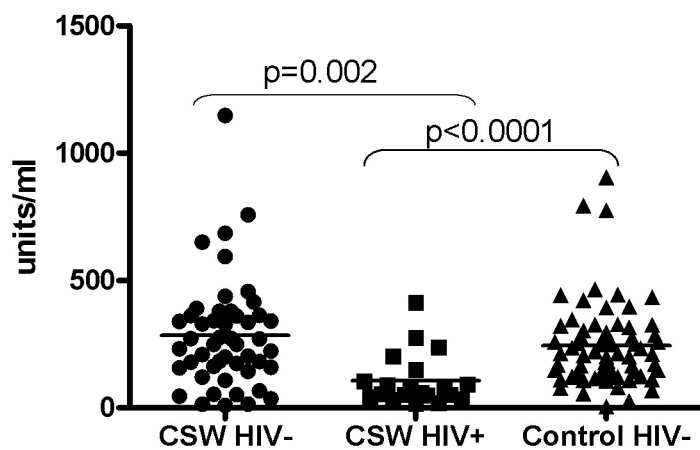


FIGURE 1 MEAN PLASMA SOLUBLE HLA-G LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.

Statistical significance of differences in the plasma 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 and HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSWs N = 49	HIV-1-infected CSWs N = 20	HIV-1-uninfected non-CSW controls N = 67	p value ^a
Age, mean (s.d.), years	34.3 (12.3)	30.8 (8.3)	31.9 (9.3)	NS
Duration of sex work, mean (s.d.), years	4.3 (3.1)	4.2 (3.2)	NA	NS
Number of clients last week, mean (s.d.)	16.9 (14.1)	10.1 (11.3)	NA	0.05
Days since last menses, mean (s.d.)	14.9 (8.3)	17.9 (17.7)	19.6 (12.7)	NS
Regular partner	29/47 (68%)	23/34 (68%)	54/67 (81%)	NS
Vaginal douching	46/49 (94%)	31/33 (94%)	61/67 (91%)	NS
Condom always used with clients	41/47 (87%)	24/30 (80%)	NA	NS
Vaginosis	19/22 (86%)	15/16 (94%)	20/45 (44%)	NS
Candidiasis	4/38 (11%)	4/22 (18%)	12/53 (23%)	NS
NG and /or CT infection	6/37 (16%)	5/25 (20%)	2/63 (3%)	NS

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

All risk factor data were collected via a questionnaire administered before samples were collected. Gynecological exams and biological sampling were performed by a physician without knowledge of HIV status of the women to avoid potential bias.

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

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

HLA-G	HIV-1-uninfected CSWs		HIV-1-infected CSWs		HIV-1 uninfected non-CSWs		P-value ^a	Total population		P-value ^b
	N	Levels	N	Levels	N	Levels		N	Levels	
allele ^c										
010101	29	317 (244)	11	118 (122)	33	232 (166)	0.009 ^d	73	249 (205)	NS
010102	15	336 (273)	5	155 (159)	12	232 (193)	NS	32	269 (234)	NS
0103	8	195 (141)	6	112 (87)	8	202 (130)	NS	24	175 (125)	NS
010401	5	328 (160)	2	141 (137)	15	320 (251)	NS	22	305 (224)	NS
010404	17	294 (190)	8	68 (47)	14	229 (123)	0.001 ^e	39	224 (168)	NS
0105N	8	265 (143)	1	83 (0)	8	168 (94)	NS	17	209 (127)	NS
3'UTR SNP ^f										
3777 (c/c)	13	251 (172)	5	116 (117)	16	227 (195)	NS	34	243 (181)	NS
3952 (a/a)	30	287 (221)	11	76 (67)	32	236 (152)	0.0003	73	246 (204)	NS
g										
14-bp (l/l)	5	206 (173)	3	103 (88)	5	165 (67)	NS	13	145 (98)	0.042

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; l, insertion, N, number of participants; NS, nonsignificant.; SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region

Data are mean (standard deviation)

^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=0.018 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs and P=0.006 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney *U* test

^e $P=0.0007$ for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs and $P=0.015$ for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non CSWs as determined by Mann-Whitney U test

^f Presence of the variants in the homozygous state

^g $P=0.0003$ for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs and $P=0.0002$ for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U test

Article 3 :**Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1 infected commercial sex workers in Benin**

Julie Lajoie, Johanne Poudrier, Marguerite Massinga-Loembe, Fernand Guédou, Clémence Agossa-Gbenafa, Annie-Claude Labbé, Michel Alary and Michel Roger

Publié dans : Mucosal Immunology 2008; July 1(4); p 309-316

Contribution des co-auteurs :

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études menant à la publication de cet article. Julie Lajoie a participé à l'élaboration du devis de l'étude, a effectué les analyses génétiques et d'expression de la protéine sur les spécimens, ainsi que les analyses statistiques. Marguerite Massinga Loembe a coordonné et supervisé l'ensemble des activités au Bénin (recrutement, prélèvements, saisie de données, assurance de la qualité) et a procédé à la préparation des échantillons. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration du devis de l'étude et est un co-investigateur de l'étude. Fernand Guédou, Michel Alary et Annie-Claude Labbé sont des co-investigateurs de l'étude. Annie-Claude Labbé et Michel Alary ont participé au devis de l'étude. Clémence Agossa-Gbenafa est l'une des médecins. Michel Roger est l'investigateur principal du projet. L'article fût rédigé par Julie Lajoie et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

DIFFERENCES IN IMMUNOREGULATORY CYTOKINE EXPRESSION PATTERNS IN THE SYSTEMIC AND GENITAL TRACT COMPARTMENTS OF HIV-1-INFECTED COMMERCIAL SEX WORKERS IN BENIN.

Julie Lajoie^{a,b}, Johanne Poudrier^{a,b}, Marguerite Massinga Loembe^{c,d}, Fernand Guédou^d, Clémence Agossa Gbenafa^e, Annie-Claude Labbé^{b,f}, Michel Alary^d, Michel Roger^{a,b,*}

^a Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Canada

^b Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada

^c Laboratory of immunology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

^d Unité de Recherche en Santé des Populations, Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada.

^e Dispensaire des IST, Centre de Santé de la Commune de Cotonou 1, Bénin

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

Word count (excluding abstract, acknowledgments, references, tables and figures):
3292

Running title: Genital mucosal cytokine expression in female sex worker

Key words: Cytokine, female genital tract, systemic, HIV

This work was presented in part at the 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, August 21-25, 2007.

ABSTRACT

Initial exposure to HIV-1 during heterosexual transmission occurs in the genital tract. Although much of the literature on the immune response to HIV-1 infection is based on studies performed at the systemic level, our understanding of tissue-specific immunity is lacking. Levels of both genital mucosal and blood IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , and IFN- γ production were compared between 57 HIV-1-uninfected and 52 HIV-1-infected female commercial sex workers (CSWs), as well as 73 HIV-1-uninfected non-CSW control women at low risk for exposure. HIV-1-infected CSWs had significantly higher genital mucosal levels of TNF- α and IFN- γ compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. In contrast, the serum levels of all the cytokines tested were lower in HIV-1-infected CSWs compared with those in the other groups. The increased production of genital mucosal pro-inflammatory cytokines in HIV-1-infected CSWs possibly reflects susceptibility to HIV-1 infection and disease progression/perpetuation at the initial site of exposure.

Word count: 152

INTRODUCTION

In 2007, there were 33.2 million people living with HIV/AIDS worldwide, and the number of women infected with HIV was estimated at 15.4 million. Most HIV infections are acquired through heterosexual intercourse, and each year the rate of HIV-infected women increases dramatically. In Africa, 60% of new HIV infections affect women, who are considered the most vulnerable population ¹. Preventive vaccine and protective microbicide strategies are still under development, but until now clinical trials have failed to prove the efficacy and safety of commercially available compounds. Indeed, in a recent clinical trial, the most promising HIV vaccine has not only failed to protect but may actually have increased the risk of HIV infection in some study participants ². Furthermore, microbicides aiming to prevent HIV entry in the vaginal tract have often failed because some components, such as nonoxynol-9, can be toxic and may increase susceptibility to HIV infection ^{3,4}. The development of efficient preventive strategies against HIV requires a further understanding of the factors involved in HIV susceptibility, such as the mucosal immunity at the initial site of infection and its link to systemic immunity.

There are a number of factors that have been correlated with women's susceptibility to HIV infection. Socio-demographic and sexual behaviour factors, such as age, marital status, history of prostitution, the use of condoms, and the number of sexual partners have been associated with HIV-1 infection ⁵⁻⁷. The practice of vaginal douching has also been shown to increase risk of HIV-1 infection ⁸. Host genetic factors such as the CCR5 32-base pair deletion HIV-1 co-receptor mutation and specific HLA class I alleles have also been associated with HIV-1 infection ^{9,10}. Biological factors such as the sexual partner's high viral load and the presence of sexually transmitted infections (STI) may also have an impact on the risk of HIV-1 acquisition. For example, *Herpes simplex-2* (HSV-2) seropositivity has been associated with increased risk of HIV acquisition ^{11,12}.

The initial site of exposure to HIV-1 during heterosexual transmission occurs in the genital tract. However, little is known about the mechanisms of transmission and HIV-specific immune responses at this site. The female genital tract is related to the mucosal-associated lymphoid tissue (MALT), which contains the majority of immune cells within the body ¹³. The particularity of the female genital tract immunity is that it is tightly regulated by a hormonal/inflammatory process throughout the menstrual cycle, having to deal with the pressure of procreation and with surveillance of the commensal microbial flora as well as with intrusion by pathogens ¹⁴. The most obvious scenario for heterosexual HIV-1 transmission involves the passage of the virus across the mucosal

epithelial barrier and its capture by langerhans and/or intraepithelial dendritic cells, which may facilitate infection of target cells in the submucosal layer and draining lymphoid organs ¹⁵. Although, the mechanism of HIV-1 transmission in the female genital tract has become an important question in recent years, the factors involved in HIV-1 susceptibility and its dissemination in the genital tract still remain unclear. Studies in Kenyan commercial sex workers (CSWs) have identified HIV-1-resistant women who present systemic and genital HIV-1-specific cytotoxic T cells (CTL) ¹⁶⁻¹⁸ and neutralising IgA ¹⁹⁻²¹. Moreover, HIV-1-resistant CSWs showed increased cervical T cell counts and RANTES expression compared with HIV-1 negative subjects. Importantly, these increases were not reflected in systemic lymphocyte compartment ²². Further characterisation of the factors involved in mucosal immunity and their links to modulation of adaptive immune responses and systemic immunity are required for the development of efficient preventive strategies against HIV.

The purpose of this study was to characterise and compare immunoregulatory cytokines' expression in cervicovaginal lavage (CVL) samples and serum of HIV-1-infected CSWs, HIV-1-uninfected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects at low risk for HIV exposure. We report that HIV-1-infected CSWs had significantly higher levels of TNF- α and IFN- γ in their CVLs compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. In contrast, the serum levels of all the cytokines tested were lower in the HIV-1-infected CSWs compared with those in the other groups.

RESULTS

Demographic, sexual behaviour, and genital infection characteristics of the study groups

These data were collected to address the issue of confounding variables for risk of HIV infection and mucosal immune responses. The three study groups were similar with respect to age, days from last menses, and the presence of genital tract infections as determined by gynaecological exams, microscopic examination of vaginal specimens and strand displacement assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* from endocervical swabs (Table 1). The HIV-1-uninfected non-CSW control subjects were more likely to have a regular partner ($p = 0.005$) and to be HSV-2 seronegative ($p = 0.0001$) than the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected CSW women. 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.

Cytokine expression patterns in cervicovaginal lavage samples

With the exception of IL-4, all investigated cytokines were detected in CVL samples of the three study groups (Table 2). The detection rate (Figure 1) and expression level (Table 2) of IL-2, IL-6 and IL-10 were similar in HIV-1-uninfected CSWs, HIV-1-infected CSWs, and HIV-uninfected non-CSW control subjects. However, TNF- α and IFN- γ detection rates and expression levels were significantly different between the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected groups. HIV-1-infected CSWs had higher levels of TNF- α and IFN- γ than did the HIV-uninfected CSWs ($p = 0.006$, $p = 0.031$, respectively) and the HIV-uninfected non-CSW control women ($p = 0.02$, $p = 0.006$, respectively). Accordingly, the percentage of women producing significant amounts of TNF- α and IFN- γ (concentrations above the LDL) was significantly higher in the HIV-1-infected CSW group compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups (Figure 1). There were no correlation between the HIV-1 viral load and the levels of cytokines in the CVL samples of the HIV-1-infected CSWs.

Cytokine expression patterns in serum

For the purpose of comparison between the mucosal and systemic compartments, we also examined the pattern of cytokine expression in the serum of all participants. In stark contrast to what is found in mucosal samples, we observed a decrease in the levels of cytokine expression in the serum of the HIV-1-infected CSWs compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups (Table 3).

HIV-1-infected CSWs had lower levels of IL-2, IL-10, and TNF- α than did the HIV-uninfected CSWs ($p = 0.010$, $p = 0.028$, $p = 0.019$, respectively) and the HIV-uninfected non-CSW control women ($p = 0.012$, $p = 0.028$, $p = 0.007$, respectively). Additionally, the percentage of women with detectable levels of IL-2, IL-10 and TNF- α was significantly lower in the HIV-1-infected CSW group compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups (Figure 2). HIV-1-infected CSWs ($p = 0.016$) and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects ($p = 0.002$) had lower levels of IL-4 than did the HIV-1-uninfected CSWs. The same finding was observed for IL-6 although the differences were not statistically significant. The IFN- γ levels were not significantly different in the three groups. There was no correlation between the HIV-1 viral load and the levels of cytokines in the serum of the HIV-1-infected CSWs.

DISCUSSION

It is of primary importance to design strategies that will protect human mucosal ports of entry, such as the female genital tract, from HIV infection. This will be better achieved by furthering our understanding of mucosal immunology and its link to the systemic immune system. The present study shows that during HIV infection, the production of immunoregulatory cytokines in the genital mucosa displays characteristic features that are distinct from those of the systemic immune compartment.

The relatively lower levels of cytokines detected in the serum of HIV-1-infected CSWs compared with those in HIV-1-uninfected women is in agreement with a recent report demonstrating that the capacity of blood-derived lymphocytes to produce *in vitro* pro-inflammatory cytokines such as IL-2, TNF- α , and IFN- γ correlated with a better prognosis and slow HIV-1 disease progression²³. Moreover, the significant increase in the IL-4 levels observed in the serum of HIV-1-uninfected CSWs may suggest that, in these women, the blood CD4⁺ T cell compartment could have the capacity to produce a more vigorous response by increasing the avidity and affinity of both the humoral and cellular immune responses. In contrast to what is found in blood samples, HIV-1-infected CSWs had relatively higher levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ in the genital mucosal tract compared with those in HIV-1-uninfected women. The local inflammatory reaction observed in the genital tract of HIV-1-infected CSWs is probably a consequence of the combinatory direct and indirect effects caused by HIV¹³. This has been demonstrated in the gastrointestinal (GI) tract where levels of HIV-1 replication and CD4⁺ T cell depletion coincided with a marked increase in transcription of human activation and inflammation associated genes²⁴. Studies of female rhesus macaques infected genitally with SIV have shown that pro-inflammatory cytokine responses are earliest and strongest in the genital mucosa and draining lymphoid tissues, and they are positively correlated with virus replication within these tissues²⁵. CD8⁺ T cells from the genital mucosa of HIV-1-infected CSWs have been shown to produce IFN- γ in response to HIV *in vitro*^{18,26}. The significant increase in the levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ in the genital mucosal tract of HIV-1-infected CSWs may favour disease progression/perpetuation by the recruitment of a continuum of target cells in view of augmenting viral replication and dissemination beyond the initial site of infection^{14,15}.

As the lumen of the female genital tract is a «non-sterile» environment, the microbial flora as well as the presence of genital infections and lesions can enhance susceptibility

to HIV-1 by breaching the epithelial barrier, recruiting target cells or generating a pro-inflammatory milieu²⁷. This has been shown at the level of the GI mucosa barrier, where microbial translocation is believed to be the major cause of HIV-1 related chronic inflammation^{28,29}. We have investigated if there was an imbalance in the female genital tract microbial flora by verifying the presence of bacterial vaginosis (BV), as any imbalance and loss at the level of the natural flora is likely to affect immune responses and their control. Indeed, BV has been associated with increased levels of cytokines such as IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and chemokines such as RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β in cervicovaginal lavages and secretions^{30,31}. The assessment of BV was done by measuring the lactobacillus/Gardnerella + Mobiluncus ratio in the vaginal secretions of all the study participants. However, we found no correlation between the presence of BV and the risk of HIV-1 infection or the cytokine expression patterns. STI could also have an impact on the genital mucosal immunity and have been shown to increase the risk of HIV-1 acquisition and to modulate the immune factors associated with HIV-1 infection. *Neisseria gonorrhoeae* infection was shown to impair HIV-1-specific cellular immune responses and to increase the levels of IL-6 and IL-8 produced by cervical and vaginal epithelial cells^{32,33}. HSV-2 seropositivity has been associated with increased risk of HIV-1 acquisition^{11,12}. In the present study, we carefully looked for genital infections by clinical examination and by testing specifically for the presence of syphilis, *Trichomonas vaginalis*, candidiasis, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and HSV-2. All participants tested negative for syphilis and *T. vaginalis* infection was detected in only two women (data not shown). Candidiasis, *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* were more prevalent in our study population but we found no correlation between the presence of these genital infections and the risk of HIV-1 infection or the cytokine expression patterns (Table 1). Although, we found a positive association between HSV-2 seropositivity and the practice of prostitution (Table 1) none of these women had active genital infection upon clinical examination. HSV IgG serology does not correlate with active infection HSV but rather reflects a past exposure to the virus. We can not exclude the possibility that other genital infections such as chancroid, donovanosis and human papillomavirus could have influenced the production of cytokines. Although we did not test specifically for these infections, none of the participants had evidence of characteristic genital chancres, ulcers and/or condylomas associated with these illnesses (data not shown). Thus, these observations suggest that HIV-1 is probably the main pathogenic cause of the increased pro-inflammatory cytokine levels found in the female genital tract of HIV-1-infected CSWs.

Our study shows that during HIV infection, the production of immunoregulatory cytokines in the genital mucosa displays characteristic features that are distinct from those of the systemic immune compartment. The increased production of genital mucosal pro-inflammatory cytokines in the HIV-1-infected CSWs possibly reflects susceptibility to HIV-1 infection and modulates disease progression/perpetuation at the initial site of exposure. This clearly reinforces the importance of well understanding the mucosal immunity, the factors involved in linking innate to adaptive responses while preserving the integrity of the mucosal/systemic balance in order to develop preventive strategies such as microbicides and vaccines.

METHODS

Study populations. Female CSWs were enrolled through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin and were divided into two groups: HIV-1-uninfected CSW (n=57) and HIV-1-infected CSW (n=52). The HIV-1-uninfected non-CSW control subjects at low risk for exposure (n=73) were enrolled from a general health clinic in Cotonou. This study was approved by the Ministère de la Santé du Bénin and by the CHUM, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, and Université Laval human research ethics boards. Women were offered to participate in the study as they attended clinics. All subjects provided written informed consent. 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. Women were excluded from the study if < 18 year old, menstruating, or pregnant. Each participant underwent a genital examination by a physician. Vaginal specimens were obtained for diagnosis of candidiasis, *Trichomonas vaginalis* infection 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, Germany). Peripheral blood was taken for HIV, syphilis, and *Herpes simplex* (HSV)-2 serologies, HIV-1 viral load, CCR5 genotype and cytokine 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, Netherlands). Non-reactive samples were considered HIV-seronegative while reactive samples were tested with Genie II HIV-1/HIV-2 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 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, Technologic park 6, Gent, Belgium) to resolved the ambiguities. Plasmatic HSV-2 IgG detection was determined with the Captia anti-HSV-2 IgG specific test. (Trinity biotech, Bray Ireland). HIV-1 viral loads were determined in the plasma of all HIV-1 infected CSW using VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown NY, USA). DNA samples were genotyped for the CCR5 32-base pair deletion allele and all women were found to be homozygous for the wild-type allele.

Mucosal sample collection and preparation. CVL samples were obtained from all study participants by a physician using a 10 ml syringe filled with sterile 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 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 5kDa (Millipore, Billerica MA, USA) prior to cytokine measurement.

Cytokine measurement. Cytokine levels were determined in serum and CVL samples using the human TH1/TH2 kit II of the BD Cytometric Bead Array technology (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), which allows simultaneous detection of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ . Analysis was performed on a BD FACSAria apparatus. The final concentration for a given cytokine in the CVL sample was determined as follows: (Concentration obtained with BD Cytometric Bead Array (pg/ml) / (CVL concentration factor) X total CVL volume prior to concentration). The lower detection limit (LDL) for each assay was 2.6 pg/ml for IL-2 and IL-4, 3.0 pg/ml for IL-6, 2.8 pg/ml for IL-10 and TNF- α and 7.1pg/ml for IFN- γ . Sample measurements below the LDL were assigned a value of 0 pg/ml.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the GraphPad PRISM 5.0 for windows (GraphPad Software inc, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA and chi-square 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 chi-square tests, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

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). Julie Lajoie and Marguerite Massinga Loembe hold Student Research awards from the CIHR. Michel Alary and Michel Roger are recipients of Research Scholar awards from the FRSQ. We are indebted to Nassirou Geraldo, Aina Gabin, and Carmelle Assogba for their clinical expertise, to Gérard Ahotin, Laurette Djossou, and Ella Goma for their technical assistance and to Georges Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers. We are grateful to Sylvain Gimmig for invaluable assistance in flow cytometry analysis and helpful discussion.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1) <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/default.asp>
- 2) Cohen J. Did Merk's failed HIV vaccine cause harm? *Science*. **318**, 1048-1049 (2007).
- 3) Cone R.A, [Hoen T.](#), [Wong X.](#), [Abusuwwa R.](#), [Anderson D.J.](#), [Moench T.R.](#) Vaginal microbicides: detecting toxicities in vivo that paradoxically increase pathogen transmission. *BMC Infect. Dis.* **6**, 90-106 (2006).
- 4) Lederman M.M., Offord R.E., Hartley O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 371-382 (2006)
- 5) Cohen B. and Trussell J. Preventing and Mitigating AIDS in Sub-Saharan Africa: Research and data priorities for the social and behavioural sciences. *National Academy press*. p105-154(1996)
- 6) Prohaska T.R, [Albrecht G.](#), [Levy J.A.](#), [Sugrue N.](#), [Kim J.H.](#) Determinants of self-perceived risk for AIDS. *J. Hlth. Soc. Behav.* **31**, 384-394 (1990).
- 7) Ahlburg [D.A.](#), [Jensen E.R.](#), [Perez A.E.](#) Determinants of extramarital sex in the Philippines. *Hlth. Trans. Rev.* **7** supplement, 467-479 (1997)
- 8) McClelland R.S., [Lavreys L.](#), [Hassan W.M.](#), [Mandaliya K.](#), [Ndinya-Achola J.O.](#), [Baeten J.M.](#) Vaginal washing and increased risk of HIV-1 acquisition among African women: a 10 years prospective study. *AIDS*. **20**, 269-73 (2006).
- 9) Lajoie J., Hargrove J., Zijenah L.S, Humphrey J., Ward B.J, 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. *J. Infec. Dis.* **193**, 298-301 (2006).
- 10) Kaslow R.A, Dorak T., Tang J.J. Influence of Host genetic variation on susceptibility to HIV type 1 infection. *J. Infec. Dis.* **191**,S68-S77 (2005).
- 11) Freeman E.E, [Weiss H.A.](#), [Glynn J.R.](#), [Cross P.L.](#), [Whitworth J.A.](#), [Hayes R.J.](#) Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*. **20**, 73-83 (2006).
- 12) Rebbapragada A. *et al.* Negative mucosal synergy between Herpes simplex type 2 and HIV in the female genital tract. *AIDS*, **21**, 589-898 (2007).
- 13) Haynes B.F. Gut microbes out of control in HIV infection. *Nat Med.* **33**, 915-933 (2006).
- 14) Wira [C.R.](#), [Fahey J.V.](#), [Sentman C.L.](#), [Pioli P.A.](#), [Shen L.](#) Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* **206**, 306-335 (2005).

- 15) Sugaya M, [Loré K](#), [Koup RA](#), [Douek DC](#), [Blauvelt A](#). HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *J. Immunol.* **172**, 2219-2224 (2004).
- 16) Fowke K.R *et al.* Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *The Lancet.* **348**, 1347-1351 (1996).
- 17) Fowke K.R *et al.* HIV-1 specific cellular immune responses among HIV-1 resistant sex workers. *Immunol. Cell. Biol.* **78**, 586-895 (2000).
- 18) Kaul R. *et al.* HIV-1 specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1 resistant prostitutes in Nairobi. *J. Immunol.* **164**, 1602-1611 (2000).
- 19) Kaul R. *et al.* HIV-1 specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1 resistant Kenyan sex worker. *AIDS.* **13**, 23-29 (1999).
- 20) Devito C. *et al.* Cross-Clade HIV-1 specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1 exposed persistently seronegative subjects. *JAIDS.* **30**, 413-420 (2002).
- 21) Broliden K. *et al.* Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol. Lett.* **79**, 29-36 (2001).
- 22) Iqbal S.M *et al.* Elevated T cell counts and Rantes expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *J. Infec. Dis.* **192**, 728-738 (2005).
- 23) Kannanganat S. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J. Virol.* **81**, 12071-12075 (2007).
- 24) Sankaran S. *et al.* Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary HIV infection is driven by imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J. Virol.* **82**, 538-545 (2008).
- 25) Abel [K](#), [Rocke D.M](#), [Chohan B](#), [Fritts L](#), [Miller C.J](#). Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **79**, 12164-12172 (2005).
- 26) Musey L, [Hu Y](#), [Eckert L](#), [Christensen M](#), [Karchmer T](#), [McElrath M.J](#). HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women. *J. Exp. Med.* **185**, 293-303 (1997).
- 27) Kaul R. *et al.* The genital tract immune milieu: An important determinant of HIV-1 susceptibility and secondary transmission. *J. Reprod. Immunol.* **77**:32-40 (2008)
- 28) Brenchley [J.M](#), [Price D.A](#), [Douek D.C](#). HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?. *Nat. immunol.* **7**, 235-239 (2006).
- 29) Brenchley JM and Douek DC. HIV infection and gastrointestinal immune system. *Mucosal. immunol.* **1**: 23-30 (2008)

- 30) Cohen C.R. *et al.* Increased interleukin-10 in the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission?. *AIDS*. **13**, 327-332 (1999).
- 31) Yasodhara [P](#), [Raghunath M](#), [Sreeramulu D](#), [Venu L](#), [Hemalatha R](#), [Krishna T.P](#). Local immunity in Indian women with bacterial vaginosis. *J. Reprod. Immunol.* **70**, 133-141 (2006).
- 32) Boulton I.C. and Gray-Owen S.D. Neisserial binding to CEACAM-1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol.* **3**, 229-236 (2002).
- 33) Fichorova [R.N](#), [Desai P.J](#), [Gibson F.C 3rd](#), [Genco C.A](#). Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* **69**, 5840-5848 (2001).

FIGURE LEGEND

FIGURE 1. DISTRIBUTION OF IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α AND IFN- γ CVL LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.

CVL cytokines levels were quantified by BD Cytometric Bead Array and normalized to a standard curve. The lower detection limit for each assay was 2.6 pg/ml for IL-2, 3.0 pg/ml for IL-6, 2.8 pg/ml for IL-10 and TNF- α and 7.1pg/ml for IFN- γ . Sample measurements below the LDL were assigned a value of 0. Values are expressed in pg/ml. Due to the high number of samples below the assay LDL, cytokine levels were dichotomized as detectable and undetectable in all analyses. Comparisons of the cytokines detection rates (% of women producing cytokine levels above the LDL) between two studies groups were examined with the chi-square test. Significant (or near significance) differences in the cytokine detection rates between two groups are shown. Differences that were not statistically significant are not illustrated.

FIGURE 2. DISTRIBUTION OF IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α AND IFN- γ SERUM LEVELS ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.

Serum cytokines levels were quantified by BD Cytometric Bead Array and normalized to a standard curve. The lower detection limit for each assay was 2.6 pg/ml for IL-2 and IL-4, 3.0 pg/ml for IL-6, 2.8 pg/ml for IL-10 and TNF- α and 7.1pg/ml for IFN- γ . Sample measurements below the LDL were assigned a value of 0. Values are expressed in pg/ml. Due to the high number of samples below the assay LDL, cytokine levels were dichotomized as detectable and undetectable in all analyses. Comparisons of the cytokines detection rates (% of women producing cytokine levels above the LDL) between two studies groups were examined with the chi-square test. Significant (or near significance) differences in the cytokine detection rates between two groups are shown. Differences that were not statistically significant are not illustrated.

Table 1. Distribution of demographic, sexual behaviour and genital tract infection characteristics in HIV-1-uninfected and HIV-1-infected commercial sex workers (CSW), and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSW N = 57	HIV-1-infected CSW N = 52	HIV-1-uninfected non-CSW controls N = 73	p value ^a
Age, mean (SD), years	34.3 (12)	33.5 (10.1)	32.4 (9.4)	NS
Duration of sex work, mean (SD), years	4.2 (3.1)	3.8 (2.6)	NA	NS
Number of clients last week, mean (SD)	17.1 (13.7)	12.0 (11.0)	NA	NS
Days since last menses, mean (SD)	14.5 (8.2)	18.5 (15.5)	20.7 (10.3)	NS
Regular partner	32/55 (58.2%)	31/52 (59.6%)	59/72 (81.9%) ^b	0.005
Vaginal douching	48/51 (94.1%)	42/42 (100%)	63/68 (92.6%)	NS
Condom always used with clients	47/55 (85.5%)	37/47 (78.7%)	NA	NS
Vaginosis	21/49 (42.9%)	24/46 (52.2%)	22/73 (30.1%)	NS
Candidiasis	5/49 (10.2%)	6/46 (13.0%)	14/73 (19.2%)	NS
NG and /or CT infection	7/51 (13.7%)	5/43 (11.6%)	2/73 (2.7%)	NS
HSV-2 positive serology	38/47 (80.9%)	42/44 (95.5%)	34/61 (55.7%) ^c	< 0.0001

All risk factors data were collected via a questionnaire administered before samples were collected. Gynaecological exams and biological sampling were performed by a physician without knowledge of HIV status of the women to avoid potential bias. N: number of participants; NA: non applicable; NS: non significance; NG/CT: *Neisseria gonorrhoeae/ Chlamydia trachomatis*; HSV-2: *Herpes simplex 2*.

^a P-values for the comparison across all groups were calculated with: one-way ANOVA for the age, days since last menses; Mann-Whitney U test for the duration of sex work and average number of clients; Chi-square test for regular partner, vaginal douching, condom use, vaginosis , candidiasis, NG/CT, HSV-2.

^b P = 0.005 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.008 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSW and HIV-1-infected CSW .

^c P = 0.008 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.001 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSW and HIV-1-infected CSW.

Table 2. Cytokine levels in cervicovaginal lavage samples from HIV-1-uninfected and HIV-1-infected commercial sex workers (CSW), and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSW N=57	HIV-1-infected CSW N=52	HIV-1-uninfected non-CSW controls N=73	p value ^a
IL-2	0.2 (1.4)	0.7 (2.6)	0.3 (1.4)	NS
IL-4	0.0	0.0	0.0	NS
IL-6	135.2 (571.0)	83.8 (148.6)	151.8 (371.4)	NS
IL-10	1.31 (3.6)	3.0 (1.8)	7.5 (36.4)	NS
TNF- α	6.31 (14.0)	17.7 (39.3) ^b	9.6 (23.4)	0.015
IFN- γ	3.95 (14.2)	24.0 (106.3) ^c	7.7 (26.2)	0.008

Data are mean (SD) pg/ml.

N: number of participants; NS: no significance.

^a P-values for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA test.

^b P = 0.006 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.02 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

^c P = 0.031 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.006 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

The lower detection limit for each assay was 2.6 pg/ml for IL-2 and IL-4, 3.0 pg/ml for IL-6, 2.8 pg/ml for IL-10 and TNF- α and 7.1pg/ml for IFN- γ .

Table 3. Cytokine levels in serum from HIV-1-uninfected and HIV-1-infected commercial sex workers (CSW), and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSW N=51	HIV-1-infected CSW N=51	HIV-1-uninfected non-CSW controls N=68	p value ^a
IL-2	5.7 (19.3)	0.9 (2.5) ^b	2.9 (5.1)	0.020
IL-4	1.8 (4.2) ^c	0.5 (1.1)	0.5 (1.8)	0.002
IL-6	4.1 (9.4)	2.9 (3.7)	2.2 (4.2)	NS
IL-10	5.5 (11.4)	2.4 (5.5) ^d	3.7 (4.7)	0.050
TNF- α	3.2 (9.2)	0.5 (1.5) ^e	1.7 (2.7)	0.021
IFN- γ	0.6 (4.6)	1.7 (8.7)	0.5 (2.2)	NS

Data are mean (SD) pg/ml.

N: number of participants; NS: no significance.

^a P-values for the comparison across all groups were calculated with one-way ANOVA test.

^b P = 0.010 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.012 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

^c P = 0.016 for the comparison between HIV-1-uninfected CSW and HIV-1-infected CSW, and p = 0.002 for the comparison between HIV-1-uninfected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

^d P = 0.028 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.028 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

^e P = 0.019 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected CSW, and p = 0.007 for the comparison between HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW as determined by Mann-Whitney U test.

The lower detection limit for each assay was 2.6 pg/ml for IL-2 and IL-4, 3.0 pg/ml for IL-6, 2.8 pg/ml for IL-10 and TNF- α and 7.1pg/ml for IFN- γ .

Figure 1 (CVL)

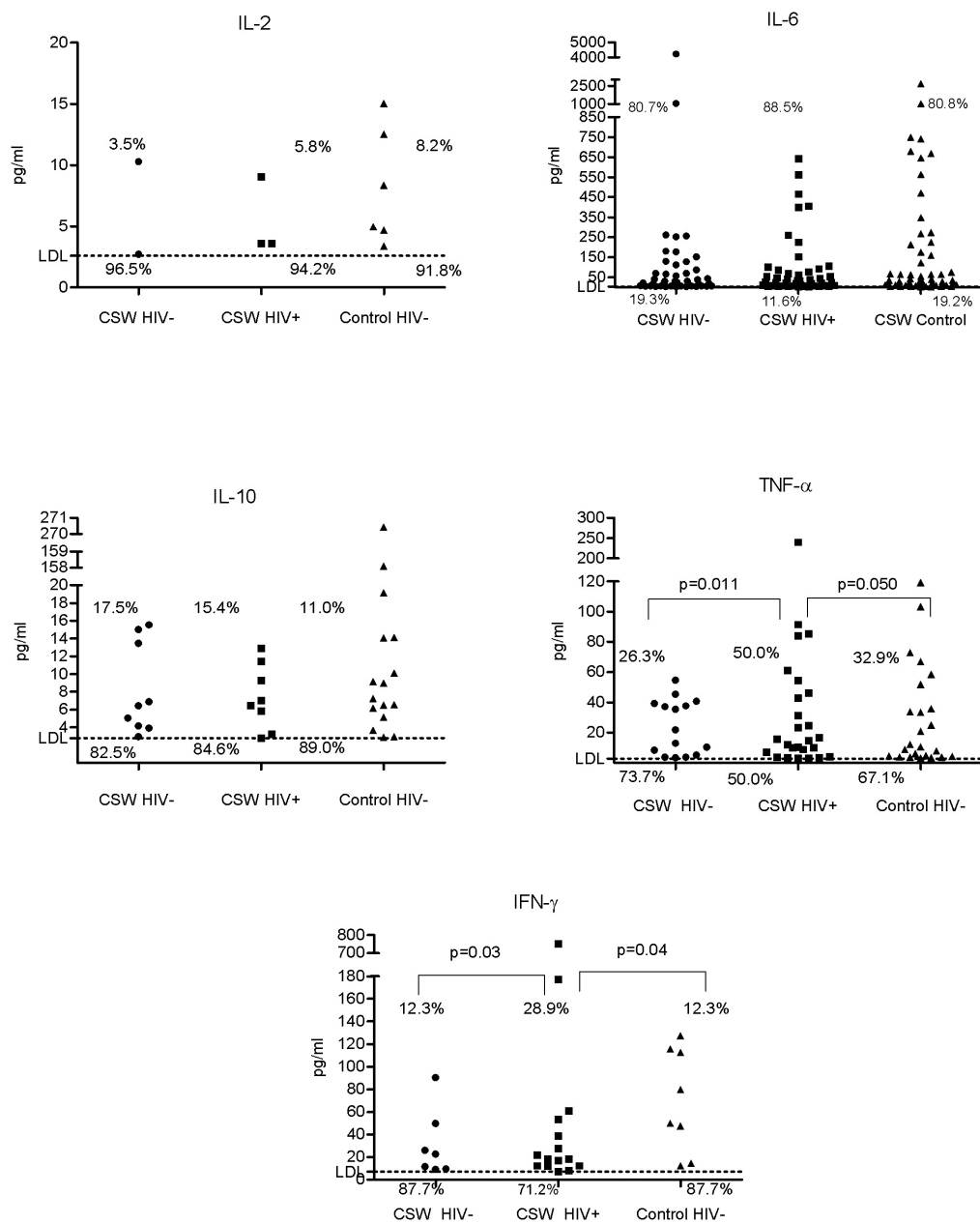
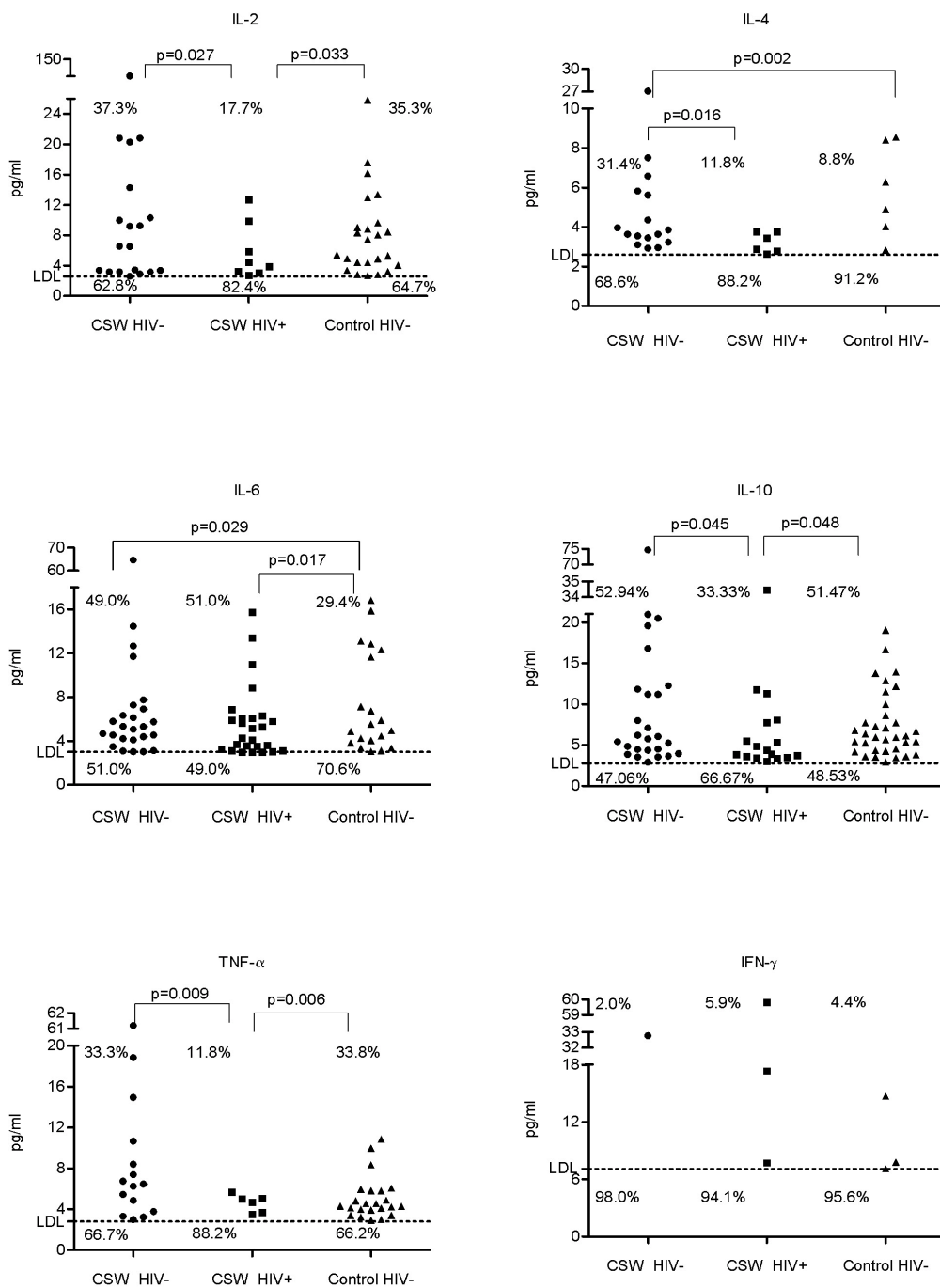


Figure 2 (sérum)



Article 4 :**Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with altered risks of HIV-1 infection**

Julie Lajoie, Johanne Poudrier, Marguerite Massinga-Loembe, Fernand Guédou, François Leblond, Annie-Claude Labbé, Michel Alary and Michel Roger

Article accepté : Journal clinical immunology 2009**Contribution des co-auteurs :**

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études menant à la publication de cet article. Julie Lajoie a participé à l'élaboration du devis de l'étude, a effectué les analyses génétiques et d'expression de la protéine sur les spécimens, ainsi que les analyses statistiques. Marguerite Massinga Loembe a coordonné et supervisé l'ensemble des activités au Bénin (recrutement, prélèvements, saisie de données, assurance de la qualité) et a procédé à la préparation des échantillons. Johanne Poudrier a participé à l'élaboration du devis de l'étude et est un co-investigateur de l'étude. . François Leblond a aidé à la mise en place du recrutement de la population générale et a agi comme expert-conseil pour l'infrastructure et l'équipement du laboratoire à Cotonou. Fernand Guédou, Michel Alary et Annie-Claude Labbé sont des co-investigateurs de l'étude. Annie-Claude Labbé et Michel Alary ont participé au devis de l'étude. Michel Roger est l'investigateur principal du projet. L'article fût rédigé par Julie Lajoie et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

CHEMOKINE EXPRESSION PATTERNS IN THE SYSTEMIC AND GENITAL TRACT COMPARTMENTS ARE ASSOCIATED WITH HIV-1 INFECTION IN WOMEN

Julie LAJOIE^{1,2}, Johanne POUDRIER^{1,2}, Marguerite MASSINGA LOEMBE^{3,4}, Fernand GUÉDOU⁴, François LEBLOND⁵, Annie-Claude LABBÉ^{2,5}, Michel ALARY⁴ and Michel ROGER^{1,2,*}

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

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

³ Laboratory of immunology, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

⁴ Unité de Recherche en Santé des Populations, Centre hospitalier *affilié* universitaire de Québec and Université Laval, Québec, Canada.

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

Running head: Chemokine levels correlate with HIV

Word count in the text: 2805

Word count in the abstract: 251

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

Sponsorship: 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). Julie Lajoie and Marguerite Massinga Loembe hold Student Research awards from the CIHR. Marguerite Massinga Loembe additionally held a fellowship from the AUF (Agence Universitaire de la Francophonie). Michel Alary and Michel Roger are recipients of Research Scholar awards from the FRSQ.

ABSTRACT

Objectives: The aims of this study was to characterize the chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of African women and to determine whether they were associated with HIV-1 infection.

Design: Levels of both genital mucosal and blood chemokines were compared between 58 HIV-1-uninfected and 50 HIV-1-infected female commercial sex workers (CSWs) as well as 53 HIV-1-uninfected non-CSW control women at low risk for exposure, recruited in Cotonou, Benin.

Methods: Interferon-inducible protein (IP)-10, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-3, monokine induced by gamma interferon (MIG), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , and regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) levels were measured in serum and cervicovaginal lavages using the commercial Bio-Plex cytokine/chemokine assay and analysed with a Luminex system.

Results: HIV-1-infected CSWs had significantly higher blood and genital levels of IP-10, MCP-3 and MIG compared with those in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups. In the HIV-1-infected group, levels of IP-10, MCP-3 and MIG were significantly higher in the genital mucosa than in the blood. However, blood levels of MIP-1 α and MIP-1 β were higher in HIV-1-uninfected CSWs compared with those in the other groups.

Conclusions: Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments contribute differently to susceptibility to HIV-1 infection in women. Increased production of chemokines in the genital tract may favour the recruitment of HIV-1 target cells causing a mucosal environment that promotes viral replication and dissemination, whereas higher expression of β -chemokines at the systemic level is associated with protection from HIV-1 infection.

Key words: Africa; chemokine; female genital tract; HIV; immunity mucosal and systemic.

INTRODUCTION

HIV vaccines and microbicides hold promise for preventing the acquisition of HIV-1 infection [1,2] but the success of designing such agents needs 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.

Chemokines are known to function as regulatory molecules in leukocyte maturation, trafficking and recruiting to sites of inflammation [5]. Besides these functions in the immune system certain chemokines and their receptors are involved in HIV-1 pathogenesis. The β -chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) are natural ligands for the HIV-1 co-receptor CCR5. The antiviral activity of these molecules is exerted by competition with HIV-1 for receptor binding capacity and the attraction of immune cells. Recent studies have shown that high copy numbers of CCL3L1 and CCL4L1 genes (encoding MIP-1 α and MIP-1 β , respectively) are associated with higher chemokine production and lower risk of HIV-1 infection [6,7]. Genital RANTES levels were increased in HIV-1-exposed persistently seronegative women [8,9]. On the other hand chemokines may have an opposite effect by promoting inflammation including up-regulating of HIV-1 receptors thereby recruiting more target cells for HIV-1 replication. Indeed, elevated genital levels of RANTES have been correlated with increased numbers of HIV-1-susceptible cells in the cervical mucosa [10]. Elevated serum levels of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 has been positively correlated with the plasma viral load by driving recruitment of target cells [11]. HIV-1-infected individuals had higher levels of plasma interferon (IFN)-inducible protein (IP)-10 and monokine induced by IFN- γ (MIG) compared with those in HIV-1-uninfected subjects [12].

We have recently shown that HIV-1-infected female commercial sex workers (CSWs) had significantly higher levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and IFN- γ in cervicovaginal lavage (CVL) samples compared with those in both HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW control women [13]. Moreover, increased levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and TNF- α in the female genital tract have been associated with enhanced HIV-1 shedding at this site [14]. Importantly, these observations were not reflected at the systemic level [13,14] suggesting that the mucosal inflammation observed in HIV-1-infected women is associated with recruitment, differentiation and

activation of immune cells, which act as targets favouring viral replication and viral dissemination at the initial site of exposure.

In order to characterize the factors involved in the modulation of the inflammatory response associated with HIV-1 susceptibility, we have measured and compared the expression levels of chemokines in the CVL samples and serum of HIV-1-infected CSWs, HIV-1-uninfected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects at low risk for HIV exposure. We report that in HIV-1-infected CSWs, levels of IP-10, MCP-3 and MIG were significantly higher in the genital mucosa than in the blood, suggesting a chemotactic gradient favouring the recruitment of immune cells contributing to the mucosal inflammatory response observed in these women. However, the blood levels of MIP-1 α and MIP-1 β were higher in HIV-1-uninfected CSWs compared with those in the other groups demonstrating that the expression of these β -chemokines at the systemic level is associated with protection from HIV-1 infection.

METHODS

Study populations. Female CSWs were enrolled through a dedicated sex worker clinic in Cotonou, Benin and were divided into two groups: HIV-1-uninfected CSWs (n = 58) and HIV-1-infected CSWs (n = 50). The HIV-1-uninfected non-CSW control subjects at low risk for exposure (n = 53) were enrolled from a general health clinic in Cotonou. This study was approved by the Ministère de la Santé du Bénin and by the CHUM human research ethics board. 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. All subjects provided written informed consent. 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, *Trichomonas vaginalis* infection 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, syphilis, and *Herpes simplex* (HSV)-2 serologies and for HIV-1 viral load, CCR5 genotype and cytokine 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). Plasmatic HSV-2 IgG detection was determined with the Captia anti-HSV-2 IgG specific test (Trinity Biotech, Bray, Ireland). HIV-1 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 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 3 kDa (Millipore, Billerica MA) prior to chemokine measurement.

Chemokine measurement. Chemokine levels were determined in serum and CVL samples using the Bio-Plex cytokine/chemokine assay kit I and II (Bio-Rad), which allows simultaneous detection of IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES. Analysis was performed on a Luminex® 200 System (Luminex corporation, Austin, TX). The final concentration for a given chemokine in the CVL sample was determined as follow: concentration obtained with the Luminex analyser (pg ml^{-1})/(CVL concentration factor) x total CVL volume prior to concentration. The lower detection limit (LDL) for each assay was determined as the last point on the standard curve, 2.7 pg ml^{-1} for IP-10, 1.7 pg ml^{-1} for MCP-1, 1.5 pg ml^{-1} for MCP-3 and RANTES, 0.5 pg ml^{-1} for MIG, 1 pg ml^{-1} for MIP-1 α and MIP-1 β . Sample below the LDL was assigned a value of 0 pg ml^{-1} .

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 chi-square 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 chi-square tests, respectively. Spearman's rank test was used to determine correlations between continuous variables.

RESULTS

Demographic, sexual behaviour, and genital infection characteristics of the study groups

These data were collected to address the issue of confounding variables for risk of HIV-1 infection and mucosal immune responses. The three groups were similar with respect to age, days from last menses, vaginal douching and the presence of vaginosis and candidiasis as determined by microscopic examination of vaginal specimens (Table 1). The HIV-1-uninfected non-CSW control subjects were more likely to have a regular partner ($P = 0.04$) and less likely to be positive for *C. trachomatis* and/or *N. gonorrhoeae* by strand displacement assay on endocervical swabs ($P = 0.03$) and to be HSV-2 seropositive ($P < 0.0001$) than the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected CSW women. Duration of sex work, average numbers of clients during the past week and condom use were equivalent between the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected CSW groups.

Chemokine expression patterns in the cervicovaginal lavage samples

HIV-1-infected CSWs had higher levels of MCP-3 and MIG than did the HIV-1-uninfected CSWs ($P = 0.023$, $P < 0.0001$, respectively) and the HIV-1-uninfected non-CSW control women ($P = 0.0004$, $P < 0.0001$, respectively) (Table 2). The level of MCP-1 was significantly different between the HIV-1-infected CSW and HIV-1-uninfected non-CSW groups ($P = 0.004$), with higher levels observed in HIV-1-infected CSWs. The percentage of women producing significant amounts of MCP-1 and MCP-3 (concentration above the LDL) was significantly higher in the HIV-1-infected CSW group compared with that in HIV-1-uninfected non-CSW group (Figure 1). Interestingly, MIP-1 α expression level was higher in HIV-1-uninfected CSWs compared with that in both HIV-1-infected CSWs ($P = 0.016$) and HIV-1-uninfected non-CSW women ($P = 0.001$). The expression level and detection rate of MIP-1 β and RANTES were significantly different between the CSW and the non-CSW groups. HIV-1-uninfected non-CSW subjects had lower levels of MIP-1 β and RANTES than did the HIV-1-infected ($P = 0.009$, $P = 0.004$, respectively) and the HIV-1-uninfected ($p=0.043$, $P=0.021$, respectively) CSW groups. Accordingly, MIP-1 β and RANTES detection rates were lower in the non-CSW group compared with that in both CSW groups (Figure 1). There was no significant correlation between the CVL chemokine expression patterns and the presence of *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* genital infections or HSV-2 seropositivity either within groups or among all patients. There was no correlation between the HIV-1 viral load and the levels of chemokines in the CVL samples of the HIV-1-infected CSWs.

Chemokine expression patterns in serum

Based on our previous findings showing important differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of these women [13], we also examined the pattern of chemokine expression in the serum of all participants. HIV-1-infected CSWs had higher levels of IP-10, MCP-3 and MIG than did the HIV-1-uninfected CSWs ($P < 0.0001$, $P = 0.02$, $P < 0.0001$, respectively) and the HIV-1-uninfected non-CSW control women ($P < 0.0001$, $P = 0.002$, $P < 0.0001$, respectively) (Table 3). In addition, the percentage of women with detectable level of MCP-3 was significantly higher in the HIV-1-infected CSW group compared with that in both the HIV-1-uninfected CSW and non-CSW groups (Figure 2). Interestingly, MIP-1 α and MIP-1 β levels were higher in HIV-1-uninfected CSWs compared with those in both HIV-1 infected CSWs ($P = 0.01$, $P = 0.03$, respectively) and HIV-1-uninfected non-CSW controls ($P = 0.0002$, $P = 0.002$, respectively). HIV-1-uninfected CSWs had higher level of MCP-1 than did HIV-1-infected CSWs ($P = 0.01$). The detection rate of MIP-1 α was significantly higher in CSWs compared to controls, whereas those of MCP-1 and MIP-1 β were similar among all groups. Although RANTES level was lower in HIV-1-uninfected CSWs compared with those in the other groups, the detection rate was similar among all groups. There was no correlation between the HIV-1 viral load and the levels of chemokines in the serum of the HIV-1-infected CSWs.

The chemokine expression levels differed considerably between the blood and genital tract compartments of all participants. Levels of IP-10, MCP-3 and MIG were significantly higher in the mucosal than in the blood samples ($P = 0.05$, $P = 0.002$, $P = 0.0004$, respectively). Inversely, levels of MIP-1 α and MIP-1 β were significantly higher in the blood than in the genital mucosa ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, respectively). The differences in the level of chemokine expression between the blood and the female genital tract compartments allowed us to identify a chemotactic gradient associated with HIV-1 infection (Supplemental digital content Figure 1).

DISCUSSION

Understanding the mucosal immunology and its link to the systemic immune system is pivotal for the design of strategies for blocking HIV-1 at ports of entry and preventing its dissemination. The present study shows that the pattern of chemokine expression in the genital mucosa displays characteristic features that are distinct from those of the systemic immune compartment and is associated with HIV-1 infection.

HIV-1-infected CSWs had significantly higher blood and genital levels of IP-10, MCP-3 and MIG compared with those in both the HIV-uninfected CSW and non-CSW groups. Importantly the levels of these chemokines were significantly higher in the genital mucosa than in the blood. These results are consistent with our previous findings showing that the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IFN- γ is increased in the genital but not in the systemic compartment of HIV-1-infected CSWs [13] and suggest a chemotactic gradient favouring the recruitment of immune cells in the genital mucosa contributing to the local inflammation observed in these women. The mucosal inflammation may favour disease progression/perpetuation by recruiting more HIV-1 target cells and causing a mucosal environment that promotes viral replication and viral dissemination beyond the initial site of infection [15,16]. Accordingly, a recent study has shown that increased genital level of RANTES correlates with an increase in the number of HIV-1 susceptible target cells such as CD4⁺ T and immature dendritic cells in the cervical mucosa [10]. Previous studies demonstrating the association between elevated genital RANTES level and HIV-1 resistance [8,9] did not control for potential confounding factors that may result from high-risk sexual practices themselves, rather than representing a mechanism of immune protection from HIV-1 acquisition. Indeed, we found that both the HIV-1-uninfected and HIV-1-infected CSWs had higher genital levels of MIP-1 β and RANTES than did the non-CSW controls suggesting that their production might be related to the practice of sex work. The CSWs were more likely to have multiple partners, genital co-infections such as *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and to be HSV-2 seropositive than did the non-CSW controls (Table 1). Exposure to semen can elicit the expression of cytokines and chemokines in the female genital tract [17]. Given that CSWs have multiple partners and are presumably exposed to a broader spectrum of semen than are non-CSW women, this could potentially contribute to the relatively higher level of chemokines observed in the genital mucosa of CSWs. Genital co-infections can also induce the production of a wide range of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the genital tract and have been shown to increase the risk of HIV-1 acquisition [18-22]. However, we found no correlation between the presence of genital co-infections and the risk of HIV-1 infection or the chemokine and cytokine [13]

expression patterns. We cannot exclude the possibility that other genital infections such as chancroid, donovanosis and human papillomavirus could have influenced the risk of infection or the production of chemokines and cytokines. Although we did not test specifically for these infections, none of the participants had evidence of characteristic genital chancres, ulcers and/or condylomas associated with these illnesses (data not shown).

The fact that some individuals remain persistently seronegative despite high exposure to the virus such as the HIV-1-uninfected CSWs presented herein, implies that there are host factors that are highly protective. Until now HIV-1 resistance has been attributed mainly to the production of genital HIV-1-specific cytotoxic T cells and neutralizing IgA [23-25]. Here we showed that HIV-1-uninfected CSWs had significantly higher levels of MIP-1 α in the genital mucosa than did both the HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSW women. Moreover, the serum levels of MIP-1 α and MIP-1 β were higher in HIV-1-uninfected CSWs compared with those observed in the other groups. These results are in agreement with recent reports demonstrating high copy numbers of CCL3L1 and CCL4L1 genes (encoding MIP-1 α and MIP-1 β , respectively) were associated with higher serum level of β -chemokines and lower risk of HIV-1 infection [6,7]. Moreover, it has been shown that *in vitro* stimulated PBMCs from HIV-1-exposed uninfected individuals produced higher level of β -chemokines compared with those from HIV-1-infected individuals [26]. Taken together, these results suggest that natural resistance to HIV-1 could be partly due to a greater capacity to develop a stronger immune response, involving the early release of β -chemokines. Indeed, the production of MIP-1 α and MIP-1 β affects the outcome of Th1 and Th2 mediated responses and enhances the development of both humoral as well as cellular mucosal and systemic immunity [27,28].

The levels of MIP-1 α and MIP-1 β were significantly lower in the genital mucosa than in the blood suggesting that the main site of production of the β -chemokines associated with HIV-1 resistance is not in the cervix or the vagina. Although the mechanism of protection remains unclear, the relatively low level of MIP-1 α and MIP-1 β in the genital mucosa might reduced the number of CCR5⁺ targets cells available for HIV-1 at the initial site exposure. On the other hand the elevated level of MIP-1 α , MIP-1 β observed in the serum of the HIV-1-uninfected CSWs might reflect immune activity upstream the female lower genital tract to contain viral dissemination beyond the cervico-vaginal barrier. This highlights the importance of enhancing our knowledge of the mucosal

immunity at the portal of entry of the virus and its link to systemic immunity in order to develop preventive strategies such as microbicides and vaccines.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Nassirou Geraldo, Aina Gabin, Carmelle Assogba and Clémence Agossa-Gbenafa for their clinical expertise, to Gérard Ahotin, Laurette Djossou, and Ella Goma for their technical assistance and to Georges Batona and other field workers who helped with recruitment of commercial sex workers.

AUTHORS' CONTRIBUTION

M. Roger is the lead investigator of this study and with J. Lajoie and J. Poudrier designed the experiments, performed the analysis and wrote the manuscript. J. Lajoie performed the experiments. M. Massinga Loembe, A-C Labbé, F. Guédou and M. Alary were responsible for the participants' recruitment and provided clinical and laboratory data. M. Massinga Loembe and F Leblond were responsible for the sample processing and data collection. All authors edited and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

1. Haynes BF, Shattock RJ. Critical issues in mucosal immunity for HIV-1 vaccine development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; **122**:3-9.
2. Padian NS, van der Straten A, Ramjee G, Chipato T, de Bruyn G, Blanchard K et al. Diaphragm and lubricant gel for prevention of HIV acquisition in southern African women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; **370**:251-261.
3. Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol.* 2006; **27**: 274-281.
4.
<http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007default.asp>
5. Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2003; **3**:467-473.
6. Colobran R, Adreani P, Ashhab Y, Llano A, Esté JA, Dominguez O et al. Multiple products derived from two CCL4 loci: high incidence of a new polymorphism in HIV positive patients. *J. Immunol.* 2005; **174**: 5655-5664.
7. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 2005; **307**:1434-1440.
8. Iqbal SM, Ball TB, Kimani J, Thottingal P, Embree JE, Fowke KR et al. Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *J. Infect. Dis.* 2005; **192**:728-738.
9. Hirbod T, Nilsson J, Andersson S, Uberti-Foppa C, Ferrari D, Maghi M et al. Upregulation of interferon- α and RANTES in the cervix of HIV-1 seronegative women with high-risk behavior. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2006; **43**:137-143.
10. Kaul R, Rebbapragada A, Hirbod T, Wachihhi 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**:2049-2051.
11. Campbell GR, Spector SA. CCL2 Increases X4-tropic HIV-1 Entry into Resting CD4+ T Cells. *J. Biol. Chem.* 2008; **283**:30745-30753.

12. Brainard DM, Tager AM, Misdraji J, Frahm N, Lichterfeld M, Draeneret R *et al.* Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction. *J. Virol.* 2007; **81**: 8439-8450.
13. Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, Guédou F, Agossa-Gbenafa C, Labbé AC *et al.* Differences in immunoregulatory cytokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments of HIV-1 infected commercial sex workers in Benin. *Mucosal Immunol.* 2008; **1**:309-316.
14. Gumbi PP, Nkwanyana NN, Bere A, Burgers WA, Gray CM, Williamson AC *et al.* Impact of inflammation on cervical human immunodeficiency virus (HIV-1)-specific DC8 T-cell responses in the female genital tract during chronic HIV infection. *J. Virol.* 2008; **82**:8529-8536.
15. Wira [CR](#), [Fahey JV](#), [Sentman CL](#), [Pioli PA](#), [Shen L](#). Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* 2005; **206**:306-335.
16. Sugaya M, [Loré K](#), [Koup RA](#), [Douek DC](#), [Blauvelt A](#). HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *J. Immunol.* 2004; **172**: 2219-2224.
17. Sharkey DJ, Macpherson AM., Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2007; **13**:491-501.
18. Cohen CR, Plummer FA, Mugo N, Maclean L, Shen C, Bukosi EA *et al.* Increased interleukin-10 in the the endocervical secretions of women with non-ulcerative sexually transmitted diseases: a mechanism for enhanced HIV-1 transmission? *AIDS* 1999; **13**:327-332.
19. Boulton IC, Gray-Owen SD. Neisserial binding to CEACAM-1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2002; **3**:229-236.
20. Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, Genco CA. Distinct proinflammatory host responses to Neisseria gonorrhoeae infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2001; **69**:5840-5848.

21. Freeman EE, [Weiss HA](#), [Glynn J.R](#), [Cross PL](#), [Whitworth JA](#), [Hayes RJ](#). Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS*. 2006; **20**:73-83.
22. Rebbapragada A, Wachihi C, Pettengell C, Sunderji S, Huibner S, Jaoko W *et al*. Negative mucosal synergy between Herpes simplex type 2 and HIV in the female genital tract. *AIDS* 2007; **21**:589-598.
23. Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, Rostron T *et al*. HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Immunol*. 2000; **164**:1602-1611.
24. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwanji FM *et al*. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; **13**:23-29.
25. Devito C, Hinkula J, Kaul R, Kimani J, Kiama P, Lopalco L *et al*. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr*. 2002; **30**:413-420.
26. Suresh P, Wanchu A., Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Spontaneous and antigen-induced chemokine production in exposed but uninfected partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2007; **23**:261-268.
27. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1993; **177**:1821-1826.
28. Lillard J.W. Singh UP, Boyaka PN, Singh S, Taub DD, McGhee JR.. MIP-1 alpha and MIP-1 beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. *Blood* 2003; **101**:807-814.

FIGURE LEGEND

FIGURE 1. DISTRIBUTION OF IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1a, MIP-1b AND RANTES CVL LEVELS

ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.

CVL chemokines levels were quantified by Bio-Plex cytokine/chemokine assay (Bio-Rad) and normalized to a standard curve. The LDL for each assay was determined as the last point on the standard curve, 2.7 pg ml⁻¹ for IP-10, 1.7 pg ml⁻¹ for MCP-1, 1.5 pg ml⁻¹ for MCP-3 and RANTES, 0.5 pg ml⁻¹ for MIG, 1 pg ml⁻¹ for MIP-1 α and MIP-1 β . Sample measurements below the LDL were assigned a value of 0. Values are expressed in pg ml⁻¹. Owing to the high number of samples below the assay LDL, chemokine levels were dichotomized as detectable and undetectable in all analyses. Comparisons of the chemokine detection rates (% of women producing chemokine levels above the LDL) between two studies groups were examined with the chi-square test. Significance levels are shown as * (P<0.05) and ** (P<0.001). Differences that were not statistically significant are not illustrated. IP, Interferon-inducible protein; LDL, lower detection limit; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

FIGURE 2. DISTRIBUTION OF IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1a, MIP-1b AND RANTES SERUM LEVELS

ACCORDING TO THE STUDY GROUPS.

Serum chemokines levels were quantified by Bio-Plex cytokine/chemokine assay (Bio-Rad) and normalized to a standard curve. The LDL for each assay was determined as the last point on the standard curve, 2.7 pg ml⁻¹ for IP-10, 1.7 pg ml⁻¹ for MCP-1, 1.5 pg ml⁻¹ for MCP-3 and RANTES, 0.5 pg ml⁻¹ for MIG, 1 pg ml⁻¹ for MIP-1 α and MIP-1 β . Sample measurements below the LDL were assigned a value of 0. Values are expressed in pg ml⁻¹. Owing to the high number of samples below the assay LDL, chemokine levels were dichotomized as detectable and undetectable in all analyses. Comparisons of the chemokine detection rates (% of women producing chemokine levels above the LDL) between two studies groups were examined with the chi-square test. Significance levels are shown as * (P<0.05) and ** (P<0.001). Differences that were not statistically significant are not illustrated. IP, Interferon-inducible protein; LDL, lower detection limit; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

SUPPLEMENTAL DIGITAL CONTENT LEGEND

FIGURE 1. CHEMOTACTIC GRADIENT BETWEEN THE BLOOD AND FEMALE GENITAL TRACT COMPARTMENTS
ACCORDING TO THE HIV STATUS.

IP, Interferon-inducible protein; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein.

Figure 1

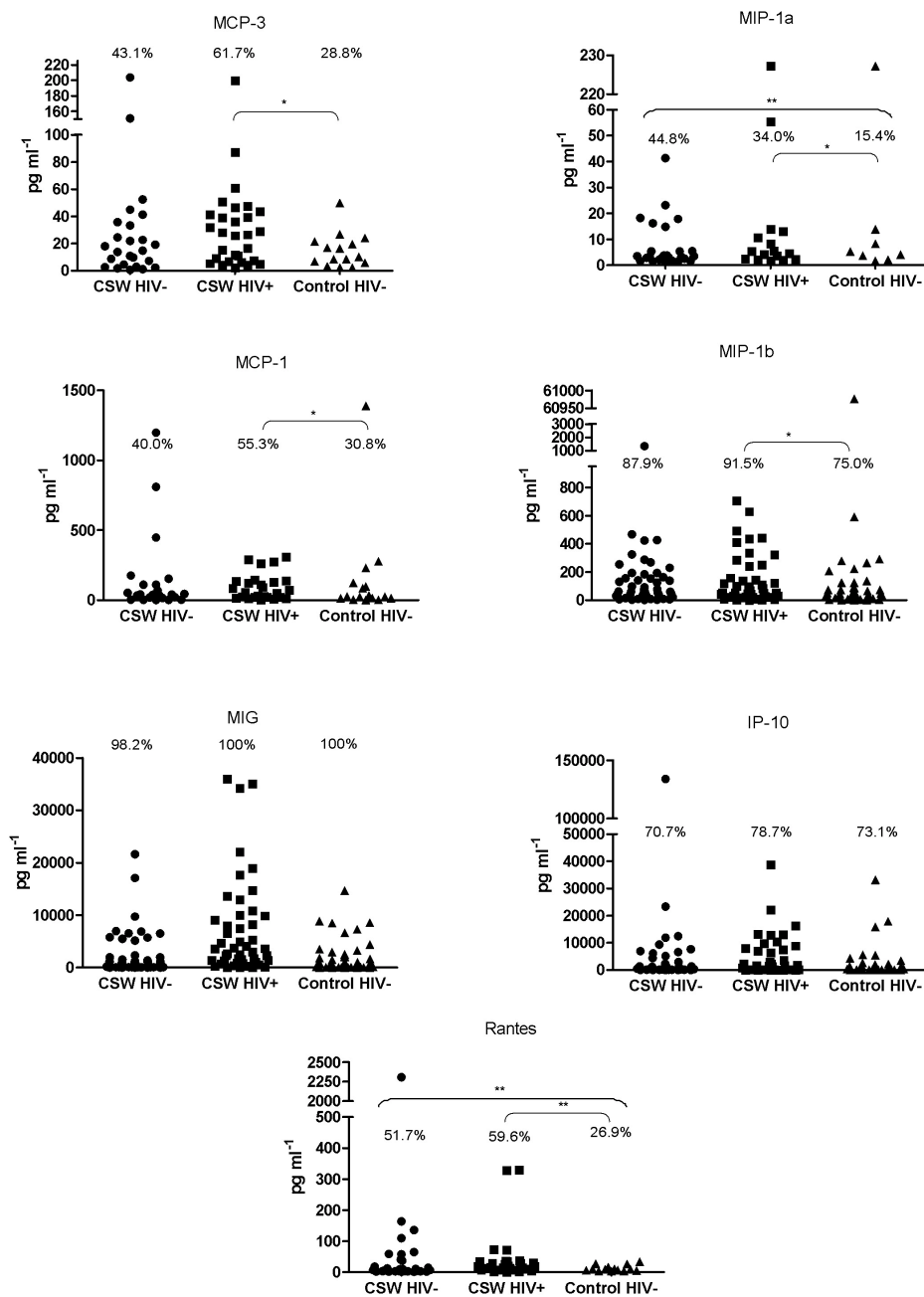


Figure 2

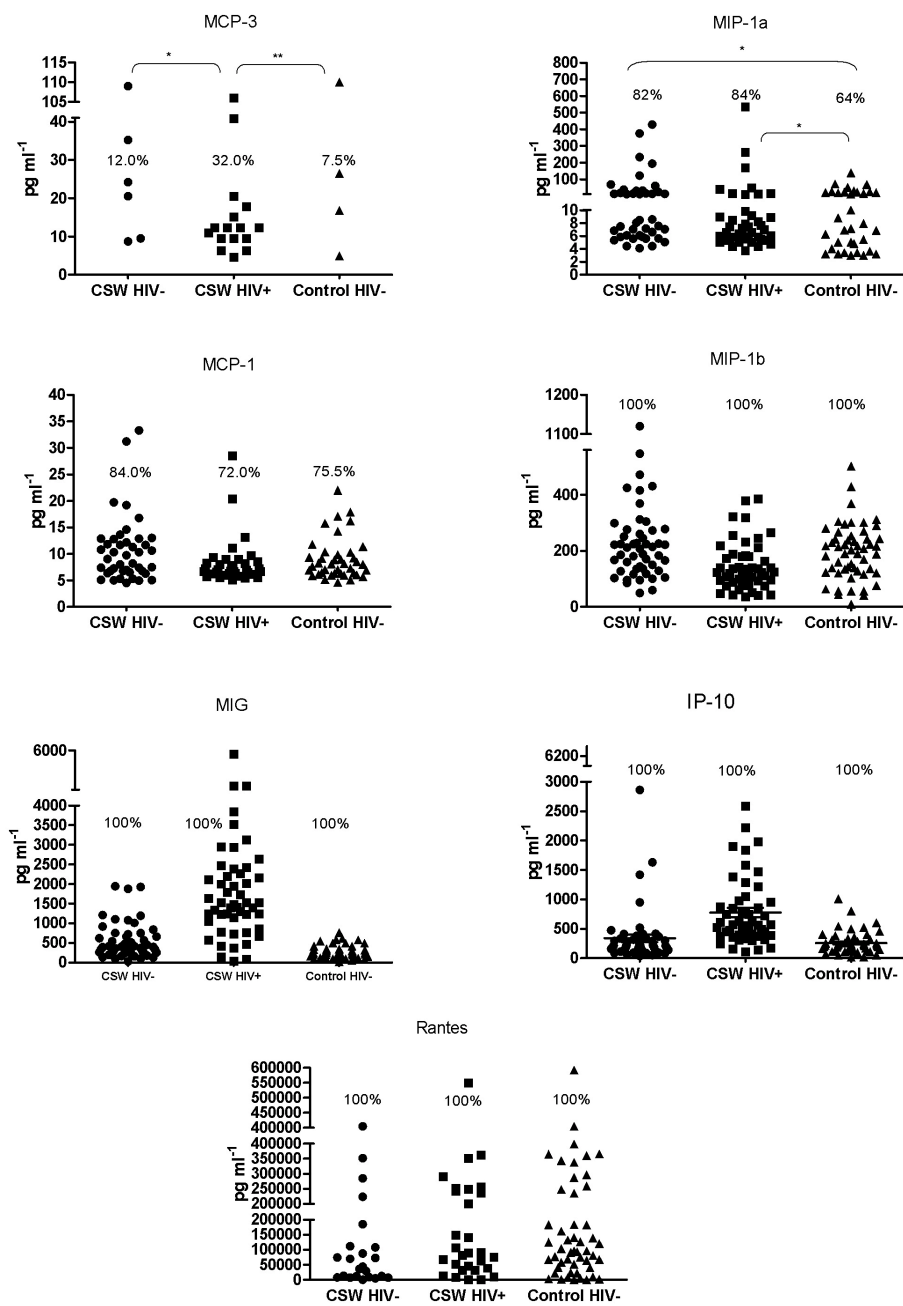


Figure supplémentaire

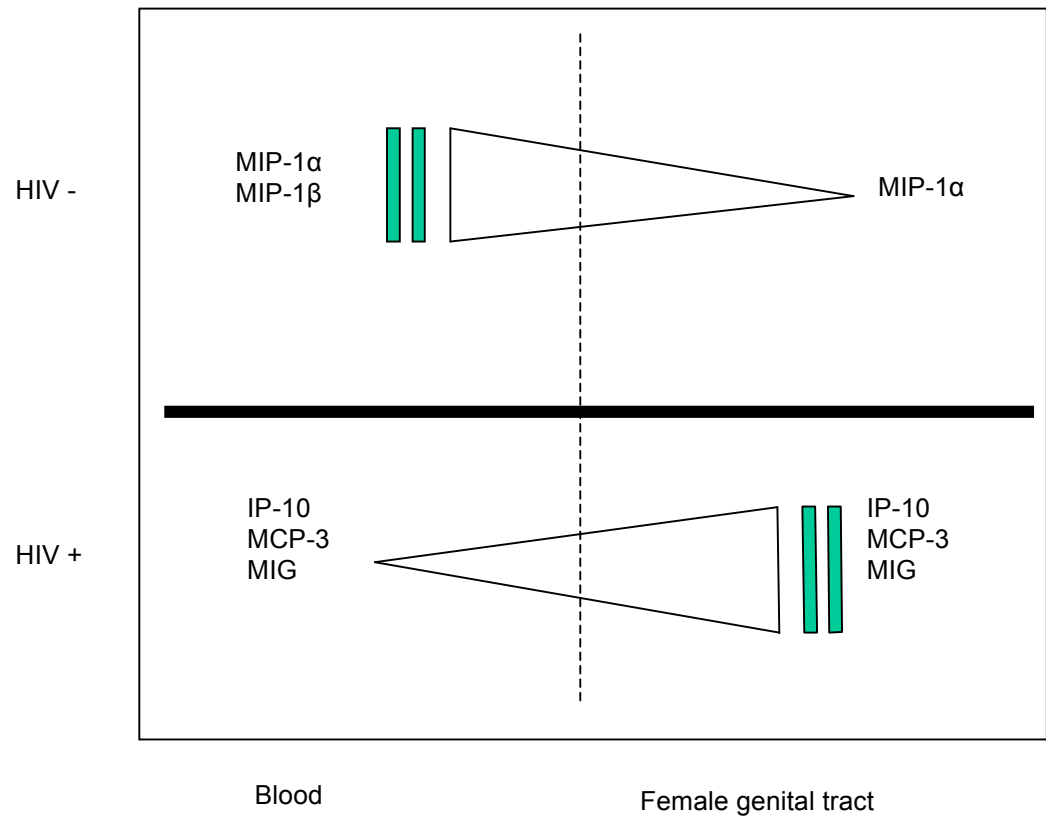


Table 1 Distribution of demographic, sexual behaviour and genital tract infection characteristics in HIV-1-uninfected and HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSWs N = 58	HIV-1-infected CSWs N = 50	HIV-1-uninfected non-CSW controls N = 53	p value ^a
Age, mean (s.d.), years	34.2 (11.9)	34.4 (8.9)	32.5 (9.3)	NS
Duration of sex work, mean (s.d.), years	4.2 (3.1)	4.0 (2.6)	NA	NS
Number of clients last week, mean (s.d.)	17.2 (13.6)	12.1 (11.2)	NA	NS
Days since last menses, mean (s.d.)	14.5 (8.2)	18.5 (15.5)	20.1 (10.3)	NS
Regular partner	32/56 (57.0%)	29/47 (61.7%)	43/53 (81.1%)	0.04 ^b
Vaginal douching	55/58 (94.8%)	42/42 (100%)	49/53 (92.5%)	NS
Condom always used with clients	47/55 (85.5%)	37/47 (78.7%)	NA	NS
Vaginosis	21/51 (43.1%)	22/43 (51.2%)	18/53 (34.0%)	NS
Candidiasis	6/51 (11.8%)	6/38 (15.8%)	12/53 (22.6%)	NS
NG and /or CT infection	6/49 (12.2%)	5/39 (12.8%)	0/53 (0%)	0.03 ^c
HSV-2-positive serology	38/47 (80.9%)	39/41 (95.1%)	25/53 (47.2%)	< 0.0001 ^d

CSW, commercial sex worker; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; HSV-2: Herpes simplex 2.

N: number of participants; NA: non applicable; NS: nonsignificant; NG/CT: Neisseria gonorrhoeae/ Chlamydia trachomatis.

All risk factor data were collected via a questionnaire administered before samples were collected. Gynecological exams and biological sampling were performed by a physician without knowledge of HIV status of the women to avoid potential bias.

^aP-values for the comparison across all groups were calculated with one-way analysis of variance for the age, days since last menses; Mann-Whitney U-test for the duration of sex work and average number of clients; Chi-square test for regular partner, vaginal douching, condom use, vaginosis, candidiasis, NG/CT, HSV-2.

^bP = 0.007 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSWs and HIV-1-uninfected CSWs, and P = 0.03 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSWs and HIV-1-infected CSWs.

^cP = 0.01 for the comparison between HIV-1-uninfected non CSWs and HIV-1-uninfected CSWs and P = 0.01 for the comparison between HIV-1-uninfected non CSWs and HIV-1-infected CSWs.

^dP = 0.002 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSWs and HIV-1-uninfected CSWs, and P < 0.0001 for the comparison between HIV-1-uninfected non-CSWs and HIV-1-infected CSWs.

Table 2 Chemokine levels in cervicovaginal lavage samples from HIV-1-uninfected and HIV-1-infected CSWs, and HIV-1-uninfected non-CSW control subjects

	HIV-1-uninfected CSWs N = 58	HIV-1-infected CSWs N = 47	HIV-1-uninfected non-CSW controls N = 52	P-value ^a
IP-10	2011 (4142)	3389 (5289)	1451 (3432)	NS
MCP-1	39.3 (124)	52.7 (84.3)	19.4 (54.7)	0.013 ^b
MIP-1 α	2.7 (5.2)	1.9 (7.1)	0.8 (2.5)	0.0002 ^c
MIP-1 β	95.6 (117)	135 (176)	64.4 (107)	0.022 ^d
RANTES	14.0 (33.1)	26.2 (66.9)	3.4 (7.5)	0.0002 ^e
MCP-3	9.6 (23.0)	16.1 (20.9)	4.3 (9.5)	0.002 ^f
MIG	1826 (3083)	7054 (9183)	1553 (2373)	< 0.0001 ^g

CSW, commercial sex worker; HIV-1, Human immunodeficiency virus type 1; IP-10, Interferon-inducible protein-10; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; N, number of participants; NS, nonsignificant RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

Data are mean (s.d.) pg ml⁻¹

The lower detection limit for each assay was: 2.7 pg ml⁻¹ for IP-10, 1.7 pg ml⁻¹ for MCP-1, 1.5 pg ml⁻¹ for MCP-3 and RANTES, 0.5 pg ml⁻¹ for MIG, 1 pg ml⁻¹ for MIP-1 α and MIP-1 β .

^aP-values for comparison across all groups were calculated with one-way analysis of variance test.

^bP=0.004 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^cP=0.016 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, and P=0.001 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^dP=0.043 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV1-uninfected non-CSWs, and P=0.009 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^eP=0.021 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs, and P=0.0004 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^fP=0.023 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs and P=0.0004 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^gP<0.0001 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, and P<0.0001 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

Table 3 Chemokine levels in serum from HIV-1-uninfected and HIV-1-infected CSWs, and HIV-1- uninfected non-CSW control subjects.

	HIV-1-uninfected CSWs N = 50	HIV-1-infected CSWs N = 50	HIV-1-uninfected non-CSW controls N = 53	P-value ^a
IP-10	290 (301)	776 (569)	259 (190)	< 0.0001 ^b
MCP-1	8.9 (6.9)	6.0 (5.3)	6.9 (5.2)	0.04 ^c
MIP-1 α	29.0 (68.0)	16.2 (43.8)	12.3 (23.9)	0.05 ^d
MIP-1 β	215 (109)	143 (86.8)	196 (98.9)	0.0005 ^e
RANTES	94126 (117263)	141069 (134907)	156774 (158527)	0.04 ^f
MCP-3	2.0 (6.8)	4.1 (7.8)	0.9 (4.3)	0.002 ^g
MIG	549 (460)	1798 (1283)	260 (163)	< 0.0001 ^h

CSW, commercial sex worker; HIV-1, Human immunodeficiency virus type 1; IP-10, Interferon-inducible protein-10; MCP, monocyte chemotactic protein; MIG, monokine induced by gamma interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; N, number of participants; NS, nonsignificant RANTES, regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

Data are mean (s.d.) pg ml⁻¹

The lower detection limit for each assay was: 2.7 pg ml⁻¹ for IP-10, 1.7 pg ml⁻¹ for MCP-1, 1.5 pg ml⁻¹ for MCP-3 and RANTES, 0.5 pg ml⁻¹ for MIG, 1 pg ml⁻¹ for MIP-1 α and MIP-1 β .

^aP-values for comparison across all groups were calculated with one-way analysis of variance test.

^bP<0.0001 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, and P<0.0001 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^cP=0.01 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^dP=0.03 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^eP=0.0002 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected 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.

^fP=0.017 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^gP=0.02 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, P=0.002 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test.

^hP<0.0001 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-infected CSWs, P<0.0001 for the comparison between HIV-1-uninfected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs, and P<0.0001 for the comparison between HIV-1-infected CSWs and HIV-1-uninfected non-CSWs as determined by Mann-Whitney U-test

DISCUSSION :

Le but de notre étude était est de mieux comprendre certains facteurs génétiques impliqués dans la susceptibilité à l'infection au VIH et d'étudier l'immunité du tractus génital chez la femme africaine. Pour ce faire, nous avons étudié le polymorphisme des gènes HLA-G et HLA-E et les produits exprimés par HLA-G qui, selon nous, peuvent avoir un rôle à jouer dans la susceptibilité à l'infection au VIH. (165) Nous avons également étudié la présence de cytokines et chimiokines dans le tractus génital féminin et le compartiment systémique pour mieux comprendre les différences immunitaires entre les deux compartiments, l'immunité naturelle de tractus génital féminin, ainsi que l'impact de la présence du VIH sur la modulation de l'immunité dans ce compartiment.

Analyse génétique de HLA-G au Zimbabwe en relation avec la susceptibilité à l'infection au VIH

Dans un premier temps, nous avons procédé à une analyse génétique du gène HLA-G, un important modulateur de la réponse immunitaire. De plus, il a été démontré que la protéine Vpu du VIH pouvait modifier l'expression de HLA-G. En effet, Vpu induit la dégradation de HLA-G1 avant que celui-ci ne soit transporté à la surface cellulaire, ce qui diminue son expression. (190;191). HLA-G est exprimé au niveau du tractus génital féminin et puisque son expression peut être modulée par le VIH, cela nous a conduits à émettre l'hypothèse que des polymorphismes dans le gène HLA-G peuvent avoir un rôle à jouer dans la susceptibilité à l'infection au VIH. Lors d'une étude précédente, effectuée au près de 228 femmes séronégatives et de 203 femmes séropositives du Zimbabwe, nous avons démontré que deux allèles de HLA-G pouvaient être associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH. L'allèle HLA-G*010108 était associé avec une augmentation du risque d'acquisition du virus alors que l'allèle HLA-G*0105N était associé avec une diminution du risque. (197)

Le premier article présenté ici est la suite de ce projet. Comme nous avons précédemment associé certains allèles de HLA-G avec la susceptibilité à l'infection au VIH, nous avons décidé de vérifier l'impact de la présence des allèles de HLA-G avec la présence de HLA-E. HLA-E joue également un rôle dans l'activation du système immunitaire inné. En effet, sa liaison avec les récepteurs CD94-NKG 2A/C entraîne l'inhibition ou l'activation de la fonction cytolytique des cellules NK (165;296;297). Comme HLA-E peut également lier des séquences peptidiques de HLA-G afin d'être exprimé à la surface cellulaire et ainsi inhiber l'action des cellules NK (298;299), nous avons analysé la présence des allèles d'HLA-G en association avec les allèles d'HLA-E.

Nous avons trouvé que la présence de l'allèle HLA-E^G de façon homozygote était observée à une fréquence de 13.8% dans le groupe des femmes VIH positives et de 30.7% dans le groupe des femmes VIH négatives. La différence entre les deux groupes pour la distribution génotypique de cet allèle était significativement différente ($p=0.001$). En effet, la présence homozygote de l'allèle HLA-E^G diminue de 3.5 fois les risques d'acquisition du virus dans cette cohorte.

Pour être exprimé à la surface cellulaire, HLA-E doit lier des séquences peptides signaux « signal sequence peptide » d'autres molécules HLA de classe I dans sa niche peptidique. HLA-E va lier préférentiellement les séquences peptidiques de HLA-G. (298) Nous avons vu précédemment que l'allèle HLA-G*0105N était associé avec une diminution du risque d'acquisition du virus. Cette fois-ci, nous trouvons que le génotype HLA-E^G/HLA-E^G diminue aussi les risques d'acquisition du virus. Nous avons donc décidé d'analyser l'impact de la combinaison de la présence de HLA-E^G sous sa forme homozygote avec la présence de HLA-G*0105N. L'allèle HLA-G*0105N est défini par la présence d'une délétion dans l'exon 3 qui conduit à un codon stop prématuré. Il ne produit donc pas l'isoforme membranaire principal G1 et les isoformes solubles principaux G1 et G5. Dans un modèle multivarié, dans lequel nous avons analysé la présence de ces deux allèles ainsi que la présence d'autres facteurs sociodémographiques associés avec la susceptibilité à l'infection dans cette population (religion, statut marital, âge au moment du recrutement), nous avons déterminé que ces deux allèles étaient associés de manière indépendante à l'infection au VIH. De plus, nous avons constaté qu'en plus de leur effet respectif sur le statut VIH, lorsque mis en combinaison, l'effet de ces deux gènes diminue d'avantage la probabilité d'infection, avec des facteurs de cotes passant de 3.5 à 12.5. Ces deux gènes pourraient donc avoir un effet à la fois indépendant et synergique sur la susceptibilité à l'infection au VIH.

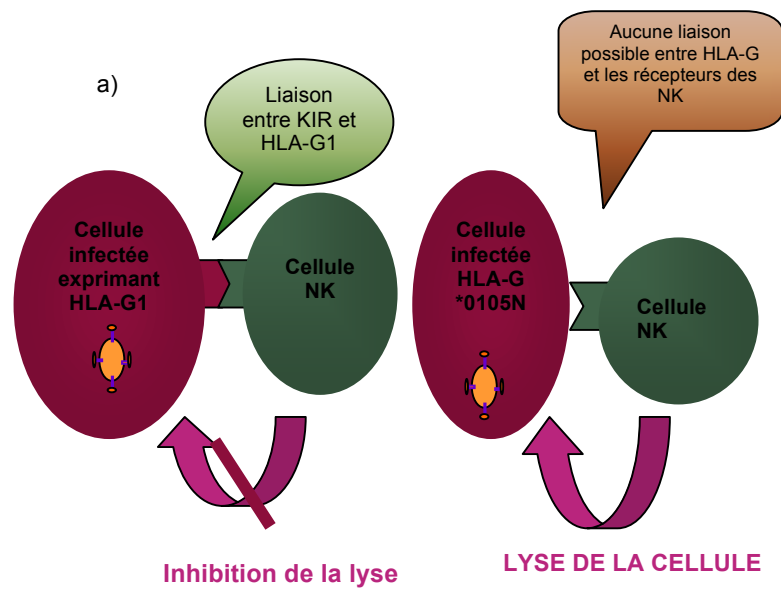
Pour essayer de comprendre ces résultats, nous avons élaboré un modèle mécanistique. Celui-ci est illustré à la figure 8. La partie A de la figure illustre notre hypothèse pour la présence de l'allèle HLA-G*0105N. Lorsqu'une cellule exprime HLA-G (et donc, principalement l'isoforme G1), celui-ci sera reconnu par les récepteurs KIR et ILT 2/4 présents sur les cellules NK. (300;301) Cette liaison entraîne une inhibition de la lyse cellulaire effectuée par les cellules NK. Par contre, lorsqu'un individu est porteur de HLA-G*0105N, la quantité de HLA-G1 à la surface cellulaire est grandement diminuée. (302) L'isoforme principal G1 étant absent, cela augmente les chances de lyse par les cellules NK. Lors d'une infection par le VIH, le virus peut moduler l'expression des molécules HLA de classe I à la surface cellulaire et ainsi empêcher la

lyse de la cellule par les CTL.(184) Il reste alors à la surface cellulaire les molécules HLA-G et HLA-E pour inhiber la lyse par les cellules NK. Toutefois, si une personne est porteuse de HLA-G*0105N, l'inhibition de la lyse cellulaire par les cellules NK n'est presque plus contrôlée et la cellule infectée sera sans doute lysée par les cellules NK.

HLA-E joue un rôle dans l'activation du système immunitaire. Tout comme HLA-G, il peut contrôler l'activation des cellules NK. (165) En liant des peptides des autres molécules HLA, et principalement ceux de HLA-G, il peut se lier au récepteur NKG2 et activer ou inhiber l'action des NK. HLA-E a aussi la capacité de lier des antigènes et de les présenter aux CTL et aux NK-CTL. (303-305) La protéine encodée par l'allèle HLA-E^G est plus fortement exprimée à la surface cellulaire et a également une plus grande affinité peptidique que la protéine codée par HLA-E^R. (167) Ainsi, nous pensons que la présence de l'allèle HLA-E^G, qui est fortement exprimée à la surface cellulaire et qui démontre une plus grande affinité peptidique, augmente les chances de présentation du virus aux CTL et diminue ainsi la susceptibilité à l'infection au VIH (figure 4b).

Pour tenter d'expliquer l'impact de la combinaison HLA-E^G/HLA-E^G-HLA-G*0105N sur la susceptibilité à l'infection au VIH, nous avons élaboré une autre hypothèse. L'allèle HLA-E^G code pour une protéine qui a une plus grande affinité peptidique et une plus forte expression à la surface cellulaire. De plus, HLA-E n'est pas touché par la régulation négative spécifique des HLA de classe I par le VIH. Pour être exprimé à la surface cellulaire, HLA-E doit soit être lié à une séquence peptide signal d'un autre HLA (principalement d'HLA-G) ou un antigène. Lorsque le VIH infecte une cellule, nous croyons que la régulation négative des HLA diminue les séquences de peptides disponibles pour les molécules HLA-E. De plus, si une personne est porteuse de l'allèle HLA-G*0105N, cela diminuerait encore plus la disponibilité de séquence peptide signal puisque la protéine HLA-G1 n'est pas produite. Donc, chez une personne porteuse de la combinaison HLA-E^G/ HLA-E^G- HLA-G*0105N, il y aurait très peu d'expression de surface HLA-G et HLA-E. Le VIH diminuant également l'expression de surface de HLA-A et HLA-B, cela augmente la possibilité de lyse cellulaire par les cellules NK. De plus, lorsqu'il y a un manque de séquences peptidiques, les molécules HLA-E peuvent lier des « heat shock protein » pour être exprimées à la surface cellulaire (306). Cette combinaison entraîne la liaison au récepteur CD94-NKG2C des NK et active la lyse de la cellule. De plus, l'affinité peptidique de HLA-E^G étant beaucoup plus grande que celle de la protéine HLA-E^R, nous pensons qu'une plus forte présentation antigénique aux CTL sera effectuée et cela entraînera la lyse des cellules infectées. Lorsqu'une personne est porteuse de la combinaison HLA-E^G/ HLA-E^G-HLA-G*0105N, la diminution de l'inhibition cytolytique par les cellules NK et l'augmentation de la présentation

d'antigènes aux CTL par les molécules HLA-E va entraîner la lyse de la cellule infectée, ce qui pourrait permettre à la personne de contrer rapidement l'infection (figure 4c).



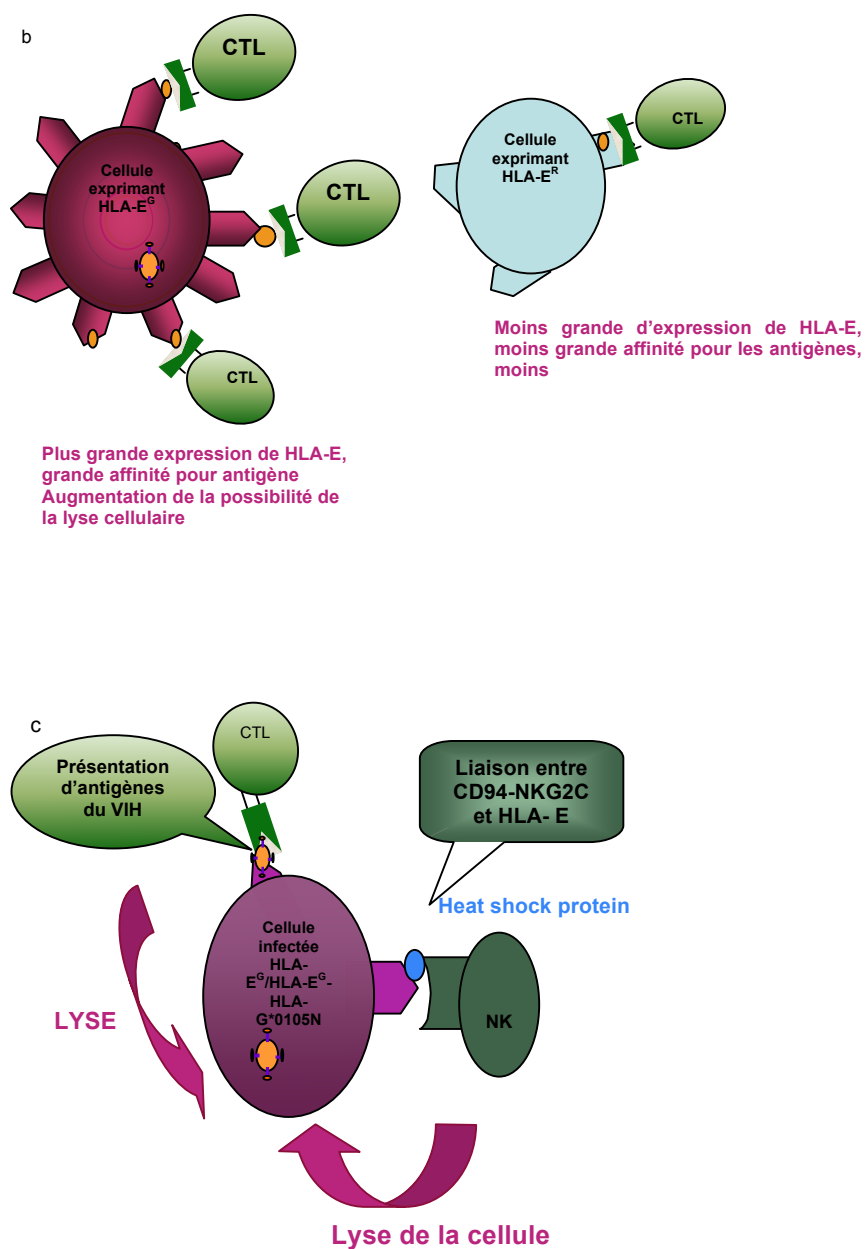


FIGURE 8: MODÈLES MÉCANISTIQUES PROPOSÉS POUR LA FONCTION DE HLA-G ET HLA-E DANS LA SUSCEPTIBILITÉ À L'INFECTION AU VIH.

- Lien entre la présence de l'allèle HLA-G*0105N et la fonction des NK.
- Différence entre les deux variant de HLA-E
- Combinaison de la présence de HLA-G*0105N et du génotype HLA-EG/HLA-EG

Typage HLA-G et HLA-E au Bénin

Suite aux résultats génétiques obtenus dans l'étude au Zimbabwe, nous avons voulu analyser la présence de la protéine HLA-G dans le sérum et le tractus génital de ces femmes. Malheureusement, pour plusieurs raisons, il nous a été impossible d'obtenir d'autres échantillons. Nous avons donc dû procéder à l'élaboration d'une nouvelle étude au Bénin. Nous avons, dans un premier temps, effectué le typage de HLA-G et HLA-E dans cette nouvelle population du Bénin. Sur les 8 allèles retrouvés, aucune différence significative au niveau de la distribution allélique n'a été observée en relation avec la l'infection par le VIH. Aucune différence significative n'a été observée dans la distribution génotypique de HLA-E.

Certaines explications peuvent être apportées pour comprendre cette différence. Premièrement, la taille de l'échantillon. Lors de la précédente étude, nos deux groupes étaient constitués d'environ 200 femmes chacun. Dans cette étude, on ne retrouve qu'environ 50 femmes dans chacun des trois groupes. L'échantillonnage de cette étude est donc beaucoup plus faible que celui obtenu au Zimbabwe. De plus, au Zimbabwe la fréquence de l'allèle HLA-G*0105N était à près de 11% alors qu'au Bénin la fréquence n'est que de 7%. La puissance n'est donc probablement pas assez élevée pour qu'une différence significative puisse être observée. Il nous faudrait augmenter l'échantillonnage pour contrer ce problème de puissance. Un autre point important à prendre en considération est l'ethnicité. Dans l'étude au Zimbabwe, toutes les personnes recrutées étaient des femmes d'ethnie Shona. Cette ethnie représente un groupe ancestral et très homogène. Dans l'étude du Bénin, plus de 15 ethnies et 8 pays d'origine étaient représentés. Lors d'une étude génétique, le choix de la population est un facteur important. Les populations génétiques théoriques et les données recueillies suggèrent qu'une population génétique isolée, c'est-à-dire homogène, est préférable à une population mixte. Une très large cohorte doit être élaborée pour contrer ce problème de stratification. Malheureusement, la population des TS au Bénin n'est pas uniforme, et il nous était impossible d'avoir une population homogène. Mentionnons que le fait que les sujets de notre étude étaient uniquement des femmes n'a pas eu d'impact sur notre analyse génétique puisque ces gènes ne sont pas situés sur les chromosomes sexuels.

L'expression de HLA-G

Même si aucune différence n'a été observée dans la distribution allélique de HLA-G, nous avons décidé de faire l'analyse de l'expression du HLA-G soluble. Pour ce

faire, par ELISA, nous avons mesuré les niveaux d'HLA-G soluble dans le plasma des participantes. Mentionnons que nous n'avons pas les plasmas de toutes les participantes ce qui explique que l'échantillonnage dans les groupes est moindre. Les protéines HLA-G solubles sont principalement générées par le clivage de l'isoforme membranaire G1 (HLA-G1s) et la sécrétion de la forme HLA-G5. Notre technique nous permet de détecter ces deux isoformes en même temps, sans toutefois les discriminer. La forme soluble de HLA-G est un important inhibiteur de la fonction lytique des cellules NK et des cellules T CD8⁺.(289;307) Une expression élevée de HLA-G soluble est observée chez les personnes ayant une maladie auto-immunitaire ou une tumeur maligne. (308-312) Certains virus, comme ceux de la famille des Herpes, modulent également l'expression de HLA-G soluble. (313) Notre groupe a, récemment, démontré que la production de HLA-G soluble était influencé par le stade de l'infection au VIH (voir article #3 en annexe). Dans cette étude longitudinale auprès d'hommes caucasiens VIH positifs, le niveau de HLA-G soluble était plus élevé dans les premières phases de l'infection (primo-infection et en phase aiguë) et reprenait un niveau normal en phase chronique. (314)

Dans cette partie de l'étude, nous avons mesuré l'expression de HLA-G soluble dans le plasma de nos trois groupes de femmes béninoises (TS VIH négatives, TS VIH positives, femmes VIH négatives sans histoire de prostitution). C'est la première fois, à notre connaissance, que le niveau de HLA-G soluble est mesuré dans une population africaine. Nous avons observé une expression significativement inférieure de HLA-G soluble dans le groupe des TS VIH positives comparativement aux deux autres groupes de femmes VIH négatives. De plus, malgré des facteurs de risque beaucoup plus prévalents dans le groupe des TS VIH négatives, un niveau d'expression de HLA-G soluble similaire a été observé dans la population contrôle. Cela nous suggère que la présence du VIH pourrait moduler directement ou indirectement l'expression de HLA-G soluble.

Jusqu'à présent, une seule autre étude, effectuée par Donaghy et coll., a étudié l'expression de HLA-G soluble par rapport à l'infection au VIH. Ceux-ci ont démontré que, dans une population caucasienne, l'expression de HLA-G soluble était augmentée chez les personnes VIH positives, ce qui est opposé aux résultats que nous avons obtenus. (189) Cette différence peut s'expliquer par le design des deux études. Premièrement, notre étude porte uniquement sur des femmes, alors que dans leur étude, Donaghy et coll. n'ont pas contrôlé pour le sexe des participants. Ce qui est un point très important dans une étude comme celle-ci. En effet, il a été démontré que le cycle hormonal a une forte incidence sur l'expression de HLA-G et que la progestérone

augmente l'expression de la protéine. (171;315) De plus, le niveau de HLA-G soluble observé chez les femmes est plus élevé que celui retrouvé chez les hommes. (171) Une étude avec un seul genre est donc nécessaire pour éliminer cet important facteur confondant. Deuxièmement, dans notre étude, le groupe de personnes VIH positives est naïf pour l'administration d'une thérapie antirétrovirale. La cohorte utilisée par Donaghy et coll. est, quant à elle, constituée d'une population mixte, c'est-à-dire de personnes sous ou sans thérapie. De plus, il n'y a aucune précision sur le type de médication utilisé pour la thérapie. Or, il a été démontré que les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse étaient capables d'induire l'expression de HLA-G sur les monocytes périphériques, alors que les inhibiteurs de la protéase n'avaient pas d'impact sur l'expression de HLA-G1.(187;188) Il est donc important de contrôler pour ce facteur lorsqu'on veut analyser l'impact du VIH sur l'expression de HLA-G, puisqu'un niveau élevé de HLA-G soluble peut être le résultat de la thérapie et non celui de l'infection à VIH. Enfin, notre étude portait sur une population africaine, alors que celle de Donaghy et coll. a été effectuée auprès d'une population caucasienne : cela peut avoir une incidence sur l'expression de HLA-G. Tous ces éléments peuvent expliquer les différences observées entre les deux études.

Nous savons que l'expression de HLA-G soluble peut être influencée par les polymorphismes génétiques d'HLA-G. Ainsi, certains allèles ont été associés avec une diminution de l'expression de la protéine soluble. Les individus porteurs des allèles HLA-G*0105N et HLA-G*010103 ont une plus faible expression de HLA-G soluble comparé aux porteurs de l'allèle HLA-G*010101 [132]. Un autre polymorphisme connu pour avoir un impact sur la production de HLA-G soluble est la présence d'une insertion/délétion de 14pb dans l'exon 8 de HLA-G. Lorsque l'insertion est présente, il y a une diminution de l'expression comparativement à celle qui est mesurée lorsqu'il y a présence de la délétion. (176;177;292) Nous avons donc cru qu'il était important de vérifier l'impact de la présence des différents allèles et polymorphismes retrouvés dans notre population sur la production de HLA-G soluble. Ainsi, nous avons observé que la présence des allèles HLA-G*010101 et HLA-G*010401, ainsi que la présence homozygotes de mutations dans le 3'UTR (soit l'insertion de 14pb et un variant au nucléotide 3952), étaient associées avec une diminution de l'expression de HLA-G soluble. Dans un modèle statistique multivarié, nous avons contrôlé la présence des variables génétiques significativement associées et de l'effet de l'infection par le VIH sur la production de HLA-G soluble. Ainsi, seul le VIH et la présence homozygote de l'insertion de 14pb sont demeurés associés avec l'expression réduite de HLA-G soluble. La présence de l'insertion de 14 pb dans la région 3'UTR entraîne une diminution de 13 fois l'expression de HLA-G soluble, alors que la présence du VIH est associée avec une

diminution de l'expression de l'ordre de 6 fois. Les deux facteurs sont donc indépendamment impliqués dans la diminution de l'expression de HLA-G soluble dans notre étude.

Il a précédemment été démontré que l'expression de HLA-G était modulée par la présence du VIH. En effet, l'expression de surface de HLA-G1 sur les monocytes est diminuée par un mécanisme impliquant Vpu. (190;191) L'expression de HLA-G soluble étant, entre autre, le résultat du clivage de la forme membranaire G1, nous émettons l'hypothèse que la diminution de l'expression de HLA-G1 par Vpu peut avoir pour conséquence de diminuer l'expression soluble de la protéine provenant des monocytes chez les TS VIH positives. De plus, HLA-G soluble pouvant être relargué par les cellules T CD4⁺, le déclin de ces dernières observé chez les personnes VIH positives tout au long de l'infection à VIH, pourrait aussi expliquer la diminution de HLA-G soluble observée dans le plasma des TS VIH positives. (139)

L'expression de HLA-G soluble peut être influencée par la présence de cytokines dans le milieu et vice-versa. D'ailleurs, il a été démontré que la présence d'IL-10 induit l'expression de HLA-G (294) et que la présence de HLA-G soluble mène à un profil d'expression des cytokines de type TH1. De plus, la présence de HLA-G soluble induit l'expression d'IL-6, d'IL-8, de TNF- α et d'IFN- γ par les cellules NK (181;183;295). Fait intéressant, dans cette étude, nous avons mesuré le niveau d'expression de certaines cytokines et chimiokines au niveau du système systémique et du tractus génital féminin (article 3 et 4 de la section résultats). Ces résultats seront discutés dans la section à venir mais mentionnons que l'expression de l'IL-2, de l'IL-10 et du TNF- α était plus basse dans le sang des TS VIH positives comparé au niveau observé chez les TS VIH négatives et chez les femmes de la population générale.

L'expression de HLA-G soluble au niveau du sang semble donc être influencée par l'infection au VIH. En mesurant l'expression des cytokines dans le tractus génital féminin, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de TNF- α et d'IFN- γ chez les TS VIH positives. Puisque l'expression des cytokines TH1 était augmentée dans le tractus génital des femmes VIH positives et que celui-ci représente la principale porte d'entrée du VIH chez la femme, il est clair qu'il aurait été intéressant de mesurer l'expression de HLA-G soluble dans ce compartiment. Or, la quantité de CVL requise pour la détection de HLA-G soluble par ELISA était trop élevée pour nous permettre d'effectuer cette analyse puisque plusieurs autres expériences ont été effectuées sur ce matériel. Cependant, nous sommes présentement dans une nouvelle phase de recrutement au Bénin pour effectuer une étude qui comprend un suivi

longitudinal sur une période de deux ans. Cela nous permettra d'augmenter le nombre de participantes pour la partie génétique mais également d'obtenir de nouveaux échantillons de CVL. Ces nouveaux échantillons vont nous permettre de pouvoir mesurer l'expression de HLA-G soluble dans le compartiment vaginal et de pouvoir mesurer l'expression de HLA-G soluble au niveau du tractus génital à différents temps pour voir s'il y a des changements dans l'expression. Avec les résultats obtenus pour les cytokines, nous croyons que l'expression de HLA-G soluble sera plus élevée dans le tractus génital des femmes VIH positives que chez les femmes VIH négatives et ce, probablement dans le but de moduler le système immunitaire et permettre ainsi plus facilement la dissémination et la perpétuation du virus. Il serait également intéressant de mesurer, par cytométrie en flux, l'expression de HLA-G membranaire à la surface des monocytes périphériques et ceux de la muqueuse vaginale pour voir si l'expression de HLA-G soluble diffère entre les deux compartiments mais également entre les trois groupes. En effet, il est possible (et même probable) que l'expression de la forme membranaire diffère de celle la forme soluble. De plus, au niveau des muqueuses, l'expression de HLA-G membranaire pourrait également être mesurée à la surface des cellules épithéliales.

Mentionnons qu'avec cette étude, il nous est impossible de déterminer si la diminution de HLA-G soluble est due à la présence du virus ou si la diminution de HLA-G observée augmente les risques d'être infecté par le virus. Cette nouvelle étude longitudinale sera un bon point de départ pour nous permettre de répondre à cette question. En effet, la mesure de HLA-G soluble à différent temps sera très utile pour voir l'impact de la présence de HLA-G soluble et le compte CD4. Un suivi à long terme des TS VIH négatives est également intéressant, puisque la mesure de HLA-G soluble à différents temps, nous permettra de voir si une différence d'expression est observée chez les TS qui deviennent infectées avant ou juste après l'infection, ce qui nous permettrait de vérifier le rôle de HLA-G soluble sur la susceptibilité à l'infection au VIH.

L'expression de cytokines et des chimiokines

Le premier compartiment touché par la présence du VIH chez la femme est le tractus génital et, par conséquent, le système immunitaire de cette muqueuse. La réponse engendrée à ce site dans les premiers moments de l'infection déterminera la vitesse de la progression. L'impact du virus sur l'immunité systémique n'apparaît que plus tard et reflète une multitude d'évènements majeurs se déroulant dans les muqueuses. Au niveau génétique, plusieurs polymorphismes dans les gènes codant

pour les cytokines et les chimiokines ont été associés avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Nous avons donc décidé de mesurer la concentration de cytokines et de chimiokines dans le tractus génital féminin et le sérum des trois groupes de femmes.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'expression des chimokines et des cytokines dans le tractus génital féminin. Un de ces facteurs est le cycle hormonal. Comme il l'a été mentionné dans l'introduction, les hormones ont une forte influence sur l'immunité présente dans le tractus génital féminin. Nous avons donc pris soin de recruter les TS et les femmes de la population contrôle de notre étude à mi-cycle (« mid-cycle »). Ce point est très important puisque cela nous permet de pouvoir comparer les données obtenues de chacune des participantes entre elles sans avoir un biais d'expression dû à l'influence du cycle hormonal. En effet, comme le cycle hormonal influence grandement l'expression des cytokines et chimiokines, il aurait été impossible de comparer une femme en début de cycle avec une femme à la fin de son cycle hormonal dans une étude comme la nôtre.

Discussion des résultats obtenus en comparant les TS et la population générale :

En comparant l'expression des cytokines et des chimiokines, nous avons observé un profil différent pour l'expression des chimiokines entre les deux groupes de TS et celui de la population contrôle. En effet, l'expression au niveau du tractus génital féminin des β -chimiokines MIP-1 β et RANTES était plus élevée chez les TS par rapport aux femmes contrôles. Cela peut suggérer un effet de la prostitution sur la production de ces chimiokines. L'exposition au sperme conduit à l'expression de cytokines et chimiokines, telles que l'IL-6, l'IL-8, GM-CSF et MCP-1 par les cellules épithéliales. (316) Schubert et coll. ont montré que la présence de sperme induit la migration de neutrophiles vers le tractus génital et une réponse immunitaire. (317) Les TS ayant des partenaires sexuels multiples, elles sont donc probablement exposées à la présence de sperme lors de relations sexuelles non protégées. Cela pourrait contribuer à l'augmentation des niveaux de chimiokines dans le tractus génital.

TS VIH positives :

Discussion des résultats du tractus génital :

Chez les TS VIH positives, nous avons observé une augmentation des cytokines proinflammatoires (TNF- α et IFN- γ) au niveau du tractus génital comparativement à ce qui a été mesuré chez les TS VIH négatives et les femmes VIH négatives du groupe contrôle. L'augmentation de ces cytokines démontre qu'une réaction inflammatoire a

lieu dans le tractus génital des femmes VIH positives. Plusieurs facteurs peuvent causer une telle réaction inflammatoire et influencer la production de cytokines. Pour nous assurer que l'expression des cytokines produites dans ce compartiment était le reflet de la présence du VIH et non d'un autre facteur, nous avons contrôlé l'expression des cytokines avec plusieurs éléments pouvant influencer la susceptibilité à l'infection au VIH et la production des cytokines. L'âge, le cycle menstruel, la pratique de douche vaginale, le nombre de partenaires sexuels, un déséquilibre de la flore vaginale et la présence d'autres ITS ont donc été pris en considération lors de l'analyse. La présence d'un déséquilibre de la flore microbienne a été précédemment associée avec la susceptibilité à l'infection au VIH ainsi qu'avec une augmentation des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 et TNF- α dans le tractus génital féminin (12;93). Par ailleurs, un déséquilibre de la flore intestinale est associé avec une augmentation de la translocation microbienne et cela représente l'un des principaux facteurs contribuant à l'inflammation chronique présente chez les personnes VIH positives (211). Nous avons donc contrôlé la présence d'un déséquilibre de la flore vaginale par la présence de vaginose bactérienne. Pour se faire, le ratio entre la présence des lactobacilles et de *Gardnerella/Mobiluncus* a été mesuré dans les sécrétions vaginales des participantes. Aucune différence quant à la présence de vaginose bactérienne, déterminé par le score Nugent, n'a été observé entre les trois groupes. De plus, dans cette étude, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence de vaginose bactérienne et l'expression des cytokines. La présence d'ITS a également été associée avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Cela peut être dû à la présence de lésions qui permettent au virus de pénétrer l'épithélium plus facilement ou à un recrutement cellulaire pour combattre l'infection, ce qui augmente le nombre de cellules cibles disponibles pour le VIH. L'infection à *N. gonorrhoeae* est associée avec une augmentation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α par les cellules épithéliales. (87) Dans notre étude, les infections à *C. trachomatis* et à *N. gonorrhoeae* étaient plus fréquentes chez les TS que chez les femmes de la population contrôle. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre la présence de ces ITS et la production des cytokines. La présence d'anticorps contre VHS-2 était également prédominante chez les TS comparé au groupe contrôle. Cependant, aucune des participantes n'avait une infection active au moment du recrutement et la présence des anticorps n'a pas été associée avec l'expression des cytokines. Tous les autres facteurs analysés étaient similaires entre les trois groupes. Ainsi, nous pouvons conclure que l'augmentation de TNF- α et d'IFN- γ est certainement due à une combinaison entre les effets directs et indirects causés par la présence du virus dans le tractus génital féminin. La présence d'ARN/ADN du virus a d'ailleurs été détectée dans les sécrétions vaginales et cervicales de femmes VIH positives du

Kenya, ce qui suggère la présence d'une réplication continue dans le tractus génital. (318) De plus, au niveau du système gastro-intestinal, le niveau de réplication virale et la déplétion des cellules T CD4⁺ coïncident avec une activation marquée de la transcription des gènes associés à l'inflammation et à une activation immunitaire. (227;319) Nos résultats sont en accord avec certaines études qui ont démontré la capacité *in vitro* des cellules T CD8⁺ du tractus génital féminin à produire de l'IFN- γ . (320) La présence des protéines du VIH Tat et gp120 a été associée avec une activation cellulaire via les récepteurs reconnaissant des patrons des pathogènes (« pattern recognition receptors » (PPR)) comme les TLR. (321) Les populations cellulaires du tractus génital expriment d'ailleurs une grande variété de ces récepteurs, ce qui peut mener à la reconnaissance des protéines du virus et donc à l'induction d'une activation de l'immunité mucoale.

L'augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ dans le tractus génital des femmes VIH positives suggère la persistance d'une activation locale du système immunitaire, probablement dans le but de favoriser la progression de l'infection par un recrutement continu des cellules cibles, augmenter la réplication virale et établir une infection persistante. Des études ont démontré que la présence de TNF- α dans le sang augmentait la réplication du VIH dans les cellules T et les macrophages et ce, par l'activation de la voie NF-KB. (322-324) Une étude *ex vivo* a aussi démontré que la présence de TNF- α dans le tractus génital féminin augmentait la réplication du VIH dans les cellules Langerhans. (130) Tous ces résultats supportent l'idée de la présence d'une activation du système immunitaire mucoale du tractus génital dans le but de favoriser la réplication et la dissémination du virus au niveau du site initial de l'infection.

Durant une réaction inflammatoire, les leucocytes migrent vers les tissus en réponse à un gradient de chimiokines. En présence d'infection par le VIH, certaines chimiokines, comme MCP-1 et MIP-1 α , ont été associées avec une modulation de la susceptibilité à l'infection. (115;284) Suite aux résultats obtenus lors de l'analyse des cytokines, nous avons décidé de mesurer les niveaux de plusieurs chimiokines (MCP-1, MCP-3, IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP- β , RANTES) dans le compartiment systémique et le tractus génital. Ainsi, le niveau d'IP-10, de MCP-3 et de MIG s'est avéré être significativement plus élevé dans le tractus génital et le sang des TS VIH positives que celui observé chez les TS VIH négatives et le groupe contrôle et ce, dans les deux compartiments. Chez les TS VIH positives, le niveau d'expression de ces trois chimiokines était plus élevé dans la muqueuse du tractus génital que dans le compartiment systémique. Cela laisse sous entendre la présence d'un gradient

chimioattractant pour le recrutement des cellules immunitaires du sang vers le tractus génital. MCP-3 a pour rôle principal d'attirer les monocytes (DC, Langerhans, macrophages) via le récepteur CCR2, alors qu'IP-10 et MIG attirent les cellules T exprimant CXCR3. Les monocytes et les cellules T, cellules cibles du VIH, jouent un rôle essentiel dans l'infection. L'appel de ces cellules au site primaire de l'infection contribue à la perpétuation et dissémination du virus. Ces trois chimiokines peuvent avoir été sécrétées par les cellules immunitaires déjà présentes dans le tractus génital, mais également par les cellules épithéliales (51;316). L'expression d'IP-10 et de MIG est induite par la présence d'IFN- γ qui était plus élevé dans le tractus génital des TS VIH positives que chez les TS VIH négatives et les femmes du groupe contrôle. L'analyse de la production des chimiokines nous permet d'émettre l'hypothèse de la présence d'un recrutement cellulaire vers le tractus génital des TS VIH positives, et donc l'idée d'une activation immunitaire dans ce compartiment. Ainsi, il semble que le VIH ait évolué de manière à pouvoir moduler à son avantage la réponse immunitaire du tractus génital. L'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires activant, entre autres, les cellules cible du virus, ainsi que le gradient de chimiokines observé permettant un recrutement cellulaire vers le tractus génital favoriseraient donc la perpétuation du virus au site d'infection et sa dissémination dans l'hôte. Mentionnons, que notre étude ne nous permet cependant pas de déterminer si l'augmentation de ces protéines augmente la susceptibilité à l'infection au VIH ou si elle est uniquement le résultat de l'infection à VIH.

Discussion résultats dans le sérum TS VIH positives :

L'étude de la présence des cytokines dans le sérum des TS VIH positives nous a permis d'observer un patron d'expression totalement différent de celui observé dans le tractus génital de ces mêmes femmes. En effet, dans le sérum des TS VIH positives, une expression inférieure d'IL-2, d'IL-10 et de TNF- α a été observée comparativement aux TS VIH négatives et la population contrôle. Ainsi, TNF- α , qui était significativement plus élevé dans le tractus génital des TS VIH positives se retrouve significativement plus bas dans le sérum. Il a récemment été démontré que la capacité *in vitro* des lymphocytes du sang périphérique à produire les cytokines pro-inflammatoire IL-2, TNF- α et IFN- γ était associée avec le contrôle de l'infection chez les personnes ne progressant pas vers le SIDA. (214) Les résultats de cette étude concordent avec les résultats présentés ici, qui démontrent une diminution significative de l'expression d'IL-2 et de TNF- α dans le sérum des TS VIH positives. De plus, la comparaison entre

l'expression des cytokines dans le tractus génital et le sérum démontre que l'étude d'un seul compartiment ne prédit pas ce qui se passe dans un autre. L'analyse du système immunitaire systémique n'est donc pas nécessairement le reflet des événements immunologiques se déroulant dans le tractus génital. Même si l'étude des muqueuses est très ardue, il est donc important d'analyser les deux compartiments si on veut pouvoir avoir une idée précise de la réponse immunitaire enclenchée par la présence du VIH. Les résultats du compartiment systémique ne devraient donc pas être extrapolés au compartiment mucosal et vice versa.

Discussion des résultats chez les TS VIH négatives :

Certaines différences dans l'expression des cytokines et des chimiokines ont également été observées au niveau du groupe des TS VIH négatives. Ce groupe représente une population de femmes ESN. L'étude de leur système immunitaire est particulièrement intéressante pour comprendre les mécanismes pouvant contrer l'établissement de l'infection. Jusqu'à présent, cette protection a été associée avec la présence de lymphocytes T cytotoxiques et d'IgA neutralisants VIH spécifiques dans le tractus génital féminin. (261;269;277) Iqball et coll. ont montré que la résistance pouvait également être attribuable à une augmentation de l'expression de RANTES dans le tractus génital et que cette augmentation n'était pas reflétée dans le sérum. (40)

L'analyse des cytokines dans le tractus génital des TS VIH négatives n'a démontré aucune différence entre leur patron d'expression et celui des femmes VIH négatives de la population contrôle et ce, malgré le risque élevé d'infections présents chez les TS VIH négatives. L'immunité présente dans le tractus génital, chez les deux groupes, semble donc être similaire à ce niveau. Par contre, au niveau du sérum, nous avons observé des niveaux d'expression d'IL-4 significativement plus élevés chez les TS VIH négatives, comparé à l'expression observée chez les TS VIH positives et chez les femmes du groupe contrôle. Cette augmentation n'étant pas présente dans le tractus génital, cela démontre encore une fois le caractère distinct de ces deux compartiments. Ces niveaux d'IL-4 élevés chez les TS VIH négatives porte à croire que les ESN pourraient avoir une meilleure capacité à produire une réponse immunitaire humorale.

Nous avons observé une augmentation significative de MIP-1 α dans le tractus génital et une augmentation significative de MIP-1 α , MIP-1 β et MCP-1 dans le sérum des TS VIH négatives versus le niveau observé chez les deux autres groupes et ce, pour les deux compartiments étudiés. Nos résultats sont supportés par plusieurs études. Premièrement, des études génétiques ont démontré qu'un nombre élevé de

copies dans les gènes CCL3L1 (codant pour MIP-1 α) et CCL4L1 (codant pour MIP-1 β) était associé avec une augmentation de l'expression de MIP-1 α et MIP-1 β . Cette augmentation était associée avec une diminution des risques d'acquisition du virus. (115;325) Deuxièmement, une étude *in vitro* a démontré que la stimulation de PBMC d'ESN entraînait une plus forte expression des β -chimiokines que la stimulation des PBMC de personnes VIH positives. (37) Troisièmement, une étude de Gonzalez et coll. a montré qu'une expression élevée de MCP-1 dans le sérum avant l'infection diminuait de 50% les risques d'acquisition du virus. (123) MIP-1 α et MIP-1 β sont les ligands principaux de CCR5 et MCP-1 lie CCR2. Ces deux récepteurs peuvent être utilisés comme corécepteurs par le VIH. Une augmentation de ces facteurs avant l'infection peut donc entrer en compétition avec le virus pour l'utilisation de ces récepteurs. De plus, MIP-1 α entraîne l'augmentation de l'immunité cellulaire antigène spécifique et MIP-1 β augmente la stimulation de la production d'IgA antigène spécifique. (326) L'augmentation des chimiokines pourrait contribuer à déployer une meilleure réponse immunitaire dans les premiers moments suivant l'infection et ainsi empêcher la dissémination du virus. Cependant, mentionnons que ces chimiokines peuvent également attirer les cellules cibles du virus et contribuer à accroître les risques d'infection. Ainsi, le moment où ces chimiokines sont présentes et l'endroit où se fait l'appel des cellules immunitaires est essentiel. Dans ce sens, comparativement à ce qui a été observé chez les TS VIH positives, l'expression de MCP-1, MIP-1 α et MIP-1 β chez les TS VIH négatives était plus élevée dans le sérum que dans le compartiment génital. Le site principal de la production de ces chimiokines et, par conséquent, le site de la migration des cellules immunitaires, ne semble donc pas être le vagin ou l'exocol. Cela pourrait diminuer le nombre de cellules cible potentielles pour le virus au niveau du principal site de contact entre le virus et la femme. Ainsi, comparativement à ce qui a été observé chez les TS VIH positives, où l'appel des cellules se faisant vers le tractus génital augmente le nombre de cellules cible potentielles pour le virus, chez les TS VIH négatives, ce recrutement cellulaire s'effectue vers un autre site. Bien que les mécanismes de protection ne soient pas encore vraiment connus, il semble qu'une activité immune puisse avoir lieu soit plus haut dans le tractus génital soit au niveau des ganglions environnants dans le but de contrer la dissémination du virus vers le compartiment systémique.

Ainsi, l'augmentation des niveaux d'IL-4, de MIP-1 α , de MIP-1 β et de MCP-1 chez les TS VIH négatives semble enclencher une réponse immunitaire précoce pour empêcher la dissémination du virus et ce, sans augmenter le nombre de cellules cible pour le virus au niveau de la porte d'entrée (vagin et exocol).

CONCLUSION :

Le but de notre étude était de mieux comprendre les facteurs immunitaires qui peuvent influencer la susceptibilité à l'infection au VIH au niveau systémique et du tractus génital féminin.

Nous avons, dans un premier temps, associé certains polymorphismes dans les gènes HLA-G et HLA-E avec la susceptibilité à l'infection au VIH. Cette étude s'est effectuée dans une population de femmes du Zimbabwe. Nous avons ainsi trouvé que la présence de l'allèle HLA-G*0105N en combinaison avec la présence homozygote de l'allèle HLA-E^G diminuait de douze fois les risques d'acquisition du virus.

Devant l'impossibilité d'obtenir des échantillons des muqueuses dans cette population pour étudier les facteurs impliqués dans la susceptibilité à l'infection au VIH, nous avons procédé à l'élaboration d'une étude cas-contrôle au Bénin. Nous avons analysé pour la première fois l'expression de HLA-G soluble dans une population africaine. De plus, nous avons démontré que la présence de HLA-G soluble était diminuée chez les femmes infectées par le VIH. Cette diminution de HLA-G soluble était également appuyée par le patron d'expression des cytokines observé dans le sérum de ces mêmes participantes.

Nous avons également démontré qu'il y avait une réaction inflammatoire locale dans le tractus génital des TS VIH positives. L'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoire TNF- α et IFN- γ nous suggère qu'il y a une activation de la réponse immunitaire dans ce compartiment. De plus, l'analyse de l'expression des chimiokines nous a permis de constater la présence d'une migration continue des cellules immunitaires du sang vers le tractus génital chez ces femmes. Tous ces facteurs peuvent favoriser la dissémination et la perpétuation du virus au site d'infection ainsi que la progression de la maladie. La comparaison de l'expression des cytokines entre les deux compartiments nous a aussi démontré que l'étude de l'immunité systémique n'était pas garante de l'immunité présente dans le tractus génital féminin et que l'extrapolation des résultats systémiques au milieu des muqueuses ne doit pas être un automatisme. Cela nous a permis de reconfirmer l'importance de mieux comprendre l'immunité « mucosale » au niveau de la porte d'entrée du virus.

Grâce à notre groupe de femmes ESN, nous avons pu observer la présence de certains facteurs pouvant contribuer à la protection contre l'infection. L'augmentation de l'expression d'IL-4, de MIP-1 α , de MIP-1 β et de MCP-1 chez les TS VIH négatives comparé aux TS VIH positives et aux femmes VIH négatives du groupe contrôle peut

contribuer à développer une réponse immunitaire précoce contre l'infection. De plus, l'expression de ces protéines étant plus élevée dans le sang comparé au tractus génital, nous pensons que ces facteurs immunitaires sont impliqués dans la protection mais que le site principal de cette protection n'a pas lieu dans le vagin ou l'exocol. Cela souligne encore une fois l'importance de mieux comprendre l'immunité des muqueuses mais également des liens présents avec l'immunité systémique.

Les événements qui prennent place entre l'exposition au VIH et l'établissement de l'infection restant encore en grande majorité inconnus, il est de première importance de mieux comprendre les facteurs pouvant influencer la susceptibilité à l'infection et l'immunité antivirale au niveau du tractus génital féminin dans le but de développer des stratégies préventives. Notre projet a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'immunité naturelle du tractus génital féminin et sur les facteurs pouvant influencer la susceptibilité à l'infection au VIH.

PERSPECTIVES

Dans un premier temps, pour continuer ce projet, il faudrait faire l'analyse génétique des gènes des chimiokines et des cytokines qui ont été significativement associés avec l'infection au VIH dans le but de savoir si la différence d'expression observée entre les groupes est due à une différence génétique et/ou modulée par les facteurs environnementaux (VIH, populations cellulaires immunitaires présentes). Des polymorphismes dans les gènes codant pour IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, CCL3 (MIP-1 α) et CCL4 (MIP-1 β) ont déjà été répertoriés dans la littérature et ceux-ci peuvent avoir un effet sur l'expression de la protéine. (114;284;327-330) Certains d'entre eux ont déjà été associés avec la susceptibilité à l'infection ou la progression du VIH. Donc, la présence des polymorphismes suivant devraient être étudiée : pour l'IL-4 (polymorphisme en position 589), pour l'IL-10 (polymorphismes aux nucléotides 592 et 1082), pour TNF- α (position-308), pour l'IFN- γ (les polymorphismes rs2069720, rs2069718, rs2069727, rs2069709) et pour MCP-1 (-2578). De plus, pour CCL3 (MIP-1 α) et CCL4 (MIP-1 β) des études ont montré que le nombre de copies avait une influence sur l'expression de la protéine et sur la susceptibilité à l'infection au VIH. Donc, par PCR en temps réel, il faudrait quantifier le nombre de copies de ces deux gènes présents chez chaque individu. Ensuite, comparer chacun des groupes entre eux mais aussi avec le nombre moyen de copies retrouvés dans les populations africaines. De plus, il serait intéressant de comparer le nombre de copies dans chaque groupe avec la génétique du récepteur CCR5 puisque certains allèles de CCR5 ont été associés avec la progression de la maladie et pourraient donc également avoir un rôle dans la susceptibilité à l'infection.

De plus, une analyse génétique pourrait être conduite pour analyser les séquences des défensines. Ces dernières jouent un rôle crucial dans l'immunité innée du tractus génital. Il serait donc intéressant de voir si certains polymorphismes peuvent influencer leur expression. Cette étude pourrait être suivie par une analyse de l'expression de défensines dans ce compartiment. Pour cela, les prélèvements du mucus devraient être effectués en utilisant une éponge (Weck-Cel ophthalmic sponge) qui permet de récolter le mucus sans avoir de dilution comme c'est le cas avec les CVL.(331) Ensuite, la concentration des β -défensines pourraient être mesurée par ÉLISA (des kits commerciaux sont d'ailleurs disponibles pour mesurer les β -défensine 2 à 4).

Dans un deuxième temps, pour expliquer les différences au niveau des cytokines et chimiokines observées, il faudrait caractériser et comparer les populations cellulaires présentes dans le tractus génital des TS VIH positives, des TS VIH négatives et des

femmes contrôles VIH négatives. Cela permettra aussi d'avoir une analyse de la composition cellulaire du tractus génital féminin. Il est important de comprendre l'immunité naturelle du tractus génital dans le but de développer un microbicide ou un vaccin « mucosal » efficace. En effet, pour qu'une telle stratégie soit efficace, il ne faut pas activer ou masquer des cellules immunitaires importantes dans la protection naturelle. De plus, grâce à nos trois groupes, une analyse comparative pourrait nous permettre de voir si certaines populations cellulaires sont impliquées dans la susceptibilité à l'infection au VIH. Malheureusement, puisqu'avec une cytobrosse et un lavage cervico-vaginal on obtient qu'un nombre restreint de cellules immunitaires (environ 10^5 cellules pour la cytobrosse et 10^6 pour le CVL), il est clair que toutes ces analyses ne pourront pas être faites en une seule étape. De plus, les cellules vaginales humaines sont en générales des cellules très fragiles, et il peut être très difficile de les analyser après la congélation. 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 d'une étude de ce genre. Il faudra donc commencer notre étude en privilégiant un ou deux types de cellules. À la lumière des résultats cytokines et chimiokines obtenus, il faudrait commencer par l'analyse des monocytes et des cellules T. De plus, le rôle des cellules épithéliales dans l'immunité du tractus génital féminin est particulièrement important. Ces cellules peuvent agir comme des APC et produire plusieurs des cytokines et chimiokines que nous avons observées dans cette étude. Par contre, leur rôle dans la transmission du VIH est encore obscur. Caractériser l'expression des TLR ainsi que des marqueurs présents à leur surface donneraient des informations supplémentaires importantes.

Dans un troisième temps, une analyse des chimiokines et cytokines intracellulaires dans ces populations cellulaires pourrait être effectuée pour déterminer quelles sont les populations exactes qui produisent les cytokines et chimiokines observées dans notre étude.

Une des faiblesses de la présente étude est l'impossibilité de déterminer si les facteurs observés chez les TS VIH+ sont l'effet ou la cause de la présence du VIH. Une étude longitudinale d'ESN qu'on pourrait suivre dans le temps avec des mesures d'incidence serait particulièrement intéressante à étudier. Les expériences, effectuées dans notre étude ainsi que celles proposées ci-haut, effectuées dans une telle cohorte apporteraient des informations précieuses sur l'environnement immunitaires vaginales à différents temps mais nous donnerait également des indicateurs nous permettant de déterminer si ces facteurs (de la présence de HLA-G ou des cytokines et chimiokines)

sont le résultat de la présence du VIH ou s'ils ont un impact sur la susceptibilité à l'infection et la vitesse de progression de la maladie.

Les études chez le singe ont démontré que, chez les Sooty Mangabey, la non-progression du virus vers le SIDA pouvait être expliquée par un problème dans la voie des TLR qui diminue l'expression d'IFN- α par les pDC et donc n'entraîne pas d'activation du système immunitaire.(234) L'analyse génétique, par séquençage direct, des gènes TLR7 et 9 (les principaux impliqués dans la reconnaissance du VIH) ainsi que des gènes impliqués dans la cascade d'activation pour la production d'interféron de type 1 (MyD88 et IRF-7) pourraient également être intéressants pour tenter de comprendre si un processus semblable à celui observé chez les Sooty pourrait être impliqué dans le phénomène de protection observé chez les ESN.

Une étude de protéomique a également été commencée, en parallèle à ce projet, pour essayer de déterminer les protéines présentes dans le tractus génital féminin et déterminer celles qui pourraient influencer la susceptibilité à l'infection au VIH. Dans un premier temps, il nous faut donc terminer l'investigation des protéines présentes dans les CVL, en faire l'analyse et le séquençage pour s'assurer des protéines présentes. Ensuite, il nous faudra élaborer des tests ÉLISA pour regarder et comparer l'expression de ces protéines dans le tractus génital de nos trois groupes de femmes.

RÉFÉRENCES

- (1) Rapport de l'épidémie mondiale du SIDA 2008. **2009**.
- (2) Van Damme L, Ramjee G, Alary M, et al. Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* **2002 Sep 28**;360(9338):971-7.
- (3) Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol* **2006 Jun**;27(6):274-81.
- (4) Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* **2008 Jan**;1(1):31-7.
- (5) Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* **2005 Aug**;206:32-63.
- (6) Hein WR. Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr Top Microbiol Immunol* **1999**;236:1-15.
- (7) Cesta MF. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol Pathol* **2006**;34(5):599-608.
- (8) Iijima N, Thompson JM, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol* **2008 Nov**;1(6):451-9.
- (9) Elaine N Marieb. Anatomie et physiologie humaines. Éditions du nouveau pédagogique ed. **1922**. p. 932-73.
- (10) Shin LY, Kaul R. Stay it with flora: maintaining vaginal health as a possible avenue for prevention of human immunodeficiency virus acquisition. *J Infect Dis* **2008 May 15**;197(10):1355-7.
- (11) Larsen B, Galask RP. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann Intern Med* **1982 Jun**;96(6 Pt 2):926-30.
- (12) Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2007 Jun**;21(3):347-54.
- (13) Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis* **2001 Feb 15**;32(4):e69-e77.
- (14) Patton DL, Thwin SS, Meier A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA. Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* **2000 Oct**;183(4):967-73.
- (15) Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* **2000 Jun**;30(6):901-7.

- (16) Hirata T, Osuga Y, Hirota Y, et al. Evidence for the presence of toll-like receptor 4 system in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **2005 Jan**;90(1):548-56.
- (17) King AE, Critchley HO, Kelly RW. Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. *Mol Hum Reprod* **2000 Feb**;6(2):191-6.
- (18) King AE, Fleming DC, Critchley HO, Kelly RW. Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium. *J Reprod Immunol* **2003 Jun**;59(1):1-16.
- (19) Marian R. Neutra, Jean-Pierre Kraehenbuhl. Cellular and molecular basis for antigen transport across epithelial barriers. Third Edition ed. Elsevier, **2005**. p. 111-29.
- (20) Vetvicka V, Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R. Effects of microflora antigens on lymphocyte migration patterns in germfree and conventional rats. *Folia Biol (Praha)* **1983**;29(6):412-8.
- (21) Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* **2004 May 15**;93(2-3):97-108.
- (22) Cole AM. Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr Top Microbiol Immunol* **2006**;306:199-230.
- (23) Hashemi FB, Mollenhauer J, Madsen LD, et al. Myeloid-related protein (MRP)-8 from cervico-vaginal secretions activates HIV replication. *AIDS* **2001 Mar 9**;15(4):441-9.
- (24) Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* **2005 Aug**;206:306-35.
- (25) McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, Wahl SM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* **1997 Aug 1**;90(3):1141-9.
- (26) Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y, et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999 Mar 16**;96(6):2678-81.
- (27) Hein M, Valore EV, Helmig RB, Uldbjerg N, Ganz T. Antimicrobial factors in the cervical mucus plug. *Am J Obstet Gynecol* **2002 Jul**;187(1):137-44.
- (28) Sorensen OE, Gram L, Johnsen AH, et al. Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem* **2003 Aug 1**;278(31):28540-6.
- (29) Charles A Janeway, Paul Travers. *Immunobiologie*. DeBoeck Université, **1996**. p. 7-25.

- (30) Liles WC, Van Voorhis WC. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J Infect Dis* **1995 Dec**;172(6):1573-80.
- (31) Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* **2002 Oct**;22(10):1067-8.
- (32) Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* **1998 Sep** **11**;273(37):23799-804.
- (33) Gravitt PE, Hildesheim A, Herrero R, et al. Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in cervical secretions. *J Clin Immunol* **2003 May**;23(3):175-83.
- (34) Lieberman JA, Moscicki AB, Sumerel JL, Ma Y, Scott ME. Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates. *Clin Vaccine Immunol* **2008 Jan**;15(1):49-54.
- (35) Prabhala RH, Wira CR. Sex hormone and IL-6 regulation of antigen presentation in the female reproductive tract mucosal tissues. *J Immunol* **1995 Dec** **15**;155(12):5566-73.
- (36) Ljunggren G, Anderson DJ. Cytokine induced modulation of MHC class I and class II molecules on human cervical epithelial cells. *J Reprod Immunol* **1998 Jul**;38(2):123-38.
- (37) Suresh P, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Spontaneous and antigen-induced chemokine production in exposed but uninfected partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2007 Feb**;23(2):261-8.
- (38) Hirbod T, Nilsson J, Andersson S, et al. Upregulation of interferon-alpha and RANTES in the cervix of HIV-1-seronegative women with high-risk behavior. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006 Oct** **1**;43(2):137-43.
- (39) Novak RM, Donoval BA, Graham PJ, et al. Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginoses in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. *Clin Vaccine Immunol* **2007 Sep**;14(9):1102-7.
- (40) Iqbal SM, Ball TB, Kimani J, et al. Elevated T cell counts and RANTES expression in the genital mucosa of HIV-1-resistant Kenyan commercial sex workers. *J Infect Dis* **2005 Sep** **1**;192(5):728-38.
- (41) Zapata W, Rodriguez B, Weber J, et al. Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals. *Curr HIV Res* **2008 Nov**;6(6):531-8.
- (42) Crane-Godreau MA, Wira CR. CCL20/macrophage inflammatory protein 3alpha and tumor necrosis factor alpha production by primary uterine epithelial cells in response to treatment with lipopolysaccharide or Pam3Cys. *Infect Immun* **2005 Jan**;73(1):476-84.

- (43) Hoover DM, Boulegue C, Yang D, et al. The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem* **2002 Oct 4**;277(40):37647-54.
- (44) Blanpain C, Migeotte I, Lee B, et al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood* **1999 Sep 15**;94(6):1899-905.
- (45) Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **2003 Jun 1**;21 Suppl 2:S12-S23.
- (46) Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* **2005 Jun**;20(6):1439-46.
- (47) Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol* **2002 Mar 1**;168(5):2424-32.
- (48) Herbst-Kralovetz MM, Quayle AJ, Ficarra M, et al. Quantification and comparison of toll-like receptor expression and responsiveness in primary and immortalized human female lower genital tract epithelia. *Am J Reprod Immunol* **2008 Mar**;59(3):212-24.
- (49) Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod* **2005 May**;20(5):1372-8.
- (50) Aflatoonian R, Fazeli A. Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression. *J Reprod Immunol* **2008 Jan**;77(1):7-13.
- (51) Nurkkala M, Nordstrom I, Telemo E, Eriksson K. MHC expression and chemokine production in the murine vagina following intra-vaginal administration of ligands to toll-like receptors 3, 7 and 9. *J Reprod Immunol* **2007 Apr**;73(2):148-57.
- (52) Wira CR, Rossoll RM, Kaushic C. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of estradiol on antigen presentation by vaginal cells. *Endocrinology* **2000 Aug**;141(8):2877-85.
- (53) Butler M, Ng CY, van Heel DA, et al. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *Eur J Immunol* **2006 Apr**;36(4):864-74.
- (54) Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **2005 May**;6(5):507-14.
- (55) Rimoldi M, Chieppa M, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* **2004 Dec**;1029:66-74.
- (56) Pudney J, Quayle AJ, Anderson DJ. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol Reprod* **2005 Dec**;73(6):1253-63.
- (57) Iijima N, Thompson JM, Iwasaki A. Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol* **2008 Nov**;1(6):451-9.

- (58) Prakash M, Kapembwa MS, Gotch F, Patterson S. Chemokine receptor expression on mucosal dendritic cells from the endocervix of healthy women. *J Infect Dis* **2004 Jul 15**;190(2):246-50.
- (59) Ildgruben AK, Sjoberg IM, Hammarstrom ML. Influence of hormonal contraceptives on the immune cells and thickness of human vaginal epithelium. *Obstet Gynecol* **2003 Sep**;102(3):571-82.
- (60) Kaul R, Pettengell C, Sheth PM, et al. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. *J Reprod Immunol* **2008 Jan**;77(1):32-40.
- (61) Wieser F, Hosmann J, Tschugguel W, Czerwenka K, Sedivy R, Huber JC. Progesterone increases the number of Langerhans cells in human vaginal epithelium. *Fertil Steril* **2001 Jun**;75(6):1234-5.
- (62) Sentman CL, Wira CR, Eriksson M. NK cell function in the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* **2007 Feb**;57(2):108-15.
- (63) Mselle TF, Meadows SK, Eriksson M, et al. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin Immunol* **2007 Jul**;124(1):69-76.
- (64) Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* **2003 Oct 20**;198(8):1201-12.
- (65) Johansson EL, Rudin A, Wassen L, Holmgren J. Distribution of lymphocytes and adhesion molecules in human cervix and vagina. *Immunology* **1999 Feb**;96(2):272-7.
- (66) Johansson M, Lycke NY. Immunology of the human genital tract. *Curr Opin Infect Dis* **2003 Feb**;16(1):43-9.
- (67) Kutteh WH, Mestecky J, Wira CR. Mucosal immunity in the human female reproductive tract. 2 ed. Elsevier, **2005**. p. 1631-46.
- (68) Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* **2007 Jul 26**;25(30):5467-84.
- (69) van Odijk J, Kull I, Borres MP, et al. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* **2003 Sep**;58(9):833-43.
- (70) Prohaska TR, Albrecht G, Levy JA, Sugrue N, Kim JH. Determinants of self-perceived risk for AIDS. *J Health Soc Behav* **1990 Dec**;31(4):384-94.
- (71) Ahlburg DA, Jensen ER, Perez AE. Determinants of extramarital sex in the Philippines. *Health Transit Rev* **1997**;7 Suppl:467-79.
- (72) McClelland RS, Lavreys L, Hassan WM, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Baeten JM. Vaginal washing and increased risk of HIV-1 acquisition among African women: a 10-year prospective study. *AIDS* **2006 Jan 9**;20(2):269-73.

- (73) Hilber AM, Chersich MF, van de Wijgert JH, Rees H, Temmerman M. Vaginal practices, microbicides and HIV: what do we need to know? *Sex Transm Infect* **2007 Dec**;83(7):505-8.
- (74) Royce RA, Sena A, Cates W, Jr., Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* **1997 Apr 10**;336(15):1072-8.
- (75) Miller CJ, Lu FX. Anti-HIV and -SIV immunity in the vagina. *Int Rev Immunol* **2003 Jan**;22(1):65-76.
- (76) Lawn SD, Subbarao S, Wright TC, Jr., et al. Correlation between human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in the female genital tract and immune activation associated with ulceration of the cervix. *J Infect Dis* **2000 Jun**;181(6):1950-6.
- (77) Rebbapragada A, Howe K, Wachih C, et al. Bacterial vaginosis in HIV-infected women induces reversible alterations in the cervical immune environment. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2008 Dec 15**;49(5):520-2.
- (78) Rebbapragada A, Wachih C, Pettengell C, et al. Negative mucosal synergy between Herpes simplex type 2 and HIV in the female genital tract. *AIDS* **2007 Mar 12**;21(5):589-98.
- (79) Karp G, Schlaeffer F, Jotkowitz A, Riesenber K. Syphilis and HIV co-infection. *Eur J Intern Med* **2009 Jan**;20(1):9-13.
- (80) Corey L, Wald A, Celum CL, Quinn TC. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2004 Apr 15**;35(5):435-45.
- (81) Mbopi Keou FX, Gresenguet G, Mayaud P, et al. Genital herpes simplex virus type 2 shedding is increased in HIV-infected women in Africa. *AIDS* **1999 Mar 11**;13(4):536-7.
- (82) Watson-Jones D, Weiss HA, Rusizoka M, et al. Effect of herpes simplex suppression on incidence of HIV among women in Tanzania. *N Engl J Med* **2008 Apr 10**;358(15):1560-71.
- (83) Baeten JM, Strick LB, Lucchetti A, et al. Herpes simplex virus (HSV)-suppressive therapy decreases plasma and genital HIV-1 levels in HSV-2/HIV-1 coinfecting women: a randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *J Infect Dis* **2008 Dec 15**;198(12):1804-8.
- (84) LeGoff J, Weiss HA, Gresenguet G, et al. Cervicovaginal HIV-1 and herpes simplex virus type 2 shedding during genital ulcer disease episodes. *AIDS* **2007 Jul 31**;21(12):1569-78.
- (85) Sellati TJ, Wilkinson DA, Sheffield JS, Koup RA, Radolf JD, Norgard MV. Virulent *Treponema pallidum*, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **2000 Jan**;181(1):283-93.
- (86) Behbahani H, Walther-Jallow L, Klareskog E, et al. Proinflammatory and type 1 cytokine expression in cervical mucosa during HIV-1 and human papillomavirus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007 May 1**;45(1):9-19.

- (87) Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, III, Genco CA. Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect Immun* **2001 Sep**;69(9):5840-8.
- (88) WHO; global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. **2009**.
- (89) de la TE, Mulla MJ, Yu AG, Lee SJ, Kavathas PB, Abrahams VM. Chlamydia trachomatis infection modulates trophoblast cytokine/chemokine production. *J Immunol* **2009 Mar 15**;182(6):3735-45.
- (90) Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, et al. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun* **2006 Oct**;74(10):5773-9.
- (91) Vachot L, Williams VG, Bess JW, Jr., Lifson JD, Robbiani M. *Candida albicans*-induced DC activation partially restricts HIV amplification in DCs and increases DC to T-cell spread of HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2008 Aug 1**;48(4):398-407.
- (92) Yasodhara P, Raghunath M, Sreeramulu D, Venu L, Hemalatha R, Krishna TP. Local immunity in Indian women with bacterial vaginosis. *J Reprod Immunol* **2006 Jun**;70(1-2):133-41.
- (93) Spear GT, St John E, Zariffard MR. Bacterial vaginosis and human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Ther* **2007**;4:25.
- (94) Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **1984 Dec 20**;312(5996):763-7.
- (95) Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **1986 Nov 7**;47(3):333-48.
- (96) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **1996 May 10**;272(5263):872-7.
- (97) Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **1996 Jun 20**;381(6584):667-73.
- (98) Paxton WA, Liu R, Kang S, et al. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* **1998 Apr 25**;244(1):66-73.
- (99) Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **1996 Aug 9**;86(3):367-77.
- (100) Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Genetic restriction of HIV-1 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* **1996 Sep 27**;273(5283):1856-62.

- (101) Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **1996 Aug 22**;382(6593):722-5.
- (102) Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien SJ, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am J Hum Genet* **1997 Dec**;61(6):1261-7.
- (103) Quillent C, Oberlin E, Braun J, et al. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* **1998 Jan 3**;351(9095):14-8.
- (104) Lama J, Planelles V. Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression. *Retrovirology* **2007**;4:52.
- (105) Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **1995 Dec 15**;270(5243):1811-5.
- (106) Paxton WA, Kang S. Chemokine receptor allelic polymorphisms: relationships to HIV resistance and disease progression. *Semin Immunol* **1998 Jun**;10(3):187-94.
- (107) Paxton WA, Kang S, Liu R, et al. HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes with relation to beta-chemokines and the CCR5 coreceptor. *Immunol Lett* **1999 Mar**;66(1-3):71-5.
- (108) Paxton WA, Kang S, Koup RA. The HIV type 1 coreceptor CCR5 and its role in viral transmission and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1998 Apr**;14 Suppl 1:S89-S92.
- (109) Paxton WA, Neumann AU, Kang S, et al. RANTES production from CD4+ lymphocytes correlates with host genotype and rates of human immunodeficiency virus type 1 disease progression. *J Infect Dis* **2001 Jun 1**;183(11):1678-81.
- (110) Paxton WA, Martin SR, Tse D, et al. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med* **1996 Apr**;2(4):412-7.
- (111) Koning FA, Jansen CA, Dekker J, et al. Correlates of resistance to HIV-1 infection in homosexual men with high-risk sexual behaviour. *AIDS* **2004 May 21**;18(8):1117-26.
- (112) Modi WS, Lautenberger J, An P, et al. Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression. *Am J Hum Genet* **2006 Jul**;79(1):120-8.
- (113) Shao W, Tang J, Song W, et al. CCL3L1 and CCL4L1: variable gene copy number in adolescents with and without human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *Genes Immun* **2007 Apr**;8(3):224-31.
- (114) Dolan MJ, Kulkarni H, Camargo JF, et al. CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms. *Nat Immunol* **2007 Dec**;8(12):1324-36.

- (115) Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* **2005 Mar 4**;307(5714):1434-40.
- (116) Colobran R, Adreani P, Ashhab Y, et al. Multiple products derived from two CCL4 loci: high incidence of a new polymorphism in HIV+ patients. *J Immunol* **2005 May 1**;174(9):5655-64.
- (117) Jang DH, Choi BS, Kim SS. The effects of RANTES/CCR5 promoter polymorphisms on HIV disease progression in HIV-infected Koreans. *Int J Immunogenet* **2008 Apr**;35(2):101-5.
- (118) Zhao XY, Lee SS, Wong KH, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the RANTES promoter region in healthy and HIV-infected indigenous Chinese. *Eur J Immunogenet* **2004 Aug**;31(4):179-83.
- (119) Vidal F, Peraire J, Domingo P, et al. Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term nonprogressive HIV-1 infection of more than 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006 Jan 1**;41(1):17-22.
- (120) McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, et al. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* **2000 Dec 1**;14(17):2671-8.
- (121) Fernandez RM, Borrego S, Marcos I, Rubio A, Lissen E, Antinolo G. Fluorescence resonance energy transfer analysis of the RANTES polymorphisms -403G --> A and -28G --> C: evaluation of both variants as susceptibility factors to HIV type 1 infection in the Spanish population. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2003 May**;19(5):349-52.
- (122) Koning FA, Jansen CA, Dekker J, et al. Correlates of resistance to HIV-1 infection in homosexual men with high-risk sexual behaviour. *AIDS* **2004 May 21**;18(8):1117-26.
- (123) Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002 Oct 15**;99(21):13795-800.
- (124) Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* **1995 Oct 7**;346(8980):941-3.
- (125) Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* **1995 Apr 8**;345(8954):886-9.
- (126) Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* **1995 Sep 15**;155(6):3013-20.
- (127) Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* **1994**;40(1):37-44.

- (128) Garred P, Madsen HO, Balslev U, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* **1997 Jan 25**;349(9047):236-40.
- (129) Boniotto M, Crovella S, Pirulli D, et al. Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. *Genes Immun* **2000 Jun**;1(5):346-8.
- (130) Geijtenbeek TB, Known DS, Torensma R et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **2000 Mar3**;100(5):587-597.
- (131) Martin MP, Lederman MM, Hutcheson HB, et al. Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **2004 Dec**;78(24):14053-6.
- (132) Liu H, Hwangbo Y, Holte S, et al. Analysis of genetic polymorphisms in CCR5, CCR2, stromal cell-derived factor-1, RANTES, and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin in seronegative individuals repeatedly exposed to HIV-1. *J Infect Dis* **2004 Sep 15**;190(6):1055-8.
- (133) Rathore A, Chatterjee A, Sivarama P, Yamamoto N, Dhole TN. Role of homozygous DC-SIGNR 5/5 tandem repeat polymorphism in HIV-1 exposed seronegative North Indian individuals. *J Clin Immunol* **2008 Jan**;28(1):50-7.
- (134) Liu H, Carrington M, Wang C, et al. Repeat-region polymorphisms in the gene for the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related molecule: effects on HIV-1 susceptibility. *J Infect Dis* **2006 Mar 1**;193(5):698-702.
- (135) Singh P, Kaur G, Sharma G, Mehra NK. Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression. *Vaccine* **2008 Jun 6**;26(24):2966-80.
- (136) Soriano A, Lozano F, Oliva H, et al. Polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS. *Immunogenetics* **2005 Oct**;57(9):644-54.
- (137) Ricci E, Malacrida S, Zanchetta M, Montagna M, Giaquinto C, De Rossi A. Role of beta-defensin-1 polymorphisms in mother-to-child transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2009 May 1**;51(1):13-9.
- (138) Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **2003 Jun 13**;113(6):803-9.
- (139) Valcke HS, Bernard NF, Bruneau J, Alary M, Tsoukas CM, Roger M. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed Caucasians. *AIDS* **2006 Oct 3**;20(15):1984-6.
- (140) Jennes W, Verheyden S, Demanet C, 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 Nov 15**;177(10):6588-92.
- (141) Ravet S, Scott-Algara D, Bonnet E, et al. Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals. *Blood* **2007 May 15**;109(10):4296-305.

- (142) Boulet S, Sharafi S, Simic N, et al. Increased proportion of KIR3DS1 homozygotes in HIV-exposed uninfected individuals. *AIDS* **2008 Mar 12**;22(5):595-9.
- (143) MacDonald KS, Embree J, Njenga S, et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* **1998 Mar**;177(3):551-6.
- (144) Polycarpou A, Ntais C, Korber BT, et al. Association between maternal and infant class I and II HLA alleles and of their concordance with the risk of perinatal HIV type 1 transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2002 Jul 20**;18(11):741-6.
- (145) Dorak MT, Tang J, Penman-Aguilar A, et al. Transmission of HIV-1 and HLA-B allele-sharing within serodiscordant heterosexual Zambian couples. *Lancet* **2004 Jun 26**;363(9427):2137-9.
- (146) MacDonald KS, Fowke KR, Kimani J, et al. Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **2000 May**;181(5):1581-9.
- (147) Beyrer C, Artenstein AW, Rugpao S, et al. Epidemiologic and biologic characterization of a cohort of human immunodeficiency virus type 1 highly exposed, persistently seronegative female sex workers in northern Thailand. Chiang Mai HEPS Working Group. *J Infect Dis* **1999 Jan**;179(1):59-67.
- (148) Rohowsky-Kochan C, Skurnick J, Molinaro D, Louria D. HLA antigens associated with susceptibility/resistance to HIV-1 infection. *Hum Immunol* **1998 Dec**;59(12):802-15.
- (149) Liu C, Carrington M, Kaslow RA, et al. Association of polymorphisms in human leukocyte antigen class I and transporter associated with antigen processing genes with resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **2003 May 1**;187(9):1404-10.
- (150) Winchester R, Chen Y, Rose S, Selby J, Borkowsky W. Major histocompatibility complex class II DR alleles DRB1*1501 and those encoding HLA-DR13 are preferentially associated with a diminution in maternally transmitted human immunodeficiency virus 1 infection in different ethnic groups: determination by an automated sequence-based typing method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995 Dec 19**;92(26):12374-8.
- (151) Ahmed SM, Al Doujaily H, Johnson MA, Kitchen V, Reid WM, Poulter LW. Immunity in the female lower genital tract and the impact of HIV infection. *Scand J Immunol* **2001 Jul**;54(1-2):225-38.
- (152) Kaplan C, Muller JY, Doinel C, et al. HLA-associated susceptibility to acquired immune deficiency syndrome in HIV-1-seropositive subjects. *Hum Hered* **1990**;40(5):290-8.
- (153) Louie LG, Newman B, King MC. Influence of host genotype on progression to AIDS among HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* **1991**;4(8):814-8.
- (154) McNeil AJ, Yap PL, Gore SM, et al. Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. *QJM* **1996 Mar**;89(3):177-85.

- (155) Kaslow RA, Carrington M, Apple R, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* **1996 Apr**;2(4):405-11.
- (156) Keet IP, Tang J, Klein MR, et al. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis* **1999 Aug**;180(2):299-309.
- (157) Donald JA, Rudman K, Cooper DW, et al. Progression of HIV-related disease is associated with HLA DQ and DR alleles defined by restriction fragment length polymorphisms. *Tissue Antigens* **1992 May**;39(5):241-8.
- (158) Steel CM, Ludlam CA, Beatson D, et al. HLA haplotype A1 B8 DR3 as a risk factor for HIV-related disease. *Lancet* **1988 May 28**;1(8596):1185-8.
- (159) Fabio G, Smeraldi RS, Gringeri A, Marchini M, Bonara P, Mannucci PM. Susceptibility to HIV infection and AIDS in Italian haemophiliacs is HLA associated. *Br J Haematol* **1990 Aug**;75(4):531-6.
- (160) Kaslow RA, Duquesnoy R, VanRaden M, et al. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Lancet* **1990 Apr 21**;335(8695):927-30.
- (161) Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **1999 Mar 12**;283(5408):1748-52.
- (162) Tang J, Tang S, Lobashevsky E, et al. Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **2002 Aug**;76(16):8276-84.
- (163) Just JJ, Casabona J, Bertran J, et al. MHC class II alleles associated with clinical and immunological manifestations of HIV-1 infection among children in Catalonia, Spain. *Tissue Antigens* **1996 Apr**;47(4):313-8.
- (164) Cameron PU, Mallal SA, French MA, Dawkins RL. Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* **1990 Dec**;29(4):282-95.
- (165) Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998 Apr 28**;95(9):5199-204.
- (166) Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **1998 Feb 19**;391(6669):795-9.
- (167) Strong RK, Holmes MA, Li P, Braun L, Lee N, Geraghty DE. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* **2003 Feb 14**;278(7):5082-90.
- (168) Nattermann J, Nischalke HD, Hofmeister V, et al. HIV-1 infection leads to increased HLA-E expression resulting in impaired function of natural killer cells. *Antivir Ther* **2005**;10(1):95-107.

- (169) Ishitani A, Geraghty DE. 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* **1992 May 1**;89(9):3947-51.
- (170) Sheu JJ, Shih I. Clinical and biological significance of HLA-G expression in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol* **2007 Dec**;17(6):436-43.
- (171) Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* **2006 Oct**;21(10):2538-44.
- (172) Sheshgiri R, Rao V, Tumiati LC, et al. Progesterone induces human leukocyte antigen-g expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circulation* **2008 Sep 30**;118(14 Suppl):S58-S64.
- (173) Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, Carosella ED. 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* **2001 Oct 9**;98(21):12150-5.
- (174) Bahri R, Naji A, Menier C, et al. Dendritic Cells Secrete the Immunosuppressive HLA-G Molecule upon CTLA4-Ig Treatment: Implication in Human Renal Transplant Acceptance. *J Immunol* **2009 Dec 1**;183(11):7054-62.
- (175) Rebmann V, van d, V, Passler M, Pfeiffer K, Krebs D, Grosse-Wilde H. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* **2001 Jan**;57(1):15-21.
- (176) Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* **2004 Jul**;64(1):66-9.
- (177) Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A, Baricordi OR. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* **2004 Jun**;56(3):135-41.
- (178) Bainbridge DR, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J Reprod Immunol* **2000 Aug**;48(1):17-26.
- (179) LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004 May 4**;101(18):7064-9.
- (180) Park GM, Lee S, Park B, et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* **2004 Jan 16**;313(3):606-11.
- (181) van der MA, Lukassen HG, van Cranenbroek B, et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. *Mol Hum Reprod* **2007 Feb**;13(2):123-33.
- (182) van der MA, Lukassen HG, van Lierop MJ, et al. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* **2004 Mar**;10(3):189-95.

- (183) Rajagopalan S, Bryceson YT, Kuppusamy SP, et al. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol* **2006 Jan**;4(1):e9.
- (184) Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **1998 Jan 22**;391(6665):397-401.
- (185) Strebel K, Bour S. Molecular interactions of HIV with host factors. *AIDS* **1999**;13 Suppl A:S13-S24.
- (186) Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS* **2002 Feb 15**;16(3):347-51.
- (187) Cabello A, Rivero A, Garcia MJ, et al. HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. *Hum Immunol* **2003 Nov**;64(11):1045-9.
- (188) Rivero A, Lozano JM, Gonzalez R, et al. 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* **2007 Apr**;68(4):303-6.
- (189) Donaghy L, Gros F, Amiot L, 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. *Clin Exp Immunol* **2007 Feb**;147(2):236-40.
- (190) Derrien M, Pizzato N, Dolcini G, et al. Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J Gen Virol* **2004 Jul**;85(Pt 7):1945-54.
- (191) Pizzato N, Derrien M, Lenfant F. The short cytoplasmic tail of HLA-G determines its resistance to HIV-1 Nef-mediated cell surface downregulation. *Hum Immunol* **2004 Nov**;65(11):1389-96.
- (192) Aikhionbare FO, Hodge T, Kuhn L, Bulterys M, Abrams EJ, Bond VC. Mother-to-child discordance in HLA-G exon 2 is associated with a reduced risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS* **2001 Nov 9**;15(16):2196-8.
- (193) Aikhionbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, Bond VC. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 transmission. *AIDS Res Ther* **2006**;3:28.
- (194) Fabris A, Catamo E, Segat L, et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* **2009 Jan 14**;23(2):177-82.
- (195) Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* **2003 Nov**;64(11):1005-10.
- (196) Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* **2008 Oct**;72(4):335-41.

- (197) 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 Feb 20**;18(3):427-31.
- (198) Mercure L, Wainberg MA. Direct involvement of extracellular HIV-1 virions in the apoptosis of CD8+ lymphocytes: a two-step model. *Med Hypotheses* **1994 Mar**;42(3):159-68.
- (199) Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **1995 Jan 27**;267(5197):483-9.
- (200) Couillin I, Culmann-Penciolelli B, Gomard E, et al. Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein. *J Exp Med* **1994 Sep 1**;180(3):1129-34.
- (201) Le GS, Erdtmann L, Benichou S, et al. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **1998 Apr**;8(4):483-95.
- (202) Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, et al. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* **1997 Apr 7**;185(7):1295-305.
- (203) Terwilliger EF, Cohen EA, Lu YC, Sodroski JG, Haseltine WA. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989 Jul**;86(13):5163-7.
- (204) Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* **1992 Dec**;66(12):7193-200.
- (205) 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 Aug 8**;418(6898):646-50.
- (206) Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* **2003 Nov**;9(11):1404-7.
- (207) Collins KL, Baltimore D. HIV's evasion of the cellular immune response. *Immunol Rev* **1999 Apr**;168:65-74.
- (208) Goulder PJ, Walker BD. The great escape - AIDS viruses and immune control. *Nat Med* **1999 Nov**;5(11):1233-5.
- (209) Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **1993 Aug**;6(8):904-12.
- (210) Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T

lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* **1999 Apr**;179(4):859-70.

- (211) Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **2006 Dec**;12(12):1365-71.
- (212) Azzoni L, Papasavvas E, Chehimi J, et al. Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* **2002 Jun 1**;168(11):5764-70.
- (213) Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* **2002 Dec 1**;169(11):6376-85.
- (214) Kannanganat S, Kapogiannis BG, Ibegbu C, et al. Human immunodeficiency virus type 1 controllers but not noncontrollers maintain CD4 T cells coexpressing three cytokines. *J Virol* **2007 Nov**;81(21):12071-6.
- (215) Koesters SA, Alimonti JB, Wachih C, et al. IL-7Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. *Eur J Immunol* **2006 Feb**;36(2):336-44.
- (216) Vlad G, Piazza F, Colovai A, et al. Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum Immunol* **2003 May**;64(5):483-9.
- (217) Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Schramm DB, et al. Host CCL3L1 gene copy number in relation to HIV-1-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses and viral load in South African women. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2008 Jul 1**;48(3):245-54.
- (218) Brito A, Almeida A, Gonzalez CR, et al. Successful HAART is associated with high B-chemokine levels in chronic HIV type 1-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2007 Jul**;23(7):906-12.
- (219) Lackner AA, Mohan M, Veazey RS. The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* **2009 May**;136(6):1965-78.
- (220) Paiardini M, Frank I, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Rev* **2008 Jan**;10(1):36-46.
- (221) Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, et al. Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* **2003 Nov**;77(21):11708-17.
- (222) Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **2004 Sep 20**;200(6):749-59.

- (223) Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **2004 Sep 20**;200(6):761-70.
- (224) Brenchley JM, Knox KS, Asher AI, et al. High frequencies of polyfunctional HIV-specific T cells are associated with preservation of mucosal CD4 T cells in bronchoalveolar lavage. *Mucosal Immunol* **2008 Jan**;1(1):49-58.
- (225) Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **2008 Oct 1**;112(7):2826-35.
- (226) 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. *J Virol* **2003 May**;77(10):5621-31.
- (227) Sankaran S, George MD, Reay E, 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. *J Virol* **2008 Jan**;82(1):538-45.
- (228) Schulbin H, Bode H, Stocker H, et al. Cytokine expression in the colonic mucosa of human immunodeficiency virus-infected individuals before and during 9 months of antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **2008 Sep**;52(9):3377-84.
- (229) Pandrea I, Sodora DL, Silvestri G, Apetrei C. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol* **2008 Sep**;29(9):419-28.
- (230) Silvestri G. Immunity in natural SIV infections. *J Intern Med* **2009 Jan**;265(1):97-109.
- (231) Gordon SN, Klatt NR, Bosinger SE, et al. Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol* **2007 Sep 1**;179(5):3026-34.
- (232) Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, et al. Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J Immunol* **2007 Sep 1**;179(5):3035-46.
- (233) Pandrea I, Apetrei C, Gordon S, et al. Paucity of CD4+CCR5+ T cells is a typical feature of natural SIV hosts. *Blood* **2007 Feb 1**;109(3):1069-76.
- (234) Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH, et al. Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* **2008 Oct**;14(10):1077-87.
- (235) Brenchley JM, Douek DC. The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* **2008 May**;3(3):356-61.
- (236) Li Q, Duan L, Estes JD, et al. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **2005 Apr 28**;434(7037):1148-52.

- (237) Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **2005 Apr 28**;434(7037):1093-7.
- (238) Verhoeven D, Sankaran S, Silvey M, Dandekar S. Antiviral therapy during primary simian immunodeficiency virus infection fails to prevent acute loss of CD4+ T cells in gut mucosa but enhances their rapid restoration through central memory T cells. *J Virol* **2008 Apr**;82(8):4016-27.
- (239) Chase AJ, Sedaghat AR, German JR, et al. Severe depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* **2007 Dec**;81(23):12748-57.
- (240) Cecchinato V, Trindade CJ, Laurence A, et al. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunol* **2008 Jul**;1(4):279-88.
- (241) Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. Vaginal CD4+ T cells express high levels of CCR5 and are rapidly depleted in simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **2003 Mar 1**;187(5):769-76.
- (242) Stevceva L, Kelsall B, Nacsa J, et al. Cervicovaginal lamina propria lymphocytes: phenotypic characterization and their importance in cytotoxic T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus SIVmac251. *J Virol* **2002 Jan**;76(1):9-18.
- (243) 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. *J Virol* **2005 Oct**;79(19):12164-72.
- (244) Boily MC, Baggaley RF, Wang L, et al. Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Lancet Infect Dis* **2009 Feb**;9(2):118-29.
- (245) Hladik F, Hope TJ. HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* **2009 Feb**;6(1):20-8.
- (246) Dezzutti CS, Guenther PC, Cummins JE, Jr., et al. Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* **2001 Apr 15**;183(8):1204-13.
- (247) Wu Z, Chen Z, Phillips DM. Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission. *J Infect Dis* **2003 Nov 15**;188(10):1473-82.
- (248) Phillips DM, Tan X, Perotti ME, Zacharopoulos VR. Mechanism of monocyte-macrophage-mediated transmission of HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1998 Apr**;14 Suppl 1:S67-S70.
- (249) Shen R, Richter HE, Clements RH, et al. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **2009 Apr**;83(7):3258-67.

- (250) Howell AL, Edkins RD, Rier SE, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. *J Virol* **1997 May**;71(5):3498-506.
- (251) Hladik F, Sakchalathorn P, Ballweber L, et al. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* **2007 Feb**;26(2):257-70.
- (252) Bouschbacher M, Bomsel M, Verronese E, et al. Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. *AIDS* **2008 Jul 11**;22(11):1257-66.
- (253) Quayle AJ, Kourtis AP, Cu-Uvin S, et al. T-lymphocyte profile and total and virus-specific immunoglobulin concentrations in the cervix of HIV-1-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007 Mar 1**;44(3):292-8.
- (254) Spear GT, Zariffard MR, Chen HY, et al. Positive association between HIV RNA and IL-6 in the genital tract of Rwandan women. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2008 Jul**;24(7):973-6.
- (255) Cummins JE, Christensen L, Lennox JL, et al. Mucosal innate immune factors in the female genital tract are associated with vaginal HIV-1 shedding independent of plasma viral load. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2006 Aug**;22(8):788-95.
- (256) Gumbi PP, Nkwanyana NN, Bere A, et al. 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* **2008 Sep**;82(17):8529-36.
- (257) Narimatsu R, Wolday D, Patterson BK. IL-8 increases transmission of HIV type 1 in cervical explant tissue. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2005 Mar**;21(3):228-33.
- (258) Zara F, Nappi RE, Berra R, Migliavacca R, Maserati R, Spinillo A. Markers of local immunity in cervico-vaginal secretions of HIV infected women: implications for HIV shedding. *Sex Transm Infect* **2004 Apr**;80(2):108-12.
- (259) Bebell LM, Passmore JA, Williamson C, et al. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* **2008 Sep 1**;198(5):710-4.
- (260) Levinson P, Kaul R, Kimani J, et al. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *AIDS* **2009 Jan 28**;23(3):309-17.
- (261) Broliden K, Hinkula J, Devito C, et al. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol Lett* **2001 Nov 1**;79(1-2):29-36.
- (262) Devito C, Broliden K, Kaul R, et al. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol* **2000 Nov 1**;165(9):5170-6.
- (263) Filteau S. The HIV-exposed, uninfected African child. *Trop Med Int Health* **2009 Mar**;14(3):276-87.

- (264) Lopalco L, Barassi C, Pastori C, et al. CCR5-reactive antibodies in seronegative partners of HIV-seropositive individuals down-modulate surface CCR5 in vivo and neutralize the infectivity of R5 strains of HIV-1 In vitro. *J Immunol* **2000 Mar 15**;164(6):3426-33.
- (265) Lopalco L, Barassi C, Paolucci C, et al. Predictive value of anti-cell and anti-human immunodeficiency virus (HIV) humoral responses in HIV-1-exposed seronegative cohorts of European and Asian origin. *J Gen Virol* **2005 Feb**;86(Pt 2):339-48.
- (266) Devito C, Hinkula J, Kaul R, et al. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2002 Aug 1**;30(4):413-20.
- (267) Hirbod T, Broliden K, Kaul R. Genital immunoglobulin A and HIV-1 protection: virus neutralization versus specificity. *AIDS* **2008 Nov 12**;22(17):2401-2.
- (268) Hirbod T, Reichard C, Hasselrot K, et al. HIV-1 neutralizing activity is correlated with increased levels of chemokines in saliva of HIV-1-exposed uninfected individuals. *Curr HIV Res* **2008 Jan**;6(1):28-33.
- (269) Hirbod T, Kaul R, Reichard C, et al. HIV-neutralizing immunoglobulin A and HIV-specific proliferation are independently associated with reduced HIV acquisition in Kenyan sex workers. *AIDS* **2008 Mar 30**;22(6):727-35.
- (270) 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 Feb 16**;15(3):431-2.
- (271) Horton RE, Ball TB, Wachichi C, et al. Cervical HIV-specific IgA in a population of commercial sex workers correlates with repeated exposure but not resistance to HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2009 Jan**;25(1):83-92.
- (272) Zhu T, Corey L, Hwangbo Y, et al. Persistence of extraordinarily low levels of genetically homogeneous human immunodeficiency virus type 1 in exposed seronegative individuals. *J Virol* **2003 Jun**;77(11):6108-16.
- (273) Hirbod T, Broliden K. Mucosal immune responses in the genital tract of HIV-1-exposed uninfected women. *J Intern Med* **2007 Jul**;262(1):44-58.
- (274) Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F, Lo CS, Veas F, Clerici M. The 'immunologic advantage' of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* **2009 Jan 14**;23(2):161-75.
- (275) Erickson AL, Willberg CB, McMahan V, et al. Potentially exposed but uninfected individuals produce cytotoxic and polyfunctional human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell responses which can be defined to the epitope level. *Clin Vaccine Immunol* **2008 Nov**;15(11):1745-8.
- (276) Schenal M, Lo CS, Fasano F, et al. Distinct patterns of HIV-specific memory T lymphocytes in HIV-exposed uninfected individuals and in HIV-infected patients. *AIDS* **2005 Apr 29**;19(7):653-61.
- (277) Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, et al. New insights into HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, persistently seronegative Kenyan sex workers. *Immunol Lett* **2001 Nov 1**;79(1-2):3-13.

- (278) Montoya CJ, Velilla PA, Chougnet C, Landay AL, Rugeles MT. Increased IFN-gamma production by NK and CD3+/CD56+ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals. *Clin Immunol* **2006 Aug**;120(2):138-46.
- (279) Biasin M, Caputo SL, Speciale L, et al. Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. *J Infect Dis* **2000 Nov**;182(5):1365-74.
- (280) Trivedi HN, Plummer FA, Anzala AO, et al. Resistance to HIV-1 infection among African sex workers is associated with global hyporesponsiveness in interleukin 4 production. *FASEB J* **2001 Aug**;15(10):1795-7.
- (281) Ball TB, Ji H, Kimani J, et al. Polymorphisms in IRF-1 associated with resistance to HIV-1 infection in highly exposed uninfected Kenyan sex workers. *AIDS* **2007 May 31**;21(9):1091-101.
- (282) Burgener A, Boutilier J, Wachihi C, et al. Identification of differentially expressed proteins in the cervical mucosa of HIV-1-resistant sex workers. *J Proteome Res* **2008 Oct**;7(10):4446-54.
- (283) Kaul R, Rebbapragada A, Hirbod T, et al. Genital levels of soluble immune factors with anti-HIV activity may correlate with increased HIV susceptibility. *AIDS* **2008 Oct 1**;22(15):2049-51.
- (284) Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, et al. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002 Oct 15**;99(21):13795-800.
- (285) Michel Lafon. *Le Shona et Les Shonas du Zimbabwe*. L'Harmattan ed. **1996**.
- (286) Rudstein-Svetlicky N, Loewenthal R, Horejsi V, Gazit E. HLA-G levels in serum and plasma. *Tissue Antigens* **2007 Apr**;69 Suppl 1:140-2.
- (287) Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* **2007 Dec**;17(6):469-79.
- (288) Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* **1999 Aug**;11(8):1351-6.
- (289) Park GM, Lee S, Park B, et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* **2004 Jan 16**;313(3):606-11.
- (290) 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. *J Infect Dis* **2006 Jan 15**;193(2):298-301.
- (291) Lajoie J, Poudrier J, Massinga-Loembe M, 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 Jul**;1(4):309-16.

- (292) Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* **2003 May**;55(2):63-79.
- (293) Hackmon R, Hallak M, Krup M, et al. HLA-G antigen and parturition: maternal serum, fetal serum and amniotic fluid levels during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* **2004 Sep**;19(5):404-9.
- (294) Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* **1999 May**;11(5):803-11.
- (295) Li C, Houser BL, Nicotra ML, Strominger JL. 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* **2009 Apr 7**;106(14):5767-72.
- (296) Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* **1998 Mar 2**;187(5):813-8.
- (297) Maier S, Grzeschik M, Weiss EH, Ulbrecht M. Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Hum Immunol* **2000 Nov**;61(11):1059-65.
- (298) Llano M, Lee N, Navarro F, et al. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* **1998 Sep**;28(9):2854-63.
- (299) Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, Yamada M, Shirakura R. Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* **2002 May 27**;73(10):1582-9.
- (300) LeMaoult 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 J* **2005 Apr**;19(6):662-4.
- (301) Yu YR, Tian XH, Wang Y, Feng MF. Rapid production of human KIR2DL4 extracellular domain and verification of its interaction with HLA-G. *Biochemistry (Mosc)* **2006**;71 Suppl 1:S60-S65.
- (302) Le Discorde M, Le Danff C, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED. HLA-G*0105N null allele encodes functional HLA-G isoforms. *Biol Reprod* **2005 Aug**;73(2):280-8.
- (303) Romagnani C, Pietra G, Falco M, Mazzarino P, Moretta L, Mingari MC. HLA-E-restricted recognition of human cytomegalovirus by a subset of cytolytic T lymphocytes. *Hum Immunol* **2004 May**;65(5):437-45.
- (304) Moretta L, Romagnani C, Pietra G, Moretta A, Mingari MC. NK-CTLs, a novel HLA-E-restricted T-cell subset. *Trends Immunol* **2003 Mar**;24(3):136-43.
- (305) Romagnani C, Pietra G, Falco M, et al. Identification of HLA-E-specific alloreactive T lymphocytes: a cell subset that undergoes preferential expansion in mixed

lymphocyte culture and displays a broad cytolytic activity against allogeneic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002 Aug 20**;99(17):11328-33.

- (306) Michaelsson J, Teixeira dM, Achour A, Lanier LL, Karre K, Soderstrom K. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med* **2002 Dec 2**;196(11):1403-14.
- (307) Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, et al. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* **2000 Jun 15**;164(12):6100-4.
- (308) Gros F, Sebti Y, De Guibert S, et al. Soluble HLA-G molecules increase during acute leukemia, especially in subtypes affecting monocytic and lymphoid lineages. *Neoplasia* **2006 Mar**;8(3):223-30.
- (309) Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* **2006 Sep**;6(9):2152-6.
- (310) Sebti Y, Le Fric G, Pangault C, et al. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol* **2003 Nov**;64(11):1093-101.
- (311) Verbruggen LA, Rebmann V, Demanet C, De Cock S, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* **2006 Aug**;67(8):561-7.
- (312) Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **2008 Jun**;71(6):520-9.
- (313) Barel MT, Hassink GC, van Voorden S, Wiertz EJ. Human cytomegalovirus-encoded US2 and US11 target unassembled MHC class I heavy chains for degradation. *Mol Immunol* **2006 Mar**;43(8):1258-66.
- (314) Lajoie J, Fontaine J, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, Roger M. Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection. *AIDS* **2009 Jul 17**;23(11):1437-40.
- (315) Basta P, Mach P, Pitynski K, et al. Differences in the blood serum levels of soluble HLA-G concentrations between the menstrual cycle phases and menopause in patients with ovarian endometriosis and uterine leiomyoma. *Neuro Endocrinol Lett* **2009 Mar**;30(1):91-8.
- (316) Sharkey DJ, Macpherson AM, Tremellen KP, Robertson SA. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol Hum Reprod* **2007 Jul**;13(7):491-501.
- (317) Schuberth HJ, Taylor U, Zerbe H, Waberski D, Hunter R, Rath D. Immunological responses to semen in the female genital tract. *Theriogenology* **2008 Nov**;70(8):1174-81.
- (318) Clemetson DB, Moss GB, Willerford DM, et al. Detection of HIV DNA in cervical and vaginal secretions. Prevalence and correlates among women in Nairobi, Kenya. *JAMA* **1993 Jun 9**;269(22):2860-4.
- (319) George MD, Reay E, Sankaran S, Dandekar S. Early antiretroviral therapy for simian immunodeficiency virus infection leads to mucosal CD4+ T-cell restoration

- and enhanced gene expression regulating mucosal repair and regeneration. *J Virol* **2005 Mar**;79(5):2709-19.
- (320) Musey L, Hu Y, Eckert L, Christensen M, Karchmer T, McElrath MJ. HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women. *J Exp Med* **1997 Jan** **20**;185(2):293-303.
- (321) Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* **2005 Nov**;115(11):3265-75.
- (322) Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989 Apr**;86(7):2336-40.
- (323) Matsuyama T, Yoshiyama H, Hamamoto Y, et al. Enhancement of HIV replication and giant cell formation by tumor necrosis factor. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1989 Apr**;5(2):139-46.
- (324) Okamoto T, Matsuyama T, Mori S, et al. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression by tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retroviruses* **1989 Apr**;5(2):131-8.
- (325) Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, et al. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001 Apr** **24**;98(9):5199-204.
- (326) Lillard JW, Jr., Singh UP, Boyaka PN, Singh S, Taub DD, McGhee JR. MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. *Blood* **2003 Feb** **1**;101(3):807-14.
- (327) Chatterjee A, Rathore A, Dhole TN. Association of IL-4 589 C/T promoter and IL-4Ralpha150V receptor polymorphism with susceptibility to HIV-1 infection in North Indians. *J Med Virol* **2009 Jun**;81(6):959-65.
- (328) Chatterjee A, Rathore A, Sivarama P, Yamamoto N, Dhole TN. Genetic association of IL-10 gene promoter polymorphism and HIV-1 infection in North Indians. *J Clin Immunol* **2009 Jan**;29(1):71-7.
- (329) Khoo SH, Pepper L, Snowden N, et al. Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *AIDS* **1997 Mar** **15**;11(4):423-8.
- (330) Zhou J, Chen DQ, Poon VK, et al. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* **2009 Jun**;61(6):423-30.
- (331) Hildesheim A, McShane LM, Schiffman M, et al. Cytokine and immunoglobulin concentrations in cervical secretions: reproducibility of the Weick-cel collection instrument and correlates of immune measures. *J Immunol Methods* **1999 May** **27**;225(1-2):131-43.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser cette thèse et qui m'ont aidée et appuyée tout au long de mes études de doctorat.

Je veux premièrement adresser mes remerciements aux membres de l'équipe du Bénin. Sans votre dévouement et votre immense travail, ce projet n'aurait pas pu être réalisé. Un remerciement spécial à Marguerite pour tout son travail et ses efforts pour surmonter les embuches que nous causait parfois le projet.

Merci aux participantes sans qui une telle étude serait impossible à réaliser.

Je veux également remercier mon directeur de recherche le D^r Michel Roger, et ma co-directrice le D^r Annie-Claude Labbé pour leur soutien et les conseils qu'ils m'ont apportés au cours des cinq dernières années. Vous m'avez donné l'occasion de travailler sur un merveilleux projet et je vous en remercie.

Merci également au personnel actuel du laboratoire d'immunogénétique : Annie Jeanneau, Marie-Claude Faucher, Julie Fontaine, Andrée-Anne Boivin, Geneviève Boily-Larouche et Johanne Poudrier ainsi qu'à ceux qui sont partis du labo (Julie Lacaille, Han Sang Valke et Jean-Nicholas Roy). Merci pour votre aide précieuse. Grâce à votre présence les cinq dernières années ont été stimulantes et amusantes quotidiennement. Je vais me souvenir longtemps de toutes nos conversations engendrées par mon projet. J'ai été ravie de partager ce moment de vie avec vous et plusieurs d'entre vous êtes devenus des amis (es) sincères que je n'oublierai jamais. J'ai partagé avec certains de vous les 9 dernières années de ma vie, on en a vécu des choses ensemble! Merci d'avoir été là au quotidien dans les bons et les mauvais moments. Vous êtes une équipe merveilleuse!

Merci à mes amis Isabelle Garber, Jonas Lefèvre, Michel Lamoureux, Étienne St-Cyr Proulx, Julie Lacasse, Jacques Coulombe et Mathieu Perreault pour votre sens de l'humour incroyable, vos encouragements et votre présence inestimable dans ma vie. Merci à certains d'entre vous pour vos impôts (on se comprend). Isa, Jacques, Julie et Mathieu grâce à vous j'ai eu une vie sociale bien remplie et des jeudis soir mémorables. Merci pour tout.

Enfin, merci du plus profond de mon cœur à ma famille. Merci pour votre support et vos encouragements. Papa, maman merci pour votre support financier sans lequel je n'aurais pu me rendre jusque là. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi et en mes capacités. Merci de m'avoir toujours poussé à aller au bout de mes rêves et de m'avoir montré que rien n'était impossible. Merci d'être toujours là pour moi, quoi qu'il arrive. Guillaume, t'es un petit frère formidable. Merci de prendre toujours soin de ta grande sœur. Je vous aime énormément tous les trois. Merci!

DÉDICACE

Je tiens, tout d'abord, à dédier ma thèse de doctorat à ma famille. À mes parents qui ont toujours appuyé chacune de mes décisions et m'ont toujours encouragée à persévérer. Vous représentez un vrai modèle pour moi. Merci pour tout du plus profond de mon cœur.

À mon petit frère que j'aime énormément. Même si on ne se voit pas souvent je pense très fort à toi, pis tes niaiseries me font toujours autant rire. À Patricia, qui fait maintenant partie intégrante de la famille et que j'apprécie beaucoup.

À Lenny, ta marraine t'aime beaucoup.

À mes amis qui m'ont appris, chacun à leur façon, à sortir de ma bulle et m'ouvrir aux autres. Pour vos niaiseries, vos bicheries, votre présence dans ma vie et votre amitié. Je vous aime tous énormément!

À mes nouveaux amis à winnipeg spécialement Aline, Sherrie, Céleste et Réal qui rendent mon adaptation à ma nouvelle vie beaucoup plus facile grâce à leur présence. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous ici.

xxx

ANNEXES

Références des articles en annexe :**Identification of six new HLA-G alleles with non-coding DNA base changes**

Lajoie J, Boivin AA, Jeanneau A, Faucher MC, Roger M

Tissue Antigens 2009 Apr;73(4) :379-80

Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes

Lajoie J, Jeanneau A, Faucher MC, Moreau P, Roger M

Tissue Antigens, 2008 Nov :72(5) :502-4

Persistence of high levels of blood soluble human leukocyte antigen-G is associated with rapid progression of HIV infection

Lajoie J, Fontaine J, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, Roger M

AIDS 2009 Jul 17;23(11) :1437-40

Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes

Julie Lajoie^{a,b}, Annie Jeanneau^a, Marie-Claude Faucher^a, Philippe Moreau^c and Michel Roger^{a,b*}

^a Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de

Montréal (CHUM), Canada

^b Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada

^c CEA, I²BM, Service de Recherche en Hématologie-Immunologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Word count (excluding table): 583

Key words: African, Caucasian, human leukocyte antigen-G, polymorphism.

Summary statement: We identified five novel HLA-G alleles with protein-modifying mutations in Caucasian and/or African populations.

Human leukocyte antigen-G (HLA-G) belongs to the family of non-classical HLA class I molecules, which additionally includes HLA-E and HLA-F. HLA-G differs from classical HLA class I molecules by its genetic diversity, expression, structure and functions. Indeed, HLA-G exhibits low polymorphism with only 31 alleles (11 coding DNA base change alleles, 20 non-coding DNA base change alleles) and 10 proteins described so far (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>) (1). HLA-G constitutive expression is highly tissue-restricted (foetal trophoblast cells, adult thymic medulla, cornea, pancreas islets, erythroid cells) but can be induced in pathological conditions such as cancers, viral infections, autoimmune diseases, and transplantation. In such cases, HLA-G expression plays a key role in the induction of immune tolerance (2). Then, it is of interest to identify new genetic variants that may affect the expression and/or function of HLA-G. Here, we report five novel HLA-G alleles, with coding DNA base changes, found in Caucasian and/or African populations.

HLA-G alleles are defined by nucleotide substitutions in exons 2, 3, and 4 (Table 1). The new alleles were characterised by three different polymerase chain reactions of the nucleotide sequence encompassing HLA-G exons 2 to 4, cloning of the amplified products (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and automatic DNA sequencing for HLA-G variants detection (ABI PRISM 3100 sequencer, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The sequencing data were aligned with the same region of the other HLA-G sequences in the IMGT/HLA database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>) (1). The nucleotide sequences of the novel HLA-G alleles were submitted to GenBank and the WHO Nomenclature Committee officially assigned the names of the alleles in June 2008. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (3), names will be assigned to new sequences as they are identified. Here are the names of the new alleles (GenBank accession numbers); HLA-G*0112 (EU750733), HLA-G*0113N (EU750734), HLA-G*0114 (EU750735), HLA-G*0115 (EU750736), and HLA-G* 0116 (EU750737).

The novel HLA-G*0112 allele bears two nucleotide substitutions in exon 2; a new nonsynonymous mutation at nucleotide position 151 (T→C) in codon 27 (Tyrosine→Histidine) and a previously described synonymous variant at codon 57 (Proline→Proline). The HLA-G*0112 allele was observed in one individual from our Zimbabwean cohort of 400 individuals (1/400). The HLA-G*0113N allele is characterised by a novel mutation at nucleotide 232 (C→T) in codon 54 leading to an early stop codon in exon 2 (alpha 1 domain) that will result in a truncated and presumably non functional protein. This null allele was found in our Ghanaian cohort

(1/100). The HLA-G*0114 allele contains the synonymous variant at codon 57 (Proline→Proline) in exon 2 and three amino acid changes including two new variants at nucleotide 371 (G→A) codon 100 (Glycine→Tyrosine) in exon 3 and at nucleotide 728 (G→A) codon 219 (Arginine→Glutamine) in exon 4. This allele also harbours the already known exon 4 variant at codon 258 (Threonine→Methionine) and was observed in our Ghanaian (1/100), Beninese (1/300) and Canadian Caucasian (1/1000) cohorts. The HLA-G*0115 allele carries a new variant at nucleotide 383 (G→T) codon 104 (Glycine→Valine) in exon 3, in association with already known variants at codon 57 (Proline→Proline) in exon 2 and codon 110 (Leucine→Isoleucine) in exon 3. The HLA-G*0116 allele contains a novel variant at nucleotide 386 (C→T) codon 105 (Serine→Cysteine) in exon 3 along with exon 2 codon 57 (Proline→Proline) and exon 3 codon 93 (Histidine→Histidine) silent variants, and the codon 258 (Threonine→Methionine) variant in exon 4. The last two alleles were each found in the Canadian Caucasian cohort at a frequency of 1/1000.

Acknowledgements

We are grateful to Julie Lacaille and Claudine Matte for sample processing and typing. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Réseau SIDA. Julie Lajoie holds a Student Research award from the CIHR. Michel Roger is recipient of a Research Scholar award from the FRSQ.

References

1. Robinson J, Waller MJ, Parham P et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 311-4
2. Favier B, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an **update** *Tissue Antigens* 2007; **69**: 207-11.
3. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005; **65**: 301-69.

Identification of six new HLA-G alleles with non-coding DNA base changes

Julie Lajoie^{a,b}, Andrée-Anne Boivin^{a,b}, Annie Jeanneau^a, Marie-Claude Faucher^a, and Michel Roger^{a,b*}

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

^b Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada

Word count (excluding table and references): 592

Key words: African, Caucasian, human leukocyte antigen-G, polymorphism.

Summary statement: We identified six novel human leukocyte antigen-G alleles with synonymous mutations in Caucasian and/or African populations

Human leukocyte antigen (HLA)-G belongs to the family of non-classical HLA class I molecules, which additionally includes HLA-E and HLA-F. HLA-G differs from classical HLA class I molecules by its genetic diversity, expression, structure and functions. Indeed, HLA-G exhibits low polymorphism with only 36 alleles (14 coding DNA base change alleles, 20 non-coding DNA base change alleles and 2 null alleles) and 14 proteins described so far (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>) (1). HLA-G constitutive expression is highly tissue-restricted (foetal trophoblast cells, adult thymic medulla, cornea, pancreas islets, erythroid cells) but can be induced in pathological conditions such as cancers, viral infections, autoimmune diseases, and transplantation. In such cases, HLA-G expression plays a key role in the induction of immune tolerance (2). Then, it is of interest to identify new genetic variants that may affect the expression and/or function of HLA-G. Here, we report six novel HLA-G alleles, with synonymous DNA base changes, found in Caucasian and/or African populations.

HLA-G alleles are defined by nucleotide substitutions in exons 2, 3, and 4 (Table 1). The new alleles were characterised by three different polymerase chain reactions of the nucleotide sequence encompassing HLA-G exons 2 to 4, cloning of the amplified products (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and automatic DNA sequencing for HLA-G variants detection (ABI PRISM 3100 sequencer, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The sequencing data were aligned with the same region of the other HLA-G sequences in the IMGT/HLA database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>) (1). The nucleotide sequences of the novel HLA-G alleles were submitted to GenBank and the WHO Nomenclature Committee officially assigned the names of the alleles in December 2008. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (3), names will be assigned to new sequences as they are identified. Names of the new alleles (GenBank accession numbers) are as follows: HLA-G*010116 (FJ464334), HLA-G*010405 (FJ464335), HLA-G*010115 (FJ460463), HLA-G*010117 (FJ460464), HLA-G*010118 (FJ469162) and HLA-G*010119 (FJ464336).

The novel HLA-G*010116 allele bears three nucleotide substitutions. A new synonymous mutation at nucleotide position 105 (C→G) codon 11 (alanine→alanine) in exon 2 and two previously described silent variants at codon 57 (proline→proline) in exon 2 and codon 93 (histidine→histine) in exon 3. The HLA-G*010116 allele was observed in one individual from our Caucasian cohort of 1000 individuals (1/1000). The HLA-G*010405 allele harbours a novel mutation at nucleotide 168 (G→A) codon 32

(glutamine→glutamine) in exon 2, in association with already known variants at codon 57 (proline→proline) in exon 2 and codon 110 (leucine→isoleucine) in exon 3. This allele was found in our Zimbabwean (7/500) and Ghanaian (8/100) cohorts. The HLA-G*010115 allele is similar to the wild-type HLA-G*010101 allele but contains a new synonymous variant at nucleotide position 237 (G→A) codon 55 (glutamic acid→glutamic acid) in exon 2. This allele was observed in our Ghanaian (5/100), Beninese (2/300) and Canadian Caucasian (6/1000) cohorts. The HLA-G*010117 allele carries a new variant at nucleotide position 372 (C→T) codon 100 (glycine→glycine) in exon 3 along with exon 2 codon 57 (proline→proline) and exon 3 codon 93 (histidine→histidine) variants. It was observed in our Beninese (2/300) and Canadian Caucasian (1/1000) cohorts. The HLA-G*010118 and HLA-G*010119 alleles contain novel variants at nucleotide positions 705 (G→A) codon 211 (alanine→alanine) and 846 (G→A) codon 258 (threonine→threonine) in exon 4, respectively. They both also harbour the known variants at codon 57 (proline→proline) in exon 2 and codon 93 (histidine→histidine) in exon 3. The HLA-G*010118 allele was found in one individual from our Canadian cohort (1/1000) while the HLA-G*010119 allele was observed relatively frequently in our Zimbabwean cohort (36/500).

Acknowledgements

We are grateful to Julie Lacaille and Claudine Matte for sample processing and typing. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Réseau SIDA. Julie Lajoie holds a Student Research award from the CIHR. Michel Roger is recipient of a Research Scholar award from the FRSQ.

References

1. Robinson J, Waller MJ, Parham P et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 311-4
2. Favier B, LeMaout J, Rouas-Freiss N, Moreau P, Menier C, Carosella ED. Research on HLA-G: an update *Tissue Antigens* 2007; **69**: 207-11.
3. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005; **65**: 301-69.

Table 1. HLA-G allele assignment based on nucleotide substitutions with new mutations shaded in grey (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>) (1)

	Exon 2				Exon 3			Exon 4	
	11	32	55	57	93	100	110	211	258
HLA-G*010101	GCC	CAG	GA G	CCG	CAC	GGC	CTC	GCG	ACG
	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Gly	Leu	Ala	Thr
HLA-G*010116	GC G			CCA	CAT				
	Ala			Pro	His				
HLA-G*010405		CAA		CCA			ATC		
		Gln		Pro			Ile		
HLA-G*010115			GA A						
			Glu						
HLA-G*010117				CCA	CAT	GGT			
				Pro	His	Gly			
HLA-G*010118				CCA	CAT			GCA	
				Pro	His			Ala	
HLA-G*010119				CCA	CAT				ACA
				Pro	His				Thr

Persistence of high levels of blood soluble HLA-G is associated with rapid progression of HIV infection

Julie Lajoie^{a,b}, Julie Fontaine^{a,b}, Cécile Tremblay^b, Jean-Pierre Routy^c, Johanne Poudrier^{a,b} and Michel Roger^{a,b*}

^a Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de

Montréal (CRCHUM), Canada

^b Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal, Canada

^c Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Canada

Running head: Soluble HLA-G level in HIV disease progression

Word count in the text: 993

Word count in abstract: 79

Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

Sponsorship: This work was supported by the Réseau SIDA et maladies infectieuses from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J Lajoie and J Fontaine hold Studentships from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). C Tremblay, JP Routy, and M Roger are recipients of Research Scholar awards from the FRSQ.

Abstract

HLA-G is an important suppressor of the immune response and HIV can modulate its expression. Longitudinal monitoring of soluble HLA-G plasma levels in subjects with primary HIV infection undergoing different rates of disease progression showed that relative levels were elevated in the early phase of infection and remained high throughout follow-up in rapid progressors who responded to antiretroviral therapy but were restored to normal levels in the chronic phase of infection in both untreated normal progressors and long-term nonprogressors.

Word count: 79

Keywords: Antiretroviral therapy, HLA-G, HIV disease progression, immune regulator, long-term nonprogressors

Human leukocyte antigen-G (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 [1]. HLA-G expression is involved in maternal-foetal tolerance and can be induced in pathological conditions such as autoimmune diseases, cancers, transplantations and viral infections. 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. They share immunological functions such as inhibition of NK and CD8⁺ T lymphocytes cytotoxic activity, as well as inhibition of CD4⁺ T cell functions [2-4]. The immunosuppressive properties of HLA-G might contribute to the susceptibility and persistence of HIV infection. Recent studies have shown that functionally active HLA-G polymorphisms are associated with susceptibility to heterosexual [5,6] and vertical [7,8] transmission of HIV-1. Blood sHLA-G levels [9] and monocytes and T lymphocytes HLA-G surface expression are elevated in HIV-1-infected individuals [10]. However, no data are available on sHLA-G expression in the context of HIV disease progression. We have therefore performed a longitudinal study of plasma levels of sHLA-G in HIV-infected individuals with different rates of clinical progression to investigate whether sHLA-G expression is associated HIV disease progression.

Twenty-four HIV-infected subjects were selected from the Montreal Primary HIV Infection (PHI) cohort: 10 were classified as rapid and 14 as normal progressors. The date of infection was estimated based on clinical and laboratory results using criteria established by the Acute HIV Infection and Early Disease Research Program. Rapid progressors had CD4⁺ T cell counts < 250 cells/mm³ within 2 years of infection. Blood samples of rapid progressors were taken at four time-points: during the acute (0-3 months) and early (5-8 months) phases of infection, 3 to 6 months and 9 to 12 months after the initiation of antiretroviral therapy (ART). Normal progressors were ART-naive patients whose CD4⁺ T cell counts remained > 500 cells/mm³ at the 2-year follow up visit. Blood samples of normal progressors were obtained in the acute, early and chronic phases (24 months) of infection. Also included were blood samples from 12 long-term non progressors (LTNPs) infected for ≥ 8 years with CD4⁺ T cell counts > 500 cells/mm³ and low to undetectable viral loads in the absence of ART and 20 age-matched HIV-negative volunteers. None of the study subjects had syphilis or hepatitis B or C infection. Informed consent was obtained from all subjects, and the research conformed to ethical guidelines of all authors' institutions. sHLA-G plasma levels were measured using a Human sHLA-G Immunoassay kit (Alexis Biochemicals, San Diego,

CA, USA), which allows detection of HLA-G1 and -G5 soluble proteins. Statistical analyses were performed using the GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Sociodemographic and clinical characteristics of HIV-infected individuals were described elsewhere [11]. Briefly, the study groups were similar with respect to sex, race, and modes of HIV acquisition. The mean age of LTNPs was higher ($p < 0.0001$). Rapid progressors had lower CD4⁺ T cell counts ($p < 0.0001$) and higher viremia levels ($p = 0.04$) than did normal progressors during the acute and early phases of infection. During the chronic phase of infection, ART-treated rapid progressors had similar levels CD4⁺ T cells and lower viral loads ($p = 0.02$) than did untreated normal progressors. There was no significant correlation between CD4⁺ T cell counts or viral loads and sHLA-G levels either within groups or among all patients during acute or chronic infection as determined by the Spearman's rank test (data not shown).

Longitudinal assessment of plasma sHLA-G levels in HIV-1 infected individuals with different rates of disease progression is depicted in Figure 1. The relative level of sHLA-G increased significantly in the acute and early phases of infection in both untreated rapid and normal progressors. Levels of sHLA-G remained elevated throughout follow-up in rapid progressors who responded to ART but were restored to normal level in the chronic phase of infection in both untreated normal progressors and LTNPs. In fact, during the chronic phase of infection, rapid progressors had higher levels of sHLA-G than did normal progressors ($p = 0.0004$) and LTNPs ($p = 0.0006$).

The relative high level of plasma sHLA-G observed in HIV-infected individuals is in agreement with previous findings [9]. However, our longitudinal study in PHI patients allowed to show, for the first time, that sHLA-G levels are elevated during the very early stage of infection but are restored to normal levels in the chronic phase of infection in both normal progressors and LTNPs, demonstrating the capacity of their immune system to control, at least to a certain extent, the infection. The situation is quite different in rapid progressors in whom sHLA-G levels remained higher than normal throughout the course of infection despite the suppression of viremia and the replenishment of CD4⁺ T cells with ART. Monocytes/macrophages together with myeloid and plasmacytoid dendritic cells are the major producers of sHLA-G [12]. We have recently shown that the blood levels of mature (HLA-DR⁺⁺ CD86⁺) plasmacytoid dendritic cells during the chronic phase of infection were higher in rapid progressors than in HIV-negative individuals ($p < 0.05$) [11]. Moreover, levels of serum interleukin-10, a potent inducer of HLA-G expression [13], were higher in rapid progressors than in

HIV-negative subjects ($p < 0.05$) (unpublished data). It has been suggested that ART itself could induce surface expression of HLA-G on peripheral monocytes from HIV-infected subjects [14]. However, this does not seem to apply to the secretion of sHLA-G since, in our study, the levels were similar before and after ART (Figure 1, left panel).

In conclusion, our results show that sHLA-G is produced in the very early stage of HIV infection and its secretion is associated with rate of disease progression. The maintenance of relatively high levels of sHLA-G, in rapid progressors, may contribute to the tolerogenic environment favouring viral immune escape and dissemination as reflected by the rapid course of disease progression in these individuals.

Acknowledgments

We are grateful to the members of the Montreal Primary HIV Infection and Long-Term Non-Progressor Study Groups: M Legault (coordinator); J Allan, N. Bernard, J Cox, J Falutz, N Gilmore, M Klein, RG Lalonde, R Leblanc, J MacLeod, M Potter, G Smith, C Tsoukas (McGill University Health Center); J Bruneau, C Fortin, A de Pokomandy, D Rouleau (CHUM); R Thomas, B Trottier, F Asselin, M Boissonnault, L Charest, H Dion, S Lavoie, D Legault, D Longpré, PJ Maziade, ME Morin, D Murphy, VK Nguyen, R O'Brien, S Vézina (Clinique médicale l'Actuel); JG Baril, P Côté, S Dufresne, P Junod, F Laplante, D Poirier, Y Parent, MA Charron, B Lessard, D Tessier, É Sasseville, A Talbot, MS Joyal (Clinique médicale du Quartier Latin); N Lapointe (Hôpital Ste-Justine); A Dascal (Jewish General Hospital); M Munoz (CLSC Cote des Neiges). We also thank Marie-Pierre Boisvert, Maryse Lainesse, Rebecca Bordi, Véronique Lafontaine, Bader Yassine-Diab and Younes Chouick for processing the blood samples. Roles of authors: J. L wrote the article and performed HLA-G measurements and analysis. J. F provided the data analysis on the socio-demographic and clinical characteristics of HIV-infected individuals. C.T and J-P. R are principal investigators of the Montreal PHI and LTNP study groups, respectively, that recruited the study subjects. J.P supervised the experiments and revised the article. M.R generated the concept, wrote the article and coordinated all aspects of this study.

References

1. Ishitani A, Geraghty DE. 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* 1992; **89**:3947-3951.
2. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999; **11**:1351-1356.
- 3- Park GM, Lee S, Park B, Kim E, Shin J, Cho K et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**:606-611.
4. Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J, Carpentier A, and Carosella ED. 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* 2001; **98**:12150-12155.
5. 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 transmission in African women. *AIDS* 2004; **18**:427-431.
6. Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M (2006). Genetic variants in non-classical MHC class I HLA-E and HLA-G molecules are associated with risk of heterosexual HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2006; **193**: 298-301.
7. Aikhinonbare FO, Kumaresan K, Shamsa F, Bon VC. HLA-G DNA sequence variants and risk of perinatal HIV-1 infection. *AIDS Res Ther* 2006; **3**:28.
8. 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**:177-182.
9. 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. *Clin Exp Immunol* 2006; **147**:236-240.

10. Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Cabellos R, Dausset J et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS* 2002; **16**:347-351.
11. Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C, Routy JP, Poudrier J, Roger M. HIV infection affects blood myeloid dendritic cells beyond successful therapy and despite non-progressing clinical disease. *J Infect Dis* 2009; in press
12. Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Hum Immunol* 2003; **64**:1017-1024.
13. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int. Immunol.* 1999; **11**:803-811.
14. Rivero A, Lozano JM, Gonzalez R, Garcia-Jurado G, Camacho A, Torres-Cisneros J et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors are able and protease inhibitors unable to induce the tperogenic molecule HLA-G1 on monocytes from HIV-1 infected patients. *Hum Immunol* 2007; **68**: 303-306.

Figure

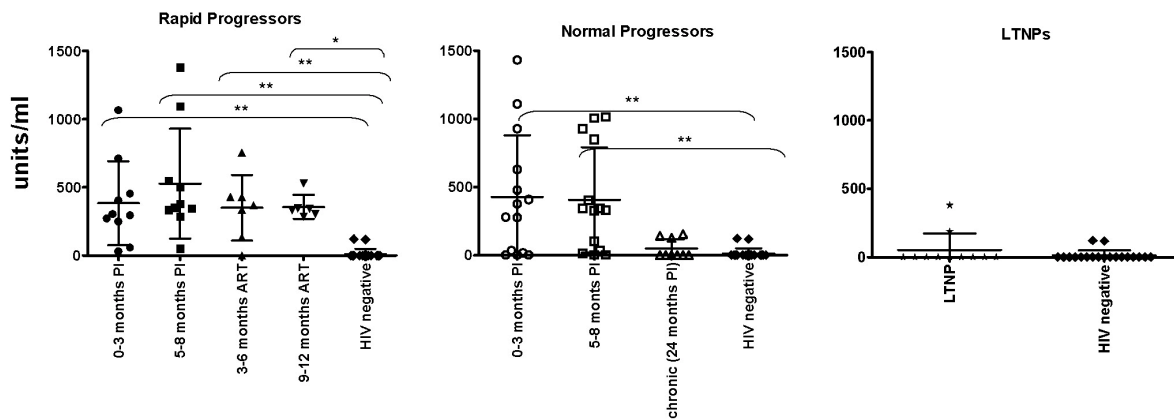


Figure 1 Longitudinal changes in plasma sHLA-G levels in rapid progressors (left panel), normal progressors (middle panel) and LTNPs (right panel).

Same values are used for HIV-negative donors in left, middle and right graphs to show this group as a control. Plasma levels were evaluated with the Wilcoxon signed rank and the Mann-Whitney U tests for pair-wise comparisons of different phases of infection within each group and between study groups, respectively. Significance levels are shown as * ($p < 0.01$) and ** ($p < 0.001$). ART, antiretroviral therapy, LTNP, long-term non-progressor; PI, post-infection; sHLA-G, soluble HLA-G.

