THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « Microbiologie, V*irologie, Parasitologie »*

Par

Julie FROUARD

« La transmission colorectale du VIH par les cellules infectées du sperme et effet du sperme sur cette transmission »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 20 Décembre 2018
Unité de recherche : Inserm U1085
Equipe « Physiologie et physiopathologie du tractus uro-genital »

Rapporteurs avant soutenance :

Serge BENICHOU Directeur de recherches, Institut Cochin

Christiane MOOG Directeur de recherches, Université de Strasbourg

Composition du Jury :

Président (et Examinateur) : Valérie LECUREUR	Maître de conférences, Université Rennes 1
Dir. de thèse : Nathalie DEJUCQ-RAINSFORD	Directeur de recherches, Université de Rennes 1
Membre du jury : Serge BENICHOU	Directeur de recherches, Institut Cochin
Membre du jury : Christiane MOOG	Directeur de recherches, Université de Strasbourg

Remerciements

Tout d'abord, je tiens sincèrement à remercier le docteur Christiane Moog et le Docteur Serge Benichou d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier le Docteur Valérie Lecureur pour avoir accepté de juger ce travail, ainsi que pour ses conseils durant ma thèse, notamment concernant ces petites cellules parfois un peu capricieuses que sont les macrophages.

Ce projet a pu être réalisé grâce au soutien financier de l'ANRS et de l'association Sidaction que je tiens donc à remercier.

Merci au Docteur Bernard Jégou de m'avoir accueillie au sein de son institut de recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Nathalie Dejucq-Rainsford pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et encadrée, aux côtés du Docteur Anna LeTortorec, au cours de cette thèse. Merci de m'avoir guidée pendant ces 4 années de thèse et de m'avoir fait grandir scientifiquement mais pas seulement. Merci pour les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises, pour votre soutien et pour avoir cru en moi pour la réalisation de ce projet de thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse, à savoir les Docteurs Oliver Fardel, Olivier Loréal et Mariangela Cavarelli. Mariangela, merci pour les nombreux conseils que tu m'as donnés quant à la culture organotypique polarisée.

Merci aux Professeurs Célia Ravel, Nathalie Rioux-Leclercq et Louis Bujan, qui m'ont permis d'avoir accès aux différents prélèvements, matière première de cette thèse.

Merci également à tous les techniciens du CECOS Olivier, Carole, Stéphane, Joëlle, Marie-Cécile, Carolane, Soazic… C'était à chaque fois un plaisir de venir récupérer les prélèvements et aussi de les « techniquer » chez vous.

C'est aussi pour moi l'occasion de remercier Juliette, rencontrée lors d'une formation en cytométrie. Merci de toujours prendre le temps de répondre à mes questions. Ton aide fut précieuse et le sera peut-être même encore.

Bien sûr je remercie toutes les personnes de l'IRSET et tout particulièrement les membres de mon équipe avec qui j'ai passé quatre excellentes années : Isa, Christelle, Bertrand, Séverine, Antoine, Aurélie, Fred (encore un énorme merci pour ton aide dans cet exercice complétement

nouveau et presque « barbare » pour moi qu'est la bioinformatique), Laurianne, Thomas, Estelle, Nathan, Laetitia, et notre plus petite sous-équipe « virus » : Laurent, Florence, Dominique, Anne-Pascale, Anna, Giulia, Salomé, Nadège.

Laurent, Florence, merci pour vos conseils, votre expérience, votre bonne humeur et votre bienveillance.

Dominique, c'est avec toi que j'ai fait mes premiers pas dans l'équipe en stage de M1. C'est aussi avec toi que j'ai connu mes tout premiers congrès. Cela restera une super expérience. Merci d'avoir toujours été à mon écoute, merci pour tes conseils, ta patience, et tout ce que tu as pu m'apporter pendant ces quatre ans. Merci pour avoir pris soin de moi avec parfois des vitamines, parfois des chocolats !

Anne-Pascale, ton aide ces derniers mois a tout simplement été « énormissime » pour moi. Comme tu le disais « à deux c'est moins impressionnant, on va en arriver à bout», et on y est arrivées ! Merci ! Merci pour ton aide dans les manips, les immuno, les heures passées à compter au microscope (tu es sûre, tu ne me détestes pas encore ?) mais surtout merci pour tout le reste. Ta bonne humeur, ton soutien, nos discussions scientifiques et non…

Anna, un immense merci ! Merci de m'avoir guidée tout au long de cette thèse et pour tout l'investissement que tu y as mis depuis mon arrivée jusqu'à la naissance de ce manuscrit. Merci de m'avoir rassurée quand j'avais besoin qu'on me redonne confiance, merci de m'avoir écoutée quand j'avais besoin d'une oreille attentive, merci de m'avoir comprise quand je me sentais perdue. Au-delà de tout ce que j'ai pu apprendre avec toi scientifiquement, ces quatre années à tes cotés m'ont beaucoup apporté personnellement. Partager mon bureau avec toi, au rythme des m&m^{s}, des minis BN et autres friandises fut un réel plaisir.

Quand je pense team virus, je ne peux pas ne pas penser à toi Giulia. Les mots me manquent pour te dire à quel point je te suis reconnaissante pour toute l'aide que tu m'as donnée, tout ce que tu m'as appris et surtout tout ce que tu m'as apportée au labo comme à l'extérieur, dans les bons et les mauvais moments. Je suis très fière que tu me surnommes ta petite sœur de labo. Grazie mille !

Salomé, (presque) dernière arrivée, tu as littéralement égayé ma dernière année de thèse. Nos soirées labo, nos soirées cytométrie, nos fous rires, nos discussions et nos expéditions sont tout ce que je retiendrai de celle qui aime me présenter comme sa « co-thésarde ». Bonne chance pour ta thèse, tu seras bien entourée, je n'en ai aucun doute.

Nadège, bienvenue, et profites de cette équipe qui est maintenant aussi la tienne.

A tous les membres de notre « team virus », je suis fière et très contente d'avoir travaillé à vos côtés. Vous avez placé la barre très haute pour mes futurs collègues !

Merci à toi Roxane, un vrai coup de cœur. Tu as été une stagiaire du tonnerre. Ton aide dans les manips a été un très gros coup de pouce, et ce fut un réel plaisir de t'avoir à mes côtés pendant ces six mois. Pleins de bonnes choses pour la suite.

Merci à toute notre joyeuse « petite » bande des stagiaires, doc et post doc (et même ingénieurs, n'est-ce pas Nathan ?!) de l'IRSET : Laurianne, Thomas, Nathan, Estelle et Julie (mes Destiny's Child, et oui c'est dit !), Louis, Ha, Salomé, Laetitia, Antonio, Charly, Sadia, Camille, Léo, Sarah … nos (innombrables…) soirées et apéro resteront dans ma mémoire. Travailler dans la joie et la bonne humeur est toujours plus agréable et productif.
Estelle et Julie, mention spéciale. Quelle galère que ces derniers mois de thèse, mais ce fut aussi ce qui nous a rapproché comme jamais. Merci d'avoir été là, chacune son tour à se porter les unes les autres. Merci les filles !

Laetitia, des personnes comme toi, on n'en rencontre pas tous les jours. T'avoir à côté de moi pendant ma thèse aura été une chance immense. Entre les soirées labo, nos karaokés en histo, les virées shopping improvisées, les petits restos du vendredi soir, les gaufres, que nous éliminions très régulièrement au sport (si,si…) . Bref je me rends compte à quel point je suis chanceuse d'avoir partagé la vie de thésard avec toi. Je te garde une place à vie dans mon cœur.

Une pensée également aux copains « d'avant la thèse », Pauline, Bastien, Hélène, Morgane, Méziane mais aussi Justine, Renan et Charlotte. Merci pour votre soutien.

Romain, arrivé à la fois au pire et au meilleur moment, merci d'avoir été cette petite bouffée d'oxygène pendant ces derniers mois.

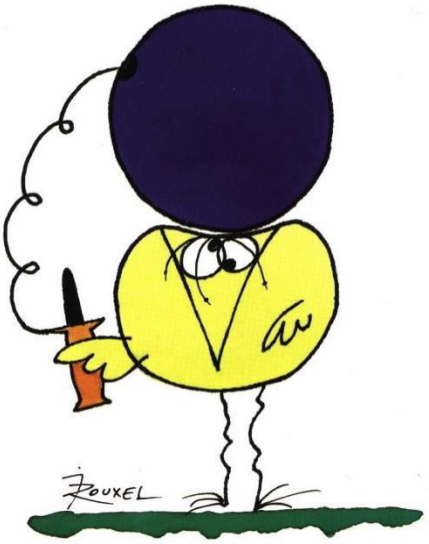
Un grand merci à toi Keltoum. Cette coloc a été une super expérience. Merci pour tout ce que tu as fait notamment pendant la rédaction. Toutes ces « petites » choses qui deviennent énormes pendant cette période. Tes petits plats, tes corrections, ton aide au quotidien… Quelle jolie personne tu es !

Pour finir, un énorme MERCI à ma famille. Caroline, Papa, Maman, merci pour votre soutien, votre amour, et d'avoir toujours su me montrer les choses vraiment importantes. Je ne serais pas arrivée jusqu'ici sans vous. J'espère vous rendre fiers. Vous m'avez toujours poussée et soutenue pendant toutes ces années. Cette fois ça y est, me voilà arrivée au bout ! Merci, merci, merci.

La dernière personne que je souhaite remercier, c'est toi Charly. Tu as été d'un soutien sans faille. Cette thèse je te la dois pour beaucoup. Tu as été un vrai moteur pour moi à chaque instant. Je sais que ce n'est pas terminé. Merci pour tout, du fond du cœur.

Cette thèse m'aura appris une chose, on ne finit jamais d'apprendre.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Sommaire

Introduction 1
I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine, généralités 3
A. La pandémie du SIDA en quelques chiffres 3
B. Notions de base sur le VIH 5
C. La dissémination virale 7
II. Transmission muqueuse du VIH 9
A. Muqueuses anales et colorectales 10
i. Organisation des épithélia des muqueuses anales et colorectales 10
ii. Les cellules épithéliales colorectales 11
iii. Répartition des cellules du système immunitaire dans la muqueuse colorectale 12
iv. Les mécanismes de défense des muqueuses 14
v. Les modèles de muqueuses colorectales reconstruites *in vitro* 19
B. Mécanismes de la transmission du VIH au niveau des muqueuses 22
i. Passage par des brèches 22
ii. Transport à travers les cellules épithéliales, la transcytose 23
iii. Capture par des cellules du système immunitaire 25
iv. Transmigration de cellules infectées 30
C. « Cell-Free Versus Cell-Associated » – quelle importance ? 34
i. Mise en évidence de l'efficacité de la « Cell Associated transmission » 34
ii. « Cell Associated versus Cell-free » : les mécanismes expliquant les différentes efficacités 35
D. Les stratégies de prévention de la transmission du VIH-1 38
i. Les stratégies de prévention actuelles 38
a. Prophylaxie Post Exposition (PEP) et Prophylaxie Pre exposition (PrEP) 39
b. Immunisation passive : Les Anticorps Largement Neutralisants (AcLN) 40
c. Microbicides 40
ii. Les modèles d'étude des stratégies antivirales locales 43
iii. Les stratégies de prévention et la muqueuse colorectale 46
iv. La transmission *in vivo* par les cellules infectées : importance pour les stratégies de prévention 47
III. Le sperme, un simple vecteur pour le VIH ? 48
A. Caractéristiques physiques et chimiques 48

B. Synthèse du sperme et composition 50
i. La synthèse 50
ii. La composition du liquide séminal 51
iii. Les cellules du sperme 53
a. Phénotype des leucocytes séminaux 53
b. Origine des leucocytes séminaux 55
C. Présence du VIH dans le sperme 57
i. Origines du virus dans le sperme et infection des organes du TGM 57
Différents niveaux d'infection des organes producteurs du sperme 58
ii. Infectiosité des cellules séminales versus le liquide séminal et prévalence des cellules infectées dans le sperme 59
iii. Association du VIH avec les spermatozoïdes 60
iv. Modification des paramètres du sperme chez les patients VIH+ 60
D. Rôle du liquide séminal dans la transmission virale 63
i. Facteurs facilitateurs 63
a. Neutralisation du pH vaginal acide 63
b. Rôle des fibrilles amyloïdes 63
c. Opsonisation des particules virales par le complément 64
ii. Facteurs inhibiteurs 65
a. Toxicité des dérivés réactifs de l'oxygène 65
b. Présence de peptides antimicrobiens 65
c. Interférence avec la capture des particules virales par DC-SIGN 65
d. Opsonisation du VIH-1 par des anticorps neutralisants 66
e. Modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs 66
f. Blocage de la transcription virale par les exosomes séminaux 67
iii. Effets indirects du LS sur les tissus portes d'entrée du VIH 67
a. Effet immuno-régulateur du LS sur les barrières épithéliales 67
b. Effets du LS sur la transmission cellule-cellule 70
OBJECTIFS 73
DEMARCHE EXPERIMENTALE ET DESCRIPTION DES MODELES D'ETUDE 77
RESULTATS 85
I. CHAPITRE I : Le liquide séminal humain diminue l'adhésion et la transmigration des macrophages à travers l'épithélium colorectal et endométrial 87
A. Synthèse de l'article et des résultats supplémentaires 87

B. Human seminal plasma decreases macrophage transmigration and adhesion to the colonic epithelium (Article 1) 91
C. Résultats supplémentaires non inclus dans l'article 119
Effet du liquide séminal sur la transmigration de macrophages à travers la barrière endométriale in vitro 119
II. CHAPITRE II - Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des leucocytes séminaux et comparaison aux leucocytes sanguins 127
A. Synthèse de l'article 127
B. Human Seminal leukocytes phenotypical and functional characterization (Article 2) 131
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 159
I. Choix des modèles d'études et des stratégies expérimentales 162
Liquides séminaux de patients séronégatifs et de patients séropositifs 166
Choix des marqueurs de caractérisation des monocytes/macrophages 166
II. PERSPECTIVES ET AUTRES STRATEGIES D'ETUDE 167
A. Effet du LS sur l'adhésion et la transmigration des monocytes macrophages à la barrière épithéliale colorectale 167
i. Validation de l'implication de la molécule LFA-1 dans l'adhésion des MDM à la barrière épithéliale 167
ii. Implication d'autres molécules d'adhésion ? 167
iii. Possibles mécanismes responsables de l'inhibition par le LS de l'adhésion et la transmigration des monocytes et macrophages 169
B. Caractérisation des leucocytes séminaux 171
i. Détermination de l'origine des leucocytes du sperme 171
ii. Stratégies expérimentales permettant une caractérisation plus globale et plus fine du phénotype des leucocytes séminaux 173
CONCLUSION 175
ANNEXES 179
Références bibliographiques 193

Liste des abréviations

AcLN : Anticorps Largement Neutralisants
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AMP : Anti-microbian peptide
ARN : Acide ribonucléique
ARV : Antirétroviraux
CA : Cell-Associated
CCL : Chemokine Ligand
CCR5 : C-C chemokine receptor type 5
CD : Cluster de différenciation
CNS : Cellules non spermatozoïdes
cP : centipoise
CXCL12 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
CyTOF : Mass Cytometry Time of Flight
DC : Dendritic Cell
DC-SIGN : Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
DGE : Digital Gene Expression
Fc : Fragment constant
Gp : glycoprotein
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leucocyte Antigen
HSH : Homme ayant des relations sexuelles avec des hommes
HSPG : Héparanes sulfate de protéoglycane
ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule 1
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobulines
IL : Interleukine
IST : Infection sexuellement transmissible
JAM : Junctional Adhesion Molecule
kb : kilobases
kDa : kilo Dalton
LB : Lymphocyte B
LDH : Lactate deshydrogenase
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
LS : Liquide séminal
LT : Lymphocyte T
NI : Non-infecté
NK : Natural Killer
NLR : Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptor
NO : Oxyde Nitrique
NOS : Synthétase d'Oxyde Nitrique

MDM : Macrophage dérivé de Monocyte
MCP1 : Monocyte chimio-attractant protein 1
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDR : Multi-Drug Resistance
MMP : Métalloprotéinase
MUC : Mucine
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAP : Phosphatidate phosphatase
PBMC *:* Peripheral blood mononuclear cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEP : Prophylaxie post-exposition
PrEP : Prophylaxie pré-exposition
PGE : Prostaglandines
pIgR : Polymeric-immunoglobulin receptor
PSA : Prostate Stem-cell Antigen
PRR : Pattern Recognition Receptor
RLR : Retinoisacid-inductible Gene-1 Like Receptor
RTE : Résistance Trans-épithéliale
ROS : Reactive Oxygen Species
SAG : Salivary agglutinin
SDF1 : Stromal Derived Factor 1
SEM : Séminogélines
SEVI : Semen-derivated Enhancer of Viral Infection
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SLPI : Secretory leukocytes protease inhibitor
SIV / VIS : Simian Immunodeficiency Virus
TGF : Tractus Génital Femelle
TGM : Tractus Génital Mâle
TGF-β : Transforming Growth Factor β
TLR : Toll-like Récepteur
TNF : Tumor Necrosis Factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
ZO1 : Zonula Occludens 1
3D : Tridimentionnel

Introduction

I. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine, généralités

Les premiers travaux de recherche sur le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ont débuté au début des années 80, et c'est en 1983 que l'agent responsable du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) fut pour la première fois isolé, produit et mis en évidence par microscopie (Barre-Sinoussi et al., 1983) (Figure 1). Cette découverte a valu aux français Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier le prix Nobel de médecine en 2008.

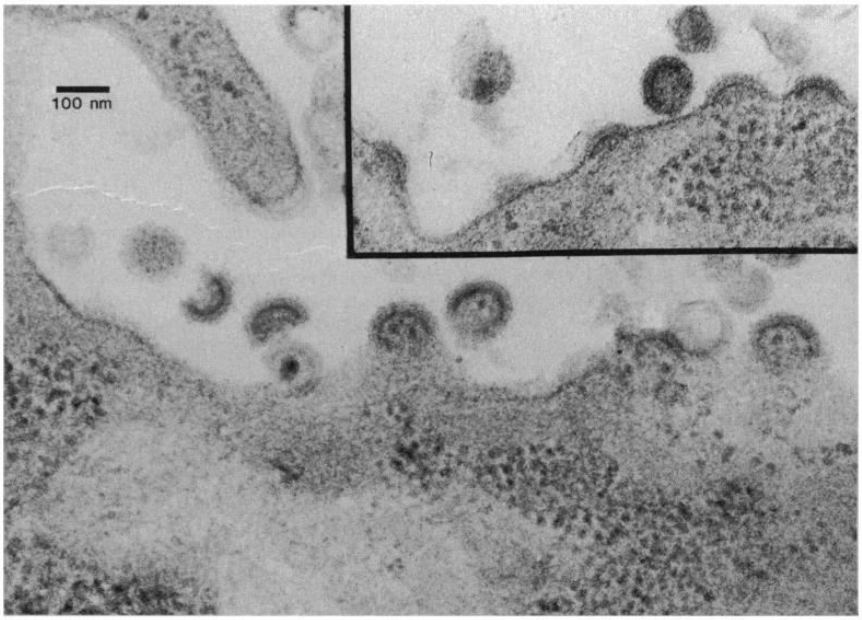


Figure 1 : Mise en évidence du VIH-1 dans les lymphocytes
Première image de microscopie électronique à transmission du bourgeonnement de particules virales dans un lymphocyte T CD4 infecté (Barre-Sinoussi et al., 1983)

A. La pandémie du SIDA en quelques chiffres

Etat des lieux

Les premiers cas d'infection par le VIH ont été mis en évidence en 1981 parmi des hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) vivant dans des centres urbains nord-américains, notamment New York, Los Angeles et San Francisco.

Par la suite, des cas de SIDA ont été identifiés en Afrique sub-saharienne et la pandémie mondiale de VIH a commencé à prendre de l'ampleur. L'épidémiologie mondiale du VIH / SIDA a évolué au cours des trois dernières décennies. Depuis 2001, l'incidence mondiale de l'infection à VIH s'est stabilisée et a commencé à diminuer dans de nombreux pays développés. En 2017, 36.9 millions de personnes vivaient avec le VIH et l'Afrique subsaharienne est considérée comme l'épicentre de l'épidémie avec 25.6 millions d'individus infectés. On estime que 1.8 million de personnes ont été nouvellement

infectées cette même année, l'Afrique subsaharienne concentrant près des deux tiers des nouveaux cas d'infection (rapport ONUSIDA 2017). En 2015, le programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA) a publié l'objectif « 90-90-90 » visant à ce qu'en 2020, 90% des personnes infectées connaissent leur statut VIH, que parmi elles 90% soient sous traitement antiviral, et que 90% de personnes traitées par antirétroviraux aient leur charge virale indétectable, afin de mettre fin à l'épidémie du SIDA d'ici 2030 (UNAIDS, 2013). En 2017 les chiffres étaient encore loin du compte. Soixante-quinze pourcent des personnes vivant avec le VIH connaissaient leur statut, parmi elles 79% avaient accès à un traitement et 81% ont vu leur charge virale supprimée (ONUSIDA, 2017).

Voies de transmission du VIH et populations à risque

Le VIH se transmet principalement lors de l'exposition des muqueuses à un fluide contaminant tel que le sang, le sperme, les sécrétions vaginales ou le lait maternel. La contamination se fait à l'occasion de rapports sexuels non protégés, lors d'une transfusion de sang contaminé, lors de l'échange de seringues contaminées, ou de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement. La transmission par voie sexuelle est la principale voie de transmission du virus puisqu'elle est à l'origine de plus de 80% des nouvelles infections. Selon les régions du monde, la prévalence associée aux différents modes de transmission sexuelle diffère. Dans les pays développés (USA, Canada, Europe, Australie, Nouvelle Zélande, certains pays d'Asie et d'Amérique du Sud), les homosexuels, exposés par voie rectale et par le pénis, constituent la population la plus infectée. Au contraire, dans les pays en voie de développement (Afrique sub-saharienne, Caraïbe, Océanie, Chine), la transmission hétérosexuelle est la plus fréquente (ONUSIDA 2017). Alors que de façon globale le nombre de nouvelles infections recule chaque année, le nombre de nouveaux diagnostics de VIH chez les HSH semble être stable ou en possible augmentation dans la plupart des pays où les données sont disponibles (Huynh and Gulick, 2018), et notamment en France (Figure 2), soulignant la sensibilité particulière de cette population à l'infection VIH. Bien que communément associée à la population homosexuelle, la transmission colorectale ne concerne pas que ces derniers. On estime que 30% des femmes ont des rapports anaux insertifs non protégés (HALPERIN, 1999; Ham et al., 2015). Au regard de ces chiffres, il est primordial de comprendre l'ensemble des mécanismes conduisant à la transmission sexuelle du virus et particulièrement au niveau colorectal afin de développer de nouvelles stratégies de prévention pour atteindre les objectifs ambitieux fixés par l'ONUSIDA et l'OMS pour 2030 : zéro nouvelle infection, zéro discrimination et zéro décès liés au SIDA.

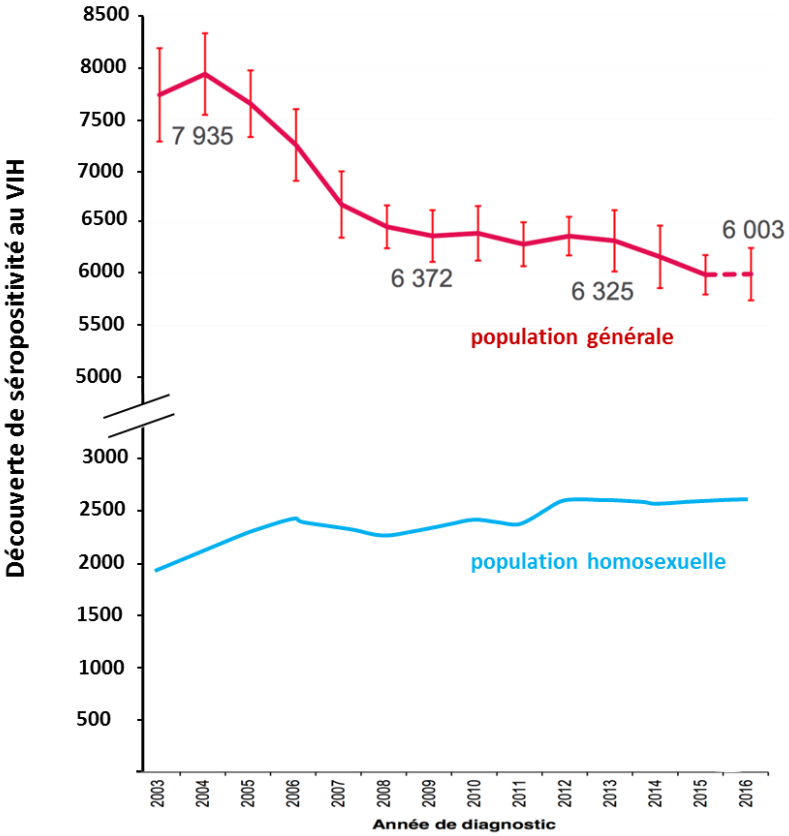


Figure 2 : Evolution du nombre de cas de découverte de séropositivité en France dans la population générale et dans la population homosexuelle depuis 2003.
Adapté de Santé Publique France DO VIH au 30 juin 2017
(http://vih.org/20171129/vih-en-france-en-2017/139817)

B. Notions de base sur le VIH

Le VIH est un lentivirus appartenant à la famille des *Retroviridae*. C'est un virus enveloppé, dont la capside protège un génome constitué de 2 copies d'acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive, d'une taille d'environ 10kb. Comme tous les rétrovirus, le cycle réplicatif du VIH se caractérise par la transcription de son génome ARN en acide désoxyribonucléique (ADN) à l'intérieur de la cellule hôte grâce à la transcriptase inverse virale et l'intégration de l'ADN viral dans les chromosomes de la cellule hôte. On parle alors d'ADN proviral, à partir duquel les ARN viraux messagers et génomiques vont être transcrits. Le bourgeonnement de nouvelles particules virales se fait à la membrane plasmique de la cellule hôte infectée.

VIH-1 et VIH-2

Il existe deux types de virus de l'immunodéficience humaine, le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-2 possède des caractéristiques génétiques, structurales et antigéniques proches du VIH-1. Ce virus possède entre 30 et 60% d'homologie avec le VIH-1 (Guyader et al., 1987). Cependant sa charge

virale dans le sang est faible voire indétectable, sa transmission est moins efficace et la progression vers le syndrome d'immunodéficience est beaucoup plus lente comparée à celle retrouvée chez les patients infectés par le VIH-1 (Makvandi-Nejad and Rowland-Jones, 2015). La répartition géographique de l'infection par le VIH-2 est limitée à l'Afrique de l'Ouest (Azevedo-Pereira and Santos-Costa, 2016), alors que le VIH-1 s'étend à travers le monde et il est responsable d'environ 95% des infections à VIH. Les travaux présentés concernent la transmission du VIH-1, c'est pourquoi nous nous intéresserons exclusivement à ce dernier dans la suite de cette introduction.

Récepteur, corécepteurs et cellules cibles du VIH-1

Les lentivirus sont des rétrovirus non oncogènes qui infectent principalement les cellules du système immunitaire. Ils sont responsables de maladies chroniques, à évolution lente, caractérisées par une immunodéficience (pour revue (Durand and Cimarelli, 2011)). Les principales cibles cellulaires du VIH sont les lymphocytes T CD4 +, les cellules de la lignée des macrophages et les populations de cellules dendritiques myéloïdes (mDC), plasmacytoïdes (pDC) et les cellules de Langerhans (Wu and KewalRamani, 2006). L'entrée du virus dans ces cellules se fait principalement suite à la reconnaissance de la molécule CD4 qui joue le rôle de récepteur pour l'entrée virale et des récepteurs de chimiokine CCR5 et CXCR4 qui fonctionnent comme des corécepteurs.

En fonction de l'utilisation de tel ou tel corécepteur, les souches de VIH-1 sont définies comme étant à tropisme R5, X4 ou « dual tropique » R5X4 (Berger et al., 1999). Les corécepteurs CXCR4 et CCR5 ne sont pas exprimés de la même manière à la surface des lymphocytes et des macrophages. En effet, les lymphocytes T expriment davantage le corécepteur CXCR4 et les macrophages le corécepteur CCR5 justifiant une infection plus importante de ces cellules par les souches correspondantes. Les cellules dendritiques expriment les deux types de corécepteurs (Lee et al., 1999), mais la permissivité à l'infection varie en fonction du sous-type de DC étudié et de la souche virale. En effet, les virus de type R5 infectent plus efficacement les mDC que les souches X4 probablement du fait de l'expression majoritaire de CCR5 à la surface de ces cellules par rapport au CXCR4 (Patterson et al., 2001; Zaitseva et al., 1997). Les virus à tropisme R5 sont majoritairement transmis par voie sexuelle et sont prédominants au début de l'infection. Puis, au cours de la maladie, des virus à tropisme X4 et à tropisme R5X4 émergent. Ces derniers, plus virulents, se répliquent plus rapidement et sont associés au déclin des LT CD4+ (pour revue (Margolis and Shattock, 2006; Naif, 2013)).

En outre, l'entrée du VIH peut se faire, au moins *in vitro,* dans des cellules CD4 négatives appartenant aux compartiments immunitaires et non immunitaires (Olinger et al., 2000). L'entrée du virus dans les cellules CD4 négatives se fait via des récepteurs alternatifs capables de fixer le VIH-1 et

dans de nombreux cas de l'internaliser. Trois grandes familles de récepteurs alternatifs ont été mises en évidence :

- le galactosylcéramide (GalCer) ou les dérivés apparentés en particulier les formes sulfatées, qui sont principalement exprimés par les cellules épithéliales neurales (Bhat et al., 1991) et colorectales (Yahi et al., 1992);
- les lectines de type C comprenant les « Macrophages Mannose Receptors » (MMR), les « Mannose Binding Lectin » (MBL), les langerines et enfin, la molécule DC-SIGN qui sont exprimés par les populations myéloïdes incluant les monocytes, les macrophages les cellules dendritiques et les granulocytes (J Hart Masato Kato et al., 2018) ;
- les héparanes sulfate de protéoglycane (HSPG) qui se composent de trois familles : les syndéglycanes, les glypicanes et les perlécanes que l'on retrouve au niveau des membranes des cellules épithéliales et des fibroblastes (Sarrazin et al., 2011).

A cela s'ajoutent d'autres molécules pouvant également servir de corécepteur et permettre l'entrée de certains variants de VIH-1 *in vivo* (pour revue (Berger et al., 1999; Pollakis and Paxton, 2012)).

C. La dissémination virale

D'une manière générale, après avoir franchi la barrière épithéliale, le virus se multiplie dans les cellules cibles immunitaires sous-muqueuses, atteint les ganglions lymphatiques puis dissémine dans l'ensemble de l'organisme (Figure 3). La fenêtre de temps entre l'entrée du virus dans l'organisme et sa détection dans le sang, varie selon la voie muqueuse d'entrée. Des études *in vivo* chez le macaque ont permis d'appréhender les premières étapes de l'infection et de la dissémination muqueuse du VIH/VIS.

Au niveau vaginal, une fois que le virus a traversé la barrière épithéliale, il va ensuite pouvoir infecter les lymphocytes T de la lamina propria. Là, une réplication virale s'initie pendant 3 à 4 jours, en parallèle d'une dissémination aux cellules cibles voisines (macrophages, DC) qui sont recrutées grâce aux stimuli inflammatoires engendrés par l'infection. L'atteinte des ganglions lymphatiques se fait rapidement après infection notamment via la migration des DC qui vont transporter le virus et jouer un rôle d'activateur pour les lymphocytes T sur place. Il faut attendre 5 à 6 jours post-infection avant de détecter une réplication virale active dans ces derniers (pour revue (Hansasuta and Rowland-Jones, 2001; Keele and Estes, 2014)). Une étude s'est intéressée spécifiquement à la dissémination virale suite à l'inoculation intra vaginale de cellules infectées. Elle a mis en évidence une dissémination très rapide des cellules infectées, puisque dès 21h post-exposition, des cellules

étaient retrouvées au niveau des ganglions axillaires. Dès 48h, on retrouve du virus (en très petite quantité) dans les cellules immunes circulantes (Salle et al., 2010).

Au niveau colorectal, la dissémination se fait également rapidement. Après la traversée de la barrière épithéliale, les premières cibles détectées sont des lymphocytes T, des macrophages et des DC présentes dans la lamina propria. Seulement 4h après inoculation intra rectale chez le macaque, les agrégats lymphoïdes sont atteints, ainsi que les cellules cibles de la lamina propria. Une réplication locale s'enclenche et on retrouve du virus au niveau des ganglions axillaires et également dans les cellules circulantes dès 24h post-exposition (Ribeiro Dos Santos et al., 2011; Sui et al., 2016).

Au vu de ces données, la transmission colorectale est, sur bien des aspects, une voie de transmission privilégiée pour le virus, c'est pourquoi je m'y suis spécifiquement intéressée au cours de ma thèse.

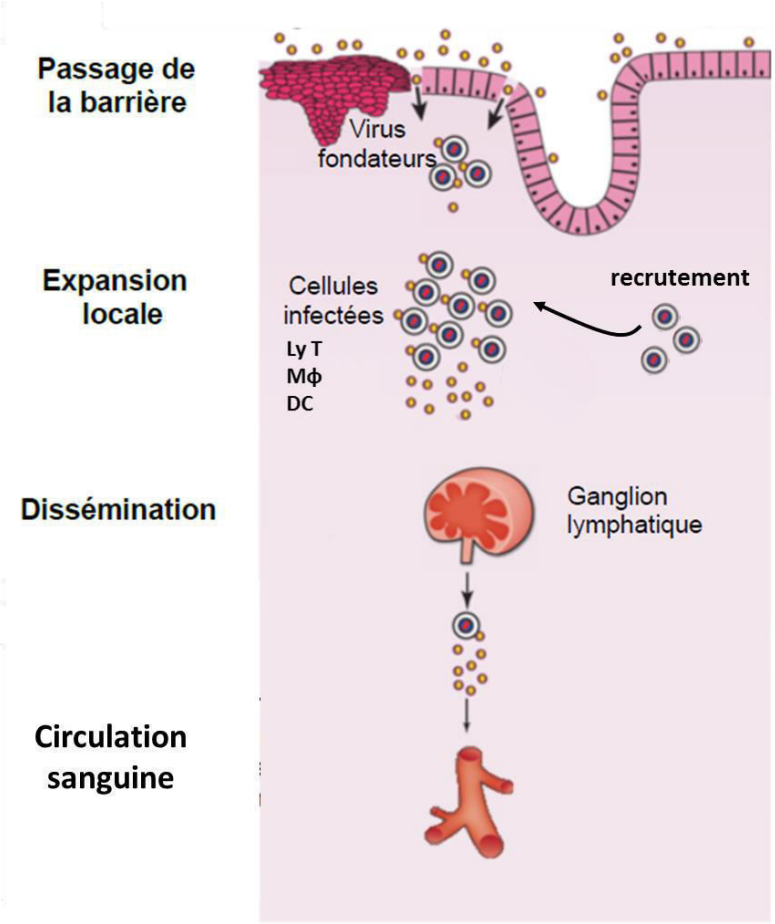


Figure 3 : Etape de la dissémination du VIH-1 lors de la transmission au niveau des muqueuses du tractus génital féminin et colorectale

En quelques heures le virus peut franchir la barrière épithéliale (mono ou pluristratifiée) et infecter les cellules du stroma. La population de cellules infectées se développe et l'infection se propage aux cellules environnantes, il y a ainsi production de virus. L'infection se dissémine alors aux ganglions lymphatiques et engendre une infection systémique.

Source : adapté de Haase, 2010

II. Transmission muqueuse du VIH

Lors d'une transmission sexuelle, le VIH peut pénétrer dans l'organisme via les différentes muqueuses génitales ou les muqueuses anale et colorectale. Spécifiquement chez la femme, les muqueuses du vagin et du col de l'utérus (exocol et endocol) représentent les principales portes d'entrée du virus dans l'organisme. L'endomètre et les trompes de Fallope sont également suspectés d'être des sites d'entrée potentiels, bien que leur exposition aux pathogènes présents dans le sperme n'a pas été clairement établie (Louissaint et al., 2012a). Spécifiquement chez l'homme, les muqueuses du prépuce, qui couvrent le gland du pénis, ainsi que l'urètre sont décrites comme des voies d'entrée du virus dans l'organisme (Ganor et al., 2010) (pour revue (Ganor and Bomsel, 2010)). La circoncision est associée à une réduction du risque d'infection par le VIH d'environ 40%. Cette protection est plus forte chez les hommes hétérosexuels, puisque les hommes circoncis présentent un risque réduit de 72% par rapport aux hommes homosexuels circoncis dont le risque est réduit de 20% (pour revue (Sharma et al., 2018)). Chez l'homme et la femme, la muqueuse colorectale représente la voie d'entrée du virus la plus perméable au passage du VIH (Tableau 1). Les cellules épithéliales muqueuses constituent une première barrière physique à l'environnement extérieur, plus ou moins efficace selon l'épaisseur de l'épithélium et l'organisation des cellules. Elles représentent également une barrière chimique avec la sécrétion de cytokines/chimiokines et de molécules à activité antimicrobienne, et jouent ainsi un rôle critique dans la défense de l'organisme face aux pathogènes. D'une manière générale, les muqueuses susceptibles d'être exposées à un virus sexuellement transmissible comportent des épithélia mono ou pluristratifiés, plus ou moins kératinisés, qui reposent sur une *lamina propria* riche en fibroblastes, en cellules immunitaires, composées à majorité de lymphocytes T, macrophages et DC, ainsi que de vaisseaux sanguins bordés par l'endothélium et enveloppés d'une couche de cellules musculaires.

Mode de transmission	Risque pour 10 000 expositions à une source infectée
Transmission sexuelle	
• Rapport sexuel anal réceptif	138
• Rapport sexuel anal insertif	11
• Rapport sexuel vaginal réceptif	8
• Rapport sexuel vaginal insertif	4
• Rapport sexuel oral	faible
Transmission verticale	
• Mère à l'enfant	2260

Tableau 1 : Risque de transmission par acte sans protection ni prise de traitements antirétroviraux (ARV), d'après Patel *et al*. (2014)

A. Muqueuses anales et colorectales

Dans ce chapitre, je décrirai en détails l'organisation des muqueuses anales et colorectales, leur composition en cellules cibles du VIH, ainsi que leurs mécanismes de défense propres. Je présenterai ensuite les différents modèles *in vitro* et *ex vivo* existant pour l'étude de la transmission du VIH à travers ces muqueuses.

i. Organisation des épithélia des muqueuses anales et colorectales

Au niveau de son organisation histologique, la muqueuse anale est formée d'un épithélium pluristratifié et kératinisé. La muqueuse colorectale quant à elle, située juste en amont de la muqueuse anale, est formée d'un épithélium cylindrique monostratifié recouvert d'une couche de mucus allant de 80 à 500 µm d'épaisseur (Corazziari, 2009). Cet épithélium de revêtement se compose en majorité de cellules caliciformes secrétant le mucus, qui s'invaginent dans la muqueuse en cryptes de Lieberkühn. Entre les muqueuses anales et colorectales, la zone de transition ou jonction anorectale se compose d'un épithélium pluristratifié non kératinisé (Iwasaki, 2010; Keele and Estes, 2014) (Figure 4).

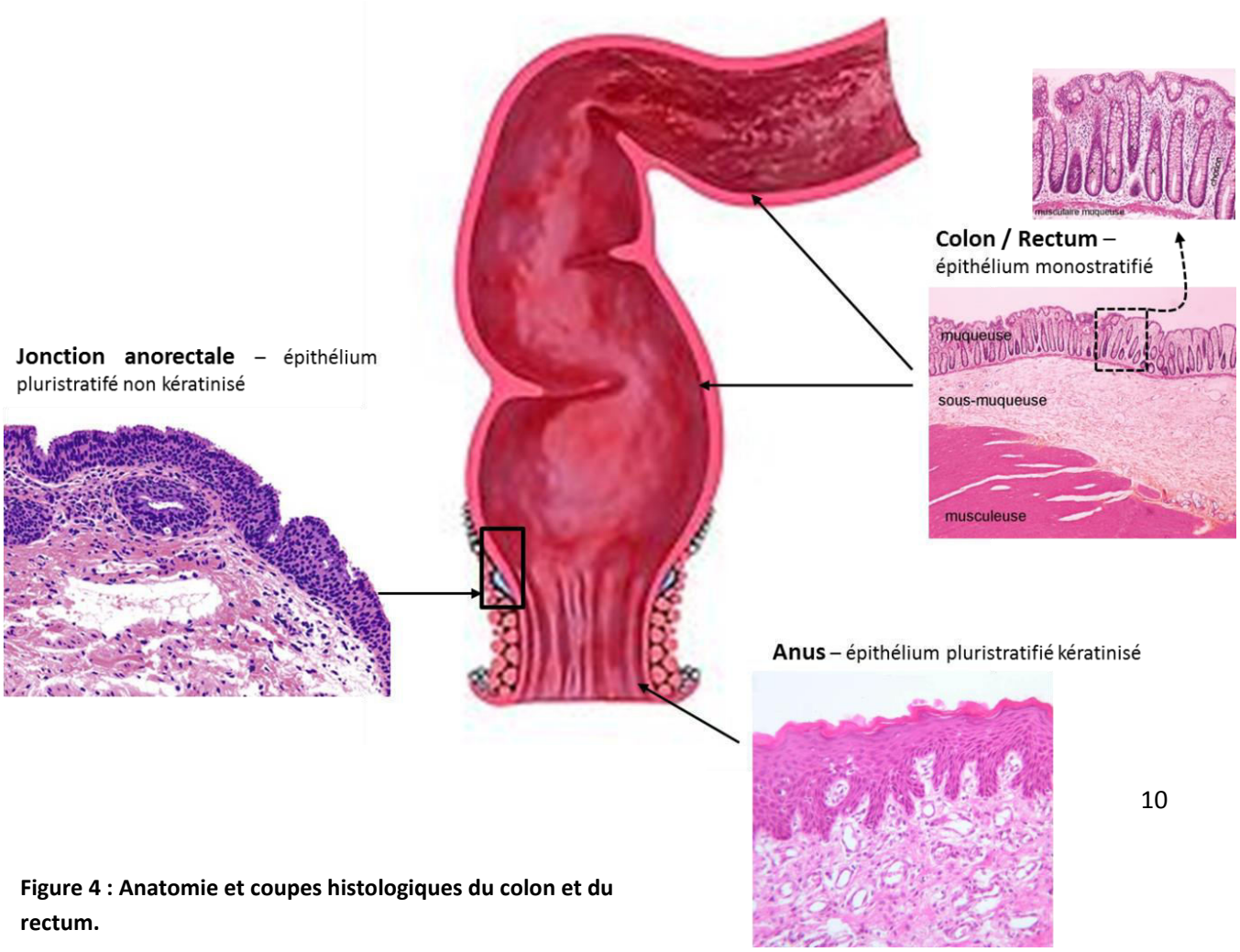


Figure 4 : Anatomie et coupes histologiques du colon et du rectum.

D'une manière générale, l'architecture des épithélia monostratifiés, tel que l'épithélium colorectal, est maintenue par un ensemble de jonctions intercellulaires, formées par les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, qui assurent la liaison physique entre les cellules, tout en permettant les échanges entres elles (Figure 5). Ces jonctions permettent aussi de limiter la translocation de pathogènes et de toxines présents du côté luminal de la barrière (Groschwitz and Hogan, 2009). Malgré l'expression de jonctions serrées entre les cellules épithéliales, les épithélia monostratifiés, moins épais, sont plus fragiles que les épithélia pluristratifiés et donc plus susceptibles à la formation de brèches. A l'inverse, des jonctions plus lâches sont observées dans les épithélia pluristratifiés, ce qui favorise l'infiltration de ces épithélia par les cellules immunitaires, potentiellement cibles de virus telles que le VIH, favorisant de fait la propagation de l'infection virale (pour revue (Shen et al., 2014)).

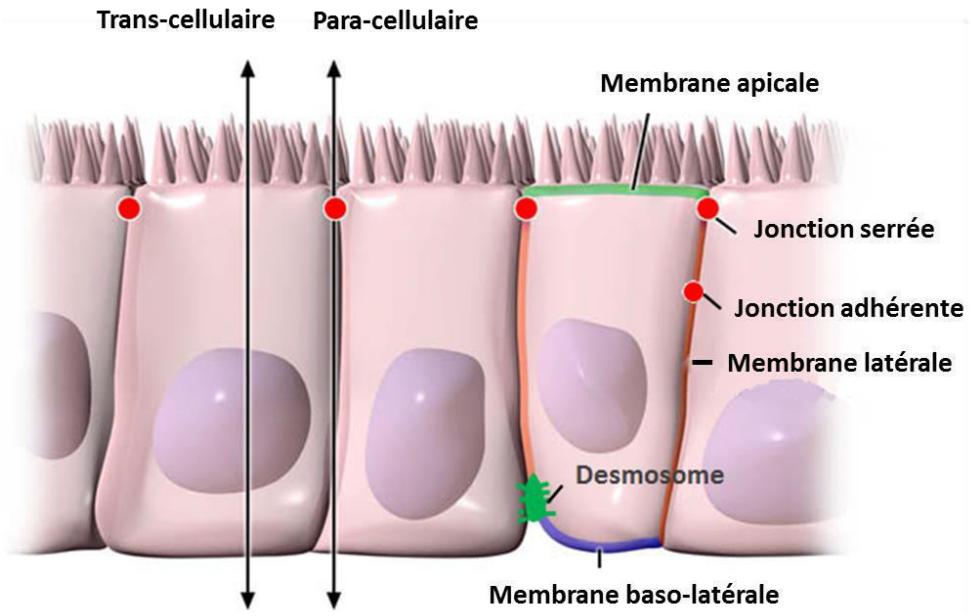


Figure 5 : Jonctions intercellulaires impliquées dans le maintien des barrières épithéliales
Adapté de Groschwitz *et al.*, 2009

ii. Les cellules épithéliales colorectales

Les cellules épithéliales sont les premières cellules au contact du virus contenu dans les secrétions contaminées par le VIH. Leur infection productive a été largement débattue. Des études *in vivo* dans le modèle simien et l'analyse de biopsies rectales de patients infectés par le VIH-1 ont

abouti au consensus actuel selon lequel les cellules épithéliales de la muqueuse rectale ne sont pas infectées de façon productive par le VIH-1 (pour revue (Ullrich et al., 1998)). Néanmoins, il est admis que le virus peut en tirer profit pour sa dissémination aux cellules cibles sous-épithéliales. En effet, les cellules épithéliales intestinales et colorectales montrent une absence d'expression du récepteur cible CD4 (Omary et al., 1991) et une expression préférentielle du corécepteur CCR5 plutôt que CXCR4 (Dwinell et al., 1999; Meng et al., 2002). En revanche, elles expriment différents récepteurs alternatifs qui permettent l'entrée du virus. Elles expriment par exemple le récepteur GalCer (galactosylceramide) ou les HSPG (Heparan Sulfate proteoglycans) (Fantini et al., 1993; Wei et al., 2015). On trouve également à leur surface luminale la glycoprotéine gp340. Cette protéine est dérivée d'une protéine soluble, l'agglutine salivaire (SAG), qui est une glycoprotéine de 340kDa appartenant à la super famille des DMBT1/Récepteur scavenger riche en cystéines et impliquée dans les défenses immunes. Elle peut être excrétée par les cellules épithéliales colorectales ou retrouvée à leur surface (Patyka et al., 2015). Dans ce cas, elle facilite entre autre la liaison du virus aux cellules épithéliales et par conséquent sa transmission (Stoddard et al., 2007).

Les cellules épithéliales colorectales expriment aussi une panoplie de molécules d'adhésion potentiellement impliquées dans la transmission cellule-cellule du VIH (transmission sur laquelle nous reviendrons en détail en partie II.B.iv). Ainsi, l'expression de JAM-A (Cavarelli et al., 2013), E-Cadherine (Cepek et al., 1994), CD44 (Brazil et al., 2010), CD29 (Rodriguez-Juan et al., 2001), Mac-1 (CD18/CD11b) (Davidson and Douglas, 1998; Hussain and Lehner, 1995) à la surface des cellules épithéliales colorectales primaires et/ou immortalisées est largement décrite. En revanche, il existe d'autres molécules dont l'expression est controversée. ICAM-1 est retrouvée sur l'épithélium colorectal sain par l'équipe de Davidson *et al.,* alors qu'il apparait aujourd'hui qu'elle n'est exprimée par ces cellules qu'en contexte inflammatoire (Vainer et al., 2003). Le panel d'expression des divers récepteurs alternatifs, et autres molécules d'adhésion fait de ces cellules épithéliales un acteur important dans la transmission du VIH, que ce soit à partir de cellules infectées des sécrétions ou par le biais de particules virales libres (mécanismes détaillés en II).

iii. Répartition des cellules du système immunitaire dans la muqueuse colorectale

De nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans la muqueuse colorectale, telles que des lymphocytes T, population la plus abondante dans le colon et le rectum (McElrath et al., 2013), des lymphocytes B principalement producteurs d'IgA (Abreu, 2010), des cellules Natural Killer (NK), des DC de type Langerhans, des éosinophiles résidents (Preza et al., 2014) et de nombreux macrophages CD14+ CD68+ CD163+ et DCSIGN+ de phénotype M2 (anti-inflammatoires). Cette

diversité de cellules immunitaires fait de cette muqueuse un site privilégié pour l'entrée de virus ciblant les cellules immunitaires tels que le VIH (Isidro and Appleyard, 2016; Preza et al., 2014). Une étude s'intéressant aux cellules présentatrices d'antigène (APC) dans la muqueuse colorectale a montré la présence de DC de type Langerhans dans l'épithélium colorectal, localisées entre les cellules caliciformes (Preza et al., 2014). Ces cellules présentent un phénotype immature puisqu'elles n'expriment pas les marqueurs classiques de maturation des cellules dendritiques, CD83 et CD208, et sont retrouvées de manière beaucoup plus importante dans la muqueuse colique par rapport à la muqueuse rectale, ce qui laisse suggérer une susceptibilité différente à l'infection par le VIH-1 de ces 2 muqueuses. Preza et al. montrent également que les macrophages/monocytes, caractérisés par les marqueurs CD163, CD14, CD68 et CD209, constituent la population majeure d'APC dans le rectum et le colon sigmoïde, puisqu'ils sont jusqu'à 7 fois plus nombreux que les DC (Preza 2014). Aussi de façon intéressante, il est décrit que le rectum contient 3 fois plus de macrophages CD68+ exprimant le corécepteur CCR5, que le colon (McElrath et al., 2013). Les macrophages rectaux seraient donc plus sensibles à l'infection par le VIH-1 que les macrophages du colon. Toutefois, ces données restent controversées, Fletcher et al. ayant montré des différences mineures entre le rectum et le colon sigmoïde, avec une tendance à une expression légèrement plus élevée de CCR5 et de HLA-DR dans les cellules du colon sigmoïde (Fletcher et al., 2006).

Les lymphocytes T sont présents à la fois dans la *lamina propria* et enchâssés dans la membrane épithéliale du colon et du rectum. Ces derniers sont appelés lymphocytes intraépithéliaux, et ils exercent un rôle majeur dans la captation du virus. Il est décrit qu'au moins une partie de ces lymphocytes intraépithéliaux expriment le récepteur γδ (Dalton et al., 2006). De larges agrégats lymphoïdes composés de lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont retrouvés dans la lamina propria, adjacent à la zone de jonction anorectale et en bordure sous-épithéliale (Iwasaki, 2010; Preza et al., 2015). Les lymphocytes T de la muqueuse colorectale (intraépithéliaux ou dans la lamina propria) présentent un phénotype mémoire, ce qui les rend particulièrement susceptibles à l'infection par le VIH (Schieferdecker et al., 1992). La population de cellules T CD4 α4β7, retrouvée dans le tractus gastro-intestinal et par conséquent dans la muqueuse colorectale, a été décrite comme une cible majeure du VIH/SIV, principalement lors de la phase aigüe de l'infection (Cicala et al., 2009; Kader et al., 2009; Martinelli et al., 2013). Il est par ailleurs estimé que 60% des lymphocytes de la muqueuse colorectale expriment les corécepteurs CCR5, CXCR4 ou les deux (Elliott et al., 2018).

iv. Les mécanismes de défense des muqueuses

Les cellules épithéliales de la muqueuse colorectale secrètent de nombreux facteurs biologiques assurant et renforçant cette barrière épithéliale, un état des lieux de leur arsenal de défense s'impose donc.

Mucus et mucines

Le mucus colorectal recouvre la face interne de la muqueuse colorectale en deux couches distinctes. Une première couche, plus dense, stérile et solidement attachée à l'épithélium qui agit comme une barrière entre la couche de cellules épithéliales et la population microbienne présente dans le colon. Elle est recouverte d'une seconde couche plus épaisse, moins dense, moins adhérente et colonisée par les bactéries (Antoni et al., 2013; Sellers and Morton, 2014). Celle-ci est constamment renouvelée puisque dégradée par les bactéries et les enzymes locales (Sellers and Morton, 2014). Le mucus, d'une manière générale est composé essentiellement d'eau (~ 65%) mais également de lipides, d'acides nucléiques, de débris cellulaires, d'ions et de protéines dont les mucines, qui sont des protéines hautement glycosylées et dont la principale caractéristique est leur capacité à former des gels (Corazziari, 2009). Dans le colon, MUC2 est la principale mucine secrétée par les cellules caliciformes de la muqueuse, avec dans une moindre mesure MUC5B et MUC6 (Sellers and Morton, 2014). Il existe également des mucines membranaires dont MUC1, MUC3 et MUC4 sont les principaux exemples, même si l'on pourrait ajouter MUC11 et MUC17 (Gaudier and Hoebler, 2006). Chaque mucine possède des fonctions directement liées au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit [pour revue (Gaudier and Hoebler, 2006)). Il est néanmoins important de retenir qu'une des fonctions majeures du mucus est de retenir les microorganismes et les polluants à la surface des épithéliums participant ainsi à leur protection. Le pH du mucus rectal est neutre, et ce dernier est activement secrété en réponse à l'insertion de matériaux non iso-osmolaires ou de pH non neutre en vue de rétablir l'iso-osmolarité et la neutralité ambiante (Ham et al., 2015).

Facteurs antimicrobiens

En plus des mucines, les secrétions des muqueuses contiennent différentes protéines et peptides à activité antimicrobienne (AMP) qui peuvent directement lier et tuer les microorganismes avant qu'ils ne puissent atteindre la couche épithéliale. Certain(e)s de ces peptides/protéines présentent une activité anti-VIH.

Les défensines et les cathélicidines sont les deux plus grandes familles de peptides antimicrobiens chez l'homme (Jäger et al., 2010). Les défensines sont divisées en trois groupes, α-, β- et θ- défensines (Mayumi K. Holly et al., 2017). Il s'agit de petits peptides cationiques à action antibactérienne, antifongique et antivirale qui sont soit produits constitutivement, soit induits par des stimuli pro-inflammatoires, des microbes ou leurs produits. Les défensines exercent une activé anti-VIH en se liant directement au virus ou en bloquant sa réplication en inhibant la voie de signalisation impliquant la protéine kinase C (α-défensine) (Furci et al., 2012). Elles peuvent également empêcher l'entrée du virus dans la cellule cible via la diminution de l'expression du corécepteur d'entrée CXCR4 (β-défensine) (Mayumi K. Holly et al., 2017). Les cathélicidines sont également des peptides cationiques à action anti-bactérienne, anti-fongique, anti-cancer, anti-inflammatoire et à activité immuno-modulatoire. Seule la cathélicidine LL-37 a été identifiée chez l'homme. Elle est notamment produite par les cellules épithéliales du colon (Antoni et al., 2013), et présente une activité inhibitrice sur la réplication du VIH en agissant en particulier sur la reverse transcription du génome viral (Ng et al., 2015).

Aux défensines et cathélicidines viennent s'ajouter la lactoferrine, la trappin/elafine, les protéines SLPI (secretory leukocytes protease inhibitor) et les enzymes telles que le lysozyme, qui sont d'autres protéines à activité antimicrobienne et anti-HIV présentes dans le mucus colorectal (Antoni et al., 2013; Romas et al., 2014).

La lactoferrine agit en inhibant l'activité de la reverse transcriptase, bloquant ainsi la bonne réplication du virus (Ng et al., 2015). Plus récemment, il a également été montré que la lactoferrine présente dans le mucus colorectal peut se lier au DC-SIGN des cellules dendritiques, bloquant ainsi la liaison des cellules dendritiques au virus et donc sa transmission aux cellules cibles de la muqueuse (Stax et al., 2015). La trappin-2/elafine inhibe l'infection par le VIH en interagissant directement avec le virus (Ghosh et al., 2010). Les protéines SLPI sont des membres de la famille des trappines et sont secrétées au niveau des muqueuses par les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages activés. Elles sont retrouvées dans de nombreuses secrétions dont le mucus colorectal. Les SLPI interagissent avec les protéines membranaires du pathogène et peuvent ainsi interférer avec l'entrée du virus et la fusion des membranes (Ghosh et al., 2010). Enfin, le lyzozyme est une enzyme antibactérienne qui agit par clivage des peptidoglycanes. C'est une protéine cationique qui peut interagir avec les membranes cellulaires et notamment avec le récepteur CD4 et bloquer l'entrée du VIH et donc sa réplication (Behbahani et al., 2018).

Les composants du complément sont également présents dans les secrétions colorectales (Romas et al., 2014). Ils sont produits de manière locale principalement par les cellules épithéliales et sont retrouvés sous leur forme native (c'est-à-dire non clivée). Le système du complément est un groupe de 25 protéines appartenant au système immunitaire inné. De façon générale, le rôle de ce système est de stimuler l'inflammation, l'opsonisation et la lyse des pathogènes et des cellules infectées permettant ainsi leur élimination. Paradoxalement, il a été démontré que le système du complément augmente le risque d'infection par le VIH. En effet, le virus opsonisé peut échapper à la lyse et détourner cette opsonisation à son avantage pour faciliter son interaction avec les récepteurs au complément CR3 et CR4 présents à la surface des cellules dendritiques, capables en aval de provoquer la dissémination du virus aux autres cellules cibles de la muqueuse (Bouhlal et al., 2002).

Les Immunoglobulines (Ig)

Les secrétions colorectales contiennent d'autres facteurs participant à la défense de la muqueuse contre les pathogènes, et notamment des immunoglobulines : les IgA, les IgG et les IgM. Les IgA sont de loin les immunoglobulines les plus abondantes présentes dans le fluide colorectal, suivie des IgG (Mestecky, 2007). Ces anticorps sont produits par des plasmocytes présents dans la *lamina propria* de la muqueuse colorectale et sont transportés dans des vésicules d'exocytose suite à leur liaison avec un récepteur cellulaire présent au niveau des cellules épithéliales, le pIgR, polymeric-imunioglobulin réceptor dans le mucus rectal (Strugnell and Wijburg, 2010). Ces immunoglobulines poly-spécifiques peuvent reconnaître différents épitopes, et bien que leur efficacité soit faible et qu'elles ne bloquent pas complètement les pathogènes, elles permettent une réponse rapide face à l'infection. Trois mécanismes d'élimination des pathogènes ont été décrits (Strugnell and Wijburg, 2010) (Figure 6):

- les Ig se fixent au virus dans la lumière de la muqueuse et forment un complexe immun. Le virus se retrouve piégé et éliminé dans le mucus. Ce mécanisme qualifié d'exclusion immune empêche donc l'attachement à et/ou l'invasion des cellules épithéliales;

-les IgA contenues dans les vésicules d'exocytose exprimant le récepteur pIgR responsable de leur adressage du côté luminal de la muqueuse peuvent neutraliser les pathogènes qui ont pénétré les cellules épithéliales;

- les IgA présentes dans la *lamina propria* participent aussi à l'excrétion des antigènes présents dans ce compartiment puisqu'elles les reconnaissent et les transportent ensuite à la surface luminale des cellules épithéliales.

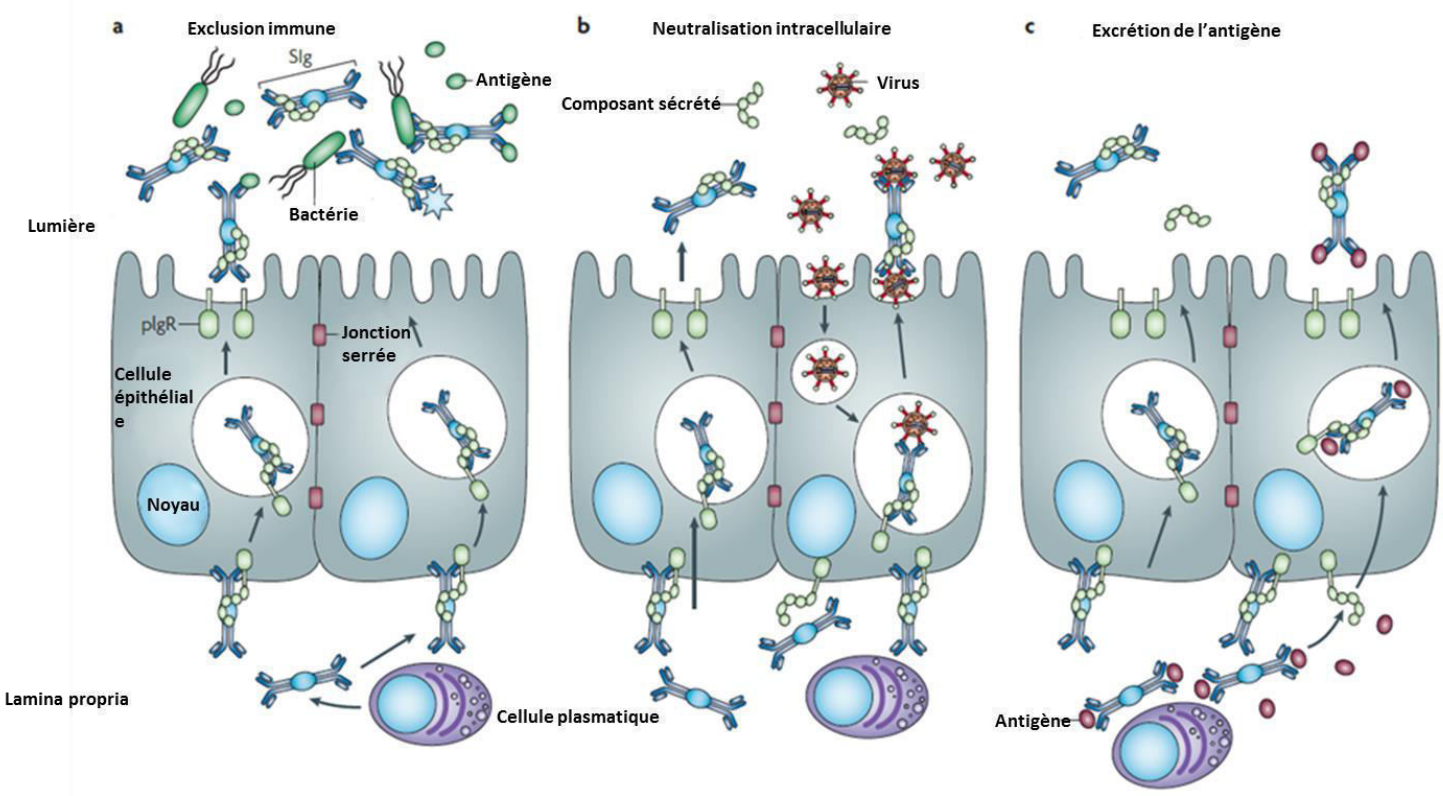


Figure 6 : Mécanismes de défense des muqueuses par les immunoglobulines
a. Exclusion immune
Les immunoglobulines de sécrétion (SIg) se lient aux antigènes (dérivés d'agents pathogènes) et empêchent ou inhibent leur fixation aux cellules épithéliales et / ou leur envahissement.
b. Neutralisation intracellulaire
Le complexe récepteur pIgR - IgA entraine la neutralisation intracellulaire des agents pathogènes qui ont envahi les cellules épithéliales.
c. Excrétion des antigènes
Les anticorps sécrétoires interviennent dans l'élimination des antigènes de la lamina propria de la muqueuse. Les antigènes sont liés aux IgA dimériques et sont ensuite transportés par endocytose à la surface luminale des cellules épithéliales pour une libération dans la lumière de la muqueuse.

Flore endogène

La flore microbienne, présente à la surface de toutes les muqueuses, joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité épithéliale. La flore du tractus gastro-intestinal dans laquelle plus de 1000 espèces de bactéries ont été identifiées joue un rôle dans la réponse immunitaire et le renouvellement des cellules de la muqueuse, puisque certaines bactéries commensales ou leurs métabolites peuvent réguler la prévalence et/ou l'état d'activation de certaines cellules immunitaires de la muqueuse. On retrouve dans cette flore gastro-intestinale 4 populations majoritaires de bactéries : les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobactéries et les Proteobactéries (Iwasaki, 2010). A ce jour, une seule étude récente menée chez le macaque a

démontré un lien entre microbiote et sensibilité à l'infection par le SIV (Virus de l'Immunodéficience Simienne). En effet, d'après les auteurs, en fonction du microbiote, les populations de cellules cibles présentes dans la muqueuse diffèrent, ainsi que dans leurs niveaux d'activation immuns, ce qui serait à l'origine d'une sensibilité différente des macaques à la transmission rectale du SIV (Sui et al., 2018).

Les PRR

Comme sur les autres surfaces muqueuses, de multiples récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) exprimés par différents types cellulaires assurent la surveillance de la barrière colorectale. Les recherches de ces vingt dernières années ont identifié plusieurs membres de la famille des PRR incluant les Toll-Like Récepteurs (TLR) exprimés à la membrane plasmique ou endosomale, les Retinoic acid-inductible Gene-1 Like Receptors (RLRs) et les Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptorrs (NLR) que l'on retrouve dans le cytosol (Onyiah and Colgan, 2016). D'une manière générale, la reconnaissance d'un antigène viral ou bactérien par les PRR conduit à la sécrétion d'un panel de cytokines pro inflammatoires (IL-6, IL-8, TNFα, SDF-1…), de β-chimiokines (MIP-1α et -1β…), mais également d'interféron β qui joue un rôle majeur dans la mise en place de l'immunité antivirale (pour revues (Nguyen et al., 2014; Sellers and Morton, 2014)). Ainsi, l'activation des PRR a pour double rôle de répondre directement aux pathogènes et de signaler l'agression en cours aux cellules du système immunitaire inné et acquis.

Les cellules épithéliales du colon expriment un large panel de PRR, les TLR-1 à 9 (Abreu, 2010). Notons toutefois que les TLR 2 et 4 (qui reconnaissent spécifiquement les lipoprotéines et lipopolysaccharides bactériens) sont exprimés à de faibles niveaux par les cellules épithéliales colorectales, à la différence des TLR 3 et 5 (qui reconnaissent respectivement les ARN double brins et la flagelline des bactéries), abondamment exprimés (Onyiah and Colgan, 2016).

Cytokines et chimiokines

Contrairement au tractus génital féminin, peu d'études décrivent les cytokines et chimiokines produites par les cellules épithéliales colorectales exposées à un pathogène. Les cellules épithéliales colorectales, ainsi que des cellules immunes comme les lymphocytes Tγδ retrouvées dans la muqueuse rectale (Groschwitz and Hogan, 2009), produisent à la fois des facteurs anti-inflammatoires tels que TFF2 (Trefoil Factor 2), IL10, TGF-β et des cytokines pro-inflammatoires : IL-1α,IL-1β, IL6, IL-8 et TNF-α. Paradoxalement, les cytokines pro-inflammatoires ont un effet facilitateur de l'infection en attirant par chimiotactisme les cellules immunitaires, cibles du virus, au site de l'infection, favorisant ainsi la propagation virale (Nguyen et al., 2014). De plus, l'activation des PRR dans les cellules épithéliales induit la production d'interférons (Andrews et al., 2018) qui, dans le

tractus génital féminin, ont une action anti-VIH en stimulant la production de facteurs de restriction (APOBEC-3G/3F, SAMHD1, Tétherine, Mx2) et/ou de ligands de CCR5 ou via l'activation des cellules NK, DC et autres macrophages (Nguyen et al., 2014).

v. Les modèles de muqueuses colorectales reconstruites *in vitro*

Je détaillerai dans cette partie les différents modèles de muqueuse colorectale qui ont été développés pour l'étude de l'infection par le VIH *in vitro*, en mettant en exergue les avantages et les limitations de chaque modèle selon le type d'étude réalisée.

- Culture de cellules épithéliales immortalisées

Le modèle de cellules épithéliales coloniques le plus largement utilisé ces 30 dernières années, et sur lequel j'ai moi-même travaillé pendant cette thèse, est le modèle CaCo2. Ces cellules, issues d'un adénocarcinome humain, ont la capacité, lorsqu'elles sont cultivées sur insert semi-perméable, de former une monocouche de cellules épithéliales pleinement différentiées présentant une polarité apico-basale et exprimant des jonctions serrées, caractéristiques des monocouches épithéliales bordant la muqueuse colorectale (Pereira et al.). Les lignées présentent l'avantage d'être bien caractérisées et standardisées et, contrairement à tous les modèles primaires, elles sont un matériel biologique facilement accessible. De ce fait, beaucoup d'études portant sur l'étude de la transmission du VIH ont été réalisées sur ce type de matériel. En 1997, Morgane Bomsel démontrait, grâce entre autres à un modèle de cellules CaCo2 polarisées, que le VIH n'infecte pas productivement ces cellules, mais qu'il est capable de traverser la monocouche épithéliale par transcytose (mécanisme qui sera détaillé dans la partie II.B.ii) (Bomsel, 1997). Cette observation sera confirmée par la suite à de multiples reprises (Alfsen et al., 2005; Bomsel et al., 2007; Shen et al., 2010a). Néanmoins, il est admis que les cellules immortalisées possèdent une morphologie et des caractéristiques biochimiques différentes des cellules primaires, ce qui constitue leur principale limitation (composition en lipides, en protéines et glycosylation différentes des cellules primaires) (Bomsel and Alfsen, 2003). Il n'existe pas à ma connaissance, d'étude utilisant des cellules épithéliales colorectales primaires.

- Co-cultures de cellules épithéliales/cellules des sécrétions génitales ou de la lamina propria

Afin de se rapprocher un peu plus des conditions physiologiques, il existe des systèmes de co-culture qui consistent à cultiver simultanément différents types cellulaires primaires et/ou de lignées, susceptibles d'interagir dans la transmission du virus. Ces modèles permettent d'analyser les

interactions entre la barrière épithéliale et les différents types cellulaires présents dans les sécrétions génitales ou en sous-muqueux lors d'une transmission virale. Grâce à un système de coculture de CaCo2 polarisées / DC primaires, Cavarelli et al. ont montré que les particules virales VIH-1 de type R5 sont capables d'attirer les cellules dendritiques de l'épithélium colorectal à la surface luminale, afin de capter et lier du virus pour ensuite le disséminer en sous-muqueux. Ils ont par ailleurs montré dans ce modèle l'existence d'un phénotype migratoire complètement réversible des cellules dendritiques, qui sont capables de retourner du côté basal de l'épithélium suite au contact avec le virus (Cavarelli et al., 2013).

- Cultures organoïdes

Depuis peu, un nouveau modèle émerge : la culture d'organoïdes. Le principe de cette approche consiste à isoler des cellules souches naturellement présentes dans l'épithélium colorectal, par cytométrie en flux par exemple. Ces cellules ont la particularité de se différencier en différentes populations cellulaires sous l'influence de facteurs de croissance particuliers. Une fois ces cellules isolées, elles sont mises en culture dans une suspension de matrigel en présence de nombreux facteurs de croissance. Il faut attendre 2 à 3 semaines avant d'obtenir les organoïdes. Les cellules différenciées (cellules épithéliales et cellules à mucus) forment une sphère avec au centre la lumière bordée par les membranes apicales des cellules (pour revues (Pereira et al.; Wildenberg and van den Brink, 2012)). A ce jour, une étude a démontré avec des cultures organoïdes de cellules épithéliales issues de la muqueuse intestinale de patients séropositifs que l'infection VIH et l'initiation d'un traitement antirétroviral induisaient des changements d'expression de l'ubiquitine A20 qui joue un rôle dans la fonction épithéliale. Cela pourrait jouer un rôle important dans la dynamique de la barrière intestinale lors d'une infection VIH (Chitre et al., 2018).

Malgré les contributions majeures qu'ils ont permis d'apporter quant à la transmission du virus, les modèles cellulaires ont une valeur physiologique qui reste limitée puisqu'ils ne prennent pas en compte le contexte tissulaire in *vivo*.

- Cultures organotypiques

A ce titre, les cultures organotypiques constituent *a priori* le modèle le plus intégratif et le plus physiologique dont les chercheurs disposent aujourd'hui pour l'étude *in vitro* des mécanismes de transmission des virus sexuellement transmissibles tels que le VIH.

Brièvement, cela consiste en la mise en culture de fragments de tissu sain comprenant l'épithélium et la sous muqueuse, obtenus après chirurgie et coupés en petits blocs de quelques mm^2

pour éviter le phénomène d'anoxie (raréfaction de l'O_2 disponible) au centre du tissu. La culture du tissu se fait le plus souvent à l'interface air/liquide ou bien également de façon submergée dans le milieu de culture. Dans le premier cas, les fragments de tissu sont disposés sur des membranes poreuses de polycarbonate ou de collagène dans des systèmes à deux chambres ou bien sur des éponges de gélatine (gelfoam). Dans ces systèmes, il est possible de polariser la transmission virale, c'est-à-dire de restreindre l'application de virus à la face apicale de l'épithélium afin de mimer au mieux les mécanismes de la dissémination virale. Pour cela, le tissu est orienté lors de sa mise en culture, face épithéliale vers le haut et face sous-muqueuse en contact avec la membrane ou le gelfoam. Pour ce faire, deux stratégies majeures sont utilisées : la première consiste à entourer l'explant d'agarose afin de ne laisser accessible que la face épithéliale aux différents composés que l'on applique (Kolodkin-Gal et al., 2013; Tugizov et al., 2011); la deuxième consiste à simplement fixer un cylindre avec de la colle chirurgicale sur la face épithéliale du tissu, permettant là encore une application des substances directement dans le cylindre et donc de façon restreinte à la face apicale (Cavarelli et al., 2013; Shen et al., 2009; Tsilingiri and Rescigno, 2012). L'association de ces deux stratégies permet d'assurer au mieux la polarisation de la culture.

L'avantage majeur des cultures organotypiques est qu'elles permettent de conserver en culture l'architecture tissulaire originale. L'infection polarisée de ces fragments de tissu permet donc de mimer de manière très physiologique les mécanismes de transmission virale au niveau des muqueuses.

Cependant, il est important de souligner que le maintien de cette architecture peut être très court selon les tissus considérés, ce qui constitue une limitation importante. La durée de survie limitée de certains types cellulaires dans le tissu, qui sont moins bien « nourris » qu'en système de culture 2D, peut s'expliquer soit en raison d'un accès plus restreint aux nutriments, soit parce que le milieu de culture utilisé doit représenter un compromis par rapport aux besoins des différents types cellulaires.

Les épithélia du colon sont de loin les plus fragiles, l'intégrité de l'épithélium n'excédant pas 6h de culture en conditions classiques (incubateurs conventionnels) (Wildenberg and van den Brink, 2012) et 24h en atmosphère enrichie en O_2 (Dezzutti et al., 2014). Dans tous les cas, l'intégrité du tissu est conditionnée par une mise en culture extrêmement rapide après l'excision chirurgicale. Enfin, une limite importante à l'utilisation de tous les modèles primaires, est l'approvisionnement en tissu humain, qui peut être rare ou irrégulier selon les organes.

B. Mécanismes de la transmission du VIH au niveau des muqueuses

Dans des conditions physiologiques normales, l'épithélium colorectal constitue une barrière physique imperméable au passage des pathogènes. De nombreuses études *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*, ont contribué à la compréhension des mécanismes permettant au VIH d'outre-passer les barrières physiques et chimiques des muqueuses génitales, et dans une moindre mesure, anale et colorectale, pour que le virus atteigne ses cellules cibles présentes dans la sous-muqueuse. Plusieurs mécanismes de passage du VIH au travers les muqueuses ont ainsi été proposés selon le site de l'infection et la nature du virus, c'est-à-dire qu'il soit sous forme de particules libres (Cell-free virus) ou bien qu'il soit présent à l'intérieur de cellules préalablement infectées (Cell-Associated virus) (Figure 7).

i. Passage par des brèches

Lors d'un rapport sexuel même « non violent », l'apparition de micro-abrasions ou de micro-brèches de l'épithélium sont fréquentes, particulièrement au niveau de la muqueuse colorectale. En effet, la muqueuse colorectale est recouverte d'un épithélium monostratifié, et de nombreux microtraumatismes peuvent donc apparaître suite à un rapport anal insertif. D'autres facteurs non mécaniques peuvent également favoriser voire engendrer l'apparition de brèches, que ce soit au sein des muqueuses féminines ou colorectales, parmi lesquels l'inflammation de la muqueuse liée à une infection préalable, le virus lui-même ou encore l'utilisation de certains lubrifiants, microbicides ou spermicides.

Plus en détails, l'inflammation de la muqueuse induite par une infection bactérienne ou virale se traduit par un afflux de cellules immunitaires et de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles peuvent altérer la barrière épithéliale et rendre ainsi les cellules muqueuses sous-épithéliales accessibles à d'autres agents pathogènes, dont le VIH.

Le virus lui-même est également capable d'altérer la barrière épithéliale colorectale ainsi que les barrières endométriale et cervico-vaginale. Nazli *et al.*, ont ainsi montré que l'exposition à des particules de VIH-1 altère l'intégrité d'une monocouche épithéliale colorectale en utilisant le modèle cellulaire T-84, et altère l'intégrité des modèles de monocouches épithéliales primaires polarisées d'endomètre et de col de l'utérus cultivées sur matrigel, ce qui se traduit par une baisse de la résistance trans-épithéliale, une perte de l'expression des protéines de jonction et une perméabilité accrue de la barrière épithéliale au dextran (Nazli et al., 2010). Grâce à ce modèle simplifié de barrière épithéliale, le mécanisme de cette altération a pu être appréhendé, et des expériences de neutralisation ont démontré que la protéine d'enveloppe du virus (gp120) génère une altération de

la barrière épithéliale en provoquant la sécrétion de TNFα par les cellules épithéliales (Nazli et al., 2013).

Pour ce qui concerne les gels lubrifiants, microbicides, ou spermicides normalement préconisés pour une utilisation vaginale, plusieurs études ont démontré qu'ils pouvaient causer une altération de l'épithélium colorectal (Gorbach et al., 2012; Patton et al., 2002; Rebe et al., 2013), une perte des jonctions adhérentes et des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Mesquita et al., 2009), et par conséquent une augmentation de la perméabilité muqueuse (Fuchs et al., 2013). Cela a notamment été rapporté dans le cas de l'utilisation du gel microbicide/spermicide nonoxynyl-9 (Phillips and Zacharopoulos, 1998; Phillips et al., 2004). Pour la petite histoire, jusque dans les années 2000 de nombreux modèles de préservatifs étaient lubrifiés avec des solutions contenant du nonoxynol-9. *In vitro*, le nonoxynol-9, en plus de pouvoir lyser les spermatozoïdes, montre des propriétés bactéricides, mais également des propriétés antivirales. Cependant, son utilisation *in vivo* présente bien des complications. Plusieurs études ont montré que non seulement le nonoxynol-9 provoque des irritations vaginales et/ou anales, ce qui augmente le risque d'infection par des agents pathogènes, mais également qu'il a tendance à augmenter, même sans irritation, la perméabilité de la muqueuse anale, notamment au VIH (McGowan and Dezzutti, 2014). Ceci lui a même valu de faire l'objet d'un message d'alerte de la part du CDC (Centers for Disease Control and Prevention) américain. Il a fallu attendre décembre 2007 pour que la Food and Drug Administration américaine émette également un bulletin d'alerte (AIDS Survival Project).

En conclusion de cette partie, nous retiendrons que l'infection par le VIH par le biais d'une brèche est le mode de passage du virus le plus simple, le plus rapide et le plus efficace puisque les virions libres ou les cellules infectées traversent directement la muqueuse pour aller au contact des cellules cibles résidentes dans la lamina propria. Cependant, toutes les muqueuses ne présentent pas la même susceptibilité à la formation de brèches et le virus peut recourir à divers autres mécanismes de passage afin de franchir une barrière épithéliale intacte.

ii. Transport à travers les cellules épithéliales, la transcytose

La transcytose se caractérise par le transport polarisé de virus à l'intérieur de cellules épithéliales, du pôle apical vers le pôle basal, sans infection productive de la cellule hôte. Le virus endocyté par les cellules épithéliales peut provenir d'une source de virus libres ou bien de particules virales relarguées par des cellules infectées qui forment des synapses virologiques au pôle apical des cellules épithéliales. Ce mécanisme de transmission virale au niveau des muqueuses génitales et colorectales a été décrit pour la première fois *in vitro* (lignées colorectale I407, HT-29, CaCo2 et endométriale HEC-1) pour le VIH-1 par Bomsel *et al.* en 1997 (Bomsel, 1997). La transcytose du VIH-1

a depuis été montrée et confirmée dans divers modèles de cultures polarisées de monocouches de cellules épithéliales immortalisées dérivées d'intestin (I407), de colon (HT29, Caco2, T84), d'endomètre (HEC1) et dans des monocouches de cellules vaginales et endocervicales primaires (Alfsen et al., 2005; Bobardt et al., 2007; Bomsel et al., 1998, 2007; Hocini et al., 2001; Martin-Latil et al., 2012). Ce processus a de plus été observé dans un modèle plus intégratif de culture d'explants colorectaux (Shen et al., 2010b), exposés à des particules virales libres de VIH-1 ou à des cellules leucocytaires infectées pendant un laps de temps court (2h), insuffisant pour générer une infection productive des cellules épithéliales.

Dans ces études, le passage de virus à travers la barrière épithéliale par transcytose, dès 30 minutes d'exposition, se fait par détection de la protéine virale p24 dans le surnageant de culture au niveau basal, par test d'infectivité sur des cellules reportrices, ou enfin par observation en microscopie électronique de l'infection des cellules. La cinétique d'internalisation des particules virales a été évaluée par mesure de la protéine virale p24 dans les cellules épithéliales lysées (Bobardt et al., 2007). Il a par ailleurs été montré que le passage viral est inhibé lorsque l'on abaisse la température à 4°C ou bien lorsque l'on provoque la dépolymérisation irréversible des microtubules (Martin-Latil et al., 2012). La mise en évidence de la transcytose de particules virales nécessite impérativement de s'assurer de l'étanchéité de la couche épithéliale. Cette vérification s'effectue par le contrôle du maintien de la résistance transépithéliale (RTE) à l'aide d'un ohmmètre, par l'absence du passage paracellulaire de marqueurs extracellulaires (eg [^{14}C]inulin ou FITC-BSA) et par le maintien de l'expression de protéines de jonction telles que ZO-1. Ceci permet d'exclure l'éventualité d'un passage de particules virales par un mécanisme paracellulaire, c'est-à-dire entre les cellules épithéliales. Les mécanismes mis en jeu lors de la transcytose ne sont pas encore clairement élucidés. Notamment, le rôle de la protéine d'enveloppe gp120 du virus est encore débattu. Certains auteurs évoquent une liaison nécessaire de la gp120 aux récepteurs HSPG (Heparan Sulfate proteoglycans) (Bobardt et al., 2007) et au récepteur gp340 (Stoddard et al., 2007) connus pour être exprimés entre autres par les cellules épithéliales vaginales (Bobardt et al., 2007), endocervicales (Stoddard et al., 2007), et de la muqueuse colorectale (Wei et al., 2015). En effet, des expériences réalisées avec des virus modifiés (Δgp120) ou bien avec l'ajout d'antagonistes ou d'anticorps bloquants contre les récepteurs de la famille HSPG et gp340 respectivement démontrent une diminution voire une inhibition du processus de transcytose. A l'inverse, d'autres études proposent un mécanisme indépendant de l'enveloppe virale (Kinlock et al., 2014; Zheng et al., 2006) puisque survenant même avec du virus dépourvu d'enveloppe virale, dans des modèles de lignées épithéliales vaginales et colorectales. Dans le cas du passage de particules virales provenant de cellules infectées, ce mécanisme semble dépendant de l'établissement d'une synapse virologique

entre la cellule infectée et le pôle apical des cellules épithéliales (Alfsen et al., 2005; Hocini and Bomsel, 1999). L'établissement de cette synapse virologique et la transcytose des particules virales nécessitent l'expression de trois molécules par les cellules épithéliales : (i) l'HSPG agrin qui interagit avec la gp41 des particules virales (ii) l'intégrine β1 et (iii) GalCer (Alfsen et al., 2005). Ces études ont permis de conclure sur la plus grande efficacité du mécanisme de transcytose lorsque les cellules épithéliales sont exposées à des cellules infectées plutôt qu'à des particules virales libres (Alfsen et al., 2005; Bomsel, 1997; Hocini et al., 2001). Nous reviendrons en partie II.C. sur les raisons de l'efficacité différentielle d'une infection par du virus libre d'une part et par des cellules infectées d'autre part.

D'autre part, il est important de noter que des modèles d'épithéliums pluristratifiés ont également fait l'objet d'étude de transcytose. Il s'agit de modèles intégratifs moins proches de *l'in vivo* mais plus contrôlés, tels que les modèles de reconstruction 3D, où l'on peut sélectionner les types cellulaires mis en présence. Ainsi, Bouschbacher et al. montrent l'absence de passage de particules virales de VIH-1 à travers l'épithélium vaginal pluristratifié dans un modèle de reconstruction 3D, que ce soit en présence ou en l'absence de cellules de Langherans enchâssées dans l'épithélium (Bouschbacher et al., 2008). Greenhead et al. ont, quant à eux, développé un modèle de culture de feuillet de l'épithélium ectocervical pour évaluer la possibilité de transcytose dans la muqueuse génitale pluristratifiée. Après isolation enzymatique, la couche épithéliale est mise en culture et exposée de façon polarisée à des particules virales libres de VIH-1 ou des cellules infectées. Aucun évènement d'infection n'a été détecté dans le surnageant de culture ou dans les cellules épithéliales (Greenhead et al., 2000). Ces 2 études suggèrent donc l'absence de transcytose du VIH-1 à travers les épithélia génitaux pluristratifiés. Toutefois, il n'est pas exclu que les étapes de digestion enzymatique nécessaires à la mise en place de ces modèles puissent avoir engendré une perte d'expression de certains marqueurs membranaires nécessaires à l'attachement et l'internalisation des particules virales.

A ce jour, la transmission mucosale de VIH par transcytose n'a jamais été mise en évidence *in vivo.*

iii. Capture par des cellules du système immunitaire

Un mécanisme alternatif détourné par les pathogènes afin d'accéder aux cellules cibles sous-épithéliales est leur capture par les DC ou les cellules de Langerhans, qui sont un sous-type de DC que l'on retrouve spécifiquement enchâssées dans les épithélia pluristratifiés ou présentes au pôle basal

des épithélia monostratifiés. On estime que ces dernières représentent 1 à 5% du total des cellules de la muqueuse colorectale (Gurney et al., 2005).

Il convient de faire un petit aparté sur ces deux types cellulaires. Les cellules de Langerhans diffèrent des DC car elles expriment spécifiquement la Langerine (CD207) et résident au niveau de l'épiderme et dans la plupart des épithélia muqueux alors que les DC DC-SIGN+ résident elles majoritairement en sous muqueux (de Witte et al., 2008).

Les DC possèdent des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites leur permettant de capter les particules virales au sein de la muqueuse mais également au niveau de la lumière. Une observation essentielle réalisée par Resfcigno *et al.,* montre que les DC elles-mêmes expriment des protéines de jonction telles que les occludines, claudines, E-cadhérines et β-catenines ce qui assure le maintien de l'étanchéité des épithélia, lorsque celles-ci y sont infiltrées (Rescigno et al., 2001).
Le pouvoir de captation du VIH par les DC s'explique par le fait qu'elles expriment des récepteurs de surface cellulaire tels que des héparines sulfate protéoglycanes (HSPGs), des lectines de type-C et des intégrines qui peuvent interagir avec des particules virales et mener à leur internalisation sans infection productive. Le devenir des particules virales captées par les cellules de Langerhans ou par les DC demeure sujet à controverse, et deux mécanismes différents ont été proposés.

Selon le premier mécanisme, les DC ayant capté du VIH permettent la dissémination de celui-ci. En effet, il a été montré que la captation du virus peut aboutir à l'internalisation des virions au niveau de vésicules d'endocytose, où ceux-ci peuvent être conservés plusieurs jours avant d'être transmis à d'autres cellules cibles au niveau de la *lamina propria* et des ganglions lymphatiques après la migration des cellules vers ces sites (Ganor et al., 2010; Gurney et al., 2005; Hladik et al., 2007; Zhou et al., 2011). A l'inverse, le second mécanisme propose que l'internalisation des virions se fasse au niveau des granules de Birbeck où ils sont dégradés, conférant ainsi un rôle protecteur aux cellules de Langerhans (qui sont les seules cellules dendritiques dotées de ces granules) (pour revue (de Witte et al., 2008)).

Ces deux mécanismes dépendent notamment de l'état de maturation des cellules et de la quantité de virus à laquelle elles sont exposées (de Witte et al., 2007). L'état de maturation des DC peut être modifié par exemple lors d'une co-infection ou d'une inflammation au niveau des muqueuses. En effet, un environnement inflammatoire induit la maturation des DC, ce qui provoque une inhibition de l'expression de la langerine qui est nécessaire à la formation des granules de Birbeck. Le virus n'est alors plus dégradé, ce qui pourrait alors expliquer pourquoi une inflammation des muqueuses peut augmenter la probabilité de la dissémination du VIH par les DC (de Witte et al., 2007).

Plusieurs études *ex vivo* se sont intéressées à la capture du VIH par les cellules immunitaires de la muqueuse colorectale. Shen *et al.* ont mis en évidence que les DC présentes dans la *lamina propria* pouvaient émettre des prolongements cytoplasmiques à travers les espaces intraépithéliaux, et ainsi capturer des virions pour les transporter jusqu'à leurs cellules cibles sub-épithéliales (Shen et al., 2010a). En termes de cinétique, il a été démontré que la liaison des DC au virus survient dès 15 minutes après l'inoculation, alors que les premiers macrophages et les premiers LT CD4+ infectés sub-mucosaux par le VIH-1 ne sont détectables que 2h après inoculation, soulignant ainsi la rapidité par laquelle les DC peuvent devenir infectieuses (Shen et al., 2010c). Une étude plus récente a confirmé ces résultats, et a montré que l'exposition au VIH-1 R5 d'une muqueuse colorectale reconstituée entraînait la migration rapide des DC présentes en sous-muqueux à travers l'épithélium colorectal, puis le transfert du virus aux cellules cibles par ces DC. De manière très intéressante, l'exposition au VIH-1 X4 n'entraîne pas de phénotype migratoire des DC (Cavarelli et al., 2013). Ce tropisme souche-spécifique pourrait donc être un des mécanismes responsables de la transmission sexuelle préférentielle des souches de type R5.

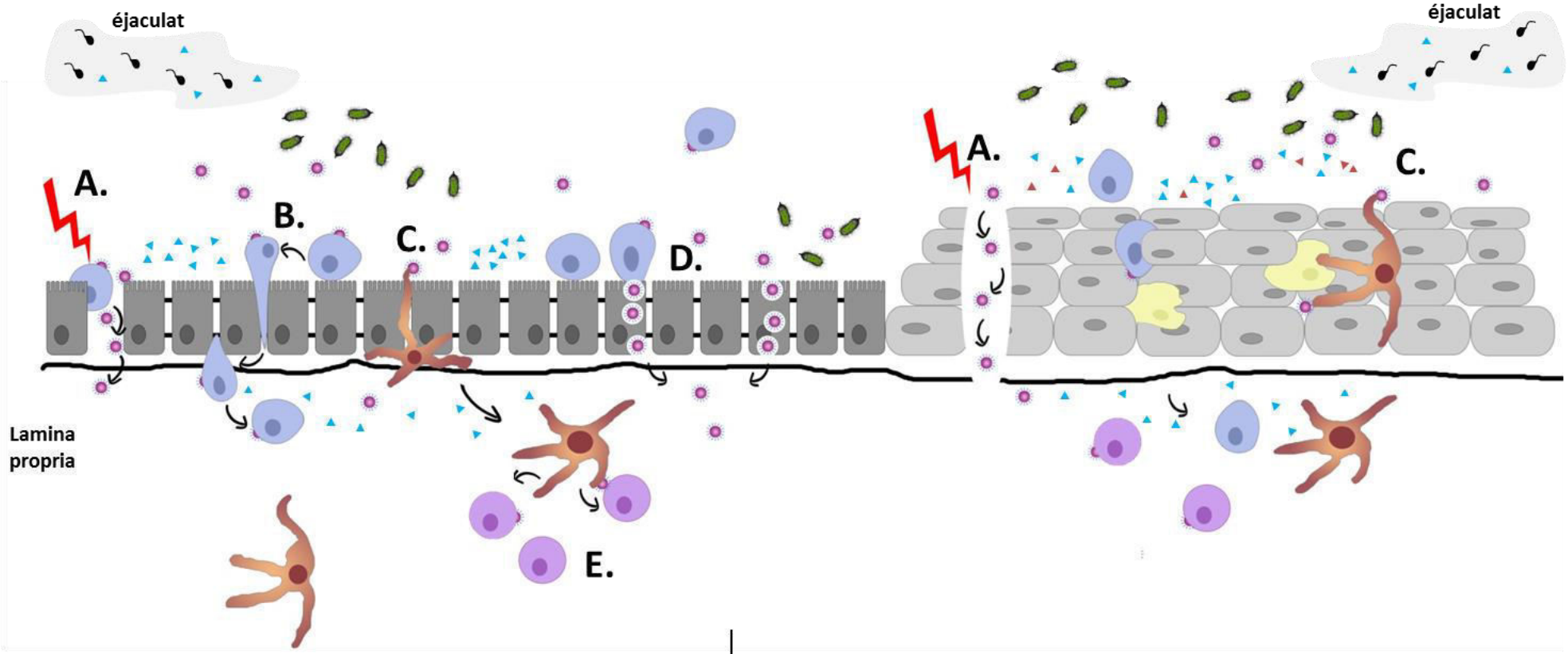
Afin d'analyser l'implication des cellules dendritiques enchâssées dans les épithélia pluristratifiés dans la transmission virale, l'équipe de M. Bomsel. ont, quant à eux, développé un modèle de culture organotypique de muqueuse de prépuce (Ganor et al., 2010; Zhou et al.). Grâce à ce modèle, les auteurs ont observé, en microscopie à fluorescence, que l'exposition polarisée de la muqueuse épithéliale interne du prépuce à des leucocytes sanguins fortement infectés par une souche de VIH-1 induit une modification rapide de la distribution spatiale des cellules de Langerhans intraépithéliales, ces dernières se rapprochant de la surface épithéliale. Ils ont également mis en évidence la formation de conjugués (cellules de Langerhans – lymphocytes T) au niveau desquels ont été observées des particules virales et ont pu décortiquer les mécanismes moléculaires impliqués. Les résultats obtenus, grâce à ce modèle, suggèrent que les cellules de Langerhans intraépithéliales du prépuce interne sont les cibles initiales de la transmission au niveau de cette muqueuse. Par ailleurs, Hladik et al. ont développé un modèle original de culture de feuillet épithélial de la muqueuse vaginale (Ballweber et al., 2011; Hladik et al., 2007). Dans ce modèle, la couche épithéliale pluristratifiée est séparée de la lamina propria par microdissection associée à un traitement à l'EDTA. L'intérêt majeur de ce modèle est qu'il permet l'étude ciblée de l'infection des cellules immunes intraépithéliales en s'affranchissant du problème d'émigration des cellules immunitaires hors du tissu caractéristique lors de la culture d'explants tissulaires. En effet, en l'absence de sous-muqueuse, les seules cellules à émigrer sont originaires de la couche épithéliale. Hladik et al. ont ainsi pu mettre en évidence l'attachement et l'entrée de particules virales dans les lymphocytes T CD4+ et cellules de Langerhans intraépithéliales de la muqueuse vaginale par microscopie confocale (Hladik et al., 2007).

Quelques années plus tard, cette même équipe a amélioré ce système en polarisant l'infection à la face apicale du feuillet épithélial. De cette façon, ils ont démontré, en mettant en évidence l'absence d'intégration de l'ADN proviral, que les cellules de Langerhans intraépithéliales ne sont pas capables d'infection productive par le VIH-1, mais participent à la dissémination virale comme l'attestent les tests d'infection sur une co-culture de lymphocytes T CD4+ (Ballweber et al., 2011).

La capture des particules virales par les cellules du système immunitaires présentes en sous muqueux et/ou en intraépithélial est donc un mécanisme potentiel de passage du virus à travers les différents types de muqueuses et donc d'épithéliums.

Figure 7 : Représentation schématique des mécanismes d'entrée des virus sexuellement transmissibles à travers les muqueuses

(A) Les cellules infectées ou particules virales libres peuvent traverser la barrière épithéliale via des brèches. (B) Les cellules infectées peuvent migrer entre les cellules épithéliales pour infecter les cellules cibles en sous muqueux (transmigration). (C) Les cellules dendritiques présentes en sous muqueux pour les épithélia monostratifiés, ou enchâssées dans les épithélia pluristratifiés peuvent capter le virus présent du coté apical de la barrière épithéliale par leur pseudopodes, et transmettre ensuite l'infection en sous muqueux. (D) Transcytose de particules virales libres ou originaires de cellules infectées à travers les cellules épithéliales pour infecter les cellules cibles en sous muqueux. (E) Dissémination de l'infection en sous muqueux par contacts « cellule-cellule ».



Environnement cytokinique hormonal

Microbiote

Barrière épithéliale monostratifiée

Barrière épithéliale pluristratifiée

Virus libre

Macrophage

Cellule dendritique

Cellule cible

Cellule infectée

A. Passage passif par brèches

B. Passage actif par transmigration de cellules infectés

C. Capture des particules virales par les pseudopodes des cellules dendritiques

D. Transcytose de particules virales à partir de cellules infectées / ou de virus libre

E. Dissémination de l'infection en sous muqueux par interaction cellule/cellule

iv. Transmigration de cellules infectées

Le processus de transmigration se caractérise par le passage actif de cellules infectées entre les cellules épithéliales sans qu'il y ait rupture de la barrière. La transmigration n'est pas sans rappeler un mécanisme similaire, dit de diapédèse, par lequel un leucocyte s'insinue entre les cellules endothéliales d'un capillaire sanguin en réponse à des signaux inflammatoires afin de rejoindre la zone de lésion. La traversée endothéliale du leucocyte nécessite successivement plusieurs acteurs ayant un rôle dans l'adhésion tels que la tetherine, les L-selectines, les intégrines, les molécules de la famille des ICAMs, puis dans la migration avec notamment un fort remodelage du cytosquelette d'actine (pour revue (Schnoor et al., 2015)). Dans le cas de la transmigration, les leucocytes infectés traversent une barrière non pas endothéliale mais épithéliale afin de disséminer l'infection.

Malgré la similarité des deux phénomènes, les mécanismes d'adhésion entre les leucocytes infectés et les cellules épithéliales sont bien moins décrits et par conséquent peu connus. Ce mode de transmission a été mis en évidence à la fois dans des modèles simplifiés *in vitro* de lignées épithéliales monostratifiées polarisées, mais aussi dans des modèles plus intégratifs *ex vivo* et *in vivo*. Pour cela, les leucocytes isolés du sang sont infectés *in vitro* ou non, marqués à l'aide d'un fluorochrome (ex : FITC), puis sont déposés sur la monocouche épithéliale polarisée ou à la surface épithéliale de l'explant. La transmigration des cellules infectées peut alors être mesurée après plusieurs heures par différentes manières : 1) par simple comptage du nombre de cellules marquées récupérées dans le surnageant basal (Mori et al., 2003), 2) par mesure de l'intensité de fluorescence de ce surnageant dans les systèmes de monocouche épithéliale (Lawrence et al., 2012), 3) enfin par visualisation microscopique ou en cytométrie de flux après dissociation enzymatique du modèle tissulaire (Kolodkin-Gal et al., 2013; Shen et al., 2009). L'utilisation de modèles simplifiés *in vitro* de lignées épithéliales monostratifiées polarisées a permis de montrer que les monocytes, et dans une moindre mesure, les lymphocytes T CD4+ sont capables de transmigrer à travers des monocouches polarisées de cellules immortalisées endométriales (HEC-1) et cervicales (ME-180)(Chancey et al., 2006; Lawrence et al., 2012). Il en est de même pour les macrophages (dérivés de monocytes sanguins) et les PBMC (Van Herrewege et al., 2007). Au niveau de l'épithélium colorectal, à ma connaissance, seul le passage de monocytes (Mori et al., 2003)et de neutrophiles polymorphonucléaires a été mis en évidence sur les lignées Caco-2 et T-84 respectivement (Parkos et al., 1991). L'avantage majeur de ces modèles simplifiés de cellules épithéliales immortalisées et polarisées est qu'ils permettent d'appréhender facilement les mécanismes moléculaires et les facteurs environnementaux impliqués dans l'adhésion des cellules transmigrantes aux cellules

épithéliales et leur passage au niveau sous-épithélial. Nous reviendrons plus en détails sur ces mécanismes à la fin de cette partie. Alors que ce système de monocouche épithéliale simplifiée représente un bon modèle d'approche ou de validation moléculaire, il fait abstraction de l'influence du contexte tissulaire *in vivo* sur l'expression des molécules d'adhésion par les cellules épithéliales. Le modèle explant constitue donc une alternative plus physiologique, bien qu'il ne permette de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale que sur une courte durée, variable selon l'origine tissulaire (selon les études et les conditions de culture : environ 24h pour le tissu colorectal, 48h pour l'exocol, 4 à 6 jours pour l'endocol) (Frouard et al., 2018). L'utilisation de ce modèle pour observer des évènements de transmigration nécessite donc de s'assurer de façon rigoureuse de la conservation de l'intégrité de la barrière épithéliale le temps nécessaire à la transmigration (notamment en vérifiant l'absence de passage de molécules extracellulaires marquées). Ainsi, dans des modèles de culture d'explant d'exocol et d'endocol humains, Maher *et al.* ont observé en microscopie l'infiltration de leucocytes séminaux après 24h de culture dans les couches les plus externes de l'épithélium pluristratifié de l'exocol, mais l'absence d'infiltration dans l'épithélium endocervical. Les auteurs expliquent cette sélectivité par le fait que les cellules séminales sont retenues dans les sécrétions de la muqueuse de l'épithélium endocervical qui exercent un rôle protecteur vis-à-vis de l'infection dans leur modèle (Maher et al., 2005). Cette étude souligne également le fait que le passage des cellules infectées par transmigration à travers une couche épithéliale pluristratifiée n'est pas un mécanisme qui semble possible. Dans ce sens, aucun évènement de transmigration n'a pu être mis en évidence au niveau de la muqueuse masculine pluristratifiée du prépuce *ex vivo* (Zhou et al., 2011).

Enfin, Kolodkin et *al*., ont démontré le passage par transmigration de PBMC à travers la barrière colorectale dans des explants de colons humains dès 1h d'exposition (Kolodkin-Gal et al., 2013). Ces observations ont pu être confirmées *in vivo* chez l'homme où des cellules séminales autologues radio marquées ont été introduites en intra rectal et leur distribution dans le colon a été suivie par imagerie jusqu'à 24h post inoculation (Louissaint et al., 2012b); et chez le macaque où après inoculation intra vaginale de leucocytes marqués, les auteurs ont retrouvé ces cellules dans les ganglions périphériques 2 jours post inoculation (Salle et al., 2010).

En conclusion, la transmigration est un mécanisme décrit jusqu'à présent seulement au niveau de la muqueuse monostratifiée génitale féminine et colorectale.

Molécules d'adhésion, modulation de leur expression et transmigration

Les mécanismes mis en jeu lors du processus de transmigration et notamment les molécules d'adhésion impliquées restent encore aujourd'hui mal définis, voire inconnus selon les muqueuses.

D'une manière générale, les intégrines de la famille β2, qui correspondent aux molécules comprenant la sous-unité CD18 : LFA-1 (CD18/CD11a ou intégrine αLβ2), Mac-1 (CD18/CD11b ou ITGAM ou intégrine αMβ2) et ITGAX (CD18/CD11c ou intégrine αXβ2) sont des molécules d'adhésion majoritairement présentes à la surface des macrophages, des monocytes et des cellules T, et qui participent à leur transmigration à travers les épithéliums muqueux (Tableau 2).

En 1991, Parkos *et al.,* démontrent par exemple la nécessité de la molécule Mac-1 exprimée par les polymorphonucléaires dans leur transmigration à travers une monocouche épithéliale colorectale T-84 (Parkos et al., 1991). Plus récemment, l'implication de la molécule LFA-1 a été démontrée comme essentielle à la transmigration de macrophages à travers un épithélium endométrial HEC-1 (Carreno et al., 2002). Les auteurs décrivent que la transmigration dans leur modèle implique la molécule LFA-1 exprimée par les macrophages ainsi que ses ligands ICAM-2 (CD50), ICAM-3 (CD102) et dans une moindre mesure ICAM-1 (CD54), exprimés à la surface des cellules épithéliales. Par ailleurs, l'inflammation des muqueuses modifie l'activation des intégrines β2, résultant en une affinité accrue pour leurs ligands, ce qui peut augmenter la capacité des leucocytes à transmigrer (Anderson et al., 2010a). L'inflammation peut également affecter la disponibilité de leurs ligands et particulièrement les ICAMs, molécules largement exprimées par les cellules épithéliales des muqueuses. C'est précisément ce qu'ont mis en évidence les auteurs, puisque l'ajout de cytokines pro-inflammatoires dans le milieu de culture (TNFa et IL1b) favorise l'expression d'ICAM2 et ICAM3 par les cellules épithéliales et ainsi, la transmigration de macrophages infectés à travers la barrière épithéliale (Carreno et al., 2002). Une autre étude a démontré de façon spécifique, *in vitro* et *in vivo*, l'implication de la molécule ICAM-1 exprimée au niveau épithélial. En effet, le blocage d'ICAM-1 exprimé par les cellules épithéliales cervicales ME-180 et HT-3 par inoculation intra-vaginale d'anticorps bloquant anti-ICAM1 chez des souris inhibe la transmigration de monocytes et de lymphocytes primaires (Chancey et al., 2006). En outre, les molécules JAM sont aussi des ligands connus pour les intégrines β2, JAM-A et JAM-C étant capables de lier LFA-1 et Mac-1 respectivement (Anderson et al., 2010a). Leur implication propre dans les phénomènes de transmigration n'a, à ma connaissance, jamais été démontré.

Chancey et al. ont par contre écarté l'implication des molécules E-cadhérine exprimées par les cellules de type épithéliales cervicales et son ligand, CD103 (ITAE ou intégrine αE), exprimé par les leucocytes (monocytes et lymphocytes) (Chancey et al., 2006). Ces résultats vont à l'encontre de ceux de Cepek et *al.* et Karecla *et al.,* qui les identifient comme à l'origine de l'adhésion des lymphocytes T à l'épithélium intestinal (Cepek et al., 1994; Karecla et al., 1995). Cette observation démontre de façon concrète la complexité des mécanismes mis en jeu, qui dépendent non seulement du type de cellules infectées mais également de l'épithélium cible.

Ces études démontrent de façon convaincante l'importance d'identifier les molécules impliquées dans l'adhésion des cellules infectées aux muqueuses, car elles peuvent constituer des cibles thérapeutiques et préventives de choix afin de bloquer l'infection par le VIH.

Par ailleurs, en plus de moduler l'expression et/ou l'état d'activation des molécules d'adhésion, l'inflammation induit également un relargage de nombreux facteurs chimiotactiques (ex : TNFα, IL-6, IL-8, MCP-1) par les cellules épithéliales et les leucocytes muqueux résidents. Cela a été largement étudié au niveau du tractus génital féminin (pour revue (Doncel et al., 2014)) mais il est fort à parier qu'il en soit de même au niveau colorectal. Ces facteurs chimio-attractants vont ainsi former un gradient qui favorisera la transmigration des leucocytes présents dans l'inoculum en les attirant. Ils peuvent donc eux aussi constituer une cible de choix en association avec des inhibiteurs de l'adhésion en vue de bloquer l'infection.

Pour conclure sur les différents mécanismes de passage du virus à travers les muqueuses et notamment via la muqueuse colorectale, on peut dire que les contributions relatives de chacun de ces modes d'entrée (les brèches, la transcytose, la capture par les cellules dendritiques ou la transmigration) demeurent méconnues, mais qu'ils peuvent probablement contribuer de façon additive à la dissémination du VIH. En revanche, comme expliqué dans le prochain paragraphe, ce qui est aujourd'hui bien admis, c'est la plus grande efficacité des cellules infectées à induire une nouvelle infection, comparé au virus sous sa forme libre.

Intégrine	Ligand
ITAE (CD103)^{L}	**E-Cadhérine^{E}**
LFA-1^{M,L,E}	**ICAM1^{M,L,E} /2^{M,L,E} /3^{M,L,E}** / JAM-A^{E}
Mac-1^{M,L,E}	ICAM1^{M,L,E} / JAM-C^{E}

Tableau 2 : Intégrines et leur(s) ligand(s) potentiellement impliquées dans le phénomène de transmigration
Les molécules en gras sont démontrées nécessaires au phénomène de transmigration
M = Macrophages et/ou monocytes
L = Lymphocytes T CD4
E = Cellule épithéliale

C. « Cell-Free Versus Cell-Associated » – quelle importance ?

Les secrétions génitales de l'homme et de la femme contiennent naturellement des leucocytes, qui peuvent être retrouvés en très grand nombre lors d'épisodes d'inflammation ou d'infection (Cf. partie III.B.ii/iii sur la composition du sperme). Des cellules infectées ont ainsi été détectées dans le sperme et les secrétions cervico-vaginales provenant d'hommes et de femmes infectées par le VIH (Anderson et al., 2010a) (la proportion relative des types cellulaires infectés dans le sperme sera détaillée en partie III.B.iii).

Pendant longtemps, seule la transmission par les particules virales libres a été considérée. On ne dispose encore que de très peu de données comparatives entre la transmission par les cellules infectées versus celle avec du virus libre chez les humains. Leur contribution spécifique est encore débattue, mais il est aujourd'hui admis que la transmission par les cellules infectées est plus efficace pour initier une nouvelle infection par rapport à la transmission par du virus libre. Grace à un modèle mathématique, on estime même que la transmission de cellule à cellule est 1.4 fois plus efficace que la transmission par du virus libre et qu'elle contribue à 60% des nouvelles infections virales (Iwami et al., 2015)). Ces données plaident donc en faveur d'un rôle prépondérant des cellules infectées dans la transmission et ainsi la propagation du VIH.

i. Mise en évidence de l'efficacité de la « Cell Associated transmission »

Plusieurs études ont cherché à déterminer la source du virus transmis en analysant les séquences d'ARN et d'ADN virales, à la fois dans les sécrétions génitales du donneur et dans le sang des personnes nouvellement infectées. Ces études ont montré que le virus retrouvé dans le sang des personnes nouvellement infectées était dans certains cas plus proches en séquence de l'ADN viral retrouvé dans les cellules infectées des secrétions génitales du donneur, et dans d'autres plus proche de l'ARN viral issu des particules virales libres (Boeras et al., 2011; Butler et al., 2010; Ronen et al., 2015). L'interprétation la plus simple de ces observations est que la source de virus peut être variable d'une transmission à l'autre, et que le virus libre comme les cellules infectées jouent un rôle dans la transmission du VIH. Cela fait donc de la transmission associée aux cellules, une voie de transmission efficace.

Chez l'homme, l'inoculation *in vivo* en intra-rectal de particules colloïdales de la taille du VIH et de cellules leucocytaires a montré que celles-ci pouvaient être retrouvées, au niveau du colon sigmoïde, à environ 20 cm de la marge anale et ce jusqu'à 24 heures sans défécation ou lavement. La localisation des particules coïncide avec celles des cellules, bien que ces dernières soient plus

largement distribuées (Louissaint et al., 2012b). Il en va de même au niveau vaginal, les particules colloïdales et les cellules inoculées en intra-vaginal colocalisent après plusieurs heures (Louissaint et al., 2012a). Malgré ces capacités de migration semblables, les études menées *in vivo* chez le macaque ont mis en évidence que la transmission de cellule à cellule est le principal moyen de transmission du VIH au niveau vaginal et colorectal (Kolodkin-Gal et al., 2013; Salle et al., 2010). Au niveau vaginal tout d'abord, Sallé *et al.,* ont démontré une dissémination aux ganglions périphériques très rapide de ces cellules infectées et inoculées en intra-vaginal (dès 21h post inoculation), démontrant une initiation et une propagation rapide de l'infection lorsqu'initée par des cellules infectées. Au niveau colorectal, une étude a comparé le pouvoir infectieux d'un stock de cellules infectées et d'un stock de virus libre (ces deux stocks présentaient le même titre viral). Ils ont montré que 3 macaques sur 5 présentaient une infection après inoculation intra-rectale des cellules infectées alors qu'aucun macaque inoculé avec la suspension de virus libre n'a présenté d'infection (Kolodkin-Gal et al., 2013). In vitro, la transcytose du VIH à travers différentes lignées de cellules épithéliales (I407, HT-29, Caco-2, HEC-1, ME-180) est beaucoup plus efficace à partir de cellules infectées que de particules de virus libre (Bomsel, 1997; Chancey et al., 2006; Kolodkin-Gal et al., 2013). L'observation de la transcytose de virus libre nécessite un inoculum (en unité de p24) de départ 100 à 1000 fois plus important qu'avec des cellules infectées (Hocini et al., 2001), si l'on veut disposer d'un nombre de particules virales ayant traversées la barrière suffisant pour générer une nouvelle infection. Les cellules infectées ont également démontré une meilleure capacité à induire une infection suite à leur transmigration à travers une barrière épithéliale en comparaison au virus libre comme le démontre l'équipe de Van Herrewege *et al.,* (Van Herrewege et al., 2007). Grâce à un système de coculture avec des cellules cibles, ils démontrent que les cellules transmigrantes permettent d'initier une nouvelle infection, à la différence du virus libre ayant transcyté.

Il est aujourd'hui bien établi que la transmission du VIH par des cellules est plus efficace pour initier une nouvelle infection que ce soit dans des modèles *in vitro*, *ex vivo* et également *in vivo*. Elle peut être, selon les modèles 10 à 1000 fois plus efficace que la transmission par du virus libre *in vitro* (Chen et al., 2007; Mazurov et al., 2010).

ii. « Cell Associated versus Cell-free » : les mécanismes expliquant les différentes efficacités

Les mécanismes de transmission par du virus libre et par des cellules infectées peuvent être les mêmes, à savoir le passage par brèche ou la transcytose. Mais ils peuvent aussi être plus ou moins

spécifiques comme la capture de virus libre par les cellules dendritiques et la transmigration des cellules infectées.

Plusieurs spécificités entre ces 2 modes de transmission peuvent expliquer la plus grande efficacité de la transmission du VIH associée aux cellules par rapport à la transmission par du virus libre ont été proposés. Au niveau vaginal par exemple, lorsqu'un éjaculat contenant des cellules infectées et du virus libre est mélangé aux secrétions acides de la muqueuse, le pouvoir tampon du sperme ne peut neutraliser l'acidité vaginale que transitoirement, laissant donc un temps limité à l'initiation d'une nouvelle infection. A la différence de la diffusion aléatoire des virus libres, les macrophages infectés peuvent être attirés par chimio-attraction à une vitesse allant jusqu'à 10µm/seconde. Il en va de même pour les lymphocytes qui peuvent migrer encore plus rapidement (Pixley, 2012). Au vu de ces données, les leucocytes séminaux pourraient traverser en quelques minutes la couche de mucus tapissant la surface épithéliale vaginale estimée à 100µm d'épaisseur. A l'inverse, la vitesse de diffusion des particules virales libres à travers le mucus vaginal est d'environ 1µm²/seconde (Lai et al., 2009). Il faudrait donc plus de 2h au virus libre pour parcourir une distance de 100µM. En intégrant ces données purement cinétiques, on comprend aisément que les cellules infectées ont bien plus de chance d'avoir traversé la couche de mucus avant le retour de l'acidité vaginale, contrairement aux virus libres qui diffusent bien plus lentement et qui se trouveront donc en grande partie détruits par le pH acide du micro-environnement de la muqueuse vaginale (Cone, 2014).

De plus, les cellules immunitaires, cibles du VIH, peuvent produire des anticorps neutralisants qui ont la capacité d'inhiber l'infectiosité des virus libres (Abela et al., 2012). Le virus présent au sein d'une cellule infectée est donc beaucoup moins susceptible d'être inhibé par ce mécanisme de défense, ce qui appuie l'observation selon laquelle la transmission par cellules infectées est plus efficace que celle par des particules libres.

Il faut toutefois garder à l'esprit que toutes les études à ce sujet ont été réalisées dans des modèles *in vitro,* ce qui pose la question de leur pertinence *in vivo* (Luis M. Agosto1 et al., 2015). Nous reviendrons plus en détails sur les stratégies de prévention à base d'anticorps neutralisants et sur leur faculté limitée à bloquer la transmission associée aux cellules en partie II.D.i.

D'autre part, il est avéré que la dissémination du VIH lors du contact cellule-cellule s'opère de façon plus efficace que lors d'une dissémination de virus libre. En effet, il a été démontré dans différents modèles cellulaires que le contact entre les cellules augmente la transmission du virus en concentrant les récepteurs d'intérêt pour la transmission au niveau des points de contact, accélérant ainsi l'étape « limitante » de l'infection : l'entrée du virus dans la cellule hôte (Jolly et al., 2007). Au

niveau de ces zones de contact, une quantité de particules virales plus importante que celle que l'on retrouve naturellement autour d'une cellule cible est ainsi relarguée et ce de façon directionnelle, augmentant ainsi la multiplicité d'infection à laquelle est soumise la cellule cible (Luis M. Agosto1 et al., 2015). Lors du contact avec une cellule cible ou épithéliale, la membrane de la cellule infectée est remaniée, avec d'une part le recrutement de récepteurs et de molécules nécessaires à l'endocytose ou la transcytose de particules virales, et d'autre part, le recrutement de molécules membranaires qui seront « emportées » par le virus lors de son bourgeonnement, et qui faciliteront son entrée future dans de nouvelles cellules cibles (Bomsel, 1997; Hocini and Bomsel, 1999). L'étude de Guedon et al, corrobore cette affirmation, puisqu'ils ont comparé la capacité de virus déposé en apical à traverser par transcytose une monocouche de cellules épithéliales selon qu'ils aient bourgeonné à partir de cellules exprimant la molécule d'adhésion LFA-1 ou de cellules ne l'exprimant pas. Comme attendu, les virus issus des cellules LFA-1 négatives n'ont pas traversé la monocouche alors que les virus issus de cellules LFA-1 positives en étaient tout à fait capables. La neutralisation de LFA-1 à l'aide d'anticorps bloquants la sous-unité CD11a a permis de valider sans ambiguïté le rôle de cette molécule dans la transmission du VIH, soulignant ainsi l'importance considérable que peut avoir l'incorporation par le VIH de facteurs exprimés par la cellule hôte lors du bourgeonnement (Guedon et al., 2015).

Pour conclure, il apparaît que le rôle de l'infection par les cellules infectées dans la transmission mucosale du VIH a été longtemps négligé par la communauté scientifique, particulièrement en ce qui concerne la muqueuse colorectale (pour revue (Anderson and Le Grand, 2014)). De plus, il n'existe pas à ma connaissance d'étude sur la transmission du VIH-1 associée aux cellules utilisant des cellules séminales spécifiquement au niveau de cette muqueuse colorectale. L'unique étude qui s'intéresse au passage de cellules séminales a étudié leur passage au niveau de la muqueuse cervicale (endo et exocol). De plus, la capacité des lymphocytes et/ou les macrophages du sperme à transmettre l'infection au niveau muqueux n'a jamais été démontrée. Nous reviendrons sur les problèmes que cela peut poser en termes d'extrapolation des mécanismes mis en jeu dans cette transmission en partie II.D.iii.

Enfin, la vaste majorité des stratégies préventives utilisées jusqu'à maintenant ont été développées pour cibler les particules virales libres uniquement. L'omission de stratégies ciblant la transmission par cellules infectées reflète probablement le manque de connaissances de la communauté scientifique à ce sujet, mais également les difficultés techniques que pose l'étude de ce mode de transmission. Il est néanmoins vital de décortiquer les mécanismes qui sous-tendent ce

mode de transmission afin de définir de nouvelles approches de prévention efficaces ne ciblant pas uniquement le VIH sous sa forme libre.

D. Les stratégies de prévention de la transmission du VIH-1

Bien que les traitements antirétroviraux (ARV) permettent de contrôler la réplication du VIH, ils ne permettent pas la guérison du patient et demandent une observance rigoureuse parfois compliquée à tenir. De plus, 90% des personnes infectées résident dans des pays en voie de développement où les traitements ne sont pas toujours disponibles. Par ailleurs, l'usage du préservatif, moyen de protection efficace contre l'ensemble des IST ne suffit pas à enrayer la propagation du VIH-1. Si on se concentre sur la transmission colorectale, on estime que le sexe anal sans préservatif concerne 30% des pratiquants (McGowan and Dezzutti, 2014). Malgré l'abondance de campagnes de sensibilisation aux pratiques à risque, on comprend avec cette donnée la nécessité de développer des stratégies de prévention alternatives pour combattre la pandémie. Plusieurs méthodes ont fait l'objet, ou sont en cours d'étude pour être utilisées comme moyens de préventions additionnels comme la circoncision, la prophylaxie post-exposition (PEP), la prophylaxie pré-exposition (PrEP), l'usage d'anticorps largement neutralisants, ou encore de microbicides.

Il est important d'avoir en tête que la grande majorité des études, sur les microbicides notamment, ont été réalisées sur des modèles de muqueuses vaginales uniquement. L'extrapolation de ces résultats à la muqueuse colorectale, qui diffère largement des muqueuses féminines, peut parfois avoir des conséquences extrêmement problématiques (exemple gel spermicide nonoxynyl-9). Pour pallier ce manque de données sur les dispositifs de protection au niveau colorectal, différents modèles ont vu le jour depuis une dizaine d'années et feront l'objet d'un paragraphe en partie II.D.ii. Enfin, comme cela a déjà été décrit en partie II.C, les spécificités de la transmission associée aux cellules, largement négligée dans la mise au point des stratégies de prévention, pourraient expliquer au moins en partie les échecs de certaines études. Nous reviendrons donc sur les enjeux que posent la transmission associée aux cellules dans le design de nouveaux moyens de prévention.

i. Les stratégies de prévention actuelles

Les stratégies de prévention du VIH idéales devraient permettre : (1) une intervention précoce et locale pour limiter l'infection des cellules cibles du VIH disponibles sur les sites d'infection ; (2) la perturbation de l'expansion locale afin d'empêcher la propagation de l'infection au niveau de l'appareil génital vers la circulation systémique.

a. Prophylaxie Post Exposition (PEP) et Prophylaxie Pre exposition (PrEP)

La PEP et la PrEP ont été proposées comme stratégies prophylactiques basées sur l'utilisation d'ARV contre le VIH. Pour la PEP, il s'agit d'une prise d'ARV immédiate et jusqu'à 72h après une potentielle exposition au VIH, et ce pendant 28 jours. Ce type de prophylaxie n'est pas efficace à 100%, mais elle a montré une forte réduction de l'infection de l'ordre de 81% (Cardo et al., 1997). Il n'est cependant pas évident de réellement établir l'efficacité de cette pratique lors de test randomisés du fait des problèmes éthiques évidents qu'une telle étude engendrerait. On ne peut bien sûr pas exposer sciemment des individus au virus afin d'évaluer l'efficacité d'une telle approche. Le PrEP consiste, elle, en l'administration préventive et quotidienne, de façon intermittente ou lors de périodes prolongées d'ARV à des individus séronégatifs exposés fréquemment au VIH afin de réduire le risque de contamination. Le but est simplement d'inhiber la réplication virale aussitôt après l'exposition virale, stoppant ainsi toute infection. Cet outil de prévention a vu le jour aux Etats-Unis en 2012 et est disponible en France depuis 2016. Elle s'adresse aux populations à haut risque d'infection par le VIH, en particulier, les hommes ayant des rapports homosexuels chez qui les méthodes de prévention traditionnelles sont insuffisantes.

Plusieurs études impliquant des couples hétérosexuels et homosexuels ont montré une bonne efficacité de ce type de prophylaxie, même si elle n'est totale (pour revue (Siguier and Molina, 2018)). En effet, la réduction du risque d'infection suite à la prise de Truvada® (combinaison de Ténofovir et d'emtricitabine) chez les sujets HSH (hommes qui ont des rapports sexuels avec des hommes) est de 44% au sein de la cohorte iPrEx et de 86% au sein de la cohorte PROUD. Dans ces essais, le traitement est pris de façon continue. L'essai IPERGAY se distingue des autres essais par la prise d'un traitement prophylactique occasionnel au moment de l'exposition aux risques. Il a dans ce cas également été constaté une réduction très importante du risque d'infection par le VIH à hauteur de 97%. Deux autres études ont renforcé ces résultats en montrant que la prise quotidienne de Truvada ® ou de TDF (ténofovir original) sous forme orale réduisait le risque de contracter le VIH chez les personnes hétérosexuelles : (i) essai TDF-2 : réduction du risque d'infection de 62% chez l'homme exposé ; (ii) essai Partners : réduction de 63% et 67% chez l'homme et la femme respectivement sous TDF et de 84% et 66% sous Truvada®.

Cependant, il faut garder en tête que le pré requis principal pour maintenir une protection efficace grâce à la PrEP est une bonne observance au traitement comme ont pu le démontrer les échecs des essais cliniques FEM-PrEP et VOICE, pour lesquels l'observance des participants était faible, respectivement < 40% et < 30% (pour revue (Siguier and Molina, 2018)). A cause de son coût élevé, une approche telle que la PrEP parait difficile à mettre en place à large échelle et reste donc un

outil réservé aux pays développés. D'autres stratégies de prévention pour les hommes et les femmes sont donc actuellement étudiées.

b. Immunisation passive : Les Anticorps Largement Neutralisants (AcLN)

Actuellement, aucun vaccin efficace contre le VIH n'a pu être mis au point, mais des approches d'immunisation passive utilisant des anticorps largement neutralisants, administrés soit en local ou bien en systémique afin de prévenir l'infection de la muqueuse vaginale, ont montré un effet prometteur lors d'études précliniques et dans les premières phases de tests cliniques (Traore et al., 2018). En effet, les résultats de l'essai clinique MABGEL-1 ont montré que l'application vaginale de trois anticorps neutralisants (2F5, 4E10 and 2G12) dirigés contre la gp41 et la gp120 du virus, à la dose quotidienne de 50mg sur 12 jours étaient capables de bloquer très efficacement l'infection par le VIH (Morris et al., 2014). Ces essais sont pour le moment toujours en phase I. Enfin, une étude publiée par le laboratoire d'Alexandra Trkola en Suisse (Zurich) au mois de septembre 2018 dans la revue Nature a permis de montrer l'existence au sein de la cohorte HIV suisse (303 paires de partenaires s'ayant transmis le virus de manière certaine), que certaines souches rares de VIH étaient extrêmement sensibles à la réponse immunitaire à base d'anticorps largement neutralisants déclenchée par l'hôte. Ils expliquent ce phénomène par la présence d'une mutation dans le génome du VIH générant une protéine d'enveloppe virale très particulière et très immunogénique, ce qui ouvre la voie au développement de vaccins plus efficaces (Kouyos et al., 2018).

c. Microbicides

Les microbicides sont des thérapies topiques développées pour prévenir l'infection par le VIH et d'autres maladies sexuellement transmissibles lors de rapports sexuels. Il s'agit d'agents biologiques ou chimiques formulés sous différents excipients: gels, crèmes, films, suspensions, suppositoires, tablettes et anneaux, pouvant être appliqués au niveau rectal ou vaginal.

Le microbicide idéal doit être actif contre la transmission par du virus libre mais aussi contre la transmission de cellule à cellule. Il doit être non irritant, ne doit pas perturber l'épithélium de la muqueuse, ni la flore microbienne et le pH du mucus. Il ne doit pas être altéré par les enzymes protéolytiques présentes dans le mucus ou toute autre sécrétion telle que le sperme. Il doit avoir une capacité à diffuser et une bio-adhésion adéquate. Son temps de rétention doit également être suffisant pour agir contre les maladies sexuellement transmissibles pendant et après la relation sexuelle (McConville et al., 2014). Enfin, il doit être bien accepté par les utilisateurs, être peu onéreux et compatible avec les préservatifs masculins.

Les microbicides actuels agissent de différentes manières en permettant :

- la destruction du virus si tôt son entrée dans la muqueuse,

- l'inhibition de la liaison du virus à son récepteur CD4,
- l'inhibition de la réplication virale,
- l'activation du système immunitaire pour combattre l'infection
- l'établissement d'une barrière physique et d'une inhibition du contact entre le VIH et la muqueuse,
- l'inhibition d'autres IST qui augmentent les risques d'infection par le VIH (pour revue (McConville et al., 2014; Traore et al., 2018)).

Les microbicides pourraient constituer un moyen de prévention de choix, en particulier pour les populations homosexuelles particulièrement vulnérables. L'utilisation de lubrifiant que ce soit au niveau vaginal ou au niveau rectal étant une pratique commune, la mise au point d'un microbicide avec des propriétés lubrifiantes n'engendrerait pas de changement dans les pratiques telles que le nécessite les autres formes de prévention. On sait notamment que la majorité des individus pratiquant le sexe anal réceptif utilisent des lubrifiants (94% des participants à une étude menée sur plus de 300 HSH entre 1995 et 1996 ont déjà utilisé un lubrifiant et 74% disent en utiliser lors d'au moins 80% de leurs rapports (Carballo-Diéguez et al., 2000)). De plus, plusieurs études révèlent l'intérêt de la population homosexuelle en faveur du développement de microbicides rectaux.

Dans le cas du VIH, différents essais ont déjà été réalisés, mais à ce jour les résultats de ces études sont décevants. C'est le cas par exemple des microbicides contenant le surfactant nonxynol-9 (N9). Diverses études ont démontré que des applications répétées de ce surfactant induisent une inflammatoire locale et des irritations favorisant ainsi l'infection par le VIH (Fuchs et al., 2007; Patton et al., 2002; Stafford et al., 1998). Les microbicides à base de polyanions sont une autre classe de microbicides. On peut par exemple citer le PRO2000. Les polyanions se lient aux protéines virales cationiques comme la gp120 et empêchent l'entrée du virus dans la cellule cible. Eux aussi ont montré des effets adverses puisque les polyanions favorisent la formation des fibrilles amyloïdes du sperme, composés « facilitateurs » de l'infection, du fait de leurs charges électriques opposées. Cela augmente donc les risques d'infection (Tan et al., 2013). La dernière classe de microbicide développée plus récemment est basée sur l'administration locale d'antiviraux. L'utilisation d'un gel contenant 1% de Ténofovir dans l'essai clinique CAPRISA 004 de phase II a permis une protection de 39% par rapport au placebo. Dans cet essai, le gel vaginal était appliqué au moment des rapports (Abdool Karim et al., 2010). Cependant, l'application de ce gel dans l'essai VOICE, s'est révélée inefficace (Klatt et al., 2017). L'essai VOICE, qui comportait 5 bras, a consisté en une prise quotidienne par voie orale de Ténofovir, de Truvada ou d'un placébo ou d'un gel vaginal à 1% de Ténofovir ou du placebo. Les bras Ténofovir par voie orale et Ténofovir en gel ont prématurément été arrêtés par manque d'efficacité. Il est entre autre primordial de sensibiliser les utilisateurs afin de

renforcer l'adhérence, cause de grandes variations des taux de protection. De plus, une autre cause soupçonnée d'être à l'origine du manque d'efficacité du microbicide dans cet essai VOICE est la diversité des flores microbiennes entre différentes ethnies. Selon la population bactérienne majoritaire de la flore vaginale, la métabolisation du Ténofovir est plus ou moins rapide (Klatt et al., 2017). En 2016, les résultats de l'étude ASPIRE financée par le NIH, ont montré qu'un anneau vaginal libérant en continu le médicament antirétroviral expérimental, la Dapivirine, fournissait un niveau modeste de protection contre l'infection par le VIH chez les femmes. L'anneau réduit le risque d'infection de 27% dans l'ensemble de la population de l'étude et de 61% chez les femmes âgées de 25 ans et plus, qui utilisent l'anneau avec la plus grande adhérence (Baeten et al., 2016).

Les études actuelles tentent de mettre aux points différents systèmes permettant la protection et la libération de la substance active de manière optimale dans les muqueuses. Il existe notamment des systèmes basés sur l'utilisation de nanoparticules. Ces dernières jouent un rôle essentiel dans la solubilité et la protection de la drogue. Elles peuvent également augmenter l'accessibilité de la drogue aux cellules cibles augmentant ainsi son pouvoir toxique à l'encontre du VIH (Traore et al., 2018). L'un des nano-systèmes bien connus, utilisés comme microbicide et entrant en essai clinique de phase 1, est le gel dendrimère SPL 7013 Vivagel®. Ce dendrimère est conçu pour interagir avec la gp120 afin d'inhiber l'entrée directe du VIH et a démontré une activité virucide sur certaines souches de VIH (Carballo-Diéguez et al., 2012).

L'utilisation de matériaux sensibles aux stimuli semble être une approche intéressante et prometteuse pour la libération « à la demande » de médicaments. Ces types de polymères, qui répondent à différents stimuli, sont capables de libérer leur substance active au moment approprié, au niveau du site d'action choisi. Plusieurs stimuli sont possibles : une variation de pH, de température, une réponse aux enzymes présentes dans la muqueuse ciblée ou bien la présence de secrétions (Traore et al., 2018). Aujourd'hui ce type de produit n'est pas encore sur le marché, mais les études sont en cours. Par exemple, dans une étude publiée par Mahalingam *et al.,* les auteurs ont mis au point un polymère synthétique ressemblant à la mucine, qui réticulera lors de l'augmentation du pH afin d'empêcher le mouvement du VIH libre (Mahalingam et al., 2011)).

Dans le même ordre d'idée, les fibres électrofilées qui sont des composés déjà largement utilisés pour diverses applications, sont une nouvelle forme de microbicide à l'étude visant à la libération contrôlée du composé antiviral (Traore et al., 2018). Sans entrer dans les détails, la/les molécule(s) ARV sont emprisonnées dans des membranes non-tissées nano fibreuses créées grâce à un champ magnétique à partir de solutions de polymères ou de polymères à l'état fondu. La drogue est ainsi protégée et délivrée au moment voulu. Peu d'études se sont intéressées à ce type de composés pour la synthèse de microbicide, mais cela ne saurait tarder.

Enfin, une dernière « catégorie » de microbicide en cours d'étude vise à utiliser les propriétés naturelles des muqueuses pour la défense antivirale. Il s'agit de synthétiser sous une forme injectable, des bactéries modifiées, naturellement présentes dans la muqueuse d'intérêt qui synthétiseraient des protéines anti-VIH. Il suffit d'inoculer en intra-vaginal ou intra-rectal ces préparations de bactéries afin qu'elles colonisent la muqueuse. Le frein principal au développement de ce genre d'outils est l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés. A ce jour, une seule étude chez le macaque a démontré une possible application de cette stratégie en intra-vaginal (Lagenaur et al., 2015). Elle concerne la biothérapie MucoCept qui utilise des bactéries *Lactobacillus jensenii* génétiquement modifiées pour sur-exprimer la Cyanovirin-N, une protéine inhibitrice de l'entrée du VIH dans sa cellule cible. Les résultats ont démontré que la colonisation de la muqueuse vaginale par les bactéries inoculées était robuste (83% des macaques après 3 semaines) et que le produit était effectivement délivré. L'efficacité de cette stratégie prometteuse doit cependant encore être démontrée.

Nous devons néanmoins garder en tête la limite principale de ce type de prophylaxie : sa sensibilité au microbiote de l'hôte. Des études protéomiques ont démontré qu'un microbiote vaginal dysbiotique, (comprenant moins de 50% de Lactobacillus spp), influait directement sur l'efficacité du traitement, comme cela a été soupçonné dans l'essai VOICE. A titre d'exemple, *Gardnerella vaginalis*, l'espèce vaginale dominante chez les femmes dysbiotiques, est capable de dégrader directement le ténofovir, mais pas la dapivirine, un antirétroviral également mis au point pour de type de prophylaxie (pour revue (Abdool Karim et al.)).

ii. Les modèles d'étude des stratégies antivirales locales

Les modèles *in vitro* et *ex vivo* de muqueuses constituent un outil incontournable pour l'évaluation préclinique des stratégies antivirales locales. En effet, il est primordial de s'assurer que les composés testés n'induisent aucune toxicité tissulaire, laquelle pourrait fragiliser la barrière épithéliale ou induire une inflammation de la muqueuse, et avoir l'effet inverse de celui désiré en favorisant le passage du VIH. On cherche également à tester l'efficacité des molécules antivirales et à déterminer la formulation optimale pour la délivrance du produit dans des modèles qui permettront de mimer les conditions physiologiques où l'infection présente un plus fort risque, à savoir lorsque la barrière épithéliale est compromise et/ou en conditions inflammatoires. Les nouvelles stratégies de prévention antivirale sont donc testées sous leur forme finale dans des modèles mimant le microenvironnement du vagin et/ou du rectum/colon.

L'approche la plus couramment utilisée consiste à exposer les muqueuses à la molécule antivirale testée de façon simultanée ou bien avant une exposition virale. D'une manière générale, l'inhibition de l'infection est évaluée selon les modèles, par mesure de protéines virales relarguées dans le milieu de culture (p24 dans le cas du VIH-1), par quantification du génome viral présent dans les cellules muqueuses ou dans le surnageant de culture, par test de l'infectiosité des cellules émigrant des explants tels que des cellules dendritiques sur des cellules reportrices permissives à l'infection ou enfin par observation histologique. L'innocuité des molécules testées sur l'intégrité de la muqueuse est évaluée par observation histologique et à l'aide de tests de viabilité de type MTT et par dosage de la LDH.

Dans un premier temps, les modèles de culture cellulaire *in vitro* ont permis de tester rapidement divers agents simultanément, bien qu'ils ne récapitulent pas le microenvironnement tridimensionnel (3D) *in vivo* (Wildenberg and van den Brink, 2012). Parmi les autres méthodes *in vitro* utilisées, les explants de tissus muqueux représentent des modèles de choix pour tester l'activité anti-VIH-1 des substances à tester et notamment des microbicides. Les tissus cervicaux ont été les premiers à être utilisés afin d'évaluer l'efficacité de la première génération de microbicides au cours de l'étude des évènements précoces de l'infection. Depuis lors, d'autres tissus muqueux ont été utilisés, en particulier les tissus colorectaux, vaginaux, prépuciaux et péniens. Il existe deux stratégies de mise en culture des explants : non polarisée ou polarisée. Les modèles d'explants non polarisés consistent en de petits cubes de tissu comportant l'épithélium et la lamina propria. Les tissus sont immergés dans un milieu contenant du VIH avec ou sans médicament. Cela mime le « pire » scénario possible en permettant au virus d'accéder aux cibles de la *lamina propria* indépendamment de sa traversée de l'épithélium. Grâce à ces modèles, il a été montré que l'inhibition de l'infection par le VIH-1 dans les muqueuses par différents inhibiteurs de l'entrée virale et inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, requiert une dose supérieure de plusieurs log10 par rapport aux doses requises en test *in vitro* traditionnel sur cellules reportrices (Fischetti et al., 2009; Fletcher et al., 2009; Herrera et al., 2009, 2011). Ces modèles ont également permis de démontrer le bénéfice d'une combinaison de molécules, plutôt que des monothérapies, dans la composition des microbicides (Abner et al., 2005; Herrera et al., 2009, 2011). Ils ont également permis de tester l'effet des fluides génitaux (sperme et sécrétions vaginales) sur la distribution et l'efficacité des drogues testées.

Bien que contraint par le maintien limité de l'intégrité de l'épithélium en culture, les explants polarisés présentent le net avantage de permettre l'évaluation de l'efficacité des molécules formulées, le plus souvent en gel, avec une application épithéliale mimant ainsi la voie d'entrée naturelle de la molécule testée (Abner et al., 2005; Cummins Jr. et al., 2007). L'utilisation de ces

modèles a ainsi permis de démontrer l'innocuité et l'efficacité de plusieurs inhibiteurs de l'entrée du VIH-1 et de la transcriptase inverse (nucléosidique et non-nucléosidique) incorporés dans des hydrogels, et de mettre en évidence leur effet protecteur sur la muqueuse. Prenons l'exemple de l'essai clinique MTN-013/IPM 026 portant sur l'effet de deux composés : le dapivirine (DPV) (25 mg) et le maraviroc (MVC) (100 mg). Malgré l'excellente tolérance des muqueuses cervicales et cervico-vaginales après 28 jours d'application, seul le DPV présentait une activité inhibitrice sur l'infection par le VIH à la dose utilisée (Chen et al., 2015).

Ces dernières années, un modèle original de culture de muqueuse a été développé et même utilisé en essai clinique (Dezzutti, 2015). Ce modèle de « challenge *ex vivo* » consiste à mettre en culture des biopsies colorectales, cervicales ou vaginales prélevées chez des participants ayant utilisé de façon assidue, pendant une période déterminée, un gel ou anneau vaginal à activité antivirale. La biopsie est ensuite infectée par le VIH-1 *ex vivo* afin d'évaluer l'efficacité du traitement microbicide. Cette approche a par exemple mis en évidence que l'utilisation de microbicides vaginaux tels que le tenofovir appliqué soit en gel (1%) soit par prise orale (300mg, prise unique) possède également un fort pouvoir suppressif de l'infection VIH au niveau de la muqueuse colorectale (Anton et al., 2011). La mise en place de ces essais permet une évaluation plus physiologique de l'efficacité des microbicides.

Enfin, les modèles animaux de souris humanisées (c'est-à-dire immunodéficientes, greffées avec des cellules immunitaires humaines) ou de primates non humains par exemple constituent la dernière alternative pour la mise au point de stratégies antivirales, et ce de façon totalement *in vivo*.

Les modèles *in vivo* ont l'avantage de permettre aux chercheurs de réaliser des travaux qui sont inenvisageables d'un point de vue éthique et moral chez l'homme, tels que des expositions au VIH (ou autres pathogènes), dans un organisme entier se voulant au plus proche possible de l'homme.

Les travaux réalisés sur souris humanisées ont par exemple permis de mettre en évidence que l'administration d'ARN interférents dirigés contre les récepteurs CD4 et CCR5 exerce un rôle protecteur face à l'infection vaginale par le VIH-1 (Kim et al., 2010b; Wheeler et al., 2013). De plus, divers autres travaux ont montré notamment que l'administration régulière de gel contenant 1% de Ténofovir (similaire à ce qui était utilisé chez les femmes dans l'essai clinique CAPRISA004 de 2010 (Abdool Karim et al.)) protégeait les souris d'une infection par le VIH-1 lors d'une exposition vaginale. Enfin, il est indéniable que les primates non humains sont biologiquement et immunologiquement similaires aux hommes, ce qui en fait un modèle de choix pour évaluer l'efficacité des stratégies thérapeutiques anti-VIH. Les modèles de macaques infectés par le SHIV (chimère du VIH et du Virus

de l'Immunodéficience Simienne SIV) ont par exemple permis d'établir de façon précise les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des traitements antiviraux, permettant ainsi de déterminer le dosage requis pour leur efficacité optimale. Malgré leur forte pertinence biologique, ces modèles présentent tout de même des limites qu'il faut avoir à l'esprit : un microbiote différent de celui de l'homme, ou bien encore des facteurs de restriction différents pour ne citer que les limitations les plus prépondérantes. Ils sont cependant aujourd'hui, en complément de tous les autres modèles vu précédemment, absolument indispensables à l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques de prévention contre le VIH-1.

iii. Les stratégies de prévention et la muqueuse colorectale

Le développement des microbicides doit prendre en compte l'environnement biologique complexe dans lequel les produits doivent agir. Pendant longtemps, les microbicides développés ont principalement été testés sur des modèles de muqueuse vaginale, mais pas vérifiés sur muqueuse colorectale. Cependant, comme cela a déjà été mentionné, les importantes différences physiologiques entre ces deux compartiments remettent en question le simple « transfert » d'un produit vaginal en produit rectal. Comme décrit précédemment, le vagin est bordé par un épithélium squameux stratifié, alors que le rectum/colon est bordé par un épithélium simple et cylindrique. De plus, la longueur du côlon en tant que «cavité ouverte» par rapport à la «cavité fermée» que constitue le vagin pose des problèmes quant au choix du volume posologique et de sa viscosité, car il fournit une plus grande surface d'infection que le vagin (McGowan, 2014). Autre différence importante entre les compartiments vaginaux et rectaux : le pH. Alors que le pH vaginal est acide (pH de 4/4.5) dû à la présence de lactobacilles produisant de l'acide lactique, le rectum présente un pH légèrement alcalin (Ham et al., 2015). Cette caractéristique explique par exemple les échecs de deux microbicides initialement vaginaux et considérés comme efficaces et sûrs : le N9 et la formulation originale du Ténofovir qui induisent une altération de la barrière épithéliale colorectale (Dezzutti et al., 2012; McGowan, 2014). En effet, les tissus muqueux rectaux sont plus affectés par l'hyper-osmolarité que les tissus vaginaux, même si ces derniers peuvent aussi être altérés dans une moindre mesure (Ham et al., 2015). Des « feuillets » épithéliaux entiers se détachent de la muqueuse rectale après application du N-9, augmentant ainsi la probabilité d'infection (Phillips et al., 2000, 2004). Pour l'anecdote, le N-9 est maintenant même utilisé dans certaines études comme contrôle positif d'altération épithéliale (Fuchs et al., 2013)!

Par ailleurs, les transporteurs membranaires exprimés au niveau du colon et de la muqueuse vaginale sont également différents en termes de niveaux d'expression, de localisation et d'activité.

Une faible expression de transporteurs d'efflux et/ou une forte expression de transporteurs d'influx est associée à une accumulation du médicament au sein de la muqueuse et inversement. Par exemple, les transporteurs d'efflux MDR1 et MDR2 sont plus nombreux au sein de la muqueuse vaginale contrairement au transporteur d'influx OAT1 qui lui est plus abondant au sein de la muqueuse rectale. Ce profil d'expression des transporteurs explique la plus grande accumulation du Tenofovir et du Maraviroc au sein de la muqueuse rectale par rapport à la muqueuse vaginale dans des explants humains (Nicol et al., 2014). Il en est de même pour les enzymes de métabolisation des médicaments. Elles sont retrouvées au niveau des muqueuses vaginales et colorectales et peuvent provoquer une métabolisation différentielle entre ces deux tissus voire entre les différents patients (To et al., 2013). Ce type d'étude souligne encore une fois l'importance de « designer » des stratégies de préventions locales qui soient spécifiques à chaque muqueuse et réfléchies pour s'adapter à chacune d'entre elles.

iv. La transmission *in vivo* par les cellules infectées : importance pour les stratégies de prévention

Aujourd'hui encore nous manquons d'une bonne compréhension de la contribution de chacune des formes du virus dans la biologie de la transmission. En terme de prévention, quelle importance que la transmission soit initiée par du virus libre ou par des cellules infectées ?

Il a été montré que les molécules ARV, qui peuvent faire partie de la composition des microbicides, ont une efficacité réduite lorsque la transmission est initiée à partir de cellules infectées, et non des particules virales libres, au moins dans les modèles cellulaires testés pour l'heure (Duncan et al., 2013; Sigal et al., 2011). Cette différence d'efficacité a été attribuée à une augmentation de la concentration locale de virions lorsque la propagation s'effectue de cellule à cellule, nécessitant de fait des quantités plus élevées d'ARV. Afin de pallier ce phénomène, l'utilisation simultanée de plusieurs ARV permet de rétablir leur efficacité contre la propagation du virus de cellule à cellule à des niveaux comparables à ceux d'une infection par du virus libre (Agosto et al., 2014). Par ailleurs, il est légitime de suspecter que le manque d'efficacité de la PrEP dans certains contextes soit au moins en partie dû à un effet protecteur relativement limité contre l'infection par les cellules infectées par le VIH.

L'efficacité relative des anticorps neutralisants varie également selon que la transmission soit initiée par du virus libre ou par des cellules infectées. Seuls certains types d'anticorps neutralisants dotés de fonctionnalités spécifiques sont aussi efficaces pour bloquer le VIH associé aux cellules et le virus libre (Duncan et al., 2013; Malbec et al., 2013; Sagar et al., 2012). A titre d'exemple, les AcLN

dirigés contre les épitopes dans le domaine transmembranaire, tels que gp41, ont montré une puissance égale à inhiber la transmission que ce soit par des cellules infectées ou bien par du virus libre. En revanche, les AcLN qui ciblent les épitopes dans la protéine de surface extracellulaire, la gp120, présentent un pouvoir inhibiteur sur l'infection réduit de 10 à 100 fois lorsque celle-ci est initiée par des cellules infectées par rapport à du virus libre (Abela et al., 2012). Cela suggère que les vaccins induisant la production d'anticorps largement neutralisants avant une exposition au VIH-1 peuvent ne pas nécessairement empêcher l'acquisition du virus par les cellules infectées s'ils ne possèdent pas les fonctionnalités spécifiques requises pour bloquer le transfert de virions de cellule à cellule. Il en va de même pour les microbicides qui visent à induire une immunisation passive via l'apport direct d'anticorps au niveau muqueux. De plus, la concentration d'anticorps requise pour inhiber la transmission de cellule à cellule est souvent 10 à 20 fois supérieure à celle requise pour inhiber la transmission par du virus libre, ce qui complique encore le développement de stratégies antivirales efficaces.

Il s'agit ici d'un petit nombre d'exemples montrant l'importance de ne pas négliger la transmission cellule-cellule dans le design de nouveaux traitements préventifs.

III. Le sperme, un simple vecteur pour le VIH ?

Le sperme est un fluide biologique très riche dont la fonction première est d'assurer la reproduction de l'espèce. Il se compose d'une fraction acellulaire, le liquide séminal (LS), qui représente environ 95-98% du volume total, et d'une fraction cellulaire composée très majoritairement des spermatozoïdes. En plus de son rôle dans la protection, le transport et la survie des spermatozoïdes, le LS est capable de moduler la réponse immunitaire du tractus génital féminin en vue de la fécondation et de l'implantation de l'embryon (Robertson and Sharkey, 2016). Le sperme est également le vecteur d'un grand nombre de pathogènes (virus, bactéries, champignons) que ce soit via sa fraction acellulaire ou via sa fraction cellulaire (pour revue (Baird et al, 2018.; Dejucq and Jegou, 2001))

A. Caractéristiques physiques et chimiques

Le LS, et plus largement le sperme, est un fluide avec des caractéristiques physiques et chimiques bien particulières qu'il est important de décrire succinctement.

pH et propriété tampon

Le LS contient toute une panoplie de composés tels que des ions inorganiques (HCO_3-/CO_2), des acides organiques, des sucres, des lipides, des stéroïdes, des acides aminées, des polyamines ainsi que des protéines lui conférant un pouvoir tampon supérieur à la plupart des autres fluides corporels (Zhou et al., 2015). Cette dernière propriété n'est absolument pas anodine, car elle permet par exemple de neutraliser l'acidité du tractus génital féminin (Bromfield, 2014), ce qui permet la survie des spermatozoïdes au sein de ce milieu en vue de la fécondation. Malheureusement, un des effets secondaires indésirables de ce pouvoir tampon est de permettre la survie des particules de virus libres et des cellules infectées contenues dans le sperme, favorisant ainsi le risque d'infection. Le pH classique du sperme d'un homme en bonne santé se situe entre 7.4 et 8.4. Une acidification de ces valeurs de pH peut être le reflet d'un défaut de sécrétion des vésicules séminales (normalement alcalines), alors qu'un pH nettement plus alcalin peut révéler une insuffisance des secrétions prostatiques (normalement légèrement acides) (Grizard and Jimenez, 1997).

Osmolarité

Le sperme possède une forte osmolarité, plus élevée que celle du plasma sanguin. Son osmolarité dépend tout autant de sa concentration en glucides et autres composants organiques que de sa concentration en sels minéraux (pour revue (Owen and Katz, 2005)).

Viscosité

Les propriétés rhéologiques du sperme sont modifiées de façon drastique après éjaculation. En effet, très rapidement le coagulum gélatineux se liquéfie, sous l'action de facteurs de coagulation issus des vésicules séminales. Les composants principaux du coagulum sont les séminogélines 1 et 2 (SEM1 et SEM2) très abondantes dans le sperme (20mg/ml) et la fibronectine). Au cours de la liquéfaction, le coagulum se transforme en un matériel fluide grâce au clivage protéolytique de sites spécifiques des séminogélines par les facteurs dits de liquéfaction : PAP (Prostatic Acide Phosphatase), PSA (Prostate Specific Antigen), originellement synthétisés au niveau de la prostate. La liquéfaction intervient 5 minutes après éjaculation *in vivo* et 20 à 30 minutes après éjaculation *in vitro*. La viscosité se mesure en centipoises (cP), la viscosité de l'eau à 20°C correspondant ainsi à une unité centipoise. Concernant le sperme, plusieurs études ont tenté de mesurer sa viscosité avec différentes méthodes, donnant des valeurs variant entre 3-4 et 6-7 cP selon les techniques employées (pour revue (Owen and Katz, 2005)).

B. Synthèse du sperme et composition

i. La synthèse

Le sperme humain est composé du mélange complexe des secrétions provenant des testicules (1-2%), de l'épididyme (2-4%), des vésicules séminales (65-75%), de la prostate (25-30%) et des glandes de Cowper (<1%) (Rolland et al., 2013). Le volume de l'éjaculat est variable (de 3 à 6 millilitres). Lors de l'éjaculation, l'éjaculat initial n'est pas une mixture homogène, et l'on peut le stratifier en 4 fractions distinctes. La première, la fraction pré-éjaculatoire, contient les secrétions des glandes de Cowper et de Littré qui semblent jouer un rôle de lubrification pour l'écoulement du sperme. La seconde, la fraction préliminaire, provient essentiellement de la prostate et dans une moindre mesure de l'épididyme. Elle contient notamment des enzymes qui permettront la liquéfaction de l'éjaculat. La troisième et principale fraction composante du sperme est constituée d'un mélange des secrétions prostatiques et des vésicules séminales. Cette fraction est particulièrement impliquée dans la formation du coagulum séminal, dans la modification de la mobilité des spermatozoïdes et dans l'immunosuppression. Enfin, la dernière fraction dite terminale, et la plus volumineuse, provient principalement des vésicules séminales (Owen and Katz, 2005). Le sperme a donc une constitution hétérogène qui se modifie au cours de l'éjaculation. L'expulsion s'effectue en 4 à 6 fractions, et les deux tiers des spermatozoïdes sont contenus dans la première moitié de l'éjaculat (Figure 8).

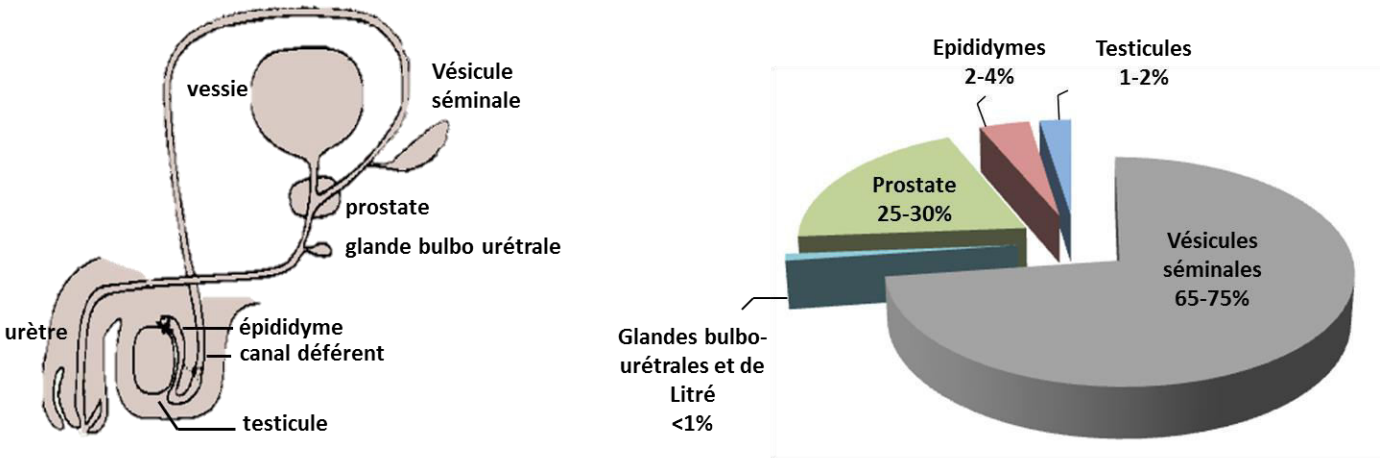


Figure 8 : Représentation schématique des différents organes du tractus génital mâle et de leur contribution à la composition du sperme.

ii. La composition du liquide séminal

La diversité moléculaire du sperme puise sa source au sein de divers organes qui vont chacun produire certains de ses constituants de manière spécifique. Par exemple, la prostate constitue la principale source de lipides, d'acide citrique, d'enzymes protéolytiques, de zinc et de phosphatases acides. Les vésicules séminales sont quant à elles à l'origine de la majorité du fructose et des prostaglandines contenues dans le sperme. A tous ces divers constituants du sperme s'ajoute des ions (dont le calcium, le magnésium, le potassium, le sodium, et le zinc), des sucres (fructose mais également glucose) qui sont une source importante d'énergie pour les spermatozoïdes, des acides aminés, présents à une concentration plus importante que dans le plasma sanguin, de nombreuses protéines sur lesquelles nous reviendrons plus en détails, ainsi que plusieurs autres molécules dont l'urée, l'acide lactique, de la choline, des acides sialiques, de l'inositol, de la spermine, du pyruvate, de la créatine, du citrate et de l'acide ascorbique (Owen and Katz, 2005; Rolland et al., 2013).

Revenons aux protéines, dont la majeure partie provient des vésicules séminales, excepté l'albumine par exemple qui représente environ 1/3 des protéines du sperme et qui a une origine prostatique (Owen, 2005). On estime aujourd'hui le nombre de protéines composites du sperme à plus de 2000 (Druart and de Graaf, 2018). La concentration en protéines totales est d'environ 5040mg/100mL (pour revue (Owen, 2005). Les protéines présentes dans le liquide séminal sont des protéines de liaison ou bien des protéines à activité catalytique (hydrolases, glycosylases, glycosidases, lipases), ou encore impliquées dans de nombreux processus biologiques (métabolisme, régulation, communication cellulaire, transport, etc.) (Figure 9). La majorité des protéines du liquide séminal appartiennent à un des trois groupes suivants : 1) les protéines porteuses de modules de fibronectine de type II, 2) les spermadhésines et 3) les protéines sécrétoires riches en cystéines (Rodriguez-Martinez et al., 2011). Le LS contient également des protéines jouant un rôle dans le système immunitaire telles que des immunoglobulines, des molécules du complément, ainsi que des cytokines et chimiokines impliquées dans la suppression de la réponse immunitaire dans le tractus génital féminin. On y trouve également des prostaglandines et des protéines à activité antimicrobiennes telles que les mucines produites par les glandes bulbo-urétrales. De plus, les protéines basiques du sperme (putrescine, spermine, spermidine, cadaverine) sont celles qui participent à l'effet tampon mentionné précédemment et qui contrecarrent l'environnement vaginal acide (Owen and Katz, 2005; Rodriguez-Martinez et al., 2011; Rolland et al., 2013). Le sperme contient aussi des prostasomes qui sont des vésicules lipidiques particulières sécrétées par la prostate humaine. Les prostasomes semblent avoir un rôle bénéfique dans la mobilité des spermatozoïdes et une action immunologique protectrice vis-à-vis des défenses immunitaires du

tractus génital féminin. Cette action s'exerce via la stimulation de la production de dérivés actifs de l'oxygène à la fois sur les polynucléaires neutrophiles et sur les spermatozoïdes. (pour revue (Aalberts et al., 2014; Zorn, 2009)).

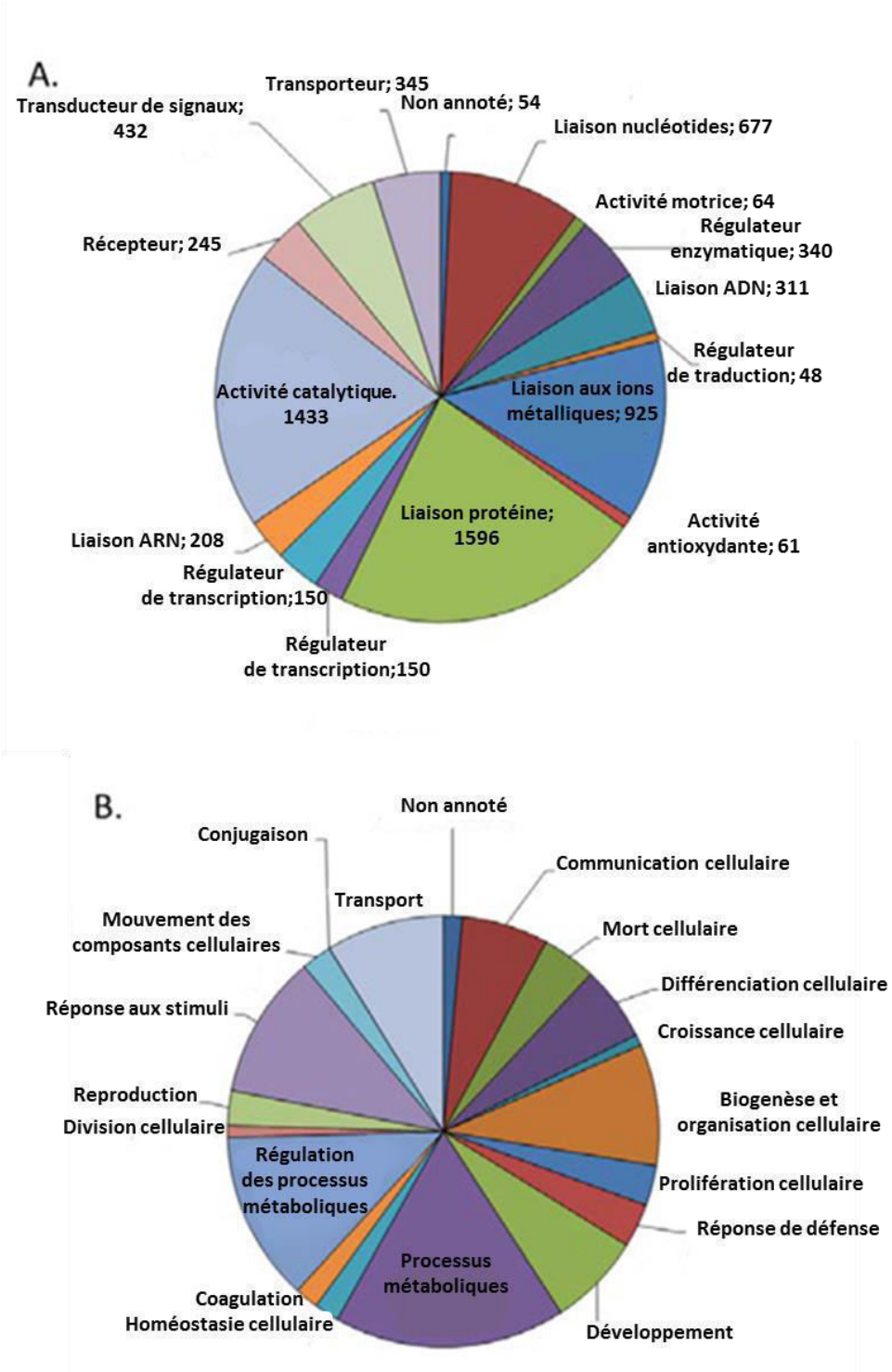


Figure 9 : Distribution des protéines présentes dans le liquide séminal

A. Selon leur fonction métabolique
B. Selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées, d'après Batruch *et al.* (2011).

iii. Les cellules du sperme

Au LS composant la partie acellulaire du sperme s'ajoute une fraction cellulaire, composée de cellules telles que celles appartenant à la lignée germinale ainsi que des cellules immunitaires, en passant par des cellules épithéliales et de Sertoli. Les spermatozoïdes sont les cellules majoritaires du sperme mais leur nombre peut grandement varier selon les individus (norme > 39 millions par éjaculat). Les divers autres composants cellulaires du sperme sont qualifiés de cellules non spermatozoïdes (CNS). Ils se composent notamment de leucocytes séminaux (norme < 1 million/mL) (WHO 2010) présents en moyenne à hauteur de 1.10^5/mL soit environ 13% des CNS, et qui sont probablement impliqués dans l'élimination des spermatozoïdes anormaux et dégénérescents. On y retrouve également des cellules germinales immatures représentant la plus grande partie des CNS (84% environ), ainsi que des cellules de Sertoli et des cellules épithéliales provenant des différents organes de synthèse du sperme, représentant approximativement 3% des CNS (Smith et al., 1989).

Au sein de la population leucocytaire, les granulocytes (ou polymorphonucléaires) sont de loin les plus abondants puisque l'on estime qu'ils représentent entre 50 et 60% de la population totale. Les monocytes/macrophages arrivent en seconde position et représentent 20 à 30% des leucocytes séminaux. On retrouve également des lymphocytes T cytotoxiques CD4 et CD8 (Quayle et al., 1997, 1998) présents chacun pour moitié, et comptant pour environ 5% des leucocytes (Smith et al., 1989). Certaines études ont rapporté la présence infime d'une population de lymphocytes B (Ball et al., 1999; Basu et al, 2002.), ainsi que de cellules dendritiques dans le sperme d'hommes et de macaques (Bernard-Stoecklin et al., 2014). Chez l'homme, la présence de cette dernière population est plus anecdotique car elle concerne quasi exclusivement des hommes souffrant d'une inflammation chronique (Duan et al., 2014).

La mise en évidence de la présence de ces cellules leucocytaires dans le sperme a été rendue possible par l'utilisation de différentes méthodes, telles que des colorations peroxydases (ex :la coloration de Endtz), immunocytologiques, et enzymatiques. Plus récemment, la cytométrie est devenue « LE » moyen de détection et d'étude de ces cellules (Politch et al., 2014), permettant la caractérisation simultanée d'une plus grande panoplie de marqueurs (ex : cytométrie de masse, CyTOF)(Korin et al., 2018).

a. Phénotype des leucocytes séminaux

Très peu d'études se sont intéressées au phénotype des leucocytes séminaux, et parmi ces études, la population leucocytaire séminale la plus étudiée est celle des lymphocytes T, ce qui peut sembler paradoxal étant donné la faible proportion de ces cellules dans le sperme (Figure 10). Les

quelques études qui s'y sont intéressées ont rapporté l'expression sur les lymphocytes T CD4 séminaux de marqueurs d'activation tels que le récepteur à l'IL2 (CD25), le CD69, un marqueur d'activation précoce, ainsi que le HLA-DR, un marqueur d'activation tardif (Basu et al.; Bernard-Stoecklin et al., 2014; Politch et al., 2009, 2014). Aussi l'expression de divers autres marqueurs de surface, tels que le CD103 (marqueur muqueux), a également été retrouvée au sein des cellules CD4, mais de façon plus hétérogène, suggérant qu'une fraction seulement des lymphocytes séminaux ont un profil muqueux classique (Quayle et al., 1997). CD103 est un marqueur exprimé par une vaste majorité des lymphocytes intraépithéliaux (95%), alors qu'il est présent sur moins de 2 % des cellules sanguines. Par ailleurs, chez le macaque, les cellules T CD4 expriment les corécepteurs du VIH CCR5 et CXCR4, mais rarement de façon concomitante (Bernard-Stoecklin et al., 2014). D'une manière générale, parmi les lymphocytes T CD4+, il existe différentes populations dites naïves et mémoires (effectrices et centrales) que l'on peut repérer grâce aux profils d'expression (CD4+ CD45RA+) et (CD4+ CD45RO+) respectivement. Dans le sperme, la majorité des CD4 présentent un phénotype mémoire, et le reste un phénotype naïf (Bernard-Stoecklin et al., 2014; Denny et al., 1995). Notons que ces proportions sont différentes de celles retrouvées dans le sang puisque les lymphocytes au phénotype naïf constituent environ la moitié de la population cellulaire. Cela signifie que ces populations lymphocytaires n'auront pas les mêmes capacités de réponse aux antigènes et d'un point de vu de l'infection par le VIH, elles ne présentent pas la même ssensibilité. Les lymphocytes mémoires étant plus susceptibles que les lymphocytes naïfs (Groot et al., 2006).

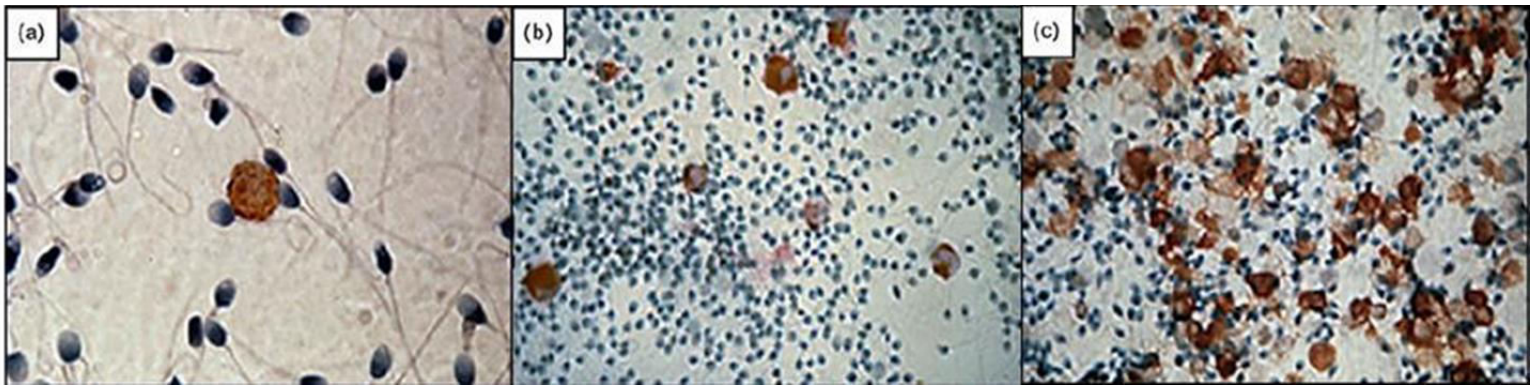


Figure 10 : Marquage immunohistochimique des leucocytes présents dans le sperme humain

a. Lymphocytes T CD4
b. Macrophages CD68+
c. Leucocytes CD45+ issues d'un homme leucocytospermique
Adapté de Anderson *et al.*, 2010

La seconde population de lymphocytes T séminaux, les T CD8, présente elle aussi un phénotype activé, mis en évidence par l'expression du marqueur d'activation TIA-1, qui est une protéine associée aux granules retrouvée chez le LT CD8 cytotoxique, indiquant un potentiel cytotoxique (Quayle et al., 1997).

Le phénotype des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques du sperme demeure jusqu'à ce jour très peu documenté. Malgré la très faible proportion de cellules dendritiques dans le sperme humain, une étude a mis en évidence que celles-ci possèdent un phénotype immature (CD80- CD86+ CD83low CCR6+ CCR7- CD14+) (Duan et al., 2014). En ce qui concerne les monocytes et macrophages séminaux humains, aucune étude ne s'est intéressée à les caractériser de manière fine, bien qu'ils représentent pourtant la seconde population leucocytaire la plus abondante derrière les granulocytes. En revanche, la caractérisation des monocytes et macrophages séminaux chez le modèle macaque, dont le sperme est décrit comme très similaire au sperme humain (Bernard-Stoecklin et al., 2013), nous apprend que ces cellules expriment fortement CCR5, à la différence de CXCR4. Ceux-ci sont en plus dotées de facteurs de migration et d'adhésion tels que les molécules LFA-1 et Mac-1.

Alors que la majorité des études portant sur la transmission du VIH par cellules infectées utilisent des lymphocytes et des monocytes/macrophages dérivés du sang, la description plus approfondie du phénotype de ces cellules séminales, tant lymphocytes T CD4 que monocytes et macrophages reste absolument nécessaire. En effet, ce type d'étude permettra d'appréhender dans quelles mesures les cellules immunitaires dérivées du sang récapitulent le phénotype des cellules immunitaires séminales. Ce sera précisément l'objet du chapitre II de ce manuscrit.

b. Origine des leucocytes séminaux

Bien que différentes hypothèses coexistent, l'origine des leucocytes dans le sperme reste aujourd'hui questionnée. Répondre à cette question permettra entre autre d'identifier au sein de tractus génital mâle quel(s) organe(s) pourraient constituer des potentiels réservoirs à VIH, contribuant ainsi à la persistance de la maladie au sein de la population. Il semble peu probable que le testicule soit un contributeur majeur de ce type de cellule, en raison de la localisation exclusivement interstitielle des leucocytes, qui sont tenus à l'écart de la lumière des tubes séminifères par la barrière hémato-testiculaire. En revanche, l'épididyme pourrait représenter une source importante de ces cellules dans le sperme, comme le suggère le fait que la vasectomie soit associée à une réduction du nombre de leucocytes séminaux (Anderson et al., 1991; Houzet et al., 2014; Wolff, 1995) et par la détection de leucocytes situés à proximité de la lumière séminale (Hedger, 2011; Hedger et al., 2015). Néanmoins, il est clairement établi que dans certains cas (ex :

prostatite, urétrite), les leucocytes séminaux rejoignent le sperme en aval des canaux déférents puisqu'on y retrouve ces cellules malgré une vasectomie. Par ailleurs, il existe un certain nombre d'évidences indiquant que l'origine des leucocytes séminaux pourrait être différente selon qu'elle concerne les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les granulocytes, ce qui ajoute un niveau supérieur de complexité. Par exemple, l'évaluation histologique des populations de leucocytes présents dans le sperme et dans différents organes producteurs du sperme avant et après vasectomie indique qu'effectivement, les lymphocytes, monocytes et macrophages séminaux seraient majoritairement originaires de l'épididyme, alors que les granulocytes proviendraient essentiellement de la prostate (Paranjpe et al., 2002). Une autre étude est parvenue à la même conclusion en étudiant les différentes fractions de l'éjaculat qui, comme décrit en partie III.B.i, peuvent permettre de relier l'organe producteur à la fraction étudiée, grâce à son contenu en protéines. Les fractions contenant le plus de protéines produites par l'épididyme étaient également celles contenant le plus de lymphocytes et de monocytes/macrophages, alors que les fractions associées à la prostate contenaient une majorité de granulocytes (Simbini et al., 1998).

Afin de véritablement valider ces hypothèses, une caractérisation fine et une comparaison du phénotype des leucocytes du sperme et de ceux issus des différents organes du tractus génital masculin reste néanmoins indispensable. Les travaux exposés dans ce manuscrit en chapitre II ont pour mission d'y contribuer.

La concentration en leucocytes du sperme varie de façon importante entre les individus mais elle ne doit pas dépasser 1.10^6/mL selon les recommandations de l'OMS. Dans le cas contraire, on parle alors de leucocytospermie. Elle survient le plus souvent lors d'une infection ou d'une inflammation génitale, la plupart du temps asymptomatique, et concerne 5 à 10% de la population masculine saine (Politch et al., 2007). Cette prévalence peut montrer jusqu'à 24% chez les hommes infectés par le VIH (Anderson et al., 2010a; Politch et al., 2014). Chez ces hommes leucocytospermiques, l'augmentation de la concentration leucocytaire concerne toutes les populations, à savoir les granulocytes, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T (Wolff and Anderson, 1988). Cette augmentation du nombre de leucocytes dans le sperme s'explique probablement du fait d'un relargage exacerbé de ces cellules venant de l'épithélium, d'une altération de l'intégrité de la barrière épithéliale et d'une attraction de ces cellules au niveau du site d'inflammation (Quayle et al., 1997).

C. Présence du VIH dans le sperme

Intéressons-nous maintenant au sperme d'hommes infectés par le VIH. Le virus est présent dans le sperme à la fois sous forme de particules virales libres et sous forme de cellules infectées, lymphocytes T CD4 et monocytes/macrophages (Quayle et al., 1997). Plusieurs éléments indiquent que les souches virales et les cellules infectées présentes dans le sperme ne proviennent pas uniquement du sang mais trouveraient leur origine au moins en partie au sein du tractus génital mâle (TGM).

i. Origines du virus dans le sperme et infection des organes du TGM

Quelles sont les données sur lesquelles repose cette hypothèse ?

Au cours de la phase aigüe d'infection, il est décrit que le sperme, très infectieux, présente des taux élevés d'ARN viraux (correspondant au virus libre) et d'ADN viraux (correspondant aux leucocytes séminaux infectés) dont les séquences sont extrêmement similaires à celles provenant de virus présent dans le sang (pour revue (Houzet et al., 2014)). Néanmoins pour environ 60% des patients, cela n'est plus vrai durant la phase chronique d'infection, ce qui indique que l'origine virale au sein de l'organisme peut diverger au fur et à mesure de l'infection

En effet, des études phylogénétiques réalisées pendant la phase chronique, au cours de laquelle la charge virale et le taux de transmission sont réduits, ont permis de mettre en évidence des différences génétiques entre les souches de VIH dans le sang et dans le sperme. L'analyse de la séquence d'ARN codant la protéine d'enveloppe Gp120 (Paranjpe et al., 2002), la transcriptase inverse ainsi que la protéase (Ghosn et al., 2004) a montré que les particules virales libres présentes dans le liquide séminal constituent une population distincte de celle retrouvée dans le sang. Cela indique l'existence d'une réplication virale locale indépendante, ainsi qu'un échange restreint de virions et cellules infectées entre les compartiments sanguin et séminal, permettant ainsi l'évolution parallèle de diverses populations de virus au sein de l'organisme. De plus, les séquences d'ADN et d'ARN viral dans les cellules infectées du sperme peuvent différer de celles des virions, suggérant une origine différente des virions et des cellules infectées (pour revue (Houzet et al., 2014)). Anderson *et al.*, sur la base d'une analyse phylogénétique du gène codant la protéine d'enveloppe de virus issus à la fois du sang et du sperme de patients séropositifs, propose plusieurs mécanismes de contamination du sperme par le VIH, non exclusifs et variables au cours du temps, à savoir: (i) un import direct de virus à partir du sang; (ii) une amplification clonale de souches virales sanguines au sein de cellules infectées infiltrant le tractus génital mâle; (iii) une réplication locale dans des cellules

résidentes du tractus génital mâle conduisant à une évolution virale distincte et caractérisant la compartimentation (Anderson et al., 2010b).

Différents niveaux d'infection des organes producteurs du sperme

Depuis plusieurs années, notre équipe s'est employée à décrire l'infection par le VIH de plusieurs organes qui contribuent à l'élaboration des constituants du sperme, à la fois chez l'homme et chez le macaque (Deleage et al., 2011; Roulet et al., 2006; Le Tortorec et al., 2008a, 2008b) (Figure 11). Ainsi, des leucocytes infectés ont été détectés au niveau des testicules, des épididymes, de la prostate, des vésicules séminales et de l'urètre. L'ensemble de ces organes est donc susceptible d'être des réservoirs viraux participant à la contamination du sperme (pour revue (Houzet et al., 2014; Le Tortorec and Dejucq-Rainsford, 2010a)). Une étude récente menée au laboratoire sur le modèle macaque a été plus loin puisqu'elle a mis en avant que plusieurs organes du tractus génital mâle présentent des souches virales phylogénétiquement différentes, et distinctes de celles du sang. Il a pu être mis en évidence chez un des macaques de l'étude qu'à la fois les particules virale et les cellules infectées provenaient des vésicules séminales et pour un autre macaque, ces mêmes populations venaient des épididymes et des vas déférents. Aucune signature « organe spécifique » commune à tous les macaques n'a en revanche pu être mise en évidence quant aux souches présentes dans le sperme, indiquant l'absence d'un organe systématiquement et préférentiellement impliqué dans la contamination du sperme (Houzet et al., 2018). Chez le macaque, les organes du tractus génital mâle diffèrent dans leur niveau d'infection, l'urètre, la prostate et les vésicules séminales étant les plus infectés, alors que les épididymes et les testicules sont moins touchés (Le Tortorec et al., 2008b). Cette infection différentielle corrobore les données de Paranjpe *et al*, qui montrent que la vasectomie a très peu d'impact sur la présence de virions libres dans le sperme, indiquant que le testicule et l'épididyme sont quantitativement de moindres contributeurs de virus dans le sperme (Paranjpe et al., 2002). Chez les hommes VIH+, le massage prostatique augmente significativement la quantité de virus dans le sperme (Smith et al., 2004).

Par ailleurs, nos études chez l'homme et le macaque montrent la présence de nombreux leucocytes infectés enchevêtrés dans l'épithélium séminal de l'épididyme, confortant l'idée que les leucocytes infectés du sperme puissent provenir majoritairement de l'épididyme.

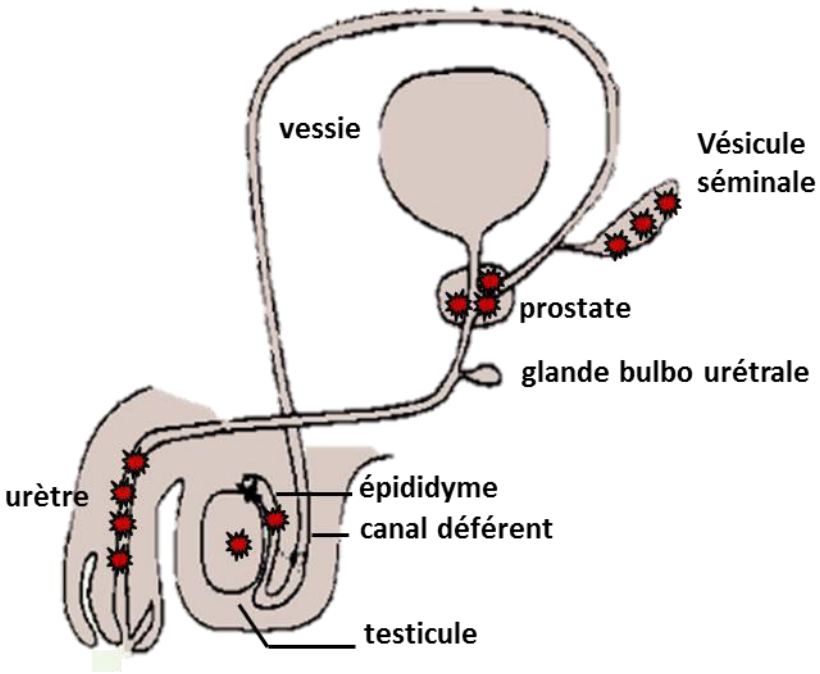


Figure 11 : Représentation schématique des différents niveaux d'infection par le VIH des organes du tractus génital mâle

ii. Infectiosité des cellules séminales versus le liquide séminal et prévalence des cellules infectées dans le sperme

Plusieurs études ont cherché à isoler du virus infectieux soit à partir de cellules séminales, soit à partir de LS de patients infectés. D'une manière générale, on isole plus fréquemment du virus infectieux à partir des cellules séminales que du LS de sperme d'hommes infectés VIH. En effet, la médiane du pourcentage de patients chez qui du virus infectieux a pu être isolé à partir des cellules séminales est de 20% (intervalle 4-55%), alors qu'elle est de 5.9% (intervalle 3-11%) pour le liquide séminal (pour revue (Anderson et al., 2010a)). Quelques études ont cherché à évaluer le nombre de cellules infectées présentes dans le sperme par PCR quantitative sur l'ADN du VIH. Si l'on pose l'hypothèse de la présence d'une copie unique d'ADN viral par cellule et avec la notion que seuls les lymphocytes T CD4 et monocytes/macrophages du sperme peuvent être infectés, la médiane du nombre de cellules retrouvées infectées parmi ces cellules cibles du sperme est de 0.2%, avec un intervalle selon les études allant de 0.002% des cellules à 16% d'infection des cellules (Anderson et al., 2010a). Parmi les cellules infectées du sperme, la fréquence des lymphocytes infectés est supérieure à celle des macrophages traduisant leur plus forte susceptibilité à l'infection (Quayle et al., 1997). Comme précédemment expliqué, les cellules infectées du sperme (lymphocytes et monocytes/macrophages), bien que peu nombreuses ont la capacité, au moins *in vitro*, de

transmettre l'infection (Bernard-Stoecklin et al., 2014; Quayle et al., 1997). A la vue de ces observations et au regard de l'efficacité de la transmission associée aux cellules décrite en partie II.C, on comprend l'importance de ne pas négliger la transmission potentiellement initiée par ces cellules du sperme et de considérer ce mode d'infection dans les stratégies de prévention.

iii. Association du VIH avec les spermatozoïdes

La question de savoir si les spermatozoïdes sont des cellules cibles du VIH capables de transmettre l'infection a longtemps été sujet à controverses (Piomboni and Baccetti, 2000). Les premières études, fondées sur l'observation en microscopie électronique et sur des expériences d'hybridation *in situ,* ont montré que les spermatozoïdes pouvaient contenir des particules de VIH et / ou de l'ARN viral (Baccetti et al., 1991; Bagasra et al., 1994; Dussaix et al., 1993). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par PCR quantitative sur des spermatozoïdes isolés de patients infectés par le VIH (Persico et al., 2006; Pudney et al., 1999; Quayle et al., 1997). Plus de 4500 inséminations de spermatozoïdes viables et mobiles isolés de patients infectés par le VIH ont été réalisées sans aucune contamination du partenaire séronégatif (Bujan et al., 2004; Savasi et al., 2007; Zafer et al., 2016). Toutefois, on sait maintenant que le VIH peut se fixer à la surface des spermatozoïdes *in vitro* via des récepteurs alternatifs, le récepteur CD4 étant absent, notamment via l'héparane sulfate et le récepteur au mannose (Cardona-Maya et al., 2011; Ceballos et al., 2009; Fanibunda et al., 2008). Les spermatozoïdes peuvent ainsi transmettre efficacement l'infection aux cellules dendritiques *in vitro*, par contact de cellule à cellule (Ceballos et al., 2009). Ainsi, les spermatozoïdes, même s'ils ne sont pas infectés de manière productive par le VIH-1, pourraient agir en tant que vecteurs de virions et ainsi favoriser la transmission virale aux cellules cibles.

iv. Modification des paramètres du sperme chez les patients VIH+

La présence du virus dans le sperme et plus largement dans les organes producteurs de ce dernier altère un certain nombre de paramètres séminaux (pour revue (Le Tortorec and Dejucq-Rainsford, 2010b)). Ainsi, il a été décrit que l'infection par le VIH provoque une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et du volume de l'éjaculat ainsi qu'une augmentation du pH séminal (Bujan et al., 2007; Dulioust et al., 2002; Nicopoullos et al., 2004; La Sala et al., 2007).

L'infection a également des répercussions sur l'abondance relative de plusieurs types de leucocytes séminaux. En effet, alors que chez les hommes en bonne santé le ratio des lymphocytes T CD4 sur CD8 est d'environ 1:1, celui-ci tombe à 1:3 avec un net déclin du nombre de T CD4 au profit

des T CD8 cytotoxiques chez les patients atteints du VIH (Denny et al., 1995; Quayle et al., 1997). La baisse des lymphocytes est telle que le ratio macrophages sur lymphocytes chez les patients VIH+ est d'environ 22:1 contre 13:1 chez les sujets non infectés (Anderson et al., 2010a).

Modification du profil cytokinique

L'infection par le VIH est également associée à une modification du contenu en cytokines du sperme, bien qu'il soit difficile d'établir de façon précise les changements qui s'opèrent à cause de la forte hétérogénéité interindividuelle des taux de cytokines du sperme, aussi bien au sein des cohortes d'individus non infectés (Politch et al., 2007), que des cohortes d'hommes infectés par le VIH (Hoffman et al., 2014; Kafka et al., 2012; Lisco et al., 2011; Olivier et al., 2014; (Vanpouille et al., 2016). Par ailleurs, la composition des cohortes (nombre d'individus testés, leur âge et leur origine géographique) ainsi que l'utilisation de techniques de détection différentes expliquent certainement la forte hétérogénéité observée entre les différentes études. Les larges fluctuations de concentrations en cytokines entre les individus peuvent aussi s'expliquer par des paramètres purement biologiques tels que la composition du microbiome du sperme, la charge virale ou bien même la présence d'autres infections génitales (Kafka et al., 2012; Lisco et al., 2011; Olivier et al., 2014; Politch et al., 2007). D'une façon générale, une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1a, l'IL-1b, l'IL6 a été rapportée (Anderson et al., 2010b; Camus et al., 2016; Lisco et al., 2012). Diverses études rapportent également une hausse de la concentration en chimiokines telles que MCP-1, MIP-1a, MIP-1b et RANTES (pour revue (Keogan et al., 2015)). En outre, il a été montré que la surexpression de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans le LS d'hommes infectés modifie le « réseau de cytokines » et peut altérer la capacité du système immunitaire à répondre à l'infection par le VIH-1 (Lisco et al., 2012; Olivier et al., 2014). Il faut également avoir à l'esprit que ce « réseau cytokinique » du sperme évolue de manière dynamique en fonction des différents stades de l'infection virale, comme cela a été décrit par Vanpouille *et al.*, (Vanpouille et al., 2016). Il a été montré que l'IL6, l'IL8 et MCP-1 sont présents en plus grandes concentrations dans le LS de patients en phase de primo-infection par rapport à des patients au stade d'infection chronique (Kafka et al., 2012). Une corrélation entre les taux de cytokines pro-inflammatoires et la charge virale dans le sperme a d'ailleurs été rapportée dans plusieurs études. Ainsi, une corrélation positive entre une charge virale séminale importante et un taux élevé d'IL-1β a été décrite sur une cohorte de 25 patients infectés par le VIH-1 (Berlier et al., 2006a). Une telle corrélation a également été décrite pour les taux de RANTES (Storey et al., 1999), d'IL-6, d'IL-8, d'IL-12 et IFNγ (Sheth et al., 2005), et d'IL-17 (Hoffman et al., 2014). Sachant par exemple que l'IL-1β est connue pour augmenter la réplication virale et la réponse immunitaire, le dosage de ces différents

marqueurs pourrait constituer une approche intéressante afin d'identifier de potentiels patients à haut risque (Berlier et al., 2006a). De plus, ces variations de concentrations en cytokines pourraient avoir de nombreuses conséquences puisqu'il a par exemple été montré que des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires favorisent l'expansion et l'activation des cellules immunitaires de la muqueuse exposée. La modification de la composition du liquide séminal en facteurs immunomodulateurs affecte également la réponse des cellules épithéliales à l'infection. Nous reviendrons plus en détails sur ces effets « facilitateurs » ou « inhibiteurs » de l'infection du sperme dans le chapitre suivant.

Modification du phénotype des cellules cibles séminales

Une unique étude réalisée chez le macaque s'est intéressé aux modifications du phénotype des cellules séminales suite à l'infection par le SIV (Bernard-Stoecklin et al., 2013). Les auteurs décrivent une augmentation du nombre de lymphocytes CD4 CD69+ présentant donc un phénotype activé suite à l'infection. Concernant la population de monocytes/macrophages, ils rapportent une augmentation de la proportion de cellules positives pour CXCR4 lors de l'infection. De façon intéressante, ils relèvent une diminution du nombre de cellules positives pour LFA-1 et une augmentation du nombre de cellules positives pour Mac-1, suggérant que le virus puisse modifier les capacités d'adhésion des cellules qu'il infecte.

D'autres études, réalisées sur cellules sanguines ont également mis en évidence des changements phénotypiques des leucocytes suite à l'infection. Il est rapporté une diminution du nombre de lymphocytes T exprimant les molécules d'adhésions L-sélectine et VLA-A impliquées entre autres dans le recrutement des cellules immunes lors d'une inflammation. A l'inverse, l'infection induit la surexpression d'ICAM-1 et LFA- 1 sur ces mêmes cellules (Hayes et al., 1999; Park et al., 1998). Du coté des monocytes et macrophages, il a été décrit que l'infection VIH conduit les macrophages vers un phénotype pro-inflammtoire « M1 » avec une diminution de l'expression des déterminants M2 CD206 et CD163 ((Porcheray et al., 2006) ; pour revue (Cassol et al., 2010)). Chez les monocytes, il est rapporté une diminution de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 (Porcheray et al., 2006). Bien qu'il s'agisse là d'études réalisées sur des leucocytes sanguins, on peut tout de même suspecter que ces marqueurs soient altérés dans le sperme comme ils le sont dans le sang.

D. Rôle du liquide séminal dans la transmission virale

Bien que les études réalisées *in vivo* montrent que le LS n'est pas nécessaire à l'établissement de l'infection (Miller et al., 1989; Salle et al., 2010), un certain nombre d'études ont démontré que les différents composants du LS peuvent impacter, faciliter ou inhiber selon les composants, l'infection VIH par du virus libre essentiellement. Nous allons revenir en détails sur ces études.

i. Facteurs facilitateurs

a. Neutralisation du pH vaginal acide

L'infectivité du VIH-1 est stable à un pH compris entre 5 et 8 mais elle est réduite de 25% à un pH de 4,5 (O'Connor et al., 1995). Le pH du LS est compris entre 7,4 et 8,4 avec des propriétés tampon permettant de ramener le pH vaginal acide à un pH neutre de manière très rapide (30 secondes) et de maintenir ce pH neutre voire basique pendant 2 heures (Fox et al., 1973; Wolters-Everhardt et al., 1986). Parce que les particules de VIH-1 libres et les leucocytes infectés sont sensibles au pH acide, ils sont donc susceptibles d'être inactivés par l'acidité vaginale. Cette action tampon du LS, permettant la protection des spermatozoïdes, a pour effet secondaire indésirable d'octroyer une certaine protection au virus, favorisant ainsi l'infection (Bouvet et al., 1997).

b. Rôle des fibrilles amyloïdes

La présence de fibrilles amyloïdes dans le liquide séminal a été décrite comme un facteur favorisant l'infection par le VIH-1 (Münch et al., 2007; Roan et al., 2011; Usmani et al., 2014). L'étude de Munch et al, publiée dans la revue Cell en 2007 démontre que seulement 1 à 3 particules virales sont suffisantes pour initier une infection productive en présence de fibrilles, alors que 1000 à 100000 virions sont requis en absence de fibrilles (Münch et al., 2007). Ces fibrilles se forment à partir de fragments de la PAP qui génèrent le peptide SEVI (Semen-derivated Enhancer of Viral Infection) ou de fragments des séménogélines (SEM1 et SEM2) qui génèrent plusieurs peptides stimulateurs de l'infection *in vitro*. La PAP et les séménogélines sont des constituants majeurs du coagulum, présents dans le sperme à des concentrations de l'ordre de plusieurs mg/ml. Les monomères de SEVI et les fragments de séménogélines (SEMs) possèdent des propriétés biochimiques leur permettant de s'auto-assembler en fibrilles amyloïdes, que l'on peut révéler par un marquage à la thioflavine T et au rouge Congo, ou par microscope électronique (Bergman et al., 2016). Elles sont composées de nombreux résidus basiques et sont donc chargées très positivement. Ces fibrilles favorisent l'infection par le VIH-1 en diminuant la répulsion électrostatique entre les membranes chargées négativement du virus et de la cellule cible (Roan et al., 2009). Ce mécanisme

est d'ailleurs indépendant du tropisme de la souche virale. L'augmentation de l'infection en présence de fibrilles a été observée sur un certain nombre de types cellulaires, dont des lignées reportrices de l'infection (TZM-BL, CEMx-M7), des lignées de cellules épithéliales du tractus génital féminin (Ect1/E6E7 et End1/E6E7), des cellules primaires dont des PBMC, des macrophages et des lymphocytes T CD4+ (Kim et al., 2010a; Micsenyi et al., 2013; Münch et al., 2007; Olsen et al., 2010; Roan and Greene, 2007; Roan et al., 2009) et plus récemment sur des explants vaginaux (Introini et al., 2017), même si sur ce modèle tissulaire cela est controversé (Kordy et al., 2018). L'effet facilitateur de l'infection induit par le LS est dépendant du donneur et corrèle avec les niveaux élevés de peptides amyloïdogéniques SEVI et SEM contenus dans le sperme (Kim et al., 2010a; Münch et al., 2007; Roan et al., 2014; Röcker et al., 2018). De plus, il a été remarqué que les échantillons de sperme provenant de patients présentant une obstruction du canal éjaculateur sont moins riches en SEVI et en fibrilles de SEM et sont dépourvus de la capacité à stimuler l'infection par le VIH *in vitro* (Roan et al., 2011; Röcker et al., 2018). Enfin, l'effet stimulateur de l'infection en présence de LS diminue progressivement au cours de la liquéfaction du sperme qui est associée à la dégradation des fragments de séménogélines (Kim et al., 2010a; Roan et al., 2014). Toutefois, des résultats plus mesurés ont été obtenus *in vivo* chez le macaque rhésus, où effectivement il semble que SEVI facilite l'infection mais particulièrement dans le cas d'une exposition à de faibles doses de virus (Munch et al., 2013). Une explication possible à ces observations serait un phénomène de saturation des fibrilles avec le virus (Bergman et al., 2016), ce qui expliquerait également les résultats divergents obtenus dans les modèles explants (Introini et al., 2017; Kordy et al., 2018) où de fortes doses de virus sont requises pour initier une infection.

c. Opsonisation des particules virales par le complément

Le LS contient des molécules du complément qui peuvent être activées par les particules virales VIH-1 (indépendamment du tropisme de la souche). Cette activation mène au clivage de la protéine du complément C3. L'opsonisation des particules virales par les fragments C3a formés suite au clivage peut favoriser l'infection des cellules exprimant le récepteur au complément comme les cellules épithéliales, les macrophages, les DC et les lymphocytes T CD4 (Bouhlal et al., 2007). Le LS de personnes séropositives contient également des anticorps dirigés contre l'enveloppe virale qui peuvent opsoniser les particules de virus libre. La formation de ces complexes favorise la transcytose du virus via l'interaction avec le récepteur Fc néonatal exprimé par les cellules épithéliales en concentrant le virus à la membrane de la cellule (Gupta et al., 2013). Ce phénomène est aussi observé avec des anticorps neutralisants supposés avoir un rôle protecteur face à l'infection (Lo Caputo et al., 2003; Söderlund et al., 2004).

ii. Facteurs inhibiteurs

Dès 1995, O'Connor et al, mettent en évidence *in vitro* un effet protecteur du LS sur l'infection par le VIH-1 (O'Connor et al., 1995). Plusieurs mécanismes et composants pourraient expliquer cette inhibition, dont voici un état de lieux :

a. Toxicité des dérivés réactifs de l'oxygène

Les polyamines présentes dans le liquide séminal, en particulier la spermine et la spermidine, peuvent être oxydées par les amines oxydases présentes dans le LS ou dans les sécrétions cervico-vaginales. Ceci induit la production de radicaux libres (en anglais reactive oxygen species, ROS) capables d'inactiver les particules virales et donc altérer leur infectivité, notamment en altérant l'enveloppe virale qui est particulièrement sensible à la présence de ROS (Agarwal and Prabakaran, 2005; Klebanoff and Kazazi, 1995; Stief, 2003).

b. Présence de peptides antimicrobiens

Le LS contient un certain nombre de peptides antimicrobiens dont la cathélicidine, les défensines, la lactoferrine ou encore des SLPI qui présentent également une activité anti-VIH (Cole and Lehrer, 2003; Venkataraman et al., 2005). Par ailleurs, Martellini et al, (2009) ont identifié jusqu'à cinquante-deux polypeptides cationiques séminaux parmi lesquels les séménogélines, la fibronectine, la PAP, le PSA… etc, pouvant contribuer à l'activité inhibitrice du liquide séminal. Cette activité inhibitrice est d'ailleurs curieusement observée même lorsque le LS est fortement dilué (jusqu'à 1/3200) (Martellini et al., 2009).

c. Interférence avec la capture des particules virales par DC-SIGN

Une étude conduite par Sabatté *et al.,* (2007) a mis en évidence *in vitro* qu'une courte exposition au LS (90 min) pouvait inhiber significativement et spécifiquement l'attachement de souches X4 et R5 du VIH à la lectine DC-SIGN des DC, ainsi que la transmission de ces souches aux lymphocytes T CD4+ (Sabatté et al., 2007). Des analyses de structure ont permis de déterminer que le facteur responsable de l'inhibition de la capture par DC-SIGN est un composé de haut poids moléculaire (plus de 100kDa), stable à la chaleur et résistant à l'action de la trypsine (Sabatté et al., 2007). La mucine 6 fut identifiée par Stax et al. (2009) comme pouvant agir comme ligand du récepteur DC-SIGN, et ainsi rentrer en compétition avec le VIH, inhibant au moins partiellement sa capture et donc sa transmission par les DC. Par la suite, Sabatté et al. ont identifié la clusterine, une protéine présente en grande quantité dans le LS (0,2 à 3,5 mg/mL), comme étant un ligand

supplémentaire du DC-SIGN et également responsable au moins en partie de l'effet inhibiteur du LS sur la capture et la transmission des particules virales (Sabatte et al., 2011).

d. Opsonisation du VIH-1 par des anticorps neutralisants

Des anticorps neutralisants, majoritairement des IgG et des IgA, ont pu être mis en évidence dans le sperme d'hommes infectés. L'opsonisation du VIH-1 par ces anticorps exerce un rôle protecteur face à l'infection par le VIH-1 soit par exclusion immune, ou bien par induction du processus d'ADCC (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps). Cependant, il est important de souligner que cette opsonisation peut aussi avoir un rôle inverse et faciliter l'infection en favorisant le contact du virus avec les cellules cibles exprimant les récepteurs Fc (macrophages, DC) comme décrit en partie III.D.i.c (Mestecky et al., 2011; Söderlund et al., 2004). Ces deux mécanismes semblent donc coexister.

e. Modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs

Une étude publiée par Balandya *et al.*, a montré, dans un modèle *in vitro*, que le liquide séminal protège les cellules CD4+ de l'infection par le VIH-1 en diminuant l'expression du récepteur CD4 à leur surface. Cette inhibition est corrélée avec le temps d'incubation et la concentration en LS utilisée (Balandya et al., 2010). Toutefois, il a été montré que l'incubation de ces cellules T CD4 avec du LS s'accompagne d'une augmentation de l'expression du corécepteur CCR5. Cela pourrait ainsi atténuer l'effet protecteur du LS au moins contre les souches R5 (et non X4), ce qui pourrait participer à la sélection préférentielle des souches R5 lors de la transmission sexuelle (Balandya et al., 2010). De plus, cette augmentation de l'expression de CCR5 suite à une exposition au LS a également été observée sur des cellules épithéliales du col de l'utérus. Cette étude n'a cependant pas déterminé si le LS modulait l'infection par le VIH-1 (Sales et al., 2014). D'autre part, une étude menée au laboratoire, qui comparait de façon originale l'impact d'une exposition de lymphocytes T CD4 sanguins au LS d'hommes séronégatifs et séropositifs a démontré un effet différentiel des deux types de LS. Une courte exposition à de faibles doses de LS engendre une diminution des niveaux d'expression de CCR5 et de façon plus importante dans le cas d'une exposition au LS HIV+. Cela est attribué au moins en partie, à la présence d'une plus grande quantité de RANTES, ligand de CCR5 dans les spermes des hommes infectés. La diminution plus importante après exposition au LS HIV+ de l'expression de CCR5 à la surface des lymphocytes est associée à un effet stimulateur de l'infection du LS HIV+ diminué par rapport au LS HIV-. Cette baisse du niveau de CCR5 est transitoire puisque 24h post exposition, les auteurs relèvent une augmentation de l'expression de cette molécule (Camus et al., 2016).

Ce que l'on peut dire, c'est qu'il apparait que la composition du LS, les temps et les doses d'exposition engendrent des effets différents sur l'expression des récepteurs et co-recépteurs du VIH des cellules exposées. C'est donc un processus dynamique et la protection apportée par le LS via la modulation de l'expression des récepteurs et corécepteurs du VIH-1 demeure largement discutable.

f. Blocage de la transcription virale par les exosomes séminaux

Les exosomes sont des nanovésicules membranaires sécrétées dans le milieu extracellulaire par divers types de cellules. Les exosomes sont décrits pour faciliter la communication intercellulaire, moduler le phénotype cellulaire et réguler la pathogenèse microbienne. Bien que peu d'études se soient intéressées aux exosomes du sperme, on peut tout de même citer celles conduites par Madison et al, (2014, 2017), dans lesquelles les auteurs ont purifié des exosomes du sperme et du sang d'hommes sains, et les ont appliqués sur des cultures cellulaires *in vitro* en présence de VIH afin de déterminer si ceux-ci pouvaient altérer la réplication virale. De manière surprenante, seuls les exosomes séminaux étaient capables d'inhiber la réplication virale après leur internalisation, cela en altérant l'activité de la transcriptase inverse de l'ARN viral. Les exosomes séminaux agissent probablement comme des cargos de molécules antivirales, ce qui pourrait être extrêmement intéressant afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Madison et al., 2014; Welch et al., 2018)(Madison and Okeoma, 2015) .

iii. Effets indirects du LS sur les tissus portes d'entrée du VIH

En plus des effets directs du sperme sur la transmission de l'infection via l'interaction de ses composants avec le virus ou les cellules cibles, il existe aussi des effets indirects qui passent par une action du sperme sur les cellules de la muqueuse exposée. Ces effets peuvent, eux aussi, moduler la transmission de l'infection. La très grande majorité des études s'intéressant aux effets du sperme sur les barrières épithéliales se sont focalisées sur les barrières génitales femelles.

a. Effet immuno-régulateur du LS sur les barrières épithéliales

Chez les hommes non-infectés, le LS contient de nombreux facteurs dits immuno-régulateurs (Anderson et al., 2010a; Lisco et al., 2012), importants pour la reproduction humaine, en particulier le TGF-β et la PGE2. Ces deux facteurs jouent principalement un rôle immunosuppresseur afin de préparer le tractus génital féminin à la conception. Ils agissent sur les neutrophiles, les cellules NK, les macrophages et les DC des muqueuses génitales féminines et sont présents en forte concentration dans le sperme. En effet, le LS contient plus de TGF-β que n'importe quel autre fluide corporel. La majorité du TGF-β présent dans le LS est issu de la prostate et est synthétisé sous forme latente

(80ng/ml). Il est activé (1ng/ml) par les plasmines et autres enzymes des sécrétions vaginales (Robertson et al., 2002). Le TGF-β agit en promouvant la différentiation et l'expansion des LT régulateurs (T-reg) de la muqueuse génitale féminine et donc la tolérance du système immunitaire face aux antigènes (Robertson et al., 2002, 2013). Chez les hommes infectés de façon chronique par le VIH-1 mais non traités, les taux de TGF-β sont plus faibles comparé aux hommes non-infectés (NI) ou traités, ce qui leur confère un pouvoir anti-inflammatoire moindre (Doncel et al., 2014; Ferreira et al., 2014).

Les prostaglandines, en particulier la PGE2, constituent un des composants majeurs du LS capable de moduler la réponse immunitaire. La sécrétion de PGE2 dans le LS, bien que variable d'un individu à l'autre, est élevée, de l'ordre de 100µg/ml (Harizi and Gualde, 2005). La PGE2 et plus globalement les prostaglandines exercent un rôle immunorégulateur dans le tractus génital féminin en inhibant l'expansion clonale des cellules NK et LT, en inhibant leur capacité cytotoxique et en polarisant les T CD4 vers le phénotype Th2. De plus, les prostaglandines induisent la tolérance immune en provoquant un changement de production de cytokine de l'IL-12 vers l'IL-10 par les DC ((Harizi and Gualde, 2005; Kelly et al., 1997) pour revue (Kalinski, 2012). Les propriétés immunosuppressives des PGE et de l'IL-10 sont importantes pour la survie des spermatozoïdes mais elles sont délétères dans le contexte des infections sexuellement transmissibles (IST) puisqu'elles peuvent créer un microenvironnement propice aux infections en inhibant la réponse du système immunitaire (Remes Lenicov et al., 2014). Paradoxalement, des études suggèrent que les PGE2 contenues dans le LS induiraient l'expression de COX-2 dans les cellules endocervicales et vaginales, ce qui entrainerait une inflammation locale et le recrutement de cellules cibles sur le site de l'inflammation (Doncel et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Sales et al., 2002). Dans le cas particulier de l'infection VIH, cela peut donc également favoriser l'établissement d'un environnement favorable à l'infection par le VIH-1.

En plus de ces deux facteurs immunomodulateurs, le LS contient de nombreuses autres cytokines, telles que MCP-1, IL-8, GM-CSF, IL15 et la fractalkine, dont les concentrations dans le LS sont environ 5 fois plus élevées que dans le sang (Olivier et al., 2014). Ces cytokines sont connues comme étant impliquées dans le recrutement, la maturation et la prolifération des monocytes/macrophages et des LT cibles du VIH, mais également des LB, DC et autres cellules NK (Barreto-de-Souza et al., 2014; Olivier et al., 2014). On peut citer une autre cytokine séminale l'IL7, dont l'expression est augmentée lors de l'infection par le VIH-1, qui prévient l'apoptose des cellules infectées de la muqueuse, facilitant ainsi la transmission virale (Barreto-de-Souza et al., 2014; Doncel et al., 2014).

En utilisant des cellules épithéliales d'exocol *in vitro* et des biopsies prélevées *in vivo* après exposition au LS, Sharkey et al. ont montré que le LS induit la production par les cellules épithéliales de nombreuses cytokines et chimiokines (IL-8, IL-6, CCL20, GM-CSF, MCP-1, IL-1α, IL1β, Groα, MIP-2α, MIP-2β). De l'expression de ce cocktail de molécules, en résulte l'infiltration de neutrophiles, de macrophages et de LT au niveau du col de l'utérus (Sharkey et al., 2007, 2012).

De plus, Berlier et al. ont également montré que le LS induit la production par les cellules épithéliales vaginales de CCL20, un facteur chimio-attractant majeur impliqué dans le recrutement et la maturation des cellules de Langerhans, des DC, ainsi que des LT intraépithéliaux, considérés comme les principales cibles du VIH dans les muqueuses (Berlier et al., 2006b; Cremel et al., 2005). Des études plus récentes ont montré que la sécrétion de CCL20 par les cellules de l'épithélium endocervical pourrait être induite par la lactoferrine présente dans le LS (Lourenço et al., 2014). De plus, les auteurs montrent qu'il existe une corrélation positive entre la charge virale et le taux de lactoferrine. De ce fait, le sperme d'homme VIH+ contient une quantité de lactoferrine supérieure au sperme d'homme NI, ce qui joue en faveur de la dissémination virale puisqu'elle favorise un recrutement plus important de cellules dendritiques (Lourenço et al., 2014).

Au-delà de la sécrétion de divers facteurs par les cellules épithéliales, une exposition des muqueuses au sperme engendre également des modifications de la perméabilité épithéliale. A ce sujet, plusieurs études présentent des résultats divergents.

Renforcement de la barrière épithéliale

Des études sur différentes lignées cellulaires du tractus génital féminin ont montré que la présence de LS d'hommes NI augmente la résistance trans-épitheliale des épithéliums en culture, renforçant ainsi leur étanchéité (Gorodeski and Goldfarb, 1998; Lawrence et al., 2012). Cet effet serait dû à la présence d'un lipide de faible poids moléculaire (<10 kDa) capable d'influencer la distribution de la protéine ZO-1, impliquée dans l'établissement des jonctions serrées (Gorodeski and Goldfarb, 1998). Très récemment 2 études se sont intéressées à l'effet du LS sur la perméabilité de la muqueuse colorectale (Kordy et al., 2018; Mullin et al., 2017). Mullin *et al.,* ont travaillé in vitro sur le modèle Caco-2 et ont montré qu'une exposition au LS engendre une hausse de la RTE, et ce, uniquement lorsque le LS est exposé sur la face basale de la barrière épithéliale (afin de mimer les conditions d'une altération de la barrière épithéliale), mais aucun changement n'est mis en évidence lorsque le LS est apporté du coté apical. De la même façon, Kordy *et al.,* grâce à un modèle de culture organotypique de muqueuse colorectale, ne relèvent aucun changement morphologique suite à l'exposition au LS, et démontrent de surcroît que la présence de ce dernier ne modifie pas les

propriétés infectieuses du virus HIV-1_{BAL} sur la muqueuse (Kordy et al., 2018). La limitation majeure de ces études est qu'elles sont réalisées avec du LS d'hommes séronégatifs, ce qui pose la question de l'extrapolation des résultats avec du sperme de patients infectés.

Altération de la perméabilité épithéliale

A l'inverse, d'autres études démontrent un effet néfaste du LS sur les barrières épithéliales colorectales et endométriales. En effet, il a été constaté qu'une exposition au LS de la muqueuse colorectale de rat induisait une augmentation de sa perméabilité (Mendizabal and Naftalin, 1992). D'autre part, les fortes concentrations séminales en TGF-β pourraient impacter sur la transmission mucosale du VIH, puisque l'exposition de la muqueuse au TGF-β modifie la distribution de l'occludine et de la claudine-7, des protéines impliquées dans les jonctions serrées, ce qui pourrait faciliter le passage de la barrière épithéliale par le VIH (Rametse et al., 2014). De la même manière, Nazli *et al.,* démontrent une hausse de la perméabilité et une altération de la barrière endométriale suite à une exposition à du LS d'hommes séropositifs (Nazli et al., 2010). Toutefois, ici, les auteurs ont montré que c'est l'infection, et plus précisément la reconnaissance de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 gp120 par les TLR2 et TLR4 des cellules épithéliales endométriales, qui est à l'origine de l'altération de la barrière via l'induction d'une production de cytokines pro-inflammatoires, particulièrement du TNFα. La RTE des cellules est diminuée, et l'expression des protéines des jonctions claudines 1, 2 et 4, des occludines et de ZO-1 est altérée (Nazli et al., 2010, 2013).

b. Effets du LS sur la transmission cellule-cellule

L'influence du sperme sur la transmission de cellule à cellule nous intéresse particulièrement dans le cadre de ce travail de thèse, or, bien que cela puisse représenter un enjeu important dans la transmission muqueuse du VIH, c'est un mécanisme qui demeure très peu étudié.

Ainsi, Lawrence *et al,* montrent dans leur modèle de HEC-1 polarisées que le LS de patients NI exerce un effet inhibiteur sur la transmigration de leucocytes infectés à travers la barrière épithéliale. Cet effet est associé à une augmentation de l'expression des protéines des jonctions ZO-1 entre les cellules épithéliales et à une augmentation des capacités d'adhésion des leucocytes aux cellules épithéliales (Lawrence et al., 2012). Une étude plus ancienne avait déjà mis en évidence une augmentation des capacités d'adhésion d'une lignée lymphocytaire sur les barrières épithéliales cervicales et intestinales (respectivement lignées MT180 et I407 non polarisées) exposées au LS, sans pouvoir expliquer l'origine de ce phénomène (Pearce Pratt and Phillips, 1993). Cependant, le LS semble pouvoir jouer un rôle « inhibiteur » ou « favorisateur » de l'adhésion cellule-cellule en fonction des types cellulaires mis en jeu.

En ce qui concerne un tout autre type d'interaction cellulaire, il a montré que le LS diminue l'adhésion entre spermatozoïdes et cellules dendritiques, et ceci de façon dose-dépendante. Les auteurs attribuent cette diminution d'adhésion aux différentes prostaglandines présentes dans le liquide séminal (Rennemeier et al., 2011). Une diminution de la trans-infection entre les cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4 en présence de LS a également été rapportée (Sabatté et al., 2007; Stax et al., 2009). Une première étude publiée en 2007 par Sabatté *et al*., attribuait l'origine de cet effet du LS sur l'intégration cellule-cellule à la présence de carbohydrates à haute teneur en mannose (au moins de manière partielle). Quelques années plus tard, l'étude de Stax *et al.*, confirmait ces observations et restreignait même l'effet inhibiteur du LS à la mucine 6. Enfin, les cytokines contenues dans le LS, ou bien produites en réponse au LS par les cellules des muqueuses, peuvent aussi avoir un effet sur la transmission de cellule à cellule, puisque certaines d'entre elles peuvent agir sur les molécules d'adhésion nécessaires à la transmigration et/ou à la formation de synapses virologiques. Par exemple, la cytokine SDF-1, aussi connue sous le nom de CXCL12, et spécifiquement enrichie dans le sperme d'hommes VIH+, est capable d'activer la molécule d'adhésion LFA-1 exprimée par les leucocytes (Barreto-de-Souza et al., 2014; Peled et al., 2000). De même, l'INF-γ sécrété par les cellules T résidentes et les natural killer des muqueuses en réponse à un stimulus inflammatoire (que représente le sperme) augmente l'expression de la molécule ICAM-1, qui est aussi largement impliquée dans les phénomènes d'adhésion et de transmigration (Parr and Parr, 2000). L'activation de ces molécules d'adhésion représente donc un moyen supplémentaire pour le LS de moduler la transmission de l'infection par le VIH.

Au regard de tous les effets décrits du LS, et de toutes les cellules et molécules qui le composent, on comprend aisément qu'il est primordial de prendre en compte l'effet de ce fluide dans les mécanismes de transmission et particulièrement par les cellules infectées. C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse.

Pour résumer et conclure sur les rôles controversés du sperme en tant qu'activateur ou inhibiteur de l'infection à VIH-1, leur étude fait face à différents défis. Le premier concerne la complexité de la composition de ce fluide. Certains de ses facteurs peuvent servir à promouvoir la transmission du VIH-1 et l'infection, alors que d'autres peuvent avoir un rôle en tant que facteurs antiviraux. Il existe aussi des facteurs, tels que les anticorps neutralisant, qui démontrent une activité ambivalente. Pris individuellement ou dans leur ensemble, des effets différents sur l'infection peuvent être observés. Les modèles d'étude utilisés sont également source de résultats distincts comme c'est le cas lors de l'étude des peptides à activité cationique. Leur action facilitatrice de l'infection, largement démontrée *in vitro,* est plus modérée voir absente dans des modèles plus

physiologiques. Enfin, le LS présente à la fois des effets directs sur l'infection, par le biais de ses constituants qui interagissent avec les mécanismes de transmission, mais aussi des effets indirects via une action sur les muqueuses exposées. D'un point de vu global, il est donc difficile de statuer de façon claire sur le rôle du sperme dans la transmission muqueuse du VIH-1. Des études se rapprochant au maximum des conditions de transmission *in vivo* et prenant en compte le plus grand nombre possible des facteurs environnementaux présents lors de cette transmission muqueuse sont nécessaires pour décrypter les réels effets du sperme sur la transmission.

OBJECTIFS

Le sperme est le principal vecteur de dissémination du VIH. La muqueuse colorectale exposée au sperme infecté lors de rapports anaux, aussi bien chez l'homme que chez la femme, représente le plus fort risque d'infection parmi toutes les voies de transmission sexuelles. Paradoxalement, les mécanismes de transmission à travers cette muqueuse ont été très peu étudiés et l'impact des constituants du sperme sur la fonction de la barrière et la transmission par les cellules infectées en particulier n'ont jamais été explorés. En effet, il a été montré récemment dans le modèle macaque que l'inoculation intra-rectale de lymphocytes T sanguins infectés est plus efficace pour initier une infection par rapport à du virus libre (Kolodkin-Gal et al., 2013). Des travaux antérieurs auxquels l'équipe a participé ont également démontré la transmission de l'infection après une exposition intra-vaginale à des cellules de la rate infectées. Le stock de cellules inoculé consistait essentiellement en des lymphocytes T (74% du stock de cellules) et contenait à l'inverse très peu de monocytes/macrophages (2%) (Salle et al., 2010). Ces études se sont focalisées sur la transmission de lymphocytes T, alors que les macrophages infectés représentent la population de leucocytes cible majeure dans le sperme d'hommes infectés par le VIH. Il est maintenant avéré que les mécanismes moléculaires de la transmission par les cellules infectées sont différents de ceux impliqués dans la transmission par des virions.

A ce jour, aucune étude n'a reproduit l'interaction complexe du sperme d'hommes infectés avec la muqueuse exposée. Et encore aujourd'hui, les mécanismes de la transmission par des cellules infectées au niveau de la muqueuse colorectale primaire, et l'impact des composants du sperme sur cette transmission, sont inconnus. D'autre part, les quelques études réalisées sur la transmission par des cellules infectées ont exclusivement utilisé des leucocytes sanguins. Or les leucocytes infectés du sperme possèdent vraisemblablement des caractéristiques différentes des leucocytes du sang. Pour autant, nous ne disposons que de très peu d'informations sur le phénotype de ces cellules.
Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont articulés autour de 2 axes :

1) l'étude de l'effet du liquide séminal sur la transmigration de monocytes et de macrophages à travers l'épithélium colorectal, ainsi que sur la barrière épithéliale elle-même

Ce projet a nécessité le développement et la caractérisation de deux modèles de la muqueuse colorectale permettant l'étude de la transmission du VIH. Les résultats de cette partie sont présentés en chapitre I.

2) la caractérisation des leucocytes séminaux potentiels cibles du VIH et leur comparaison aux leucocytes sanguins

Le recrutement d'une cohorte de 30 donneurs séropositifs et naïfs de traitement a été initiée dans le cadre de ce projet. Actuellement 9 patients ont été recrutés.
Afin d'étudier le phénotype des cellules séminales, 4 panels de cytométrie de 11 à 14 couleurs ont été mis en place. Les résultats de cette caractérisation sont présentés en chapitre II.

Le lecteur de ce manuscrit se voit proposer deux articles principaux traitant de l'effet du liquide séminal sur la transmission colorectale du VIH par les cellules infectées, et de la caractérisation des leucocytes séminaux impliqués dans cette transmission. La version proposée de l'article 1 est proche de son état final de publication, mais des corrections et peut-être même des ajouts d'expériences complémentaires sont envisagés. L'article 2 nécessitera des expériences complémentaires avant publication, avec l'ajout indispensable d'un nombre conséquent d'individus séropositifs.

DESCRIPTION DES MODELES D'ETUDE

ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Dans cette partie, je détaillerai la mise en place des modèles de barrière colorectale et vous présenterai sous forme schématique la démarche expérimentale des expériences d'adhésion et de transmigration de leucocytes sur mes deux modèles d'étude de la barrière colorectale : le modèle CaCo2 et le modèle explant. Le détail des expérimentations est décrit dans la partie matériel et méthodes des deux articles présentés dans ce manuscrit.

1) Modèle cellulaire CaCo2

Les cellules CaCo2, cellules humaines issues d'un adénocarcinome du colon, sont cultivées dans du DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) High Glucose (4,5 g/l) enrichi en pyruvate (110 mg/L) et L-glutamine (580 mg/L) et complémenté par 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine.

La polarisation des cellules, c'est-à-dire l'acquisition d'un pôle basal et d'un pôle apical, est obtenue après culture des cellules sur inserts semi-perméables. Les inserts de culture utilisés sont des inserts de polycarbonate pour plaques de cultures 12 puits Falcon® dont les pores mesurent 3µm de diamètre. Les cellules sont ensemencées à raison de 1.10^5 cellules par insert dans 0,5mL de milieu et les inserts sont placés dans les puits contenant 1,5 mL de milieu. La culture se fait en incubateur 5% CO_2 et 95% d'air à 37°C. Le milieu dans les puits et les inserts est changé tous les deux jours jusqu'à la polarisation des cellules. La polarisation est vérifiée par la mesure de différents paramètres : (i) la perméabilité au Dextran-FITC, (ii) la résistance trans-épithéliale, (iii) l'expression de protéines de jonctions serrées, dans notre cas ZO-1. Il est établi que les cellules sont pleinement polarisées et la barrière imperméable lorsque la RTE atteint une valeur d'environ 400 Ohms/cm^2. Huit à dix jours de culture sont nécessaires à la polarisation des cellules.

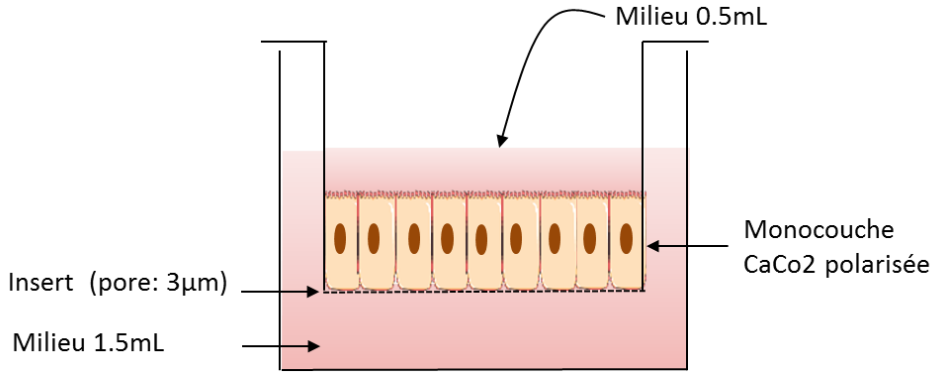


Figure 12 : Principe de la culture en insert des cellules CaCo2

2) Modèle de culture polarisé d'explant de colon

Les tissus colorectaux utilisés dans notre étude proviennent de colectomies pour diverticulose et cancers non traités par radiation ou chimiothérapie. Seuls les tissus sains, déterminés comme normaux par l'examen anatomopathologique ont été utilisés. Le choix de ne travailler qu'avec des tissus provenant de cancers non traités par radiothérapie ou chimiothérapie a été fait après la mise en évidence d'une altération de la barrière épithéliale suite à ce genre de traitements. Les tissus qui ont subi ces thérapies sont fortement agressés par ces interventions et la barrière colorectale se trouve largement endommagée. Nous avons donc dû écarter les tissus traités, réduisant ainsi le nombre de prélèvements exploitables pour nos analyses.

Le fragment de colon est récupéré dans l'heure suivant l'opération et transporté au laboratoire en milieu RPMI + 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine et 15µg/mL de gentamycine. Le temps entre l'excision et la technique du tissu doit être réduit au maximum, puisque nous avons observé que la desquamation de la couche épithéliale est très rapide et survient dès les premières heures post-opératoires. Nous avons donc veillé à une bonne coordination entre les différents services pour réduire au minimum le temps d'acheminement du tissu entre la salle d'opération, le service d'anatomocytopathologie, puis le laboratoire. Une fois le tissu récupéré, le fragment de colon est ouvert et délicatement lavé par bains successifs dans du nouveau milieu de transport. Ici encore cette étape à fait l'objet de mises au point puisque lors de nos premiers tests, le tissu était lavé à l'eau courante et les fèces retirés par frictions sous l'eau. La fragilité de l'épithélium colorectal nous a obligé à procéder de manière plus douce. Une fois le tissu lavé, la musculeuse est retirée de la muqueuse. Le tissu est coupé à l'aide de « biopsy punch » de 8mm de diamètre (Kai), puis les fragments sont placés avec l'épithélium dirigé vers le haut sur une membrane poreuse de polycarbonate en insert de culture 12 puits (pores de 3µm, Falcon) face sous-muqueuse en contact avec la membrane. Le fragment est entouré d'agarose 3% pour maintenir sa structure. Afin d'assurer la polarisation du système et donc de restreindre l'application de différents traitements à la face apicale de l'épithélium, un cylindre en polystyrène (ID x H : 4,7mm x 8mm, Sigma) est placé au-dessus du tissu et fixé avec de la colle vétérinaire chirurgicale (3M Vetbond, St. Paul, MN). Les inserts contenant le tissu sont placés dans des plaques de culture 12 puits contenant 600µL de milieu de culture RMPI complémenté par 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate, 1% de L-glutamine, 1% de tampon HEPES, 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine. Le cylindre fixé sur la face apicale du tissu est rempli avec 100µL de milieu de culture pouvant contenir les substances à tester. La vérification de la bonne étanchéité du système a été réalisée par différents moyens : - un contrôle visuel par ajout dans le cylindre de bleu trypan; - une mesure plus fine du passage de billes de dextran FITC ajoutées là encore dans le cylindre et mesurées après plusieurs

heures dans le surnageant basal. Avant de valider l'utilisation d'un cylindre scellé à l'aide de colle chirurgicale, plusieurs systèmes ont été testés. D'une part, la présence d'agarose uniquement entourant le tissu et ne laissant que la face apicale exposée, et d'autre part la présence d'un cylindre fixé du côté apical du tissu par de l'agarose déposé extemporanément. Seul le système de cylindre fixé par de la colle vétérinaire a démontré une bonne étanchéité. Le système est cultivé en incubateur 5% CO_2 et 95% d'air à 37°C. Après la culture, les explants sont fixés au paraformaldéhyde (PBS-PAF 4%) une nuit à 4°C, abondamment rincés en PBS puis déshydratés et inclus en paraffine pour l'analyse immunohistologique.

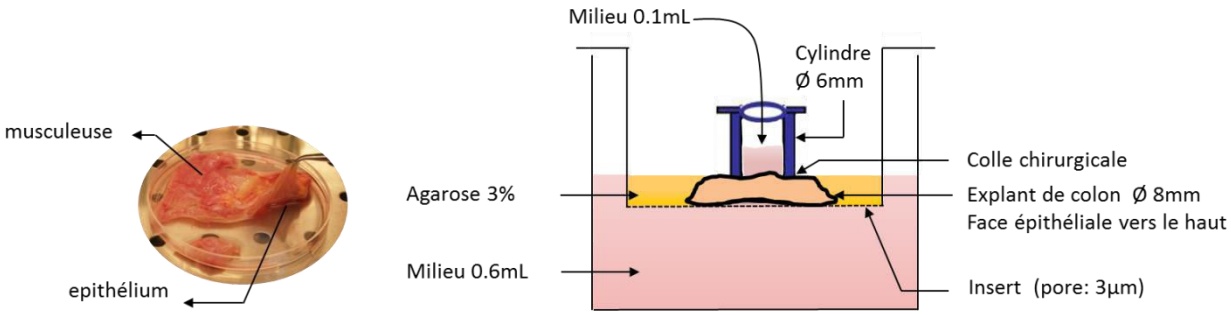


Figure 13 : Principe de la culture polarisé d'explants colorectaux humains
A gauche, une photo de la muqueuse colorectale permettant de visualiser la couche musculeuse et la membrane épithéliale.
A droite, le système de culture développé.

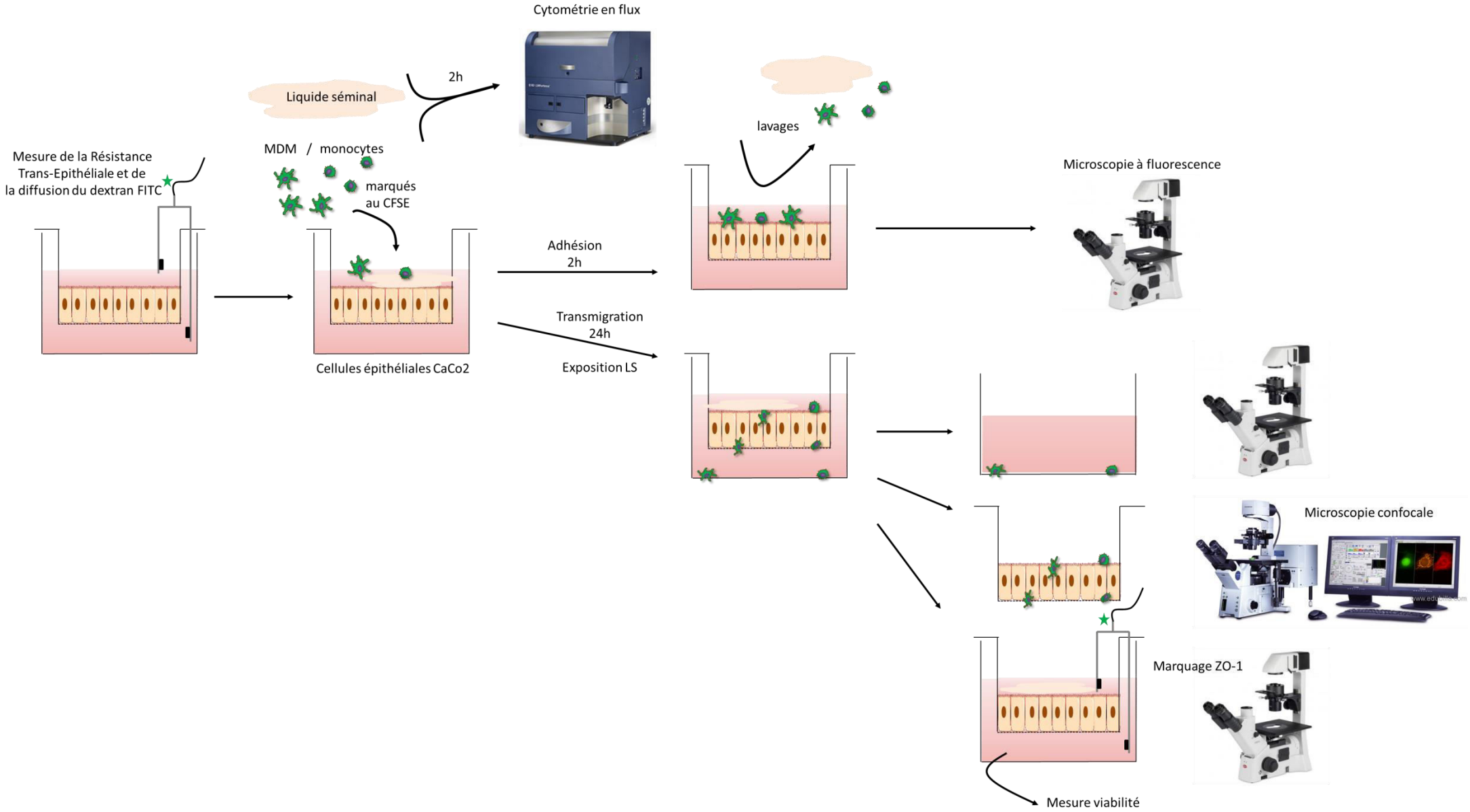


Figure 14 : Démarche expérimentale des expériences d'adhésion et de transmigration sur le modèle cellulaire

Figure 14 : Démarche expérimentale résumant les différentes étapes des expériences d'adhésion et de transmigration sur le modèle cellulaire
La polarisation des CaCo2 ou HEC-1A est vérifiée par mesure de la Résistance Trans-Epithéliale (RTE) et du passage de dextran FITC.
Les monocytes ou MDM, exposés ou non au VIH-1, et préalablement marqués au CFSE sont déposés sur la barrière épithéliale en présence ou non de LS (LS d'hommes séropositifs ou séronégatifs). Le LS peut également être déposé seul sur la barrière.
Pour les expériences d'adhésion, les cellules sont laissées pendant 2h au contact des CaCo2 puis retirées. La barrière est lavée et analysée au microscope à fluorescence afin de compter les cellules CFSE+ adhérentes.
Pour les expériences de transmigration, les cellules sont laissées pendant 24h au contact des CaCo2. Les cellules transmigrantes retrouvées dans le surnageant basal sont comptées par observation microscopique en fluorescence. Les cellules transmigrantes enchâssées dans la monocouche épithéliale sont recherchées par microscopie confocale.
Dans le cas d'une simple exposition au LS, l'intégrité de la barrière épithéliale est évaluée par observation microscopique du marquage de la protéine de jonction ZO-1, mesure de la RTE et du passage du dextran FITC, et mesure de la viabilité par mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant.
Afin d'analyser l'effet du LS sur le phénotype et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des monocytes ou MDM, ces derniers sont incubés 2h en présence de LS, puis l'expression de différents marqueurs de surface est analysée par cytométrie de flux.

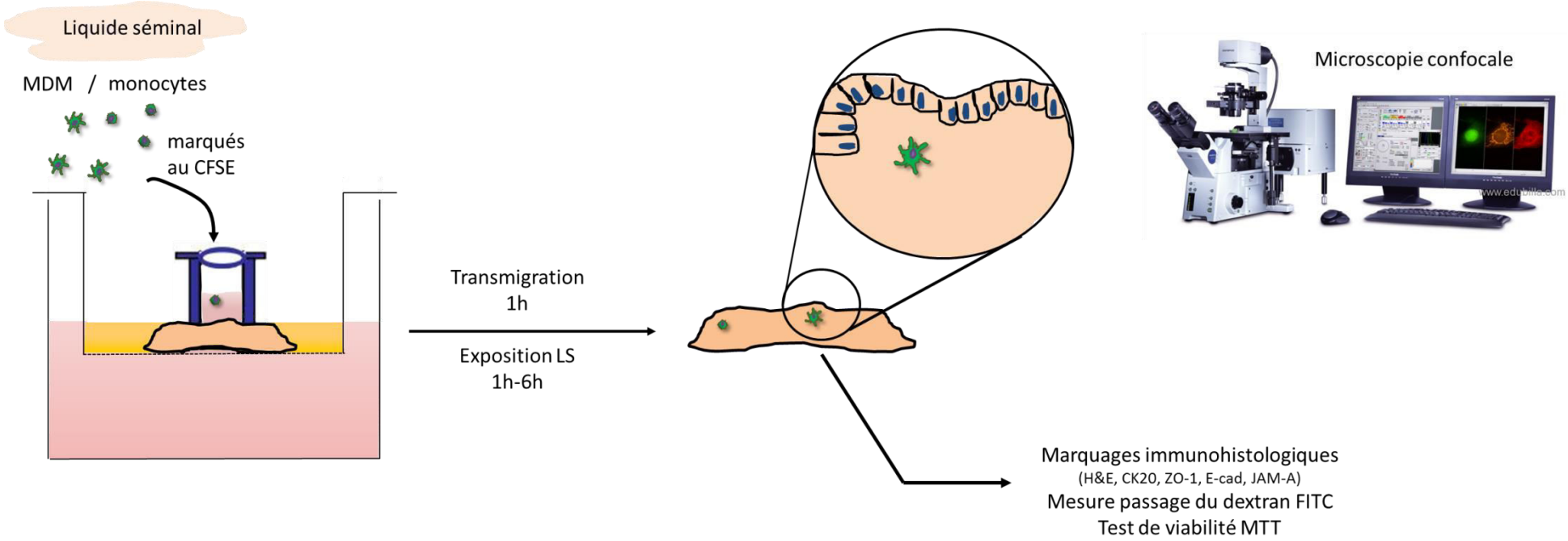


Figure 15 : Démarche expérimentale des expériences de transmigration sur le modèle tissulaire

Suite à la mise en culture des explants de muqueuse colorectale (Cf. partie 2, Modèle de culture polarisé d'explant de colon), les monocytes ou MDM ou cellules séminales, préalablement marqués au CFSE, sont déposés sur la surface apicale de la barrière épithéliale en présence ou non de LS. Le LS peut également être déposé seul sur la barrière.

Pour les expériences de transmigration, les cellules sont laissées pendant 1h au contact de la muqueuse colorectale. Les cellules transmigrantes sont recherchées dans le tissu (sous la barrière épithéliale intacte) par microscopie confocale.

Dans le cas d'une simple exposition au LS, l'exposition varie de 1h à 6h. L'intégrité de la barrière épithéliale est ensuite évaluée par marquages immunohistologiques pour différentes molécules (CK20, ZO-1, E-cad, JAM-A) et par observation microscopique, mesure de passage du dextran FITC, et mesure de la viabilité par test MTT sur le tissu.

RESULTATS

I. CHAPITRE I : Le liquide séminal humain diminue l'adhésion et la transmigration des macrophages à travers l'épithélium colorectal et endométrial

A. Synthèse de l'article et des résultats supplémentaires

Objectifs et méthodologie

Dans cette étude, nous avons évalué, pour la première fois à notre connaissance, l'effet du liquide séminal (LS) d'hommes séronégatifs ou infectés par le VIH sur le passage par transmigration de monocytes et de macrophages à travers la barrière épithéliale colorectale. Nous avons également évalué l'effet du LS sur la transmigration de macrophages à travers une barrière épithéliale endométriale. Ces derniers résultats sont présentés en annexe à l'article (résultats supplémentaires), puisque nous avons fait le choix de focaliser notre article sur la transmission colorectale du VIH-1. Il m'a tout de même semblé important de présenter ces travaux car ils permettent, d'une part, une comparaison directe de l'effet du LS sur deux types de barrières épithéliales monostratifiées exposées au VIH-1 et au LS, et d'autre part, cette étude nous permet de comparer nos résultats avec la littérature. En effet, à notre connaissance, le seul papier étudiant l'effet du LS sur le passage de leucocytes sanguins par transmigration à travers une muqueuse a utilisé un modèle de barrière endométriale. La transmigration des monocytes et des macrophages dérivés de monocytes (MDM) non infectés ou exposés au VIH-1 a été évaluée dans deux modèles complémentaires : un premier modèle *ex vivo* d'explants de tissu colorectal humain permettant de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo*, et un second modèle *in vitro* de cellules épithéliales de colon polarisées CaCo2 et de cellules épithéliales endométriales HEC-1A, permettant quant à lui d'initier la compréhension des mécanismes en jeu.

Pour les deux modèles, la face épithéliale apicale a été exposée à des monocytes et /ou MDM (marqués CFSE), en présence ou en absence de 10 à 50% de LS d'hommes séronégatifs (pool de 30 donneurs ou LS individuels) ou d'hommes infectés VIH (LS individuels). L'intégrité de la barrière épithéliale, avant et après exposition, a été évaluée par mesure de la perméabilité (passage de dextran et mesure de la résistance trans-épithéliale), analyse histologique et marquage de molécules de jonction/adhésion. L'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers les épithéliums ont été évaluées en microscopie à fluorescence. Afin d'évaluer l'effet du LS sur les monocytes et MDM, les

cellules ont été exposées à 10% de LS pendant 2h et l'expression de différentes sous-unités d'intégrines que l'on suspecte impliquées dans les phénomènes d'adhésion et de transmigration a été mesurée par cytométrie de flux.

Résultats et discussion

Nos résultats montrent pour la première fois le passage rapide (dès 1h) de MDM à travers une barrière épithéliale colorectale intacte *ex vivo*. Nous reproduisons ce passage dans notre modèle *in vitro* de barrière épithéliale CaCo2 avec des monocytes et des MDM et en présence de LS. Il en est de même dans le modèle HEC-1A où la transmigration de MDM avait déjà été mise en évidence auparavant (Carreno et al., 2002).

Le LS présente *in vitro*, dans des conditions non cytotoxiques, un effet inhibiteur sur la transmigration de ces cellules à travers une monocouche de cellules épithéliales polarisées de colon ou d'endomètre, sans lien avec une modification quelconque de la barrière épithéliale. En effet, l'exposition de la muqueuse colorectale (modèle de CaCo2 et modèle d'explants colorectaux) au LS d'hommes sains n'impacte ni la viabilité, ni la perméabilité, ni l'expression des molécules d'adhésion (JAM-A, E-Cadhérine) et des jonctions (ZO-1). Ces observations sont en accord avec deux études qui ne relèvent aucun impact d'une exposition au LS sur modèles tissulaire (Kordy et al., 2018) ou cellulaire (Mullin et al., 2017) de la barrière colorectale. De la même manière, nous n'observons aucune modification de la perméabilité de la monocouche HEC-1A après exposition au LS.

Afin d'expliquer ce phénomène, nous nous sommes intéressés à la première étape de la transmigration : l'adhésion des leucocytes à la barrière épithéliale. Nous avons là encore mis en évidence un effet répresseur du LS sur l'adhésion des monocytes et des MDM qu'ils soient infectés par le VIH-1 ou non, à nos deux types de barrières épithéliales *in vitro*. Cet effet est également observé après exposition à du LS d'hommes VIH+. Nous avons cependant remarqué que la diminution d'adhésion des MDM au niveau de la barrière HEC-1A est moins importante que celle observée sur la barrière colorectale. Nos résultats suggèrent que la diminution de transmigration des monocytes et des MDM en présence de LS découle d'une diminution de l'adhésion des cellules à l'épithélium. De façon intéressante, nos résultats diffèrent en partie de ceux de l'étude de Lawrence *et al*. Comme nous, ils notent une diminution de la transmigration de monocytes et de lymphocytes à travers la monocouche de cellules épithéliales endométriales HEC-1 en présence de LS, mais à l'inverse ils associent cette diminution à une hausse de l'adhésion des leucocytes à la barrière épithéliale et une augmentation de la résistance trans épithéliale (RTE) (Lawrence et al., 2012).

Nous avons écarté l'hypothèse d'un effet « viscosité » du LS sur les phénomènes observés, et montré qu'une pré-incubation des monocytes et des macrophages avec du LS avant leur mise en contact avec les cellules épithéliales engendrait une baisse de leur adhésion à la barrière colorectale. Ces résultats sont en faveur d'un effet direct du LS sur les monocytes et MDM.

Une analyse par cytométrie de flux nous a permis de mette évidence une diminution de l'expression de la molécule d'adhésion LFA-1, composée des deux sous unités CD18 et CD11a, à la surface des MDM après leur exposition au LS. Cette diminution pourrait expliquer la baisse de l'adhésion et par conséquent de la transmigration des macrophages à travers la barrière épithéliale, puisque cette molécule a déjà été démontrée comme impliquée dans ces phénomènes ((Carreno et al., 2002) pour revue (Anderson et al., 2010a)).

En revanche, le LS n'impacte l'expression à la surface des monocytes d'aucunes des sous-unités de molécules d'adhésion investiguées. Ces résultats nous incitent à penser que l'effet du LS sur les monocytes et les macrophages pourrait avoir une origine différente ou bien qu'il s'agit d'un mécanisme commun mais non identifié.

Ces travaux ouvrent la discussion sur le peu d'études s'intéressant au passage de monocytes/macrophages à travers les barrières épithéliales monostratifiées, bien qu'ils représentent la population de leucocytes cibles du VIH la plus abondante du sperme, loin devant les lymphocytes CD4 qui sont déplètés lors de l'infection (Politch et al., 2009). Cette étude appuie la vulnérabilité de la muqueuse colorectale face à la transmission du VIH-1 par les cellules infectées du sperme puisqu'elle démontre la possibilité d'un passage rapide (dès 1h) des macrophages par transmigration à travers une muqueuse intacte. L'implication des molécules d'adhésion, notamment la molécule LFA-1 dont l'expression est diminuée sur les MDM après exposition au LS, ainsi que l'élucidation des composés du LS responsables de cet effet inhibiteur de l'adhésion/transmigration, feront l'objet de recherches plus approfondies.

Conclusion

Il s'agit là de la première démonstration de transmigration active et rapide de monocytes/macrophages à travers la barrière colorectale en présence de LS. Nos résultats démontrent que ce dernier n'a pas d'effet sur l'intégrité de la barrière colorectale, mais qu'il diminue l'adhésion et la transmigration des monocytes/macrophages, possiblement en altérant l'expression de la molécule d'adhésion LFA-1 ou d'autres molécules composées de la sous unité CD18. Cela n'est pas spécifique à la muqueuse colorectale puisque nous obtenons des résultats similaires dans un modèle épithélial endométrial.

B. Human seminal plasma decreases macrophage transmigration and adhesion to the colonic epithelium (Article 1)

Human seminal plasma decreases macrophage transmigration and adhesion to the colonic epithelium

Julie Frouard [1], Anne-Pascale Satie [1], Roxane Valentin [1], Giulia Matusali [1], Laurent Sulpice [2], Célia Ravel [1 3], Louis Bujan [4], Nathalie Rioux-Leclercq [1,5], Anna Le Tortorec [1], Nathalie Dejucq-Rainsford [1]

[1] Université de Rennes, Inserm, École des hautes études en santé publique (EHESP), Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) — UMR_S1085, Rennes, France. [2] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Service de chirurgie hépatobiliaire et digestive, Rennes, France. [3] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Laboratoire de biologie de la reproduction-CECOS, Rennes, France. [4] Research Group on Human Fertility EA 3694, Université Paul Sabatier Toulouse III – CECOS, Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse, Toulouse, France. [5] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, Rennes, France.

Introduction

Each year, an average of 1.8 million people become infected with HIV worldwide (ONUSIDA, 2018). Most of these new infections result from ano-genital exposure to infected semen. Yet, the mechanisms of HIV transmission through contaminated semen remain ill defined, in particular in the colo-rectal mucosa which carries the highest risk of infection of all sexual routes (Patel et al., 2014). Semen contains free HIV particles as well as infected CD4+ T lymphocytes and macrophages, the latter largely outnumbering the lymphocyte population (Politch et al., 2009; Quayle et al., 1997; Wolff and Anderson, 1988). A number of recent studies have highlighted the efficiency of HIV cell-associated transmission through the ano-genital mucosa *in vitro* and in animal models (Anderson et al., 2010; Kolodkin-Gal et al., 2013). However, these studies have essentially focused on infected T lymphocytes as donor cells and have largely ignored the effect of seminal plasma (SP), the a-cellular fraction of semen, on CA transmission. SP is a very complex fluid encompassing over 2000 proteins, lipid and carbohydrate. SP was discovered to influence cell free HIV infection in vitro and *ex vivo* (for review (Doncel et al., 2010, 2014; Ferreira et al., 2014; Sabatté et al., 2011)) and is therefore believed to play an active part in HIV transmission. While most studies used seminal plasma from uninfected men, we and others demonstrated that the composition of SP from HIV-infected individuals differs in terms of cytokine content and microbiome (Keogan et al., 2015), which impact the modulatory properties of SP on HIV cell free infection (Camus et al., 2016).

In this study, we aimed to investigate whether monocytes and macrophages can mediate HIV CA transmission through the colo-rectal mucosa and whether SP from uninfected and HIV-infected men can modulate such transmission, using *ex vivo* and *in vitro* models. We showed that macrophages rapidly transmigrated across the intact epithelium of human colonic tissue *ex vivo*.

Using an *in vitro* CaCo2 colonic epithelium, we demonstrated that SP from either HIV-infected and uninfected donors decreased the transmigration of monocytes and macrophages without modifying the epithelial barrier permeability. SP from HIV-infected or uninfected men decreased monocytes/macrophages adhesion to the colonic epithelial barrier, and induced downregulation of the cell adhesion molecules CD18 and CD11a expression on the cell surface of macrophages, which may participate to its effect.

Material and Methods

HIV-1 viral stock and human seminal plasma samples

R5 HIV-1_{BA-L} strain (ARP118) was obtained from the NIBSC Centralized Facility for AIDS Reagent and expanded in IL2/phytohemagglutinin activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The viral culture supernatants were ultracentrifuged for 2 h at 100 000g on a 20% sucrose pillow. Resulting virus stocks were titrated on TZM-bl with the 50% infectivity end-point method (TCID50) of Reed and Muench. Human semen was obtained from HIV-negative patients via the center for the cryopreservation of 'eggs and semen' (CECOS) of Rennes and for HIV positive patients from CECOS of Rennes and Toulouse, in respect to consent of the patients and authorized by Ethics Committee Ouest V, Rennes, France (authorization DC-2016-2783). Ejaculates were liquefied for 30 min at 37°C and seminal plasma (SP) was recovered following centrifugation at 1000g for 10 min at room temperature. SP was pooled or not and stored at -80°C.

Primary monocytes and macrophages preparation and infection

Monocytes were purified from ficoll-density centrifuged PBMC by CD14 negative selection (MACS Miltenyi Biotec, Auburn, CA), according to manufacturer's instructions. Monocytes were either directly used or differentiated into monocytes-derived-macrophages (MDM) by M-CSF (50 ng/ml, Miltenyi Biotec) treatment for 6 days in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (complete RPMI). MDM were incubated with HIV-1_{Ba-L} viral stock at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 for 4h at 37°C and cultured for 3 days before adhesion and transmigration experiments.

Human colonic tissue ex vivo culture

Colon specimens provided by the anatomo-cytopathology department of Rennes university Hospital were obtained from patients undergoing colon resection for cancer or diverticulitis. Only normal parts of resected tissues were used and processed within one hour after excision. This collection was approved by Ethics Committee Ouest V, Rennes, France (authorization DC-2016-2783).

After intensive washes, small fragments of 8 mm diameter including the epithelium and the submucosa were cut using a biopsy punch (Kai, Laboderm), and the tissue fragments were placed on a semi permeable transwell (3µm pore size, polycarbonate membrane, Falcon) with the submucosa facing the insert. A polystyrene cylinder (I.DxH 4.7mm x 8 mm, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was sealed with veterinary glue (3M Vetbond, St. Paul, MN) onto the apical surface of the mucosa to avoid leakage and tissue was surrounded with agarose 3% to avoid spreading. Specimen were placed into a 12-well plate, containing 0.6mL of complete medium (RPMI supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% NEAA, 1% Na-pyruvate, 1% HEPES buffer 1M).

Immunohistostaining

Sections of 4% paraformaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue (5µm thickness) were deparaffinized and rehydrated before staining. Antigen retrieval was achieved through either 40 min incubation in Tris-based buffer solution pH8 at 95°C for ZO-1, 40 min incubation in 1mM pH9 EDTA solution at 80°C for JAM-A or 95 min incubation in 1mM pH8 EDTA solution at 95°C for CK20 and E-Cadherin. Slides were incubated in a humid chamber with ZO-1 primary antibody (Thermo Fisher Scientific, clone ZO1-1A12, 10 µg/ml), JAM-A primary antibody (5.83µg/mL, Abcam), Cytokeratin 20 (Ck20) primary antibody (Dako Agilent, clone Ks20,8, 3.4µg/mL), E Cadherin primary antiblody (Invitrogen, clone 4A2C7, 1.5µg/mL) or appropriate isotype controls. Sections were washed and for fluorescent staining incubated with either anti-Mouse HRP and DISCOVERY Rhodamine Kit (542-568nm) for ZO-1 or anti rabbit Alexa Fluor 488 fluorescent secondary antibody (10µg/mL Life Technology) for JAM-A, before counterstaining with ProLong™ Gold Antifade Mountant medium with Dapi (Invitrogen). Slides were analysed under a fluorescent microscope (Zeiss Imager M1). For immunochemistry staining, detection was achieved using UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche), and slides counterstained with hematoxylin and mounted in Eukitt (O. Kindler) before observation using a bright-field microscopy (Olympus AX60).

Transmigration/Adhesion experiments

CaCo2 model:

Human colonic CaCo2 cells (American Type Culture Collection) were seeded in 12-mm diameter transwells (3µm pore size, polycarbonate membrane, Falcon) at a density of 10^5 cells/well and cultured for 10 days until the formation of a fully-differentiated monolayer, as assessed by ZO-1 tight junction's immunostaining. Polarized cells were used when trans-epithelial electrical resistance (TEER) reached 300-350 ohms.cm^2, as measured using a Millicel resistance system (ERS; Millipore, Bedford, Mass). The impermeability of the barrier and the sealing of the system was verified by absence of passage of 4kDa Dextran FITC beads. 8.10^5 CFSE (Life Technologies)-stained monocytes or MDM infected or not with HIV-1 were incubated in 500µl complete RPMI with or without 10% or 50%

SP in the apical chamber of the transwell system for 2h (adhesion assay) or 24h (transmigration assay) in humidified atmosphere 5% CO_2 at 37°C. Adherent cells were numbered directly on the insert surface with an epifluorescent microscope (ZEISS®), and adherent infected cells identified by p24 immunostaining on 4% paraformaldehyde (PFA) fixed inserts. Cells that transmigrated were recovered in the basal chamber of the transwell system and counted under a fluorescent microscope (Nikon).

Ex vivo model:

1.10^6 CFSE-stained MDM in 100µl complete medium with or without 10 or 50% SP were added on the apical side of the mucosa for transmigration assay. After 2 washes with PBS, tissues were fixed in 4% PFA overnight and embedded in paraffin. Transmigrating cells were examined on micro-sections using an SPE confocal microscope (HCX Plan Apochromat, NA 1.4; Leica).

Flow cytometry analysis

Monocytes and MDM exposed or not to 10% or 50% SP for 2 or 24h were stained with 7AAD (ThermoFisher Scientific) for viability and with antibodies against adhesion molecules for 30 min at 4°C, washed in PBS-1% FCS and fixed in 1% PFA (antibodies concentrations in table S1). Acquisition and analysis were performed using a LSR II cytometer (BD Bioscience) and FACSDiva Software (BD Biosciences).

Statistical analysis

All data were analyzed using the non-parametric Kruskall-Wallis test. Values were considered significant when P was less than 0.05. Statistical analyses were performed using commercially available software (GraphPad Prism 6, GraphPad Software).

Results

Monocytes and MDM actively transmigrates across the intact colonic epithelium ex vivo and in vitro

To evaluate the potential of HIV-target cells to penetrate the colonic epithelial layer, we first develpped a polarized human colonic mucosa culture model. The maintenance of the colonic epithelium integrity for over 6h of culture was demonstrated through immunostaining for tight junction protein ZO-1, adhesion molecules E-Cadherin and JAM-A, and epithelial marker CK20 (Fig1a). CFSE-stained monocyte-derived macrophages (MDM) added to the apical side of the colonic mucosa were observed within 1h post-exposure in the sub-epithelial layer by fluorescent microcopy, whereas 4kDa FITC-labelled dextran beads did not cross the barrier (Fig1b). We next used a polarized monolayer of CaCo2 colonic epithelial cells as a surrogate model mimicking colonic epithelium in order to quantify cell transmigration and determine the potential impact of SP. Prior to transmigration experiments, the expression of ZO-1 tight junction proteins and the absence of 4kDa FITC-labelled dextran beads leakage were monitored to assess the polarization and impermeability of the CaCo2 monolayer (Fig S1a-b). Monocytes and MDM applied apically for 24h actively transmigrated across the tight CaCo2 monolayer, in contrast to fixed cells and fluorescent beads (Fig1c). Although it did not reach statistical significance, a trend for more efficient transmigration of MDM over monocytes was noticed. MDM exposed to HIV-1 R5 BAL for 3 days transmigrated with similar efficiency as non-exposed MDM, and HIV-1 infected macrophages readily crossed the CaCo2 monolayer, as determined by p24 immunostaining of transmigrating cells inserted in CaCo2 monolayer (fig 1c-d).

Monocytes and MDM transmigration across the colonic epithelium is decreased by SP

The effect of SP on the epithelial barrier permeability was next investigated in the *ex vivo* and *in vitro* models. Exposure of the apical side of the colonic mucosal tissue to 50% SP (pool from 30 donors) for 1 or 6h did not affect the tissue viability, nor altered the barrier, as showed by adhesion molecules immunostaining and FITC Dextran beads assay (Fig2a-c). Similarly, exposure to 50% SP (obtained either by pooling SP from 30 donors, or from 3 individual donors) had no effect on the impermeability, trans-epithelial resistance or viability of the CaCo2 cells monolayer, nor on the polarization of the epithelial cells, as assessed by ZO-1 expression (Fig S1). Note that HIV+ SP exposure of both *in vitro* and *ex vivo* models does not differ from NI SP exposure in terms of ZO-1 and E-Cadherin, JAM-A and CK20 staining (Fig.S1). In the CaCo2 model, 10% SP exposure for 24 h drastically decreased monocytes and MDM transmigration by a median of 66% and 82.4% ($p \leq 0.01$)

respectively. 50% SP exposure further decreased transmigrated monocytes and MDM number by a median of 84% ($p \leq 0.01$) and 94.6% ($p \leq 0.001$), respectively (fig2d). The transmigration efficiency of HIV-1-exposed MDM was also affected by SP (median of 44% decrease in presence of 10% SP) (fig2e). Because SP can be cytotoxic (Okamoto et al., 2002), we investigated whether the decreased transmigration efficiency of MDM and monocytes in presence of SP could be due to loss of viability. Monocytes viability was not affected by 24h exposure to 10% SP, as determined by 7AAD cytometry staining, whereas a low but significant decrease of the number of viable monocytes was measured with 50% SP (median of 22 % decrease of viable cells, $p \leq 0.05$). In contrast, MDM exposure to 10% or 50% SP for 24h did not affect their viability (fig2f).

Altogether, these results suggest that SP has an inhibitory effect on the transmigration of both monocytes and MDM across the colonic epithelium that is not mediated by a modification of the epithelial barrier resistance or decreased cell viability, at least for 10% SP.

SP decreases monocytes and MDM adhesion to the colonic epithelium

To determine the mechanisms of SP inhibition on monocytes and MDM transmigration across the CaCo2 cell monolayer, we investigated whether SP modulated the adhesion of these cells to the epithelial layer. 50% SP drastically decreased the adhesion to CaCo2 cells of monocytes by a median of 88% ($p \leq 0.01$) and of MDM by a median of 93% ($p \leq 0.001$). While 10% SP also decreased the adhesion of monocytes and MDM, the effect was milder and did not reach significance (median of 80 %, and 75%, respectively) (Fig3a). In the 3 independent experiments performed, 10% SP exposure also consistently decreased the adhesion of HIV-1 infected cells by a median of 86 %, albeit this was not significant ($p= 0.1$) (Fig 3b,c).

We then assessed whether the viscosity of SP could play a role in the diminished adhesion. The viscosity of 10 and 50% SP was measured (d=1.19mPa/s and 1.89mPa/s respectively) and mimicked by incubating MDM applied to the apical layer of CaCo2 cells with 10% methylcellulose (d= 1.17mPa/s) and 50% methylcellulose (d=1.91 mPa/s). Unlike exposure with 10% or 50% SP, the adhesion of MDM to CaCo2 was not affected (Fig S2). We confirmed that the decreased adhesion observed using a pool of SP was also observed using SP from uninfected individual donors (n=3) and SP from one HIV-1 infected individual (Fig S2d). We next aimed to determine whether SP acted directly on MDM and monocytes. For this, MDM and monocytes were pre-incubated with 10% SP for 2h, and SP was extensively washed off before the adhesion assay. A decrease of monocytes and MDM adhesion was also observed when the leukocytes were exposed to SP before incubation with CaCo2 cells, although it did not reach significance, and was less pronounced than when SP was added

all along the contact duration of leukocytes and epithelial cells (fig3d). Altogether, these results point at an effect of SP on monocytes and MDM.

To further address the mechanisms responsible for the SP-induced inhibition of monocyte and MDM adhesion to the CaCo2 monolayer, we investigated the impact of SP exposure on cell surface expression of a panel of well-known integrins implicated in cell adhesion, i.e. LFA-1 (CD18/CD11a), Mac-1 (CD18/CD11b), p150,95 (CD18/CD11c) and CD103. Interestingly, a higher proportion of MDM expressed LFA-1 compared to monocytes (median of 90% and 30% of cells positive for LFA-1 respectively, n=3, data not shown). 10% SP exposure of MDM for 2h significantly decreased the expression levels of CD11a and CD18, as evidenced by lower MFI (fig3e). In contrast, monocytes exposure to SP did not modify the MFI for any of these proteins (fig3f). For each surface protein tested, the % of positive cells was unchanged following SP exposure (data not shown). Overall our results indicate that SP exposure differently modulated the expression of adhesion molecules depending on the cell type.

Discussion

Here we demonstrate for the first time that blood-derived macrophages can rapidly (as soon as 1h) transmigrate across the intact epithelium of human colon *ex vivo*. Whereas T lymphocytes or PBMC transmigration across different mucosal epithelium has been well documented (Chancey et al., 2006; Van Herrewege et al., 2007; Kolodkin-Gal et al., 2013; Lawrence et al., 2012; Tugizov et al., 2011), before ours only two studies investigated the ability of macrophages to transmigrate (Carreno et al., 2002; Tugizov et al., 2011). Timing of transmigration was relatively different between models. In their in vitro model of HEC-1, Carreno *et al.*, observed transmigration as soon as 90 minutes and a plateau in transmigration was observed after 3 h of incubation of MDM with the epithelial monolayer (Carreno et al., 2002). Tugizov *et al.* observed MDM and lymphocytes transmigration 4h post-exposure in *ex vivo* models of monostratified fetal intestinal epithelium and incompletely stratified fetal oral epithelium (2 to 7 epithelial layers), whereas no transmigration was observed across a fully stratified adult oral epithelium model (10 to 30 epithelial layers) (Tugizov et al., 2011). This suggests that thick epithelia may impair transmigration or require longer exposure for crossing to occur. In line with this, Maher *et al.* observed seminal round cells penetration beneath the most external layer of ectocervical epithelial cells only 24h post-contact, although earlier time points were not assessed (Maher et al., 2005). Finally, Zhou *et al.*, which evaluate and compare infection of foreskin explant with cell free virus and cell-associated virus never detect donors PBMC within the multiple layer of keratin epithelium after their inoculation at the apical surface during 4h (Zhou et al., 2011).

In *ex vivo* models, Kolodkin *et al.*, demonstrated lymphocyte transmigration across intact colonic mucosa as soon as 1h. They described an increasing number of transmigrating cells over time, but these results were hampered by the fact that the epithelial barrier was already largely damaged by the time that cells were removed from the apical compartment and detected in the basal compartment.

Altogether, these observations and the rapidity of monolayer transmigration in our study highlight how transmigration may be a specifically important mechanism of transmission across columnar epithelia such as those encountered in the colorectal, endo-cervical and urethral mucosa. In addition, the single layer columnar epithelium of the colon being underlined by a lamina propria rich in virus-permissive immune cells (activated CD4+ T cells, macrophages, dendritic cells) (Shattock and Moore, 2003) this site may be particularly susceptible to CA transmission through contact between the donor's HIV-infected transmigrated cells and the recipient's mucosal cells. Indeed, using polarized monolayers of transformed epithelial cells, a number of studies have conclusively shown that infected cells are much more effective than cell-free virions at infecting subepithelial target cells (Anderson, 2014). Moreover, CA was found to be more efficient than cell free transmission following intra-rectal inoculation in macaques (Kolodkin-Gal et al., 2013). In another in vivo study, infected donors cells (spleen cells) were detected in the proximal and distal lymphoid tissues of macaques as soon as 21h and 45h post intra vaginally challenge, (Salle et al., 2010). Thus on top of its potential rapidity and efficiency at initiating a localized infection in the host mucosa, CA transmission could pose the additional problem of rapid dissemination throughout the body of virus sheltered within infected cells- possibly latently infected-and which may thus escape from the local immune responses or prophylaxis.

A limitation of our *ex vivo* colonic model is the relatively rapid loss of epithelium integrity in culture, similarly reported by other authors (Cavarelli et al., 2013; Kolodkin-Gal et al., 2013). The relatively low number of transmigrated cells during the short time frame of colonic epithelium integrity prevented the quantification of transmigrated cells and in turn the measurement of SP effect on such transmigration. Of note however is that we observed transmigrated MDM in the colon's sub-epithelial mucosa even in the presence of 50% SP (data not shown).

We did not observe any impact of SP (from both NI and HIV+ men) on the integrity of the epithelial cell barrier, neither *ex vivo* (maintenance of tissue viability and expression of junctional adhesion molecules) nor *in vitro* using polarized CaCo2 cell line (maintenance of the epithelial cell barrier trans-epithelial resistance, permeability and expression of junctional adhesion molecules). This is in agreement with the data from Mullin *et al.,* who showed in an *in vitro* model of CaCo2 that apical exposure to 10 % SP did not modify TEER, permeability or Claudin staining, and with that from Kordy *et al*., who found no alteration of cell viability and morphology of non-polarized colon explants

exposed to 10 and 100 % SP (Kordy et al., 2018; Mullin et al., 2017). Similarly to colon explants, the impermeable CaCo2 layer supported MDM transmigration. In this system, a relatively low but consistent number of MDM and monocytes transmigrated over a 24h period. This low rate of transmigration is consistent with that reported by other authors for T lymphocytes, monocytes and MDM (overall less than 2% of the apically applied cells) (Carreno et al., 2002; Van Herrewege et al., 2007; Lawrence et al., 2012; Mori et al., 2003; Parkos et al., 1991), with however some variations depending on the epithelial cell type used, and was similarly observed in our laboratory following polarized HEC-1A endometrial epithelial cells exposure to MDM (unpublished data). However, *in vivo* studies indicate that a very small number of infected cells is sufficient to induce CA transmission: thus only 300 infected CD4+ T lymphocytes diluted in SP and applied to the cervix of chimpanzees initiated de novo infection (Milman and Sharma, 1994), while an inoculum of 10^7 cells containing ~10 000-100 000 infected spleen cells, a number compatible with data on infected cell number in human semen, could lead to intra-vaginal transmission (Salle et al., 2010).Therefore, despite its low efficiency *in vitro* and *ex vivo*, the high potential infectivity of the transmigration process cannot be ignored.

Interestingly, we found that 10 to 50% SP decreased the transmigration of monocytes and MDM across a polarized epithelial monolayer of CaCo2 cells over a 24h period, as well as their adherence after 2h of contact. Lawrence et *al.* similarly reported a SP-induced decreased transmigration of peripheral blood lymphocytes and monocytes across an epithelial endometrial monolayer (HEC-1) after 24 hours exposure in presence of 7 % SP (Lawrence et al., 2012). However, in contrast to our observation, this effect was associated with an enhanced trans-epithelial resistance of HEC-1 monolayer measured immediately after SP exposure. This effect was shown to be stable as cells treated by seminal plasma displayed a significantly elevated TEER after 18 h of treatment. They also showed an increased adherence of leukocytes to the monolayer 16h after contact between leukocytes and epithelial monolayer in presence of 7% SP. In line with this Increased trans-epithelial resistance of polarized endocervix epithelial cells monolayer exposed from 1 to 5 minutes to very low doses of SP (0.2% to 2%) was similarly reported by Gorodeski et al., (Gorodeski and Goldfarb, 1998) . Thus the effect of SP on TEER and adhesion may vary depending on a number of parameters such as the origin of the epithelium, the duration of SP exposure or the processing of SP. Indeed SP is a dynamic fluid which properties can vary over time post-ejaculation. Here SP was processed immediately post-ejaculation and we conclusively demonstrated that the effect observed for a pool of SP from different donors was also observed for individual donors, thus strengthening our results and indicating consistent semen treatment.

The analysis of cell adhesion molecules expression on the surface of MDM revealed a down-regulating effect of SP on CD18 and CD11a as early as 2h post-exposure. The rapidity of the effect of

SP suggests an internalization mechanism or a defect of membrane addressing of these molecules. Such decreased surface expression could also be result from the binding of semen component(s) on certain cell surface proteins, thus masking antibody recognition. Further experiments are needed to decipher the mechanisms involved in this down regulation. The decreased expression level of CD18 and CD11a integrins on MDM surface might participate to the inhibitory effect of SP on the adhesion of these cells to the epithelial CaCo2. These 2 integrins compose the adhesion molecule LFA-1, known to interact with ICAM members or JAM-A receptors expressed on epithelial cells, including CaCo2 cells (data not shown) (Anderson et al., 2010; Barreto-de-Souza et al., 2014). CD18 is also part of the Mac-1 (CD18/CD11b), p150,95 (CD18/CD11c) and CD18/CD11d adhesion molecule complexes. Further investigations with neutralizing antibodies will be required to validate the implication of these adhesion molecules in the decreased adhesion/transmigration of macrophages to epithelial barrier. In favor of the hypothesis of a role of LFA-1, a higher proportion of MDM expressed LFA-1 as compared with monocytes, which might be correlated to higher adhesion efficiency of MDM by comparison to monocytes.

SP exposure did not affect the expression of any of the integrins tested on monocytes, suggesting either the implication of other adhesion molecules or others mechanisms such as the SP-induced blocking of adhesion molecule recognition by its epithelial ligand without altering antibody recognition, or the SP-induced activation of anti-adhesive molecules naturally expressed on the apical side of epithelial cells (Brazil et al., 2010; Lawrence et al., 2003; Reglero-Real et al., 2016). In fact, some semen components themselves can act as anti-adhesive agents. For instance, oxid nitric is known to have anti-adhesive properties in the context of trans-endothelial migration of leukocytes (for review (Kanwar and Kubes, 1995). While our results highlight a specific effect of SP on monocyte/MDM capacity to adhere, SP might also modify adhesion molecule expression on the epithelial cell barrier, although our preliminary data suggest unchanged expression on SP-exposed Caco2 cells.

One important question remains the identification of the seminal component(s) responsible for the inhibition of monocytes/MDM adhesion and transmigration. Seminal prostaglandins were found to indirectly decrease dendritic cells (DC) adhesion to spermatozoa within 2h via an alteration of the maturation of DC (Rennemeier et al., 2011). A direct SP inhibitory effect on HIV-1 / DC binding through DC-SIGN has been reported (Sabatté et al., 2007) and later demonstrated in two independent studies to be attributable to either seminal clusterin (Sabatte et al., 2011) or mucin 6 (Stax et al., 2009), which both bind DC-SIGN through glycan structure .

As in these studies where seminal component can interact directly with DC-SIGN, it is likely that SP protein or component bind adhesion molecules. We attempted to split SP components according to their molecular weight (10kDa cut-off). Each of the two fractions, one containing

seminal compounds > 10kDa and one containing seminal compounds < 10kDa, retained their inhibiting effect on adhesion of monocytes/macrophages to CaCo2 epithelial barrier (data not shown), suggesting that this effect might originate from multiple molecules.

In conclusion, we showed using an ex vivo model of human colonic mucosa that the most numerous population of HIV target cells in semen, i.e. monocytes/macrophages, are able to cross the intact colonic epithelium as soon as 1hour post-contact. This study provides new data on the initial event of CA HIV-1 transmission and highlights the importance in considering CA as a very rapid way of crossing the colonic epithelial barrier. On the other hand, we have demonstrated that the seminal environment exerts an inhibitory effect on the adhesion to the colonic epithelium of transmigrating monocytes/macrophages. Further studies are now needed to determine the mechanisms involved in this inhibition and its impact *in vivo*.

References

Anderson, D.J. (2014). Modeling Mucosal Cell-Associated HIV Type 1 Transmission in Vitro.

Anderson, D.J., Politch, J.A., Nadolski, A.M., Blaskewicz, C.D., Pudney, J., and Mayer, K.H. (2010). Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. AIDS *24*, 163–187.

Barreto-de-Souza, V., Arakelyan, A., Margolis, L., and Vanpouille, C. (2014). HIV-1 vaginal transmission: cell-free or cell-associated virus? Am J Reprod Immunol *71*, 589–599.

Brazil, J.C., Lee, W.Y., Kolegraff, K.N., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Louis, N.A. (2010). Neutrophil Migration across Intestinal Epithelium: Evidence for a Role of CD44 in Regulating Detachment of Migrating Cells from the Luminal Surface. J. Immunol. *185*, 7026–7036.

Camus, C., Matusali, G., Bourry, O., Mahe, D., Aubry, F., Bujan, L., Pasquier, C., Massip, P., Ravel, C., Zirafi, O., et al. (2016). Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4+ T-cell infection. AIDS *30*, 1197–1208.

Carreno, M.P., Chomont, N., Kazatchkine, M.D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A.S., Andreoletti, L., Matta, M., and Belec, L. (2002). Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. J Virol *76*, 32–40.

Cavarelli, M., Foglieni, C., Rescigno, M., and Scarlatti, G. (2013). R5 HIV-1 envelope attracts dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5. EMBO Mol Med *5*, 776–794.

Chancey, C.J., Khanna, K. V, Seegers, J.F., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., and Markham, R.B. (2006). Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. J Immunol *176*, 5627–5636.

Doncel, G.F., Joseph, T., and Thurman, A.R. (2010). Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? Am J Reprod Immunol *65*, 292–301.

Doncel, G.F., Anderson, S., and Zalenskaya, I. (2014). Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment--implications for HIV transmission. Am J Reprod Immunol *71*, 564–574.

Ferreira, V.H., Kafka, J.K., and Kaushic, C. (2014). Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. Am. J. Reprod. Immunol. *71*, 543–554.

Gorodeski, G.I., and Goldfarb, J. (1998). Seminal fluid factor increases the resistance of the tight junctional complex of cultured human cervical epithelium CaSki cells. Fertil. Steril. *69*, 309–317.

Van Herrewege, Y., Michiels, J., Waeytens, A., De Boeck, G., Salden, E., Heyndrickx, L., van den Mooter, G., de Bethune, M.P., Andries, K., Lewi, P., et al. (2007). A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. Antivir. Res *74*, 111–124.

Kanwar, S., and Kubes, P. (1995). Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes. New Horiz. *3*, 93–104.

Keogan, S., Siegert, K., Wigdahl, B., and Krebs, F.C. (2015). Critical Review: Immunomodulation by Seminal Factors and Implications for Male-to-Female HIV-1 Transmission. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *69*, 131–137.

Kolodkin-Gal, D., Hulot, S.L., Korioth-Schmitz, B., Gombos, R.B., Zheng, Y., Owuor, J., Lifton, M.A., Ayeni, C., Najarian, R.M., Yeh, W.W., et al. (2013). Efficiency of Cell-Free and Cell-Associated Virus in Mucosal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. J. Virol. *87*, 13589–13597.

Kordy, K., Elliott, J., Tanner, K., Johnson, E.J., McGowan, I.M., and Anton, P.A. (2018). Human Semen or Seminal Plasma Does Not Enhance HIV-1BaL Ex Vivo Infection of Human Colonic Explants. AIDS Res. Hum. Retroviruses *34*, 459–466.

Lawrence, D.W., Bruyninckx, W.J., Louis, N.A., Lublin, D.M., Stahl, G.L., Parkos, C.A., and Colgan, S.P. (2003). Antiadhesive role of apical decay-accelerating factor (CD55) in human neutrophil transmigration across mucosal epithelia. J. Exp. Med. *198*, 999–1010.

Lawrence, P., Portran, D., Terrasse, R., Palle, S., Olivier, T., Fantini, J., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2012). Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. AIDS *26*, 785–796.

Maher, D., Wu, X., Schacker, T., Horbul, J., and Southern, P. (2005). HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 11504–11509.

Milman, G., and Sharma, O. (1994). Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. AIDS-Res-Hum-Retroviruses *10*, 1305–2229.

Mori, A., Satsu, H., and Shimizu, M. (2003). New model for studying the migration of immune cells into intestinal epithelial cell monolayers. Cytotechnology *43*, 57–64.

Mullin, J.M., Diguilio, K.M., Valenzano, M.C., Deis, R., Thomas, S., Zurbach, E.P., Abdulhaqq, S., and Montaner, L.J. (2017). Zinc reduces epithelial barrier compromise induced by human seminal plasma. PLoS One *12*, e0170306.

Okamoto, M., Byrn, R., Eyre, R.C., Mullen, T., Church, P., and Kiessling, A.A. (2002). Seminal plasma induces programmed cell death in cultured peripheral blood mononuclear cells. AIDS Res Hum Retroviruses *18*, 797–803.

Parkos, C.A., Delp, C., Arnaout, M.A., and Madara, J.L. (1991). Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. J. Clin. Invest. *88*, 1605–1612.

Patel, P., Borkowf, C.B., Brooks, J.T., Lasry, A., Lansky, A., and Mermin, J. (2014). Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. AIDS *28*, 1509–1519.

Politch, J.A., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (2009). Depletion of CD4 + T Cells in Semen During HIV Infection and Their Restoration Following Antiretroviral Therapy.

Quayle, A.J., Xu, C., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (1997). T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. J Infect Dis *176*, 960–968.

Reglero-Real, N., García-Weber, D., and Millán, J. (2016). Cellular Barriers after Extravasation: Leukocyte Interactions with Polarized Epithelia in the Inflamed Tissue. Mediators Inflamm. *2016*, 7650260.

Rennemeier, C., Schwab, M., Lermann, U., Albert, C., Kämmerer, U., Frambach, T., Morschhäuser, J., Dietl, J., and Staib, P. (2011). Seminal plasma protects human spermatozoa and pathogenic yeasts from capture by dendritic cells. Hum. Reprod. *26*, 987–999.

Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodrigues, C.R., Lenicov, F.R., Thepaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernandez, M., et al. (2011). Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. J Immunol *187*, 5299–5309.

Sabatté, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomón, H., Amigorena, S., and Geffner, J. (2007). Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. J. Virol. *81*, 13723–13734.

Sabatté, J., Remes Lenicov, F., Cabrini, M., Rodriguez Rodrigues, C., Ostrowski, M., Ceballos, A., Amigorena, S., and Geffner, J. (2011). The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. Microbes Infect. *13*, 977–982.

Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., Manniou, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejucq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. J Infect Dis *202*, 337–344.

Shattock, R.J., and Moore, J.P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. Nat Rev Microbiol *1*, 25–34.

Stax, M.J., van Montfort, T., Sprenger, R.R., Melchers, M., Sanders, R.W., van Leeuwen, E., Repping, S., Pollakis, G., Speijer, D., and Paxton, W.A. (2009). Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4(+) T-lymphocytes. Virology *391*, 203–211.

Tugizov, S.M., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W.C., Levy, J.A., and Palefsky, J.M. (2011). Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia. J Virol *86*, 2556–2570.

Wolff, H., and Anderson, D.J. (1988). Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril *49*, 497–504.

Zhou, Z., Barry de Longchamps, N., Schmitt, A., Zerbib, M., Vacher-Lavenu, M.-C., Bomsel, M., and Ganor, Y. (2011). HIV-1 Efficient Entry in Inner Foreskin Is Mediated by Elevated CCL5/RANTES that Recruits T Cells and Fuels Conjugate Formation with Langerhans Cells. PLoS Pathog. *7*, e1002100.

Figure legends

Figure 1. MDM and monocytes transmigrate across the human colonic epithelial barrier *ex vivo* and *in vitro*.

a. Representative histology (H&E staining) and staining for CK20, ZO-1, E-cadherin and JAM-A of the colonic explants before (T0) and after 1h or 6h of culture. Magnification x 20. (n=20 for T0 and 1h, n=6 for 6h).

b. CFSE stained MDM or 4kDa Dextran FITC microbeads (negative control) were added to the apical side of colorectal explants for 1 h. Tissues were then washed and fixed with 4% paraformaldehyde. The penetration of green stained MDM or microbeads into the explant tissue was assessed using fluorescence microscopy and photographed at x20 magnification. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Images are representative of 2 exp.

c. CFSE stained monocytes or MDM infected or not with HIV-1 R5 BaL were placed in the apical compartment of confluent CaCo2 cell culture insert. After 24h incubation, CFSE-stained cells found in the basal compartment were counted by microscopic observation. Results are expressed as the mean +/- SEM of 3 to 12 independent experiments and represent the number of transmigrated cells per well.

d. CaCo2 were fixed 24h post-exposure to CFSE-stained MDM, stained for HIV-1 p24 (red) and analyzed by confocal microscopy at 40X magnification. Representative image of z stack from CaCo2 layer exposed to CFSE–stained MDM. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Both HIV-1 infected (yellow) and uninfected MDM (green) are presented.

Figure 2. SP does not impact the colon epithelial barrier *ex vivo* and *in vitro* but decreases monocytes and MDM transmigration across CaCo2 colonic epithelium.

a. Viability of colonic explants measured after 1h or 6h exposure to 50% seminal plasma (SP) (fold change compared to control (non-exposed tissue)). Dead control corresponds to tissue treated by lysis buffer. Means +/- SEM (n = 3).

b. Representative histology (H&E staining) and staining for CK20, ZO-1, E-cadherin and JAM-A of colonic explants after 1h of culture with apical exposure to 50% SP. Magnification x 20. (n=17)

c. Integrity of the epithelial barrier measured by addition of 4kDa Dextran-FITC in the apical side of the colonic explants epithelium in presence or not of 50% seminal plasma (SP) during 1h, 4h and 6h (fold increase of Dextran-FITC passage into the basolateral medium compared to control (basolateral medium before the apical addition of Dextran-FITC)). EDTA, which disrupts tight junction structures, is a positive control of permeability. Means +/- SEM (n = 3-4).

d,e. CFSE stained monocytes or macrophages exposed or not to HIV-1 R5 BaL were placed in the apical compartment of confluent CaCo2 cell culture insert in presence or not of 10% and 50% seminal plasma (SP). After 24h incubation, CFSE-stained cells found in the basal compartment were counted by microscopic observation. (d) Transmigration fold change in presence of 10 or 50% of SP by comparison to medium alone. Each bar represents mean +/- SEM of 3 to 9 independent experiments. (e) Number of transmigrated cells recovered in the basal compartment in presence or not of 10% SP. Each symbol represents 1 patient (n=2).

f. Monocytes and MDM were exposed to 10 or 50% SP for 24h and viable cells stained with 7AAD before flow cytometry analysis. Results are expressed as relative percentage of viable cells to non-exposed cells (mean +/- SEM of 3 to 5 independent experiments).

Figure 3. Monocytes and MDM adhesion to CaCo2 monolayer is decreased by SP.

a,b. CFSE stained monocytes or MDM exposed or not to HIV-1 BaL were placed in the apical compartment of polarized CaCo2 cell culture insert in presence or not of 10% or 50% seminal plasma (SP). After 2h incubation non adherent cells were removed and insert extensively washed. HIV-1 p24 immunostaining (red) discriminates HIV-1 infected cells. Adherent cells were counted by microscopic observation. (a) Adhesion fold change in presence of 10 or 50% SP by comparison to medium alone. Each bar represents the mean +/- SEM of 3 to 6 independent experiments. (b) Number of adherent cells on CaCo2 monolayer in presence or absence of 10% SP. For HIV+ MDM, only infected cells (p24+) were counted. Each symbol represents 1 patient (n= 2 for NI MDM and 3 for HIV-1 R5 BaL infected MDM).

c. Representative image of CaCo2 monolayer culture insert following 2h exposure with HIV-1 exposed MDM showing that both non infected and HIV-1 infected MDM, discriminated by a HIV-1 p24 immunocytostaining (red cells point out with a white arrow), adhere to the CaCo2 barrier.

d. Monocytes or MDM were pre-incubated with 10% SP or medium alone for 2h before the adhesion assay. Preincubated cells were then extensively washed before their addition on the apical side of CaCo2 monolayer for 2h without SP. Non pre incubated cells were added on the apical side of CaCo2 monolayer in presence or not of 10% SP for 2h. Adherent cells were counted by microscopic observation. Results are expressed in fold change to the number of adherent cells when exposed to medium alone (Adhesion fold change and are the mean +/- SEM of 3 independent experiments.

e,f. Monocytes and MDM were exposed to medium containing or not 10% SP for 2h. Cells were washed and stained for CD18, CD11a, CD11b, CD11c and CD103 markers before flow cytometry analysis. Results are expressed as median intensity of fluorescence (MFI) fold change compared to cells exposed to medium alone (n=5 for monocytes and 3 for MDM).

Supplementary data

Material and Methods

ZO-1 Immunocytostaining

CaCo2 monolayer on inserts were fixed in 4% PAF solution for 15 min at RT, washed in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), and blocked for 1 hour in blocking solution (5% bovine serum albumin in PBS). Primary antibody ZO-1 (5µg/mL, Thermo Fisher Scientific) was diluted in blocking solution and incubated with monolayers over night at 4°C. Monolayers were then washed with PBS 0.1% tween20 (Promega) and secondary antibody, Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (10µg/mL Life Technology) was added for 30minutes at room temperature. Nuclear counterstaining was done with DraqV (10µM, Biostatus) incubation for 30 minutes at 37°C. Insert surface were washed 3 times in PBS, excised from the polystyrene inserts and monted in ProLong™ Gold Antifate Moutant medium (Invitrogen).

Blue Dextran leakage assay

Blue Dextran dye (1mM) was added to the apical surface of confluent epithelial cell monolayers grown on 3µm pore size culture inserts. After one hours and half incubation, 100µl of basolateral medium was sampled. The presence of Blue Dextran dye in basolateral samples was measured using a microplate reader (Biorad iMark Microplate Reader) at 520nm and the optical density was expressed as a fold increase of density of dye added to the basal medium at the beginning of experiment (medium “alone”’).

Viability

MTT viability

Tissue biopsy punches were recovered after exposure to medium alone or SP and incubated with the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) substrate (0.5mg/mL, Sigma-Aldrich) over night at 37°C. Tissue were then dried and incubated in methanol over night at room temperature to dissolve the colored crystal products. Samples were read using an enzyme linked immunosorbent assay plate reader (Biorad iMark Microplate Reader) at a wavelength of 570 nm. The amount of color produced is proportional to the number of viable cells.

LDH viability

The CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega) is based on the measure of the release of lactate dehydrogenase (LDH) from cells with a damaged membrane. Measure of

cytotoxicity has been done in accordance with manufacturer instructions. Culture medium was mixed with an equal volume of CytoTox-ONE reagent for 10 minutes at 22°C before reading using a microplate reader (Fluostar OPTIMA) at a wavelength of 570 nm. The amount of color produced is proportional to the number of viable cells.

Rheological analysis

A pool of non-infected SP or a solution of RPMI 0.17% methyl cellulose (Sigma) were diluted in RPMI medium to reach the following concentrations: 10% for both and 50% for SP only. All rheological measurements were carried out with a Physica MCR 301 (Anton Paar). Cone plate geometry (CP50-2) was used as measuring systems. All measurements were carried out at 20° C after a rest time of 3 min. The apparent viscosity of the samples was measured after application of a growing shear rate and corresponds to the slope value of Shear Stress mesure (Pa) related to deformation rate (s^{-1}).

Supplementary material

Ab	fluo	Ref	Concentration use (µg/mL)
CD11a	BV711	BD – 563935	0.12
CD11b	BV786	BD – 740965	20
CD11c	BV786	BD – 740966	2
CD18	BV650	BD – 743373	2
CD103	APC	BD – 563883	1.2

Figure legends

Figure S1. CaCo2 monolayer integrity and polarization and HIV+ SP effect on CaCo2 and explant model.

a. ZO-1 tight junctions immunocytostaining (in red) on a polarized CaCo2 monolayer (400 ohms.cm² TEER) before and after 24h exposition with medium containing or not 50% SP (HIV- or individual HIV+ SP). DAPI stains the nuclei (n= 3).

b. Integrity of the epithelial barrier measured by addition of 4kDa Dextran-FITC in the apical side of the polarized CaCo2 (fold increase of Dextran-FITC leakage into the basolateral medium compared to control (basolateral medium before the apical addition of Dextran-FITC) after 24h exposure to 50% SP from different pool (P1, P2) or individual SP (I1, I2, I3). EDTA is a positive control of permeability (n= 1 culture well for individuals SP and 2 to 5 for pool SP).

c. Cytotoxicity measured after 24h exposure of CaCo2 to 50% SP from different pool (P1, P2) or individual SP (I1, I2, I3) (fold increase of LDH release into the basolateral medium compared to control (basolateral medium of non-exposed CaCo2)). Positive control corresponds to lysed CaCo2. (n= 1 culture well for individuals SP and 2 to 5 for pool SP)

d. TEER variation after 24h exposure to 50% SP from different pool (P1, P2) or individual SP (I1, I2, I3). EDTA is a positive control for junction break (n= 1 culture well for individuals SP and 2 to 6 for pool SP) (percentage of control TER (non-exposed cells)).

e. Representative histology (H&E staining) and staining for CK20, ZO-1, E-cadherin and JAM-A of the colonic explants after 1h of culture in presence of 50% HIV+ SP from individuals donors. Magnification x 20. (n=7).

Figure S2. Seminal plasma's effects are not linked to viscosity.

a. Viscosity of 10% SP, 50% SP, 10% methyl cellulose 0.17% and 50% methyl cellulose 0.17% was measured with a rheometer. Graph shows the shear stress behavior of different preparations according to time (S^{-1}).

b. Monocytes were exposed to 10 or 50% SP (SP) or 10 or 50% methyl cellulose 0.17% (Met Cell) for 2h. Cells were stained with 7AAD and viable cells proportion was evaluated by flow cytometry. Results are expressed in relative percentage of viable cells to non-exposed cells (n=1 experiment).

c/d. 800 000 monocytes and/or MDM were placed in the apical compartment of polarized CaCo2 cell culture insert for 2h in presence of (c) 10% or 50% SP (SP), 10% or 50% of a 0.17% methyl cellulose solution (Met Cell) with a viscosity similar to respectively 10% and 50% SP, (d) 10% SP from different

pool (P1, P2) or individual SP (I1, I2, I3) or HIV+ SP. Insert were extensively washed to remove non-adherent cells. Adherent cells were counted by microscopic observation. Results are expressed as fold change compared to the number of adherent cells when exposed to medium alone (Panel c n=1, panel d n=4 to 5).

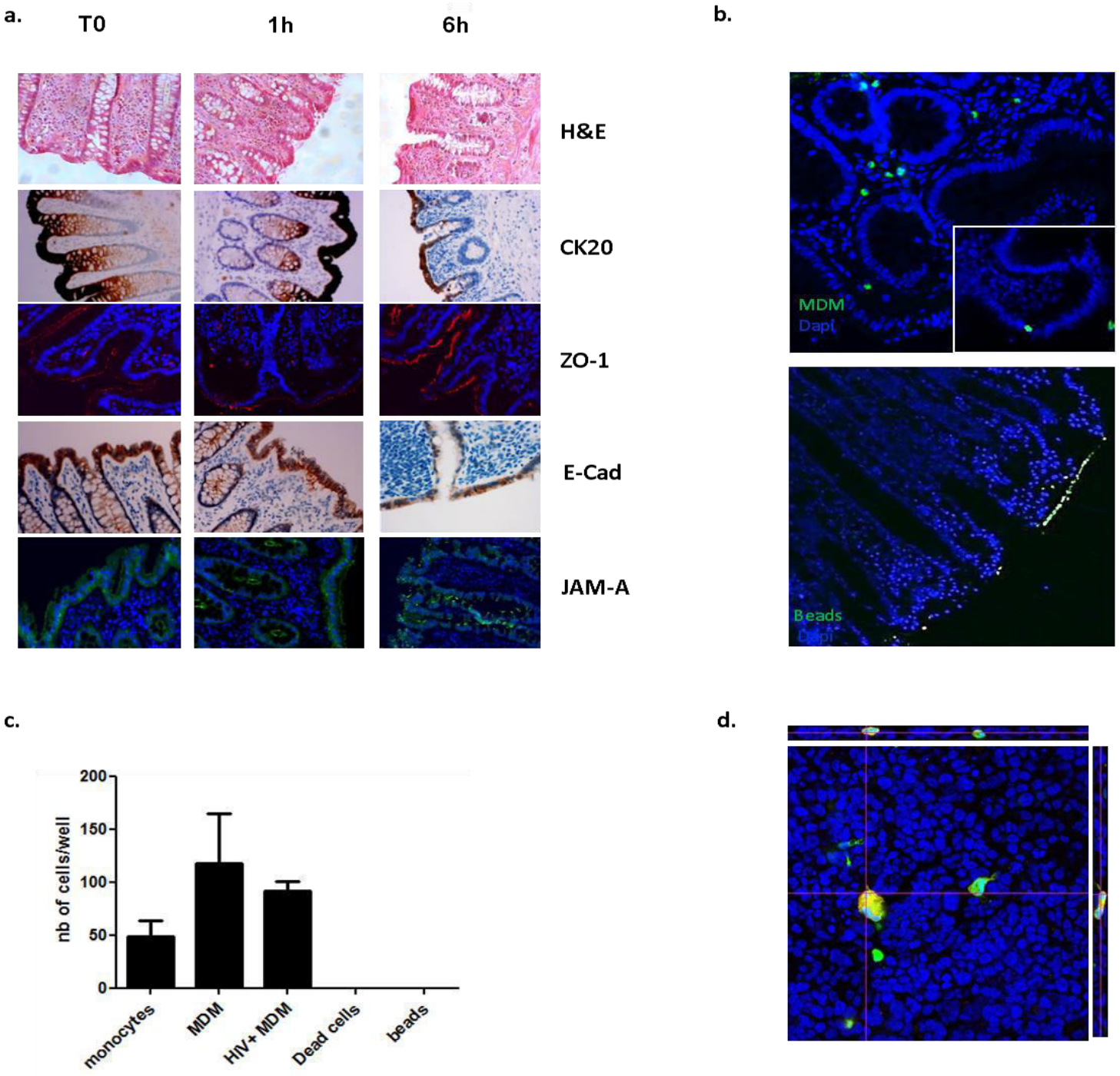


Figure 1. MDM and monocytes transmigrate across the human colonic epithelial barrier *ex vivo* and *in vitro*.

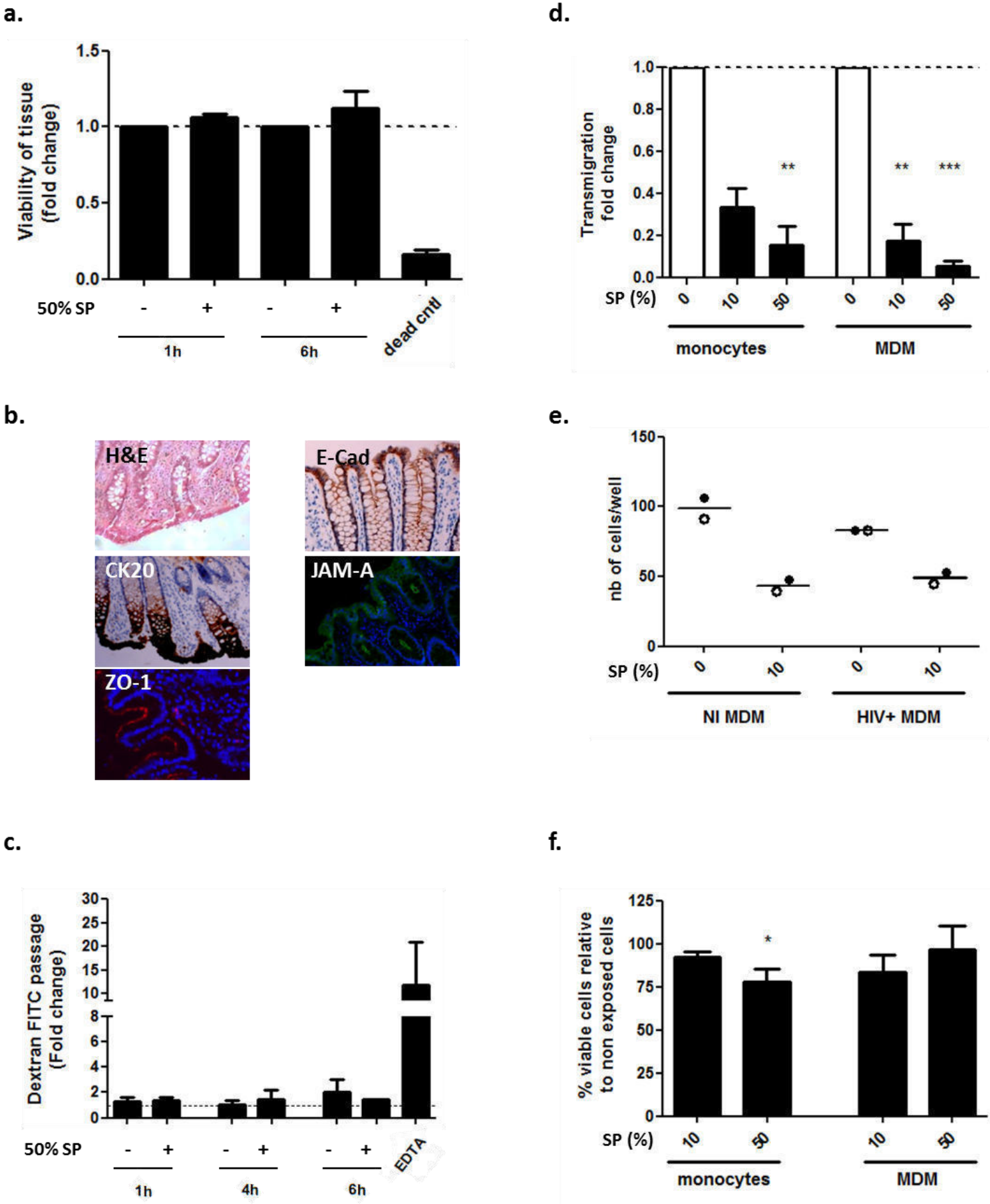


Figure 2. SP does not impact the colon epithelial barrier *ex vivo* and *in vitro* but decreases monocytes and MDM transmigration across CaCo2 colonic epithelium.

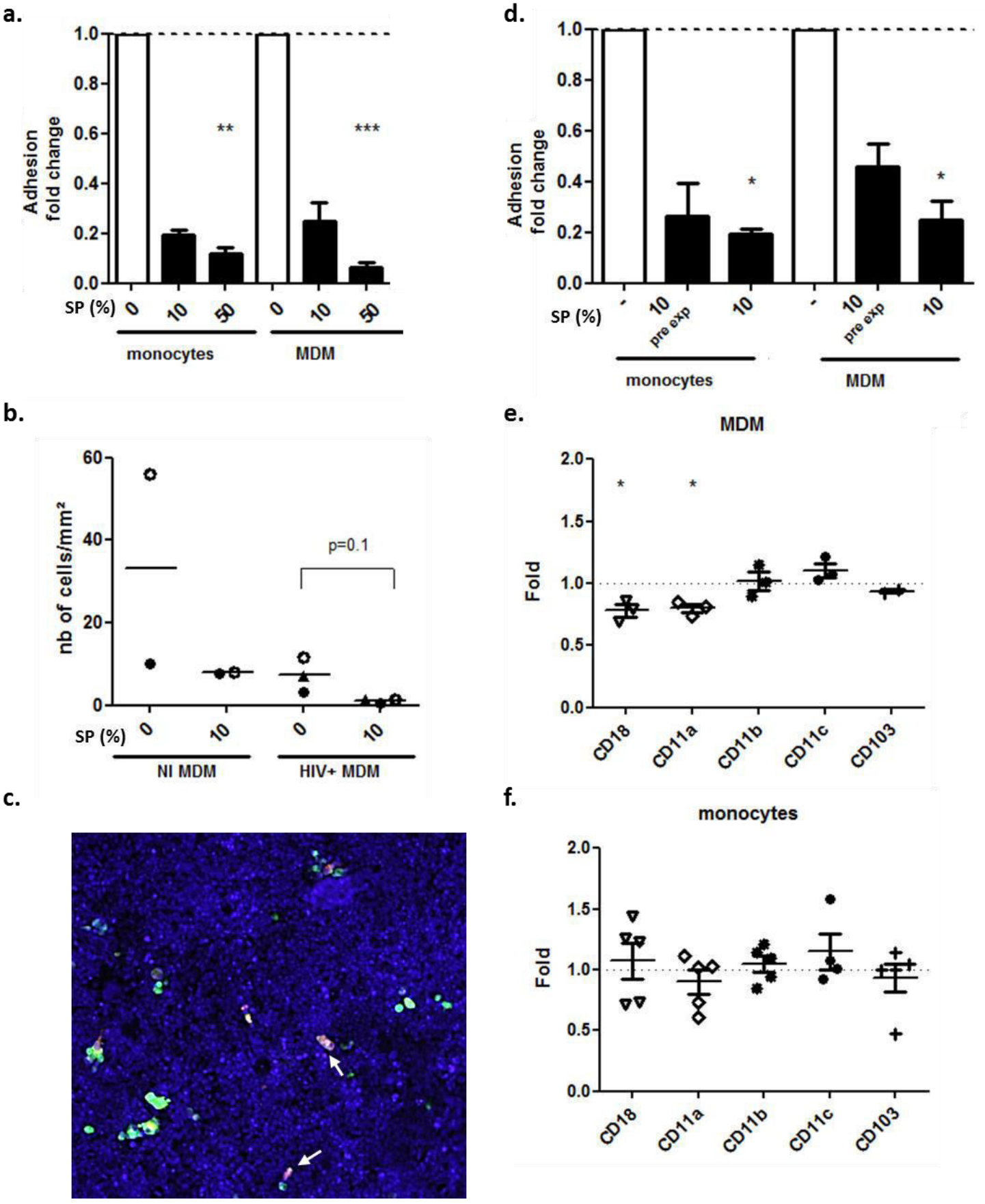


Figure 3 Monocytes and MDM adhesion to CaCo2 monolayer is decreased by SP.

Supplementary

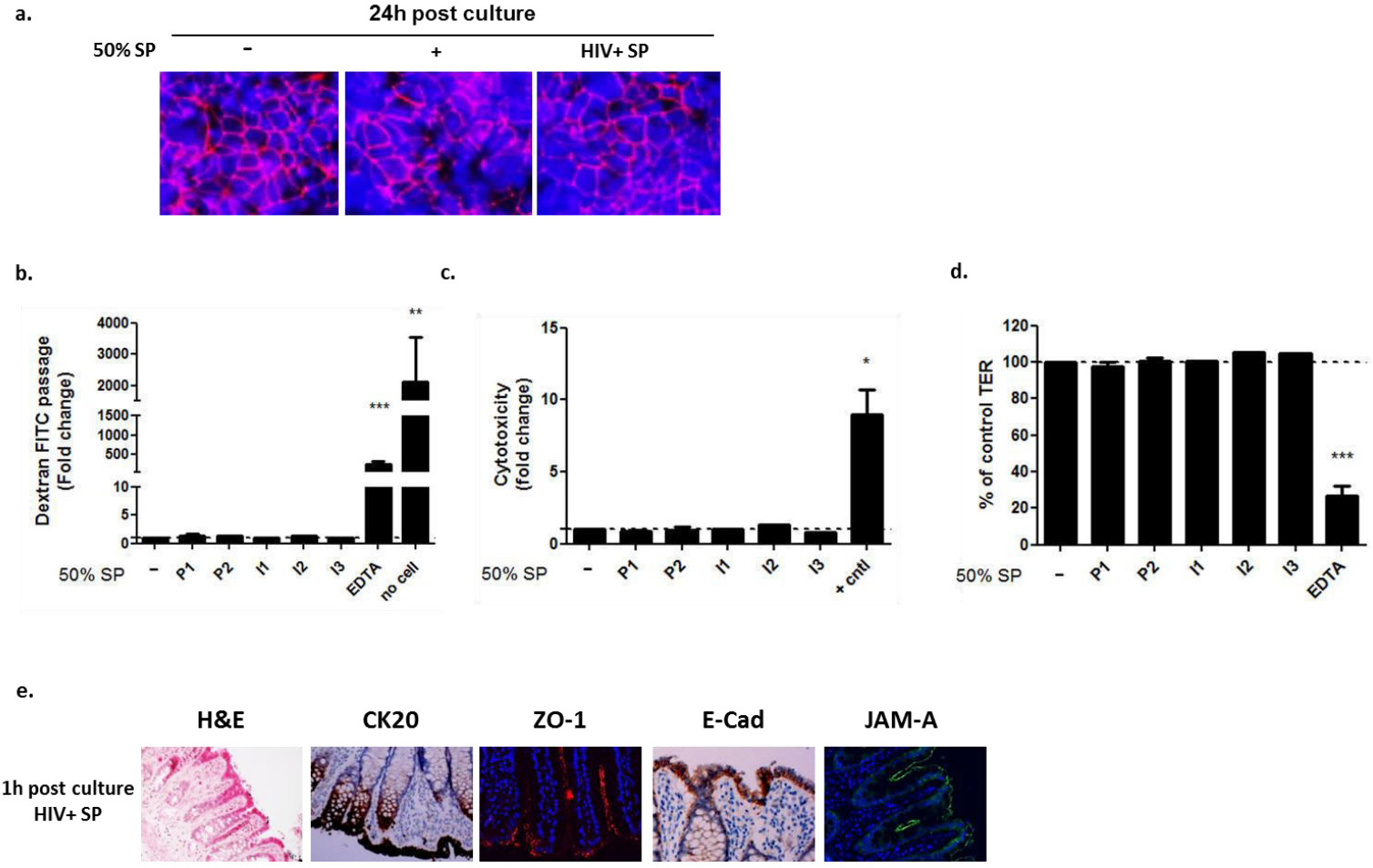


Figure S1. CaCo2 monolayer integrity and polarization and HIV+ SP effect on CaCo2 and explant model.

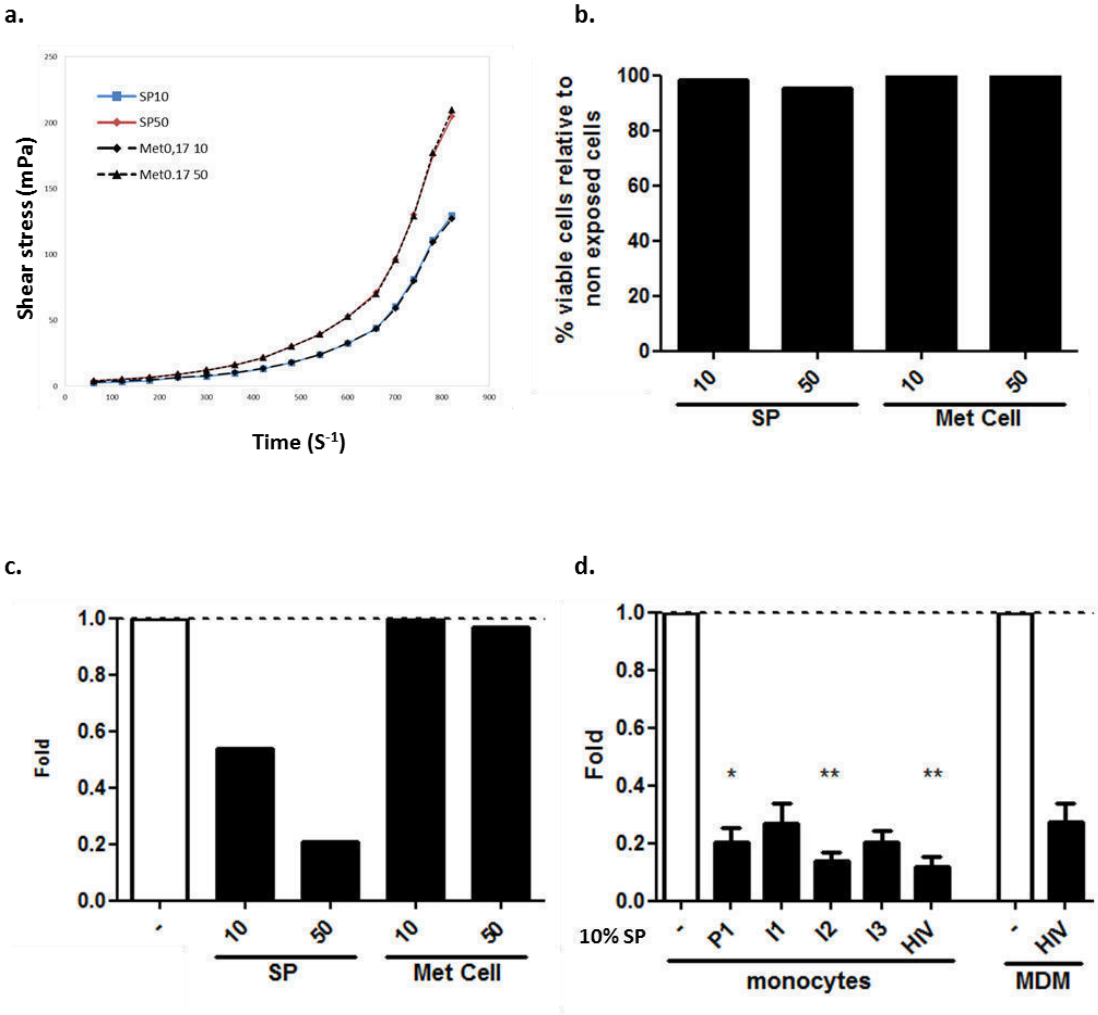


Figure S2. Seminal plasma's effects are not linked to viscosity.

C. Résultats supplémentaires non inclus dans l'article

Effet du liquide séminal sur la transmigration de macrophages à travers la barrière endométriale in vitro

La transmigration de MDM à travers la barrière endométriale in vitro est diminuée par le liquide séminal (LS).

Afin d'évaluer si l'effet inhibiteur du LS sur la transmigration et l'adhésion des monocytes et macrophages à la barrière colorectale est spécifique au colon, nous avons réalisé des expériences de transmigration et d'adhésion de MDM sur une barrière épithéliale polarisée monostratifiée de cellules endométriales transformées HEC-1A. De plus, nous souhaitons comparer nos résultats à ceux de Lawrence et al. qui ont précédemment mis en évidence un effet inhibiteur du LS sur la transmigration de leucocytes sanguins à travers une monocouche polarisée de cellules endométriales (Lawrence et al., 2012).

La polarisation et l'imperméabilité de la monocouche de cellules épithéliales HEC-1A ont été vérifiées avant les expériences de transmigration, ainsi que suite à une exposition au LS, grâce au suivi de la résistance trans-épithéliale (RTE), les cultures utilisées ayant une RTE comprise entre 120 et 200 ohms.cm², et par test de perméabilité au dextran FITC (Fig 1a). Une exposition de la monocouche de cellules épithéliales à 10% et 50% de LS pendant 24h ne modifie pas la perméabilité de la barrière (Fig 1a) et n'induit pas de cytotoxicité (Fig 1b).

Nos résultats montrent qu'une exposition à 10% de LS induit une diminution significative de 47% de la transmigration de MDM à travers la monocouche de HEC-1A ($p=0.0379$) (Fig 2a). La condition 50% LS induit également une diminution de la transmigration des MDM, mais nécessitera d'être répétée (n=1). Les MDM infectés par VIH-1 sont capables de transmigrer à travers la barrière HEC1-A (Fig 2c). L'exposition à 10% de LS des MDM infectés par le VIH-1 induit également une inhibition de la transmigration de ces cellules (baisse non significative de 33% de la transmigration) (Fig 2b).

L'adhésion des MDM à la barrière épithéliale endométriale est diminuée en présence de LS.

L'adhésion des MDM à la monocouche HEC-1A est diminuée de 37% en présence de 10% de LS (Fig 3a). La condition 50% LS induit une diminution de l'adhésion des MDM plus importante, mais nécessitera d'être répétée (n=1). L'interprétation de l'effet du LS sur l'adhésion des MDM infectés VIH-1 à la barrière HEC-1A nécessitera d'augmenter le nombre de réplicats. Sur n=2, la capacité

d’adhésion à la barrière HEC-1A des MDM VIH-1+ du premier patient n’est pas altérée par l’exposition au LS. Pour le second patient, on observe un effet inhibiteur du LS sur l’adhésion des MDM VIH-1+ aux HEC1-A (Fig 3b). A noter, l’infection elle-même semble induire une baisse de leur capacité d’adhésion.

Discussion

Dans cette partie, seuls les résultats supplémentaires seront discutés au regard de ceux présentés dans l'article 1.

Afin d'évaluer si l'effet inhibiteur du LS sur la transmigration et l'adhésion des monocytes et MDM à la barrière colorectale est spécifique au colon, nous avons réalisé des expériences de transmigration et d'adhésion de MDM sur une barrière épithéliale polarisée monostratifiée de cellules endométriales transformées HEC-1A.

Nous avons confirmé que les cellules myéloïdes, ici MDM, qui représentent la principale population de cellules cibles du VIH dans le sperme d'hommes infectés (Anderson et al., 2010a), transmigrent in vitro à travers une barrière intacte de HEC-1A. Bien que la transmigration survienne de façon systématique, la proportion de MDM à transmigrer est faible : 0.021 % après 24h de transmigration. Ce pourcentage de transmigration est environ dix fois en dessous de ceux décrits dans d'autres études utilisant un modèle épithélial similaire (Carreno et al., 2002; Lawrence et al., 2012). Toutefois, dans ces études, les cellules transmigrantes sont soit des monocytes sanguins, soit une lignée monocytaire (THP1), ce qui pourrait expliquer les variations observées.

Le LS inhibe significativement la transmigration des MDM à travers la barrière de HEC-1A. Lawrence et al. avait également montré une diminution LS-dépendante de la transmigration de lymphocytes et de monocytes sanguins à travers une barrière épithéliale endométriale HEC-1A (Lawrence et al., 2012). Ces résultats corroborent nos résultats sur CaCo2. Toutefois, l'effet du LS sur l'adhésion des MDM à la monocouche HEC-1A semble moins prononcé, l'adhésion des MDM aux CaCO2 en présence de 10% LS étant diminuée de 76% contre 37% avec les HEC-1A. Un niveau différentiel d'expression de molécules d'adhésion sur les CaCo2 et les HEC-1A pourrait expliquer ces différences.

Pour comprendre l'effet inhibiteur du LS sur la transmigration des MDM à travers la monocouche de HEC-1A, nous avons recherché si le LS est capable de moduler l'adhésion de ces cellules aux cellules épithéliales. De manière similaire à ce que nous avions obtenu sur CaCo2, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du LS sur l'adhésion des MDM à la monocouche de HEC-1A. De façon surprenante, alors que le modèle épithélial utilisé est le même, nos résultats s'opposent à ceux de Lawrence et al, qui voient une augmentation de l'adhésion des monocytes et des lymphocytes aux HEC-1A en présence de LS (Lawrence et al., 2012). Dans les résultats présentés, il est à noter que la nature des cellules transmigrantes, les doses de LS testées et les temps d'exposition diffèrent (exposition 2h des MDM à 10% de LS dans notre étude contre 18h d'exposition des monocytes à 6% de LS pour Lawrence et al.). Toutefois, lorsque nous nous plaçons dans les mêmes conditions expérimentales que les auteurs (% LS, temps d'exposition), nous obtenons des

résultats similaires à savoir une inhibition de l'adhésion des leucocytes. Nous ne pouvons pas exclure que ces différences de résultats soient dues à la nature des cellules transmigrantes ou encore liées à des variations interindividuelles des LS constituant le pool.

Pour conclure, ces résultats supplémentaires nous permettent d'attester d'un effet actif du plasma séminal sur la transmigration des monocytes et des MDM NI et infectés par le VIH à travers les barrières épithéliales muqueuses colorectale et endométriale. Les mécanismes sous-jacents restent à élucider, mais ces données ouvrent la voie à de nouvelles pistes de cibles thérapeutiques.

Figures

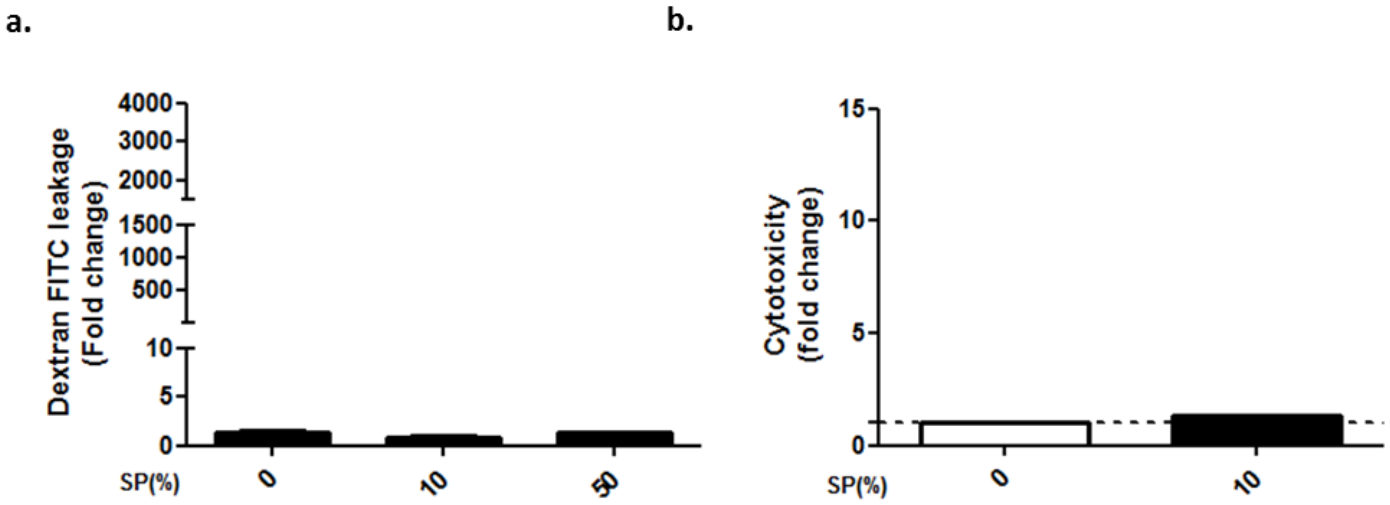


Fig 1 : Maintien de l'intégrité de la monocouche HEC-1A suite à l'exposition par du LS

a. L'intégrité de la barrière épithéliale est mesurée par addition de Dextran-FITC 4kDa du coté apical des HEC-1A polarisées (*fold change* du passage de dextran dans le milieu basal par rapport au témoin (milieu basal avant l'ajout de dextran FITC) après 24h d'exposition à 10% et 50% de plasma séminal (LS) (n = 4 puits de culture pour les expositions à 0 et 10% LS et n=1 pour l'exposition 50% LS).

b. Mesure de la cytotoxicité après 24h d'exposition des HEC-1A à du milieu seul ou contenant 10% de LS (*fold change* du relargage de la LDH dans le milieu basal par rapport au témoin «0» (milieu basal de HEC-1A non exposées)) (n=2).

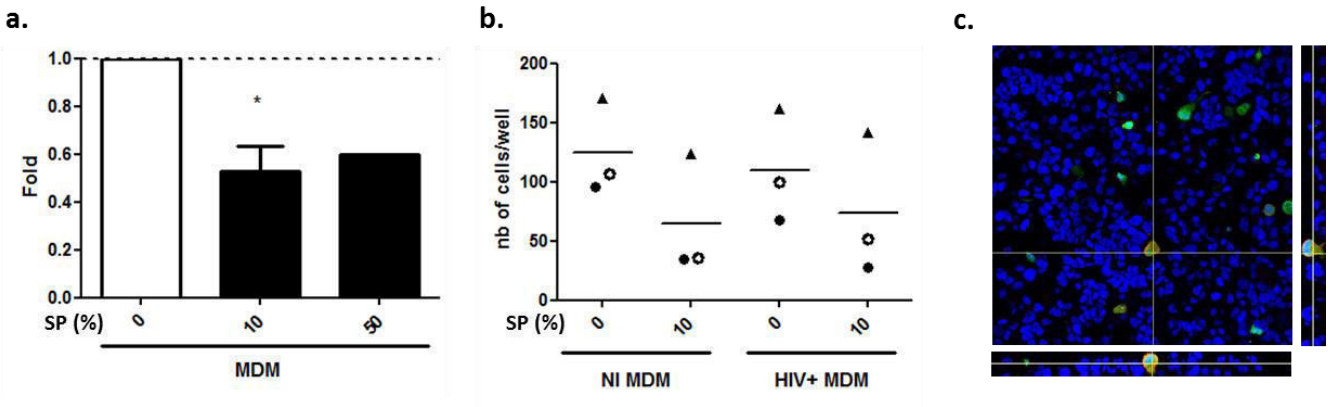


Fig 2 : Le LS diminue la transmigration des MDM à travers la monocouche épithéliale de HEC-1A

a,b. Des MDM marqués au CFSE, exposés ou non au VIH, ont été placés du coté apical des cellules polarisées HEC-1A confluentes en présence ou non de plasma séminal (LS) à 10% et 50%. Après une incubation de 24h, les cellules marquées CFSE présentes dans le compartiment basal ont été comptées par observation microscopique. (a) Le graphique représente le *fold change* du nombre de cellules transmigrantes en présence de 10 ou 50% de LS par rapport à la transmigration en milieu seul. Chaque barre représente la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes pour les conditions 0% et 10% et n=1 pour la condition 50% LS. (b) Le graphique représente le nombre de cellules transmigrantes récupérées dans le compartiment basal en présence ou non de 10% de LS. Chaque symbole représente 1 patient (n = 3).

c. Après la transmigration, les monocouches de HEC-1A ont été fixées, marquées pour la p24 du VIH-1 (rouge) et analysées par microscopie confocale à un grossissement de 40X. Image représentative d'un z stack d'une couche de HEC-1A exposées à des macrophages marqués au CFSE en présence ou en absence de 10% de LS. Les noyaux cellulaires sont colorés au DAPI (bleu). Les MDM NI apparaissent vert (CFSE), les MDM infectés apparaissent jaunes.

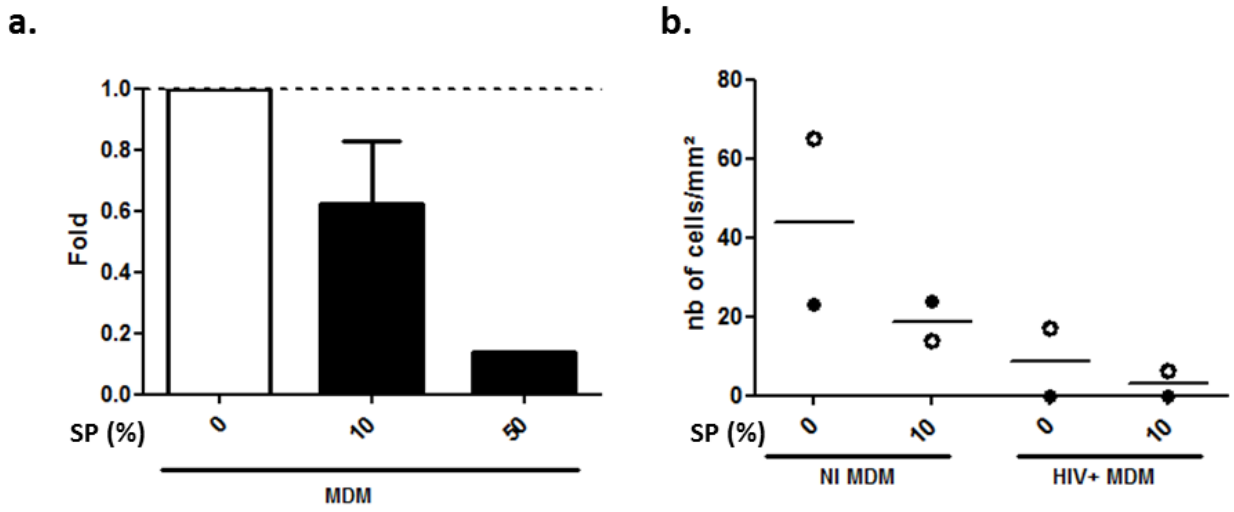


Fig 3 : Le LS diminue l'adhésion des MDM à la monocouche épithéliale de HEC-1A

a,b. Des MDM colorés au CFSE, exposés ou non au VIH, ont été placés du coté apical des cellules HEC-1A polarisées en présence ou non de plasma séminal (LS) à 10% et 50%. Après 2h d'incubation, les cellules non adhérentes sont retirées et l'insert abondamment lavé. L'immunomarquage p24 du VIH-1 (rouge) permet de discriminer les cellules infectées par le VIH-1 lorsque les HEC-1A ont été exposées aux MDM exposés au VIH-1. Les cellules adhérentes ont été comptées par observation microscopique. (a) Le graphique représente le *fold change* des niveaux d'adhésion en présence de 10 ou 50% de LS par rapport à l'adhésion en milieu seul. Chaque barre correspond à la moyenne +/- SEM. n=4 pour la condition 10% LS et n=1 pour la condition 50% LS. (b) Le graphique représente le nombre de cellules adhérentes infectées (p24+) comptées sur une monocouche de HEC-1A en présence ou non de 10% de LS. Chaque symbole représente 1 patient (n = 2).

II. CHAPITRE II - Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des leucocytes séminaux et comparaison aux leucocytes sanguins

A. Synthèse de l'article

Objectifs et méthodologie

Le but de cette étude est de caractériser les leucocytes séminaux humains au niveau fonctionnel en mesurant leur capacité de transmigration à travers une barrière épithéliale colorectale intacte, et au niveau phénotypique, par analyse en cytométrie de flux de leur particularité au regard des leucocytes sanguins ainsi que leur similitude notamment concernant leur équipement en terme de (co)-récepteurs à l'entrée pour le VIH-1 et de molécules d'adhésion. Nous avons également initié leur comparaison aux leucocytes séminaux de patients séropositifs, non traités par ARV. Enfin, puisque les leucocytes dérivés du sang sont communément utilisés pour l'étude des mécanismes de transmission virale par les cellules infectées, nous avons évalué si une exposition des leucocytes sanguins au liquide séminal (LS) induisait un changement de leur phénotype vers un phénotype plus proche de celui des leucocytes séminaux.

La transmigration de leucocytes séminaux a été évaluée dans un modèle *ex vivo* d'explants de tissu colorectal humain permettant de se rapprocher au maximum des conditions *in vivo*. La face apicale des explants colorectaux a été exposée aux cellules séminales « rondes » (marquées CFSE) préalablement isolées sur gradient PureSperm. La transmigration de cellules séminales ainsi que la nature des cellules transmigrantes à travers l'épithélium ont été recherchées par microscopie confocale.

La caractérisation des monocytes, macrophages et lymphocytes repose sur différents panels anticorps comportant des marqueurs phénotypiques, d'activation, d'origine muqueuse, des récepteurs aux chimiokines ainsi que des marqueurs des co-recépteurs du VIH et des molécules d'adhésion. Ces cellules sont spécifiquement étudiées de fait de leur présence dans le sperme et de leur statut de cellules cibles pour le VIH-1.

Dans le cadre de ce projet, nous prévoyons le recrutement de 30 patients VIH+ naïfs de traitement. A ce jour 9 patients ont été recrutés.

Résultats et discussion

Nos résultats montrent pour la première fois le passage rapide (dès 1h) par transmigration de macrophages et lymphocytes T séminaux à travers une barrière colorectale intacte *ex vivo*.

Les monocytes/macrophages séminaux présentent un phénotype plutôt de type M2, avec une proportion importante de cellules exprimant CD163 et CD206. Nos résultats préliminaires sur cellules séminales de patients VIH+ révèlent une augmentation des populations de cellules exprimant les marqueurs de macrophages M1, CD80 et CD86, ce qui pourrait indiquer que l'infection des cellules séminales puisse induire un changement vers un phénotype de type M1. Un plus grand nombre de donneurs VIH+ sera néanmoins nécessaire pour confirmer cette observation. Les proportions de cellules positives pour les différents récepteurs aux chimiokines évalués, incluant les co-recépteurs du VIH CXCR4 et CCR5, diffèrent entre les populations séminales et sanguines. Le pourcentage de monocytes/macrophages séminaux exprimant CCR5 est plus faible que dans la population de monocytes sanguins, mais plus haut que dans la population de MDM. Par ailleurs, le nombre de cellules exprimant CCR5 semble plus important dans le sperme de patients séropositifs que dans le sperme de patients non infectés. En cela, nos résultats diffèrent de ce qui a été observé chez le macaque (Bernard-Stoecklin et al., 2014). Par ailleurs, les proportions de cellules positives pour les autres récepteurs, CXCR4, CCR2 et CX3CR1 se rapprochent de celles des MDM. Comme les souches R5 sont les souches de virus préférentiellement transmises par voie sexuelle, nous avons évalué si la population de monocytes/macrophages séminaux CCR5+ présentait un phénotype particulier. Nos données montrent que le phénotype de ces cellules CCR5+ est similaire au phénotype de la population générale des monocytes/macrophages séminaux. Enfin, nous avons montré que les cellules séminales, au même titre que les monocytes et macrophages sanguins étaient hautement équipées en molécules d'adhésion (LFA-1, Mac-1 et p150,95). Cela constitue un argument en faveur d'un rôle de ces cellules dans la transmission muqueuse du VIH-1 par transmigration. Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous estimons que la population de monocytes/macrophages séminaux constitue une population bien distincte des monocytes et macrophages sanguins.

Nous nous sommes également intéressés à la caractérisation des lymphocytes T CD4 séminaux, autre population cible du VIH-1. Nous avons mis en évidence que contrairement au compartiment sanguin, la majorité des lymphocytes T CD4 séminaux présente un phénotype mémoire, ce qui d'après la littérature les rend particulièrement sensibles à l'infection VIH-1. Une très grande majorité d'entre eux expriment aussi le marqueur d'activation CD69. Par ailleurs, nos résultats nous amènent à penser que selon les donneurs, les lymphocytes retrouvés dans le sperme ont une origine différente puisque les proportions de cellules exprimant CD103, un marqueur muqueux, diffèrent grandement entre les donneurs. Enfin, comme les monocytes/macrophages, les

lymphocytes séminaux sont eux aussi hautement équipés en molécules d'adhésion puisqu'ils expriment les molécules LFA-1, Mac1 et α4β7.

Par ailleurs, nous avons constaté qu'une exposition courte au LS n'engendrait pas de modification sur le phénotype des cellules sanguines.

Conclusion

Grâce à ce travail, nous avons pu montrer que, au même titre que les cellules sanguines comme il est rapporté dans le chapitre I de ce manuscrit, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T séminaux sont capables de traverser de façon active et rapide la barrière épithéliale colorectale. Par ailleurs, la caractérisation des cellules séminales et leur comparaison aux cellules sanguines et séminales de patients VIH+ nécessitera des expériences complémentaires. Il est nécessaire d'augmenter le nombre de donneurs analysés, particulièrement celui des donneurs séropositifs, en vu de dégager de potentiels effets significatifs de l'infection. D'autre part, une caractérisation plus fine au niveau transcriptomique devrait débuter prochainement afin de compléter la caractérisation des cellules (technique DGE-Seq). Enfin, une limite majeure de notre étude est l'absence des données de densité antigénique, ce qui rend compliqué la comparaison fine des différents types cellulaires. Les prochains donneurs inclus permettront cette analyse.

B. Human Seminal leukocytes phenotypical and functional characterization (Article 2)

Human Seminal leukocytes phenotypical and functional characterization

Julie Frouard [1], Giulia Matusali [1], Laurent Sulpice [2], Célia Ravel [1 3], Louis Bujan [4], Nathalie Rioux-Leclercq [1,5], Anna Le Tortorec [1], Nathalie Dejucq-Rainsford [1]

[1] Université de Rennes, Inserm, École des hautes études en santé publique (EHESP), Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) — UMR_S1085, Rennes, France. [2] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Service de chirurgie hépatobiliaire et digestive, Rennes, France. [3] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Laboratoire de biologie de la reproduction-CECOS, Rennes, France. [4] Research Group on Human Fertility EA 3694, Université Paul Sabatier Toulouse III – CECOS, Hôpital Paule de Viguier, CHU Toulouse, Toulouse, France. [5] Centre Hospitalier Universitaire de Pontchaillou, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, Rennes, France.

Introduction

In 2017, 1.8 million people became newly infected with HIV worldwide (onusida), the majority through exposure to infected semen. While oral pre-exposure prophylaxis based on the uptake of antiretroviral pills efficiently reduces HIV-1 sexual transmission (Cardo et al., 1997), this prevention strategy has cost and compliance issues. Deciphering the mechanisms of HIV transmission and establishing pre-clinical models is of prime importance for the development of vaccines or novel local agents to prevent mucosal transmission. So far, most attempts to develop HIV vaccines and microbicides have focused on blocking cell-free virus transmission. However, in the semen of HIV infected individuals, the virus is present both as free viral particles in the seminal fluid and within infected cells. Infected seminal macrophages and T lymphocytes are highly infectious *in vitro* (Quayle J Inf dis, 1997). Semen cells comprise about 20-30 % of monocytes/macrophages and 5 % T lymphocytes (Politch et al., 2014; Smith et al., 1989; Wallach and Wolff, 1995). An increase in semen leukocytes above 10^6 cells/ml (called leukocytospermia) occurs as many as 24% of HIV-infected men (Anderson et al., 2010). This increase is associated with a high degree of semen infectiousness (Politch et al., 2009).

A number of recent *in vitro, ex vivo* and *in vivo* studies using blood/spleen-derived leukocytes as surrogates for seminal cells in ano-genital models have demonstrated transmigration of infected cells through the mucosal barrier, and found cell-associated transmission of HIV/SIV to be more efficient than cell free virus transmission (Chancey et al., 2006; Van Herrewege et al., 2007; Kolodkin-Gal et al., 2013; Salle et al., 2010). This suggests that CA transmission may be of prime importance for HIV dissemination (Anderson, 2014; Frouard et al., 2018). However, whether blood-derived leukocytes accurately mimic seminal leukocytes is unknown. We demonstrated that infected cells in semen from SIV-infected macaques have a mucosal origin and are released from various

genital organs (Bernard-Stoecklin et al., 2013; Houzet et al., 2018). Furthermore, seminal plasma contains a rich variety of bioactive cytokines, chemokines, growth factors, prostaglandins, and other immunomodulatory mediators that can potentially affect the viability, phenotype and functions of leukocytes (Doncel et al., 2014). Because of their mucosal origin and bathing in seminal plasma, seminal leukocytes might be phenotypically and functionally distinct from the blood-derived leukocytes used in the absence of seminal plasma in the bulk of HIV/SIV transmission studies. Moreover, although HIV infects male genital organs and modifies the cytokines and microbiota content of seminal plasma (Camus et al., 2016; Liu et al., 2014; Le Tortorec and Dejucq-Rainsford, 2010a, 2010b), the influence of HIV-1 infection on the phenotype of human seminal leukocytes has never been investigated. It is therefore crucial for our understanding of CA transmission to assess to what extent seminal leukocytes from HIV-infected men share phenotypic and functional characteristics with blood-derived leukocytes.

Here, we characterized the monocytes/macrophages and CD4+ T lymphocytes populations present in semen of HIV-infected versus non-infected men and compared them to blood-derived leukocytes using multi-parameter flow cytometry. In particular, to evaluate the contribution of seminal leukocytes to the sexual transmission of HIV-1, we examined the cell surface expression of HIV-1 receptors and molecules involved in adhesion and migration mechanisms. Since blood-derived cells are commonly used for CA transmission assay, we evaluated whether an exposure of blood-derived cells to seminal plasma can induce a “shift” of cell’s phenotype toward a phenotype closer to that of seminal cells. Finally, we demonstrated that seminal monocytes/macrophages and T lymphocytes are able to transmigrate through an intact columnar mucosal epithelium *ex vivo*.

Material & Methods

Volunteer recruitment and semen sample collection

Semen from HIV-negative leukocytospermic men (polymorphonuclear cell count above 1 million cell/ ml) was obtained via the center for the cryopreservation of 'eggs and semen' (CECOS) of Rennes, in respect to consent of the patients and authorized by Ethics Committee Ouest V, Rennes, France (authorization DC-2016-2783). Semen from antiretroviral therapy-naive HIV-infected was obtained within the framework of a research protocol authorized by the "Centre de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre-mer II" (CPP) (protocol RC31/16/8193) and Ethics Committee Ouest V, Rennes, France (authorization DC-2016-2783). Ejaculates were collected in sterile specimen container following voluntary self-masturbation and were liquefied for 30 min at 37°C before use. Seminal plasma (SP) from 30 healthy donors was recovered following centrifugation at 1000g for 10 min at room temperature, pooled, and aliquots stored at -80°C.

Cell isolation from semen

All semen samples were processed within 2–4 h after donation. Seminal round cells were isolated after puresperm 40/80 gradient centrifugation at 800xg for 30 minutes (Nidacon) according to manufacturer's instructions. The cellular fraction was then washed in RPMI 1640 medium (Gibco) and the total number of round cells was enumerated by Malassez counting.

Blood monocytes, macrophages and lymphocytes isolation and seminal plasma exposure

Monocytes were purified from ficoll-density centrifuged peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by CD14 negative selection (MACS Miltenyi Biotec, Auburn, CA) according to manufacturer's instructions. Monocytes were either directly used or derived into macrophages (MDM for monocytes derived macrophages) by M-CSF (50 ng/ml) (Miltenyi Biotech) treatment for 6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum (FCS) (EurobioAbCys), 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (complete medium). CD4+ T lymphocytes were purified from PHA/IL2-stimulated PBMC by negative selection (Dynabeads Untouched Human CD4; Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and then stimulated with IL-2 (5 ng/ml) in complete medium for 24 h before use.

For seminal plasma exposure experiments, blood cells (monocytes, MDM and CD4+ T Lymphocytes) at 1.10^6 cells/mL in complete medium were exposed or not for 2h to 10% SP. Cells were then washed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.6) and stained for cytometry analysis, as described in the following paragraph.

Multi parametric flow-cytometric experiments

All antibodies were pre-titered to determine optimal staining amounts. For blood cells, Fc receptors were saturated before staining with 0.25µg/mL Fc block solution (BD Bioscience) for 10 min at RT. Amine-reactive red-orange dye (FVS620, BD Biosciences) was used to assess cell viability and to exclude dead cells from the analysis. Cells were stained for 30 min at 4°C with monoclonal fluorescent-dye conjugated antibodies, washed in PBS/1% fetal calf serum (FCS) and fixed in paraformaldehyde 1% PBS. Four different antibodies panels were used (supplementary material and methods S1). Corresponding isotype controls for all antibodies were validated at the same concentrations as the reference antibody. Acquisition was performed on a BD LSR Fortessa X-20 machine (BD Bioscience) equipped with four lasers (488, 561, 640 and 405nm). Diva software (BD Bioscience) was used for analyses.

Human colonic tissue ex vivo culture and transmigration assay

Colon specimens were obtained from patients undergoing colon resection for cancer or diverticulitis and provided by the "anatomo-cytophathology department" of Pontchaillou Hospital and approved by the Ethics Committee Ouest V, Rennes, France (authorization DC-2016-2783). Normal parts of resected tissues were processed within one hour after excision. After intensive washes, small fragments of 8 mm diameter including the epithelium and the submucosa were cut using a biopsy punch (Kai, Laboderm), and the tissue fragments were placed on a semi permeable transwell (3µm pore size, polycarbonate membrane, Falcon) with the submucosa facing the transwell. The tissue fragment was surrounded by agarose 3% and a polystyrene cylinder (I.D.H 4.7mm8 mm, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was sealed with veterinary glue (3M Vetbond, St. Paul, MN) onto the apical surface of the mucosa to avoid leakage. Specimen were placed in a 12-well plate, containing 0,6mL of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% Non-Essential Amino Acid, 1% Na-pyruvate, 1% HEPES buffer 1M (colon complete medium). 1.10^6 CFSE-stained seminal cells (total round cells population) in 100µl colon complete medium were added into the polyester cylinder on the apical side of the mucosa for transmigration assay for 1h. After abundant rinse with PBS, tissues were fixed in 4% PFA overnight and embedded in paraffin. The maintenance of the colonic epithelium integrity over the transmigration assay was assessed by immunostaining for ZO-1, E-cadherin and JAM-A adhesion molecules, as well as by the lack of 4kDa FITC Dextran beads passage across the epithelia, as previously described (Frouard et al, in preparation).

Immunofluorescent staining

Paraffin sections (5µm thickness) were deparaffinized, rehydrated, and incubated in an antigen-retrieval solution (10 mmol/L citrate, pH 6) for 40 minutes at 80°C followed by 15 min at RT.

Slides were saturated in 5% BSA tris buffer saline (TBS, pH 7.6) for 2h, and then incubated in a humid chamber with anti-CD68 (KP1, Dako, 2µg/mL), anti-CD163 (NCL, Leica, 0.5µg/mL) and anti-CD3 (SP7, Thermoscientific, 1µg/mL) antibodies or appropriate isotype controls in diluent Dako solution (Dako) at 4°C overnight. Slides were washed with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) PBS before incubation with secondary antibody, Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG for CD68/CD163 or Alexa Fluo 633 goat anti-rabbit IgG (10µg/mL Life Technology) for CD3, in diluent Dako solution (Dako) for 30 minutes at room temperature. Slides were washed with PBS and mounted in ProLong™ Gold Antifade Mountant medium with Dapi (Invitrogen).

Statistical analysis

Data were analyzed with nonparametric Mann-Whitney U test. Bonferroni's correction was applied for comparison between non-infected seminal cells, infected seminal cells, blood monocytes and MDM. Values were considered significant when P was less than 0.05/k (k= number of tests). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 software.

Results

Human seminal leukocytes transmigrate across the intact epithelium of human colonic mucosa ex vivo

To evaluate the potential of seminal leukocytes to penetrate the colonic epithelial layer, we used the polarized human colonic mucosa culture model that we previously developed (Frouard *et al.,* (in preparation) 2018). CFSE-stained seminal cells added to the apical side of the colonic mucosa were observed within 1h post exposure in the sub-epithelial layer by fluorescent microscopy, indicating their ability to rapidly transmigrate through the colonic epithelium (figure 1). The integrity of the colorectal barrier over the transmigration assay duration was verified by the absence of 4kDA FITC beads passage across the epithelia and the maintenance of the expression of the ZO-1, E-Cadherin and JAM-A adhesion molecules) (Frouard *et al.,* (in preparation) 2018). Immunostaining with CD3 and CD68/CD163 demonstrated that both seminal T-lymphocytes and monocytes/macrophages transmigrated across the colonic barrier (Fig 1a and b, respectively). These data indicate that both seminal macrophages and T lymphocytes have the ability to rapidly transmigrate through an intact columnar epithelium.

Donors' semen characteristics

Semen samples from 3 antiretroviral treatment naïve HIV-1-infected (HIV+) men and 12 non-infected (NI) men were analyzed. As expected, the number of CD45+ leukocytes/ml of semen was variable among individuals (median 3.1 x 10^6, range 0.7 -3.1 x 10^6 for HIV+ men and median 2.6 x 10^6, range 0.1 – 41.4 x 10^6 for NI), irrespective of HIV-1 infection (Table 1). Among the CD45+ leukocytes, HLA-DR+CD14+ myeloid cells represented a median of 22 % (range 11-37%) for HIV+ and 26% for NI (range 4,8-86%). CD3+ T lymphocytes represented a median of 11.5% (range 3,3-72%) for HIV+ and 1.2% (range 0,2-47%) for NI. Of note one HIV-1 donor (HIV+ 2) had an unusually high proportion of T lymphocytes in semen. The low number of CD3+ T lymphocytes in semen restricted the phenotypical analysis of seminal lymphocytes to 2 HIV+ donors (donor HIV+ 1 and HIV+ 2) and to 5 NI donors (NI 2,3,9,10,11).

Seminal monocytes/macrophages phenotype

We used a panel of antibodies to phenotype seminal myeloid cells in HIV+ and NI donors. Because they are widely used in CA transmission studies, blood monocytes and blood-derived macrophages were submitted to the same panel of antibodies for comparison of surface expression of a selection of phenotypic markers, adhesion molecules and chemokine receptors, including HIV co-receptors.

CD163 and CD206 are considered part of the "anti-inflammatory" M2 tissue macrophages markers. CD163 was expressed by a median of 100% (range 21-100%) of seminal myeloid cells from HIV+ donors and by a median of 85% (range 25-99%) of seminal myeloid cells from NI donors, while it was expressed by a median of 76 % (range 25-100%) of blood monocytes and a median of 77% (range 34-94%) of blood-derived MDM. CD206 was expressed by a median of 100% of seminal myeloid cells from HIV+ donors and by a median of 89% (range 1.7-100%) of seminal myeloid cells from NI donors, while it was expressed by a median of 56 % (range 1-81%) of blood monocytes and a median of 94% (range 68-100%) of blood-derived MDM (Figure 2a).

CD80 and CD86 are part of the "pro-inflammatory" M1 macrophages markers. CD80 was expressed by a median of 100% of seminal myeloid cells from HIV+ donors and by a median of 17% (range 1-100%) of seminal myeloid cells from NI donors, whereas they were expressed by a median of 27 % (range 0-49%) of blood monocytes and a median of 4% (range 0-91%) of blood-derived MDM (Figure 2a).

Overall, although the percentage of monocytes/macrophages expressing this four markers was heterogeneous among donors, seminal monocytes/macrophages phenotype from NI patients showed a tendency towards a more M2 -like phenotype, with an important proportion of cells expressing CD163 and CD206 (median 85% and 89% respectively), and a low proportion of cells expressing CD80 (median 17%). Interestingly, infection with HIV-1 resulted in a significant and massive increase of the proportion of CD80+ cells among seminal monocytes/macrophages (median: 100%). Although already high, the proportion of CD206 and CD86 + seminal monocytes/macrophages was also significantly increased in HIV-infected donors. These preliminary data suggest that HIV infection might upregulate expression of these markers, but this will need to be confirmed with additional HIV patients.

LFA-1, Mac-1, CD11c and CD103 (also known as Integrin a-E or ITAE) play a key role in leukocytes adhesion to epithelial cells and migration through mucosal barrier. Moreover, LFA-1 is an important component of the virological synapse, which mediates the efficient cell-to-cell transmission of HIV-1 (Jolly et al., 2004; Rudnicka et al., 2009). LFA-1 is a heterodimer formed by the

a-chain CD11a and the b-chain CD18, while Mac-1 is a heterodimer composed of the a-chain CD11b and the b-chain CD18. For all patients, most seminal monocytes/macrophages expressed LFA-1, Mac-1 and CD11c, as did blood MDM. In contrast, the proportion of LFA1 and CD11c + blood monocytes was markedly different among patients, with two patterns, i.e. patients with a very high proportion of LFA1 and CD11c + monocytes, and patients with an intermediate proportion of monocytes expressing these 2 markers (30 and 58%, respectively) (Figure 2b). CD103 was expressed by a median of 11,5% of seminal monocytes/macrophages, whereas only 3% of blood monocytes and 1,6% of MDM expressed this marker, as described (Cresswell et al., 2001). Within the small number of patients analyzed, HIV-1 infection did not significantly change the expression of these 4 integrins.

CCR2 and CX3CR1 are two chemokines receptors involved in adhesion and migration of monocytes (McCausland et al., 2015). Whereas the amount of CCR2 positive seminal monocytes/macrophages in NI donor was relatively low and homogenous between patients (except for 1 donor), the percentage of CX3CR1 positive monocytes/macrophages was very heterogeneous between donors, varying from 3 to 95% (median 23%) (Figure 2c). Regarding these 2 markers, seminal monocytes/ macrophages displayed a phenotype closer to blood MDM than to blood monocytes, which were almost all positive for CCR2 and CX3CR1 (median 81% and 97% respectively). The proportion of CCR2 and CX3CR1 + monocytes/macrophages did not significantly differ in HIV-infected semen. These results needs to be confirmed by the analysis of additional semen donors.

Finally, we studied the membrane expression of CCR5 and CXCR4, the two major co-receptors for HIV which are also involved in chemoattraction (Figure 2c). Whether in blood or semen, monocytes/macrophage surface expression of CCR5 and CXCR4 was highly heterogeneous among patients, ranging from 0 to 100% expression. Interestingly, despite this expression heterogeneity, the proportion of CCR5+ monocytes/macrophages was significantly lower in semen (median 32%, range 2-98) than in blood MDM (median 77.5%, range 12-100), and appeared closer to blood monocytes (median 7%, range 0-83). In 2 out of the 3 HIV+ patients, most seminal monocytes/ macrophages expressed CCR5 or CXCR4, but the small number of patients did not allow reaching significance (Figure 2c). Within the CCR5+ seminal monocyte/macrophage population, a majority of cell expressed CD163 (median 98.75%, range 91-100) and CD86 (median 100%), whereas only a small proportion of cells expressed CD80, CCR2, CXCR3, similarly to the general population of seminal monocytes/macrophages. In the two HIV patients with CCR5+ cells, all the CCR5+ population was positive for CD163, CD206, CD80 and CD86. In one patient, CCR5+ cells were positive for CXCR4, CCR2 and CX3CR1 whereas in another patient CCR5+ cells were mostly negative for these molecules (Figure 2d).

Semen T CD4 lymphocytes phenotype

We identified different subsets of CD4+ T lymphocytes based on their expression of CCR7 and CD45Ra. As expected, blood CD4+ T lymphocytes were mainly naïve (CCR7+ CD45Ra+, median 50%) and central memory (CCR7+ CD45Ra-, median 50%) T cells, whereas no effector memory (CCR7- CD45Ra-) or terminally differentiated CD4+ T cells (CCR7- CD45Ra+) were detected. In contrast, in semen, the majority (median of 60%) of CD4+ T lymphocytes had an effector memory phenotype and a median of 32% had a central memory phenotype. Interestingly, memory CD4+ T cells are HIV preferential targets and the main producers of viral particles (Brenchley et al., 2004; Mattapallil et al., 2005; Veazey et al., 2000). There were very few terminally differentiated CD4+ T cells in both semen and blood (Figure 3a).

In line with these results, the proportion of activated CD69+ CD4+ T cells was significantly higher in semen than in blood (median: 78.6% and 26%, respectively). CCR6, a marker of Th17 also expressed on subsets of effector and memory T cells, was detected on a small proportion of semen (median of 17%) and blood (median of 35%) T lymphocytes. Interestingly, the mucosal marker CD103 (also known as ITAE) showed a very heterogeneous expression among semen donors, labelling from 0 to 100% of CD4+ T lymphocytes, suggesting distinct origin for seminal lymphocytes between donors. As expected, blood lymphocytes lacked CD103 on their surface (Figure 3b).

The frequency of expression of HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 on seminal CD4 + T lymphocytes was heterogeneous between patients, ranging from 0 % to 60% (median 40%) for CCR5, and from 15% to 56% (median 33%) for CXCR4, the latter being significantly lower than for blood lymphocytes (median 100%). Interestingly, the seminal CD4+ T lymphocytes from the two HIV-1 donors analyzed did not express CXCR4, suggesting that HIV infection might downregulate its expression of this marker (Figure 3c).

All seminal CD4 T lymphocytes expressed the adhesion molecule LFA-1 at their surface, similarly to blood CD4+ T lymphocytes. The frequency of cell surface expression of the integrins Mac-1 and a4b7 (the latter present on gut homing mucosal T lymphocytes) on the surface of seminal CD4+ T lymphocytes differed between the 3 donors tested, with a 100% expression in 2 donors and a markedly lower expression in a third donor (22% expression for MAC-1 and absence of expression for a4b7). This suggests a mucosal origin for T lymphocytes in semen in a subset of donors (Figure 3d).

Lack of impact of SP exposure on the expression of selected blood cell markers

To evaluate whether semen compounds may modify the surface expression of the markers analyzed above on blood leukocytes, we exposed for 2h blood monocytes, macrophages and T lymphocytes to seminal plasma from NI donors. There was no significant change in the surface expression of any of the surface molecules tested (Figure 4), albeit CCR5 expression on monocytes showed a tendency to increase.

Discussion

We report here the phenotypical and functional characterization of human seminal monocytes/macrophages and CD4 T lymphocytes and their comparison with blood cells. We demonstrated the rapid transmigration, as soon as 1h, of seminal macrophages and T lymphocytes across colonic epithelium *ex vivo*. This transmigration ability seems to be similar to that of blood cells (Frouard et al., in preparation). As blood cells are largely use as surrogate to seminal cells which are more difficult to obtain, an overview of the phenotype of each of these cell populations is needed to determine their similarities and their differences. Because HIV infection can lead to leukocytes phenotype modification, it is important to take into account this factor and thus the seminal cell phenotype of HIV + and HIV- patients was compared.

We observed variable numbers of leukocytes in semen between donors in both NI and HIV-infected men, in line with observations in semen from SIV-infected macaques (Bernard-Stoecklin et al., 2013). However, we should note that there is a bias in the selection of NI donors because we selected samples containing more than $0{,}5.10^6$ round cells/ml to ensure sufficient leukocytes number for downstream experiments.

Our study focused on the monocytes/macrophages and CD4 T lymphocyte seminal populations, the two main HIV target cell types present in the semen, whereas DC are only scarcely found in human semen (Duan et al., 2014). Seminal monocytes/macrophages and T lymphocytes from HIV-infected men have been found to contain HIV DNA and to transmit HIV infection to reporter cells *in vitro* (Quayle et al., 1997). They are therefore major candidates for cell associated virus transmission. Moreover, it has been reported that a higher proportion of HIV infected men present leukocytospermia than NI men (as many as 24% of HIV infected men compared with 5–10% of healthy non-HIV-infected men) (for review (Anderson et al., 2010)). This underlines the importance of not neglecting these cells.

In our study we characterized and compared leukocytes isolated from semen just after and up to 4 hours post-ejaculation as well as blood macrophages derived monocytes (MDM), monocytes and blood CD4 T lymphocytes. Blood cells were prepared in accordance with studies using blood derived leukocytes in cell-associated transmission model. Blood MDM were differentiated into “M0” macrophages since other teams demonstrated transmigration using these cells (Carreno et al., 2002; Tugizov et al., 2011). CD4 T lymphocytes were activated by phytohaemagglutinin and IL2 exposure, a condition matching that used by Lawrence et al., and Kolodkin *et al.*, to show transmigration of T cells in an *in vitro* model of endometrial cells HEC-1 and an *ex vivo* colorectal model, respectively (Kolodkin-Gal et al., 2013; Lawrence et al., 2012).

We first characterized the seminal monocytes/macrophage phenotype. CD163 and CD206 are classical marker use to identified M2 subtype macrophages, described in tissues and involved in maintaining and balancing the microenvironment (Cassol et al., 2010). They present an anti-inflammatory profile, as opposed to M1 macrophages, which are pro inflammatory and those main markers are CD80 and CD86. Seminal cells from NI donors displayed a heterogeneous phenotype among donors in terms of CD163/CD206 and CD80/CD86 expression, but overall showed a tendency toward M2-like phenotype. In contrast to NI donors, seminal monocytes/macrophages from the 3 HIV-infected donors tested were all positive for CD80 and CD86. Because HIV infection induces macrophages differentiation toward a M1 phenotype *in vitro* (Cassol et al., 2010; Chihara et al., 2012), it would be tempting to speculate that at least part of these cells were infected and produced specific cytokines leading to an M1 switch of the cell population. However, a down regulation of typical M2 markers (e.g. CD206 and CD163) induced by HIV infection has been reported (Porcheray et al., 2006), whereas no significant difference between NI and HIV-infected samples were observed. All the studies describing an effect of HIV infection on the cell phenotype were performed using blood cells (Chihara et al., 2012; McCausland et al., 2015; Nabatanzi et al., 2018; Porcheray et al., 2006), which may explain why the same phenotypic changes were not observed for seminal cells. In our experimental design, a marker of infection could not be included in our antibody panels due to restriction in cell number and color channels available for flow cytometry , and therefore it is unknown whether these cells were infected or not. The percentage of seminal monocytes/macrophages positive for CCR5 was lower in semen than in blood monocytes but higher than in blood derived macrophages. CCR5 positive cells among infected donor's samples appeared to be more frequent than among NI donors, but this will need to be confirmed with additional donors. Unlike our results, in macaques' semen, a high proportion of monocytes/macrophages expressed CCR5 (around 70% of cells) independently of the infection status (Bernard-Stoecklin et al., 2013). This highlights the precautions to be taken regarding the use of macaque cells to mimic human cells. Interestingly, we have also highlighted that the population of monocytes/macrophages expressing the chemokine receptors CCR2, CXCR4 and CX3CR1 are systematically less numerous amongst seminal cells than amongst blood monocytes. Regarding these markers, seminal monocytes/macrophages appear closer to blood-derived macrophages. Of note, CXCR4+ cells were more numerous in infected macaques' semen compared to uninfected ones, although their proportion remained very low (3%) (Bernard-Stoecklin et al., 2013). In our case, we observed a higher proportion of positive CXCR4 cells (43%) than in the macaque model, but the low number of HIV-infected donors analyzed did not permit a reliable comparison. The lower equipment of seminal cells compared to blood monocytes in terms of chemokine receptors may impact their ability to be chemo-attracted. The higher level of chemokine receptors expression by blood monocytes is in line

with their function as circulating cells which can be recruited to specific sites during inflammation, in contrast to seminal monocytes/macrophages retained in genital organs. Similarly to blood monocytes and blood-derived macrophages, seminal monocytes/macrophages are well equipped for adhesion processes. Indeed, seminal monocytes/macrophages were all positive for LFA-1, Mac-1 and p150,95 (CD18/CD11c), irrespective of the infection status of the donors. This differs from chronically infected macaques seminal cells, where SIV infection decreased the proportion of positive cells for LFA-1 and up regulated Mac-1 expression (Bernard-Stoecklin et al., 2013). Again, further HIV-infected donors will need to be analyzed in order to compare. Overall, the high percentage of positive cells for adhesion molecules in human seminal monocytes/macrophages provides support for a role of HIV CA transmission. Because R5 virus are selectively transmitted after sexual intercourse (Margolis and Shattock, 2006), we focused on CCR5+ which displayed the same expression profile for all markers as the general population of seminal monocytes/macrophages. From our data, it appears that, as expected, seminal cells differ from blood cells on several aspects (phenotypical marker, chemokines receptor). The analysis of other patients will be crucial to validate or not the trends observed.

Because of their importance for HIV transmission, we next focused on T CD4 lymphocytes, which are normally present in semen in much lower proportion than monocytes/macrophages. The proportion of CD4+ T lymphocytes in semen was highly variable, especially among HIV+ donors (between 0,2 and 7% of total round cell population). Increased number of T cells may reflect genital inflammation, for instance caused by co-infections. In order to evaluate if, in fact, this high number of lymphocytes is due to a co-infection, a research of some common pathogens and viruses (Mycoplasma Genitalium, Trichomonas Vaginalis, Neisseria Gonorrhoeae, Chlamydia Trachomatis, Hepers-Simplex-Virus-2 and Cytomegalovirus) will be done on each donor seminal plasma sample. For most donors, the quantity of T lymphocytes in semen was below the flow cytometry detection threshold, thus limiting their study. In the donors who could be analyzed, we identified 2 subsets of seminal CD4 lymphocytes: effector memory and central memory. These memory cells were described to be more susceptible to infection than naïve cells and thus can constitute potent HIV Trojan horse during CA transmission (Rodriguez-Garcia et al., 2014). In contrast, no effector memory CD4+ T cells were recovered from blood and half of blood CD4+ T lymphocytes had a naïve phenotype, thus significantly differing from those of semen. These proportions in blood cells are in accordance with literature data (Okada et al., 2008). Semen T lymphocytes had a more activated phenotype than those in blood. Specifically, the early activation marker CD69 was more frequently expressed amongst semen lymphocytes than blood lymphocytes (mean 78% vs 26%). This higher expression of CD69, associated with other activation markers (CD25 and HLA-DR) was described as a profile typical of resident mucosal T cells (Prakash et al., 2001). In agreement, blood CD4+ T

lymphocytes did not express the mucosal marker CD103, whereas a high heterogeneity in the proportion of positive T lymphocytes was observed in semen (from 0 to 100% of cells expressed CD103). Thus it appears that at least a fraction of seminal CD4+ T lymphocytes have a mucosal origin. While their precise origin remains to be demonstrated, it is interesting to note that lymphocytes in the penile urethra express CD103 (Quayle et al., 1997), suggesting that at least part of semen leukocytes may arise from this site. Conversely, a lower proportion of semen CD4+ T cells (median 11%) than blood lymphocytes (median 35%) were positive for CCR6, a T helper 17 lymphocytes marker. This differs from the results of Osborne *et al.*, who found a higher number of CCR6 positive cells amongst semen T CD4 cells than amongst blood cells of the same patient for 13 patients. This difference in terms of proportion may be linked to the HIV+ status of patients they analyzed, as opposed to uninfected donors in our study. Moreover, we did not compare semen and blood cells from the same patient. Th17 cells are highly susceptible to HIV infection and postulated to constitute a reservoir for the virus (Gosselin et al., 2017). This marker was also described to mediate the trafficking of T cells to epithelial sites near mucosal surfaces during inflammation and immunological responses (Williams, 2004). It will be interesting to analyze the phenotype of seminal cells from HIV infected donors in order to evaluate if the proportion of CCR6 change. Finally, and similarly to seminal monocytes/macrophages, a high proportion of both seminal and blood lymphocytes expressed the adhesion molecules LFA-1, and Mac-1, in addition to a4b7, a homing integrin which confers trafficking properties to lymphocytes.

Overall, the high heterogeneity observed within seminal leukocytes for a majority of the markers studied may be linked to the various sources of these leukocytes (Anderson and Le Grand, 2014; Houzet et al., 2018). Thus, while epididymis is believed to represent an important source of semen leukocytes (Houzet et al., 2014), other male genital organs have been demonstrated as additional sources (Houzet et al., 2018) and leukocytes can potentially enter semen from a whole range of sites along the reproductive tract. Seminal monocytes/macrophages may be released into the seminal lumen of male genital organs or enter semen through passive diffusion from the blood along the male ducts. M1 macrophages may for example arise from the epididymis where they have been described within the epithelium (Zheng et al., 2017), whereas CD163+ and/or CD206+ macrophages may arise from the rete testis (Frungieri et al., 2002; Zheng et al., 2017). To date there are no detailed characterization of the monocytes/macrophages populations present in male genital organs. Further studies are thus needed to compare semen cell phenotype with semen producing organ cells phenotype and to clearly determine the origin of semen leukocytes.

Finally, we exposed blood leukocytes to seminal plasma in an attempt to determine whether this may shift their phenotype towards a seminal-like phenotype. A 2 hours exposure to 10% SP did not the modify blood cells' phenotype. A short exposure duration to SP was chosen to avoid the cytotoxic effect of SP described on lymphocytes (Okamoto et al., 2002), but this may prevent any significant effect. In contrast, exposure of DC to SP (dilution 1/5000; 5 days) changed their maturation state toward a tolorogenic phenotype (Remes Lenicov et al., 2012).

In conclusion, our results show that seminal leukocytes have transmigration capacities, at least across the colonic mucosa *ex vivo*, and display heterogeneous expression of mucosal, adhesion and activation markers among donors, which overall differ from those of blood leukocytes. One limitation of our study is the lack of antigen density quantification. This information will be crucial to deepen the seminal cell characterization and permit a more accurate comparison with blood cell and measurement of the effect of infection. Moreover, the low number of infected patients restricted our interpretation of infection effect. Thus additional donors will need to be included and further analyses performed, including assessment of the transcriptional landscape of seminal versus blood cells using DGE-seq.

References

Anderson, D.J. (2014). Modeling Mucosal Cell-Associated HIV Type 1 Transmission in Vitro.

Anderson, D.J., and Le Grand, R. (2014). Cell-associated HIV mucosal transmission: the neglected pathway. J Infect Dis *210 Suppl*, S606-8.

Anderson, D.J., Politch, J.A., Nadolski, A.M., Blaskewicz, C.D., Pudney, J., and Mayer, K.H. (2010). Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. AIDS *24*, 163–187.

Bernard-Stoecklin, S., Gommet, C., Corneau, A.B., Guenounou, S., Torres, C., Dejucq-Rainsford, N., Cosma, A., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2013). Semen CD4(+) T Cells and Macrophages Are Productively Infected at All Stages of SIV infection in Macaques. PLoS Pathog *9*, e1003810.

Brenchley, J.M., Schacker, T.W., Ruff, L.E., Price, D.A., Taylor, J.H., Beilman, G.J., Nguyen, P.L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A.T., et al. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. J Exp Med *200*, 749–759.

Camus, C., Matusali, G., Bourry, O., Mahe, D., Aubry, F., Bujan, L., Pasquier, C., Massip, P., Ravel, C., Zirafi, O., et al. (2016). Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4+ T-cell infection. AIDS *30*, 1197–1208.

Cardo, D.M., Culver, D.H., Ciesielski, C.A., Srivastava, P.U., Marcus, R., Abiteboul, D., Heptonstall, J., Ippolito, G., Lot, F., McKibben, P.S., et al. (1997). A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group. N. Engl. J. Med. *337*, 1485–1490.

Carreno, M.P., Chomont, N., Kazatchkine, M.D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A.S., Andreoletti, L., Matta, M., and Belec, L. (2002). Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. J Virol *76*, 32–40.

Cassol, E., Cassetta, L., Alfano, M., and Poli, G. (2010). Macrophage polarization and HIV-1 infection. J. Leukoc. Biol. *87*, 599–608.

Chancey, C.J., Khanna, K. V, Seegers, J.F., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., and Markham, R.B. (2006). Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. J Immunol *176*, 5627–5636.

Chihara, T., Hashimoto, M., Osman, A., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Suzu, I., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Okada, S., and Suzu, S. (2012). HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages. J. Immunol. *188*, 3620–3627.

Cresswell, J., Robertson, H., Neal, D.E., Griffiths, T.R., and Kirby, J.A. (2001). Distribution of lymphocytes of the alpha(E)beta(7) phenotype and E-cadherin in normal human urothelium and bladder carcinomas. Clin. Exp. Immunol. *126*, 397–402.

Doncel, G.F., Anderson, S., and Zalenskaya, I. (2014). Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment--implications for HIV transmission. Am J Reprod Immunol *71*, 564–574.

Duan, Y.G., Zhang, Q., Liu, Y., Mou, L., Li, G., Gui, Y., and Cai, Z. (2014). Dendritic cells in semen of infertile men: association with sperm quality and inflammatory status of the epididymis. Fertil Steril *101*, 70–77 e3.

Frouard, J., Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2018). In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. Virology *515*, 1–10.

Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Lustig, L., Meineke, V., Kohn, F.M., Vogt, H.J., and Mayerhofer, A. (2002). Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile

men. Fertil Steril *78*, 298–306.

Gosselin, A., Wiche Salinas, T.R., Planas, D., Wacleche, V.S., Zhang, Y., Fromentin, R., Chomont, N., Cohen, É.A., Shacklett, B., Mehraj, V., et al. (2017). HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. AIDS *31*, 35–48.

Van Herrewege, Y., Michiels, J., Waeytens, A., De Boeck, G., Salden, E., Heyndrickx, L., van den Mooter, G., de Bethune, M.P., Andries, K., Lewi, P., et al. (2007). A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. Antivir. Res *74*, 111–124.

Houzet, L., Matusali, G., and Dejucq-Rainsford, N. (2014). Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. J Infect Dis In press.

Houzet, L., Pérez-Losada, M., Matusali, G., Deleage, C., Dereuddre-Bosquet, N., Satie, A.-P., Aubry, F., Becker, E., Jégou, B., Le Grand, R., et al. (2018). Seminal Simian Immunodeficiency Virus in Chronically Infected Cynomolgus Macaques Is Dominated by Virus Originating from Multiple Genital Organs. J. Virol. *92*.

Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M., and Sattentau, Q.J. (2004). HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. J Exp Med *199*, 283–293.

Kolodkin-Gal, D., Hulot, S.L., Korioth-Schmitz, B., Gombos, R.B., Zheng, Y., Owuor, J., Lifton, M.A., Ayeni, C., Najarian, R.M., Yeh, W.W., et al. (2013). Efficiency of Cell-Free and Cell-Associated Virus in Mucosal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. J. Virol. *87*, 13589–13597.

Lawrence, P., Portran, D., Terrasse, R., Palle, S., Olivier, T., Fantini, J., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2012). Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. AIDS *26*, 785–796.

Liu, C.M., Osborne, B.J., Hungate, B.A., Shahabi, K., Huibner, S., Lester, R., Dwan, M.G., Kovacs, C., Contente-Cuomo, T.L., Benko, E., et al. (2014). The semen microbiome and its relationship with local immunology and viral load in HIV infection. PLoS Pathog *10*, e1004262.

Margolis, L., and Shattock, R. (2006). Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved? Nat. Rev. Microbiol. *4*, 312–317.

Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., and Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. Nature *434*, 1093–1097.

McCausland, M.R., Juchnowski, S.M., Zidar, D.A., Kuritzkes, D.R., Andrade, A., Sieg, S.F., Lederman, M.M., and Funderburg, N.T. (2015). Altered Monocyte Phenotype in HIV-1 Infection Tends to Normalize with Integrase-Inhibitor-Based Antiretroviral Therapy. PLoS One *10*, e0139474.

Nabatanzi, R., Cose, S., Joloba, M., Jones, S.R., and Nakanjako, D. (2018). Effects of HIV infection and ART on phenotype and function of circulating monocytes, natural killer, and innate lymphoid cells. AIDS Res. Ther. *15*, 7.

Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H., and Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. Int. Immunol. *20*, 1189–1199.

Okamoto, M., Byrn, R., Eyre, R.C., Mullen, T., Church, P., and Kiessling, A.A. (2002). Seminal plasma induces programmed cell death in cultured peripheral blood mononuclear cells. AIDS Res Hum Retroviruses *18*, 797–803.

Politch, J.A., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (2009). Depletion of CD4 + T Cells in Semen During HIV Infection and Their Restoration Following Antiretroviral Therapy.

Politch, J.A., Marathe, J., and Anderson, D.J. (2014). Characteristics and quantities of HIV host cells in human genital tract secretions. J. Infect. Dis. *210 Suppl 3*, S609-15.

Porcheray, F., Samah, B., Léone, C., Dereuddre-Bosquet, N., and Gras, G. (2006). Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production.

Prakash, M., Kapembwa, M.S., Gotch, F., and Patterson, S. (2001). Higher levels of activation markers and chemokine receptors on T lymphocytes in the cervix than peripheral blood of normal healthy women.

Quayle, A.J., Xu, C., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (1997). T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. J Infect Dis *176*, 960–968.

Remes Lenicov, F., Rodriguez Rodrigues, C., Sabatté, J., Cabrini, M., Jancic, C., Ostrowski, M., Merlotti, A., Gonzalez, H., Alonso, A., Pasqualini, R.A., et al. (2012). Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. J. Immunol. *189*, 4777–4786.

Rodriguez-Garcia, M., Barr, F.D., Crist, S.G., Fahey, J. V, and Wira, C.R. (2014). Phenotype and susceptibility to HIV infection of CD4+ Th17 cells in the human female reproductive tract. Mucosal Immunol *7*, 1375–1385.

Rudnicka, D., Feldmann, J., Porrot, F., Wietgrefe, S., Guadagnini, S., Prévost, M.-C., Estaquier, J., Haase, A.T., Sol-Foulon, N., and Schwartz, O. (2009). Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. J. Virol. *83*, 6234–6246.

Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., Manniοui, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejucq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. J Infect Dis *202*, 337–344.

Smith, D.C., Barratt, C.L., and Williams, M.A. (1989). The characterisation of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. Andrologia *21*, 319–333.

Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2010a). HIV infection of the male genital tract--consequences for sexual transmission and reproduction. Int J Androl *33*, e98-108.

Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2010b). Infection of semen-producing organs by HIV and role in virus dissemination. Med Sci *26*, 861–868.

Tugizov, S.M., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W.C., Levy, J.A., and Palefsky, J.M. (2011). Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia. J Virol *86*, 2556–2570.

Veazey, R.S., Mansfield, K.G., Tham, I.C., Carville, A.C., Shvetz, D.E., Forand, A.E., and Lackner, A.A. (2000). Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. J Virol *74*, 11001–11007.

Wallach, E.E., and Wolff, H. (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil. Steril. *63*, 1143–1157.

Williams, I.R. (2004). Chemokine Receptors and Leukocyte Trafficking in the Mucosal Immune System. Immunol. Res. *29*, 283–292.

Zheng, W., Wang, Y., Chen, J., Zhu, Y., Li, M., Fan, L., and Li, X. (2017). Identification and function analysis of macrophages subsets in chronically inflamed human epididymis.

Figure legends

Figure 1. Seminal leukocytes translocate accross the human colonic mucosa ex vivo.

1.10^6 CFSE-stained seminal cells were added to the apical side of colorectal explants for 1 h. Tissues were then washed and fixed with 4% paraformaldehyde. Immunofluorescence staining was performed to evidence the presence of CD68/163 monocytes/macrophages (red) and CD3 T lymphocytes (white). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Immunostained colon explants were examined using confocal microscopy and photographed at X63 magnification.

(a) The white square shows the transmigration of a seminal lymphocyte (in white and green).

(b) The white square shows the transmigration of a seminal macrophage.

Table1. Donors' semen characteristics.

[(a)]Millions of CD45+ cells per milliliters are calculated from the percentage of CD45+ cells into the total population of round cells.Median (mini-max).

[(b)] Monocytes/macrophages or T lymphocytes are identified on the basis of their expression of CD14/HLA-DR or CD3, respectively, among CD45+ cells. Median (%) (min-max).

N.D = Not Determined

B.D = Below Detection

Figure 2. Semen monocytes /macrophages phenotypical characterization and comparison with blood cells.

(a, b, c) Comparison of mono-stained CD14+/HLA-DR+ cells for each marker between seminal cells from NI donors (n = 4 or 11, black dot), seminal cells from HIV+ donors (n =1 or 3, red dot), blood derived macrophages from NI donors (n= 5 or 9, green dot), and blood derived monocytes from NI donors (n= 7 or 9, blue dot). Median are represented. For seminal cells, each symbol represents a patient

(d) Comparison of mono-stained CD14+/HLA-DR+/CCR5+ cells for each marker between seminal cells from NI donors (n = 5 or 11, black dot), and seminal cells from HIV+ donors (n =2, red dot). Median are represented. Each symbol represents a patient

Figure 3. Semen CD4 T lymphocytes phenotypical characterization and comparison with blood cells.

(a-d) Comparison of stained CD3+/CD4+ cells for each marker between seminal cells from NI donors (n = 3 or 5, black dot), seminal cells from HIV+ donors (for CCR5/CXCR4 only) (n= 2, red dot) and blood CD4 T lymphocytes from NI donors (n= 3, purple dot). Median are represented. For seminal cells, each symbol represents a donor.

Figure 4. Blood cells (monocytes, macrophages and lymphocytes) exposure to SP does not modify their phenotype.

Blood monocytes (top panel), macrophages (middle panel) and CD4 T lymphocytes (bottom panel) were exposed for 2h to medium alone (blue symbols) or containing 10% SP (green symbols). Cells were then washed and stained with the different antibodies panels. Proportions of positive cells was compared to seminal cells (black dot). Results are expressed in percentage of positives cells (seminal cells n= 3 to 11, blood monocytes n=5, blood macrophages and lymphocytes n= 5). Median are represented.

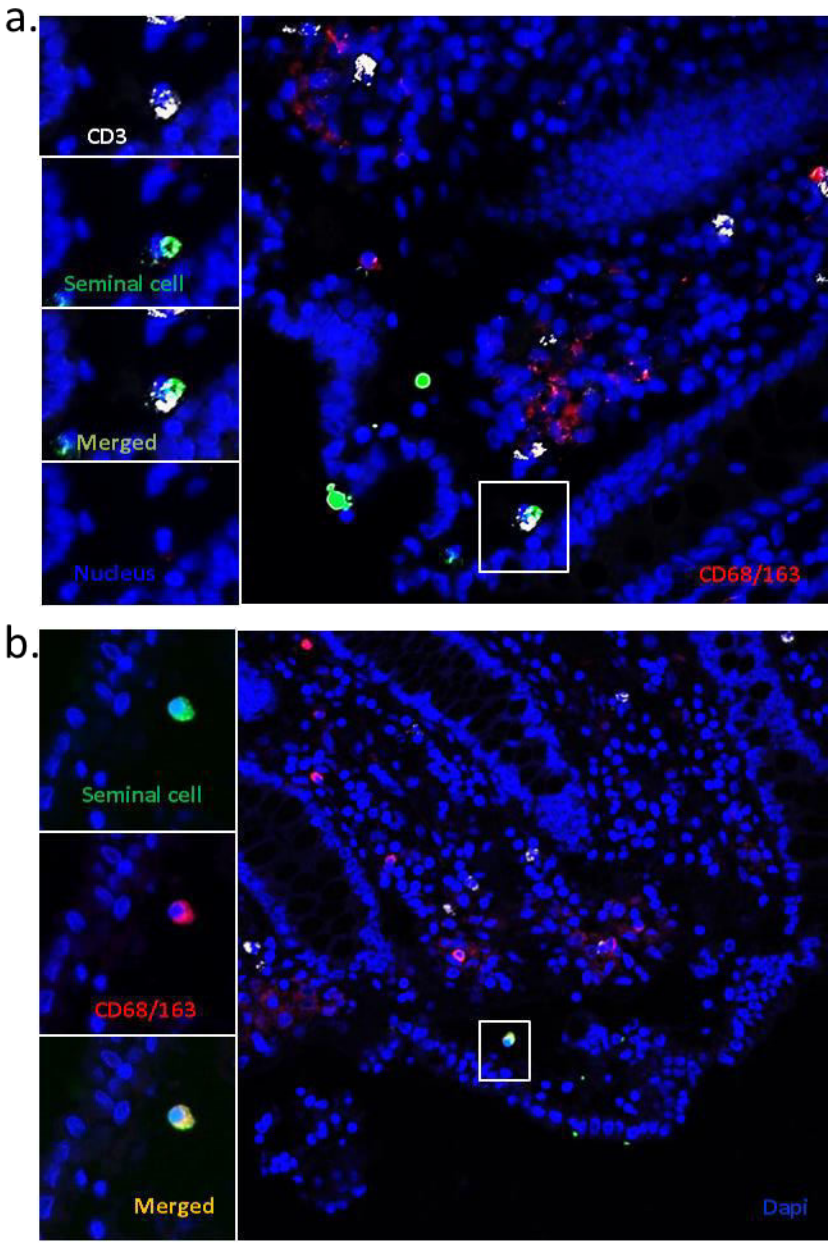


Figure 1. Seminal leukocytes translocate accross the human colonic mucosa *ex vivo*.

Donor	Nb of CD45+/mL ($x10^6$) [a]	Mono/Macro (%)[b]	T Lymphocytes (CD3+) (%)[b]	Semen VL (copy/mL)	Blood VL (copy/mL)	CD4 count (/mm^3)
HIV 1	3,6	37	3.3	N.D	N.D	N.D
HIV 2	0,7	11	72	51100	101100	455
HIV 3	3,1	22	11,5	98195	39266	593
Median	**3,1(0,7-3,6)**	**22 (11-37)**	**11,5 (3,3-72)**	-	-	-
1	1,3	32	B.D	-	-	-
2	0,2	47	7,7	-	-	-
3	6,7	26	1,7	-	-	-
4	3	50	0,5	-	-	-
5	41,4	83	B.D	-	-	-
6	0,1	86	B.D	-	-	-
7	2,2	24	1,2	-	-	-
8	1,4	6	0,2	-	-	-
9	6,4	10	0,8	-	-	-
10	5,8	4,8	1,7	-	-	-
11	4	7	4,3	-	-	-
12	0,2	20	1	-	-	-
Median	**2,6 (0,1-41,4)**	**26 (4,8-86)**	**1,2 (0,2-4,7)**			

Table 1. Donors' semen characteristics.

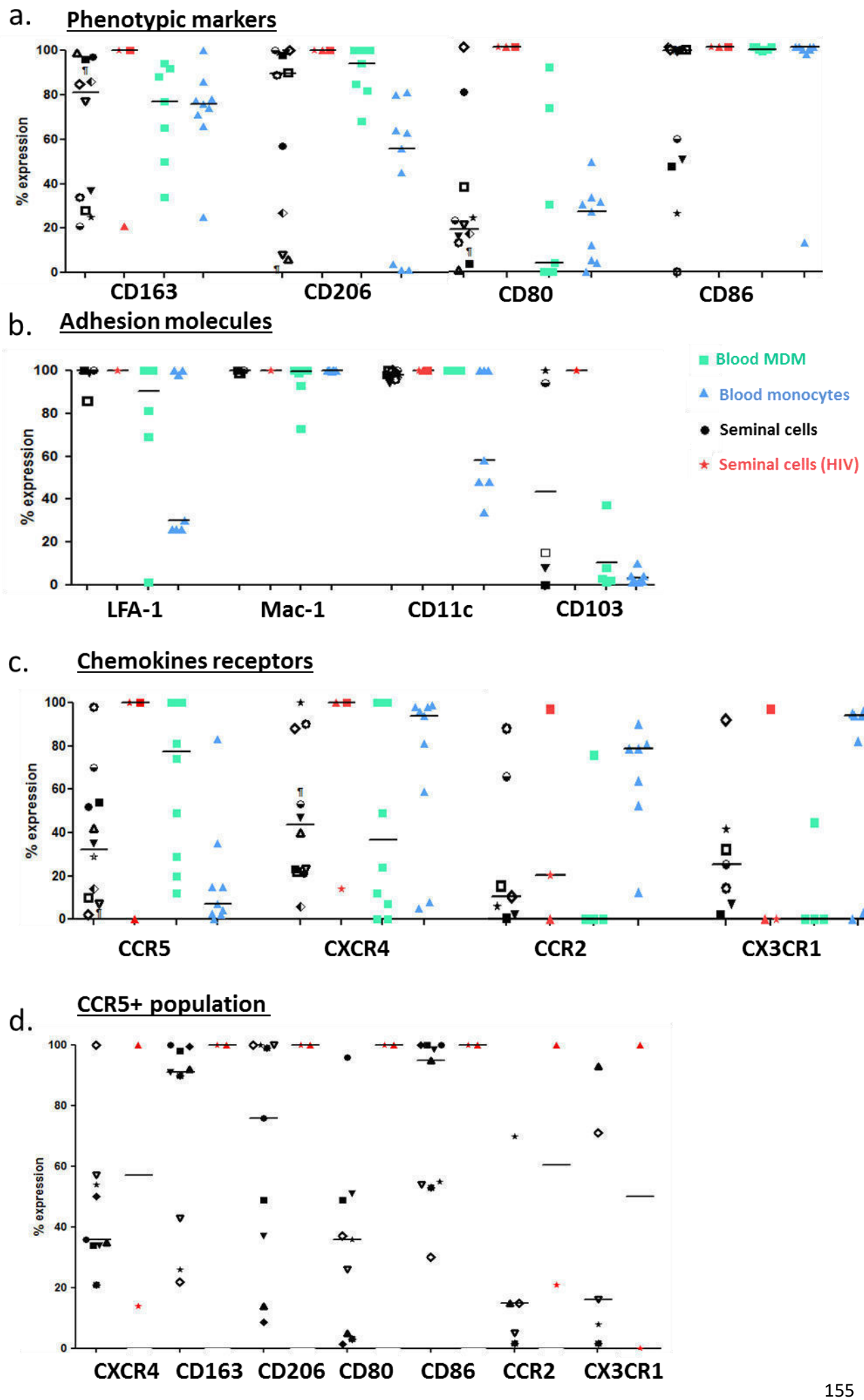


Figure 2. Semen monocytes /macrophages phenotypical characterization and comparison with blood cells.

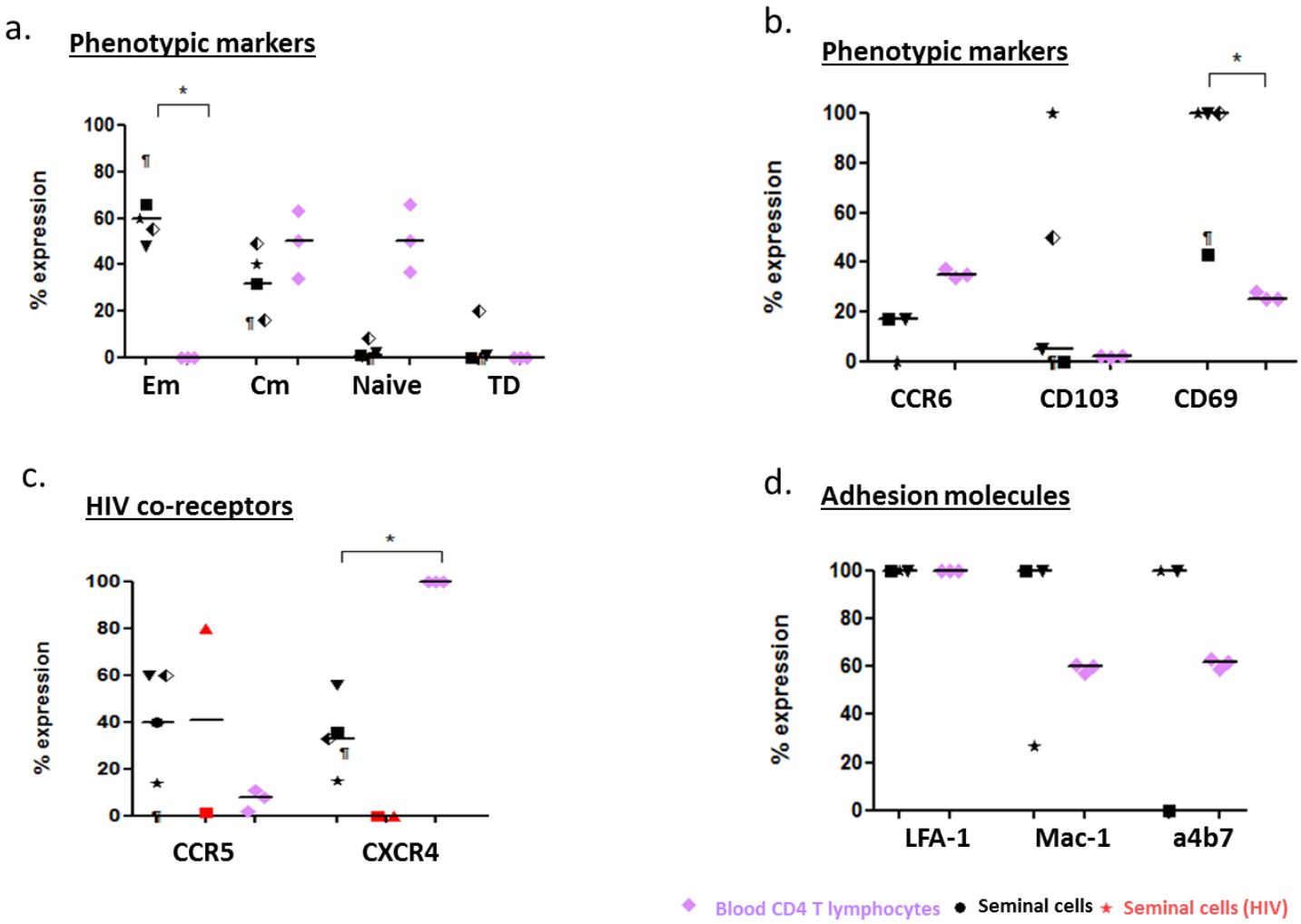


Figure 3. Semen CD4 T lymphocytes phenotypical characterization and comparison with blood cells.

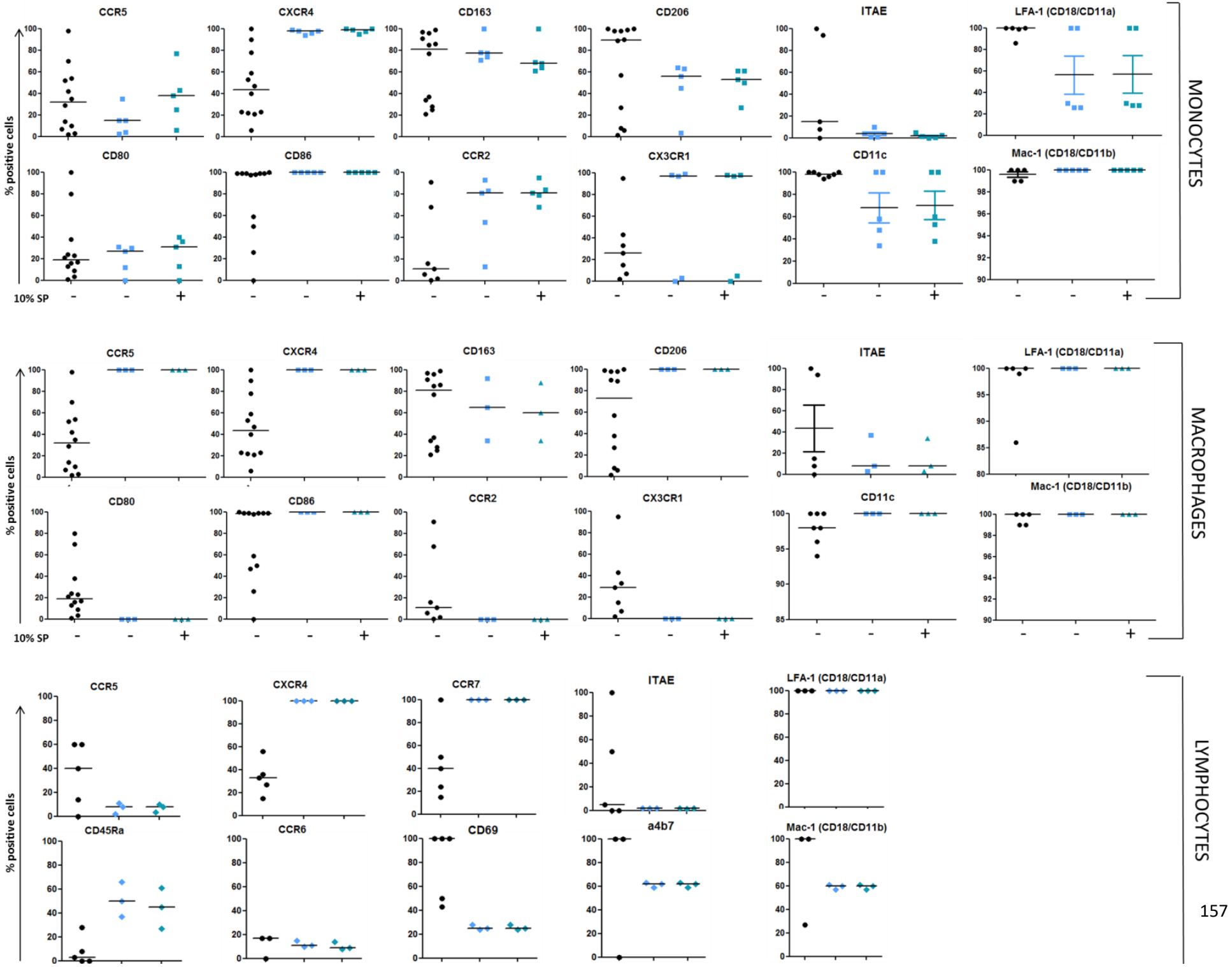


Figure 4. Blood cells (monocytes, macrophages and lymphocytes) exposure to SP does not modify their phenotype.

Supplementary

Antibody	Fluorochrome	C° (µg/mL)	Clone	Supplier
Backbone				
CD45	APC-H7	2.5	2D1	BD Biosciences
HLA-DR	BV510	10	G46-6	BD Biosciences
CD14	FITC	20	M5E2	BD Biosciences
CD4	APC-R700	1.25	RPA-T4	BD Biosciences
CCR5	BV421	2.5	3A9	BD Biosciences
CXCR4	PE	0.625	12G5	BD Biosciences
Panel 1 : Mono/macro characterization				
CD80	BV605	5	L307.4	BD Biosciences
CD86	PE-Cy7	5	FUN-1	BD Biosciences
CD163	BV650	5	GHI/61	BD Biosciences
CD206	BV711	10	19.2	BD Biosciences
CCR2	APC	5	48607	BD Biosciences
CX3CR1	PercP	17.5	2A91	BD Biosciences
CD11c	BV786	2	B-ly6	BD Biosciences
Panel 2 : Mono/macro adhesion				
CD18	BV650	2	6.7	BD Biosciences
CD11a	BV711	0.12	HI111	BD Biosciences
CD11b	BV786	20	ICRF44	BD Biosciences
CD103	APC	1.2	Ber-ACT8	BD Biosciences

Antibody	Fluorochrome	C° (µg/mL)	Clone	Supplier
Backbone				
CD45	APC-H7	2.5	2D1	BD Biosciences
CD3	BV510	1.2	HIT3A	BD Biosciences
CD4	APC-R700	1.25	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	FITC	17.5	RPA-T8	BD Biosciences
CCR5	BV421	2.5	3A9	BD Biosciences
CXCR4	PE	0.625	12G5	BD Biosciences
CD69	BV605	4	FN50	BD Biosciences
Panel 1 : Lymphocytes characterization				
CCR7	BV711	20	3D12	BD Biosciences
CD45RA	BV786	0.12	HI100	BD Biosciences
CD103	APC	1.2	Ber-ATC8	BD Biosciences
CCR6	BV650	1	11A9	BD Biosciences
Panel 2 : Lymphocytes adhesion				
CD18	BV650	2	6.7	BD Biosciences
CD11a	BV711	0.12	HI111	BD Biosciences
CD11b	BV786	20	ICRF44	BD Biosciences
A4 (CD49d)	APC	1.26	9F10	BD Biosciences
β7	PercP	49.5	FIB504	BD Biosciences

Protocol S1

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ma thèse était d'évaluer les mécanismes de transmission du VIH par les cellules infectées du sperme au niveau de la muqueuse colorectale, ainsi que d'évaluer l'effet du sperme sur cette transmission et cette muqueuse. Pour tenter de répondre à ces problématiques, nous avons développé deux approches distinctes mais complémentaires : - d'une part, l'analyse *in vitro* et *ex vivo* (dans un modèle cellulaire de CaCo2 et un modèle d'explants colorectaux humain) de la transmigration de leucocytes, et l'effet du LS, d'hommes infectés VIH ou non, sur ce mécanisme de passage et sur la barrière colorectale; - d'autre part, la caractérisation des leucocytes séminaux d'hommes VIH+ et séronégatifs et leur comparaison aux leucocytes sanguins classiquement utilisés dans les études de transmission associée aux cellules.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse m'ont permis de :

- mettre en évidence, pour la première fois à ma connaissance, la transmigration rapide, dès 1heure, de monocytes et de macrophages sanguins et séminaux à travers la barrière colorectale *in vitro* et *ex vivo*, et en présence de liquide séminal ;

- montrer un effet inhibiteur du LS sur la transmigration de ces deux types cellulaires en modèle CaCo2 sans modification de la barrière épithéliale. De plus, nous avons également montré un effet inhibiteur du LS sur l'adhésion des monocytes et des macrophages à la barrière épithéliale, première étape du mécanisme de transmigration ;

- amorcer la caractérisation du phénotype des monocytes/macrophages et lymphocytes présents dans le sperme d'hommes non infectés et infectés VIH. Nous avons ainsi pu mettre en évidence leurs particularités au regard des leucocytes sanguins ainsi que leurs similitudes notamment concernant leur équipement en termes de molécules d'adhésion.

Dans cette dernière partie, nous reviendrons sur les avantages et aussi les limites de chacune des approches et stratégies expérimentales choisies, et nous proposerons de nouvelles stratégies expérimentales qui pourront être mises en place pour approfondir et/ou poursuivre ce travail.

I. Choix des modèles d'études et des stratégies expérimentales

Nous avons utilisé des modèles d'études de la muqueuse colorectale qui tentent de répondre au mieux aux questions posées mais également de se rapprocher au maximum de la réalité physiologique. Nous justifierons ici le choix de ces modèles pour notre étude, préciserons leurs limites, et discuterons la possibilité d'explorer d'autres modèles d'études ou stratégies expérimentales.

Le modèle cellulaire in vitro CaCo-2

La lignée cellulaire colorectale CaCo2, issue d'un adénocarcinome de colon, a été utilisée afin de modéliser l'épithélium monostratifié de la muqueuse colorectale. D'une façon générale, les modèles de lignées cellulaires constituent des outils essentiels à la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de la transmission du VIH. Ils ont l'avantage d'être peu onéreux, faciles d'accès, produit facilement et permettent une bonne reproductibilité des expériences. La culture sur insert permet de polariser et compartimentaliser la culture cellulaire et ainsi de se rapprocher du modèle muqueux. Le pôle apical correspond à la lumière de la muqueuse, exposée au LS, alors que le pôle basal correspond au compartiment sous-muqueux où les cellules immunitaires, potentiellement cibles du VIH, sont présentes. La simplicité de ces modèles est à la fois une force puisqu'elle permet de bien identifier les éléments impliqués dans les mécanismes décrits et une faiblesse du fait de sa simplification sur le plan physiologique. En effet, la composition en lipides, protéines et la glycosylation des lignées transformées peut grandement différer des cellules primaires (Bomsel and Alfsen, 2003). Toutefois, nous avons montré que la monocouche polarisée de CaCo2, à l'instar de la muqueuse colorectale humaine, exprime les molécules d'adhésion E-Cadherine et JAM-A (données non présentées). En revanche, les CaCo2 polarisées expriment ICAM-1, qui n'est exprimée sur les cellules épithéliales coloniques humaines qu'en condition inflammatoire (Dippold et al., 1993).

Les cellules primaires, isolées à partir de tissus frais, constituent des modèles cellulaires permettant de s'affranchir des artéfacts potentiels liés à l'utilisation de cultures immortalisées, pouvant influer sur l'infection virale ou les mécanismes étudiés. Elles sont néanmoins plus difficiles à préparer et à maintenir en culture (pour revue (Arien et al., 2012; Frouard et al., 2018)). Certaines cellules épithéliales isolées peuvent être cultivées en monocouche polarisée de la même façon que les lignées. Toutefois, cette polarisation peut être plus difficile à obtenir (Bomsel and Alfsen, 2003). En effet, la purification des cellules primaires peut compromettre la fonction de la barrière épithéliale

et empêcher la reformation de jonctions serrées nécessaires à la polarisation. A ma connaissance, aucun modèle de culture primaire de cellules colorectales humaines n'a été mis au point.

Le modèle ex vivo de muqueuse colorectale

Afin de nous rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, et de valider les résultats de transmigration obtenus dans le modèle cellulaire, j'ai développé un modèle d'explants polarisés de tissu colorectal humain. Le modèle d'explants permet de reproduire une muqueuse plus complexe, comprenant à la fois les cellules épithéliales et les cellules immunitaires du donneur dans leur environnement tissulaire (Collins et al., 2000; Fletcher et al., 2006; Frouard et al., 2018; Merbah et al., 2011). La polarisation, quant à elle, permet d'assurer une application virale restreinte à la face apicale de l'épithélium afin de mimer au mieux les mécanismes de la dissémination virale. En effet, lors du contact entre les secrétions infectées du donneur et la muqueuse, c'est bien le pôle apical des cellules épithéliales qui est exposé. Cependant, le modèle explant colorectal possède un certain nombre de limites dont un maintien en culture particulièrement délicat, avec, dans nos conditions expérimentales, une mortalité cellulaire importante dès 12 heures, et une perte de l'intégrité de l'épithélium après 12 heures de culture, ce qui est en accord avec les données expérimentales d'autres équipes (Cavarelli et al., 2013; Fletcher et al., 2006; Kolodkin-Gal et al., 2013). Le maintien de l'intégrité de l'épithélium peut être prolongé jusqu'à 24h par l'utilisation d'un incubateur avec atmosphère enrichie en O_2 (Dezzutti et al., 2014). Malgré ce court maintien en culture, ce modèle nous a permis de mettre en évidence la rapide transmigration de leucocytes sanguins et séminaux, dès 1h.

Par rapport aux modèles *in vitro*, les résultats obtenus avec les modèles *ex vivo* sont assez variables selon les donneurs, ce qui peut compliquer l'interprétation des données (Arien et al., 2012; Grivel et al., 2000; Merbah et al., 2011). De plus, leur mise en place dépend de l'approvisionnement en tissu humain, qui peut être irrégulier. Pour notre étude, les tissus colorectaux proviennent de colectomies pour diverticulose et cancers non traités par radiothérapie ou chimiothérapie en vue d'assurer un épithélium intègre. Bien que seuls les tissus sains, déterminés comme normaux par l'examen anatomopathologique, soient utilisés, aucune donnée en dehors de l'âge n'est fournie, que ce soit l'existence ou non d'éventuelles coinfections, les traitements antibiotiques reçus, etc. Certains patients ne sont donc peut-être pas représentatifs de la situation dans la population générale. La qualité des tissus acheminés a été un problème majeur pour mon étude, une grande partie des explants étant inexploitables en raison d'une barrière épithéliale altérée, visible uniquement à l'issue des expériences sur les coupes de tissus. Nous avons en partie maîtrisé ce problème en sélectionnant

uniquement les tissus de colons non-inflammatoires et non issus de cancers traités par chimio ou radiothérapie, et en essayant d'obtenir les pièces opératoires dans un délai le plus court possible après le prélèvement, tout en maintenant le transit par le service d'anatomo-pathologie nécessaire à leur évaluation.

Une amélioration significative de la survie de l'épithélium colorectal serait nécessaire pour utiliser pleinement ce modèle ex vivo. A ce titre, il serait intéressant d'optimiser la culture polarisée par exemple via un système microfluidique permettant d'améliorer la circulation des gaz et nutriments, ou en modifiant la teneur en oxygène ou le milieu de culture utilisé. L'impression 3D pourrait peut-être permettre un meilleur maintien des cellules épithéliales au sein de structures spécifiques (scafolds). Hormis ces développements, seule un étude *in vivo* permettrait à présent d'étudier sur un temps long les interactions entre les différents acteurs (cellules épithéliales, particules virales, cellules immunitaires), ainsi que l'influence de divers facteurs tels que le microbiote ou l'environnement cytokinique. Le modèle simien constitue le modèle animal le plus adapté pour étudier la transmission sexuelle du VIH-1 (Miller et al., 1989)(pour revue (Fennessey and Keele, 2013)). Ce modèle comporte néanmoins lui aussi des limites comme un microbiote différent de celui de l'homme (pour revue (Dezzutti, 2015)). La disponibilité limitée des primates non humains et le coût important des expériences peuvent aussi être un frein au design expérimental.

Les leucocytes sanguins et séminaux

Hormis une étude (Maher et al., 2005), pour des raisons pratiques évidentes, toutes les études sur la transmission sexuelle du VIH ont utilisé des leucocytes d'origine sanguine pour mimer la transmission virale depuis les cellules infectées du sperme. Toutefois, on peut se poser la question de la pertinence de l'utilisation de leucocytes d'origine sanguine pour mimer des mécanismes concernant des leucocytes d'origine muqueuse (Houzet et al., 2014) et baignant dans le liquide séminal. Dans mon premier article de thèse, nous avons montré la transmigration de monocytes/macrophages sanguins à travers la barrière épithéliale colorectale *ex vivo.* Dans le deuxième article, nous démontrons que les macrophages/lymphocytes T séminaux sont également capables de transmigrer à travers l'épithélium colorectal. Ainsi, ces résultats montrent que les macrophages sanguins et séminaux ont tous deux la capacité de transmigrer à travers la barrière épithéliale colorectale. Toutefois, nous ne pouvons pas certifier que les molécules mises en jeu dans les mécanismes d'adhésion et de transmigration soient les mêmes. Bernard Stoeklin *et al.*, qui ont caractérisé les leucocytes séminaux simiens (Bernard-Stoecklin et al., 2014), ainsi que mes premiers

résultats sur la caractérisation des leucocytes séminaux humains, mettent en avant que les monocytes/macrophages séminaux possèdent des phénotypes variables (différentes proportions de cellules exprimant les marqueurs phénotypiques CD163, CD206, CD80 et CD86). Selon les marqueurs considérés, les cellules séminales se rapprochent tantôt des monocytes, tantôt des macrophages (résultats à confirmer par l'analyse d'un nombre de donneurs plus important). Elles présentent par exemple des niveaux d'expression des récepteurs aux chimiokines (CCR2, CX3CR1) plus proches des macrophages que des monocytes sanguins, sans les récapituler complètement. Ces dissimilitudes peuvent conduire à un chimiotactisme différent des cellules. Par contre, l'expression des molécules d'adhésion (LFA-1, Mac-1 et CD11c) est assez similaire, ce qui laisse supposer que les leucocytes d'origine sanguine puissent récapituler les propriétés d'adhésion des leucocytes séminaux. Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer la production de cytokines de ces différents types cellulaires. Leurs états d'activation n'étant pas les mêmes, il est fort probable que leurs profils sécrétoires diffèrent.

Dans notre étude, les macrophages dits sanguins dérivent de monocytes sanguins (MDM). Dans l'organisme, les MDM constituent une famille extrêmement hétérogène de cellules d'origine hématopoïétique. Les sous-populations présentent des caractéristiques phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles bien différentes qui peuvent également varier en fonction de leur localisation dans l'organisme. Très brièvement deux grands types de macrophages sont décrits selon leur état d'activation. Les macrophages de type M1, activés dit « classiquement » sous l'effet de cytokines appartenant à la réponse immune Th1 (IFNγ et TNFα), et les macrophages de type M2 activés « alternativement » induits par des cytokines Th2, l'IL4 et l'IL13 ainsi que différentes autres formes d'activation (pour revue (Gordon, 2003)). Alors que les macrophages M1 sont essentiels à la défense de l'hôte contre les pathogènes et les cellules tumorales grâce à un profil plutôt pro-inflammatoire, les macrophages M2 présentent un phénotype associé à des fonctions anti-inflammatoires et de réparation tissulaire. Dans notre étude, les monocytes ont été différenciés en MDM pendant 6 jours de culture en présence de 50ng/mL de M-CSF. Cela permet leur différenciation en macrophages M0, correspondant à un état de macrophage différencié mais non polarisé (pour revues (Gordon, 2003; Martinez and Gordon,2014). Notre étude (article 2) analyse pour la première fois le phénotype des macrophages séminaux. Nous montrons qu'ils ne peuvent être classés de façon catégorique dans l'une ou l'autre des populations classiquement décrites M1 ou M2 puisqu'ils expriment des marqueurs de ces deux populations. Nous avons fait le choix d'une différenciation au M-CSF des monocytes sanguins afin de nous placer dans les conditions utilisées par l'équipe de

Carreno *et al.*, dont l'étude est la seule démontrant la transmigration de MDM primaires à travers une barrière épithéliale polarisée (Carreno et al., 2002).

Liquides séminaux de patients séronégatifs et de patients séropositifs

Les expériences de transmigration, d'adhésion et les expositions de la barrière colorectale ont été réalisées avec des doses de 10 et 50% de LS. Lors du contact du LS avec la barrière colorectale, ce dernier est dilué par le mucus présent à la surface de l'épithélium, or l'importance de cette dilution n'est pas connue de façon précise. Nous nous sommes donc appuyés sur ce qui est décrit au niveau cervico-vaginal (Sharkey et al., 2007) et l'avons transposé à la muqueuse colorectale. Nos conditions d'exposition au LS sont d'ailleurs proches de l'unique autre étude s'intéressant à la transmigration de leucocytes sur une lignée épithéliale féminine en présence de LS (dose de 7% de LS) (Lawrence et al., 2012).

Choix des marqueurs de caractérisation des monocytes/macrophages

Lors de la conception des panels anticorps dédiés à la caractérisation des monocytes/macrophages séminaux et leur comparaison à ceux du sang, nous avons dû nous restreindre à un nombre de 14 marqueurs différents afin d'assurer une relativement bonne sensibilité dans la détection de populations rares ou exprimant faiblement certains marqueurs. Notre population de monocytes/macrophages a été sélectionnée sur la base de l'expression des marqueurs CD14 et HLA-DR. Afin d'étudier le phénotype des monocytes/macrophages, nous avons ensuite intégré des marqueurs classiquement associés aux macrophages M1 : CD80, CD86, et aux macrophages M2 : CD163 et CD206. Toutefois, il faut rester prudent dans l'interprétation des résultats, car, bien qu'encore classiquement utilisés pour classifier ces deux populations de macrophages (pour revue (Cassol et al., 2010; Zhi et al., 2017), l'expression distincte de ces marqueurs entre M1 et M2 est aujourd'hui remise en cause. C'est le cas notamment du marqueur CD206 pour lequel Jaguin et *al.,* n'ont observé aucune différence entre les macrophages M1 et M2 lorsqu'ils sont différenciés *in vitro* en présence de M-CSF et stimulés par l'IFN-γ pour l'orientation M1 ou de l'IL-4 pour l'orientation M2 (Jaguin et al., 2013). Les conditions de différenciation peuvent néanmoins avoir un rôle important sur le phénotype des cellules obtenues. De même, il a été montré dans les tissus humains que CD163 est un marqueur de macrophage M2 uniquement en combinaison avec le facteur de transcription CMAF. CD163 ne peut donc pas être considéré comme un marqueur M2 lorsqu'il est utilisé comme marqueur unique (Barros et al., 2013). Ces données nous montrent

qu'il faut rester prudent dans le choix des marqueurs et dans l'interprétation que l'on en fait. Il apparaît aujourd'hui que le simple phénotypage des macrophages sur la base des « quelques » marqueurs membranaires ne suffit pas et qu'il faudrait prendre en compte d'autres types de marqueurs, tels que l'expression génique de facteurs de transcription ou la sécrétion par les cellules de cytokines et de chimiokines.

II. PERSPECTIVES ET AUTRES STRATEGIES D'ETUDE

A. Effet du LS sur l'adhésion et la transmigration des monocytes/macrophages à la barrière épithéliale colorectale

i. Validation de l'implication de la molécule LFA-1 dans l'adhésion des MDM à la barrière épithéliale

Nous avons montré que le LS exerce un effet inhibiteur sur l'adhésion et la transmigration de monocytes/macrophages dans 2 modèles *in vitro* d'épithélium monostratifié de muqueuse colorectale (CaCo2 polarisées) et endométriale (HEC-1A polarisées). Nous avons ensuite cherché à expliquer cette diminution de l'adhésion induite par le LS. Nous avons sélectionné deux molécules d'adhésion principales, déjà décrites comme impliquées dans les phénomènes d'adhésion ou de transmigration de leucocytes à une barrière épithéliale (LFA-1 (Carreno et al., 2002), Mac-1 (Parkos et al., 1991)). Une analyse par cytométrie de flux nous a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de chacune des sous-unités composant la molécule d'adhésion LFA-1 (CD18/CD11a) après exposition au LS des MDM. Cela pourrait expliquer les effets du LS observés sur les capacités d'adhésion et de transmigration de ces cellules.

Afin de valider l'hypothèse de l'implication de LFA-1, il nous paraît primordial de réaliser des tests d'adhésion et de transmigration des MDM en présence d'anticorps neutralisants dirigés contre cette molécule d'adhésion. Il faudra potentiellement tester plusieurs anticorps neutralisants de LFA-1. En effet, LFA-1 possède plusieurs ligands potentiels (ICAM-1,2/3 et JAM-A) et les anticorps bloquent spécifiquement un site de liaison entre l'intégrine et son ligand (Driessens et al., 1996). Cela demande donc d'anticiper sur la liaison ligand/récepteur que l'on souhaite inhiber.

ii. Implication d'autres molécules d'adhésion ?

La sous-unité CD18 est commune à différentes intégrines, à savoir : LFA-1 (CD18/CD11a), Mac-1 (CD18/CD11b), p150/95 (CD18/CD11c) et CD18/CD11d. De ce fait, la diminution de la densité antigénique de CD18 à la surface des macrophages pourrait impacter chacune de ces molécules,

faisant de chacune d'elles un acteur potentiel intervenant dans l'adhésion et la transmigration. Afin de vérifier leur implication, l'approche la plus simple serait ici aussi des tests d'inhibition de l'adhésion par des anticorps neutralisants dirigés contre ces molécules. Une notion à garder en tête, est qu'un anticorps bloquant anti-CD18 ne bloquera pas simultanément toutes les molécules d'adhésion composées de cette sous-unité comme on pourrait l'imaginer. Si on souhaite bloquer collectivement toutes les molécules impliquant CD18, alors une approche par ARN interférence (siRNA) pourrait être envisagée, mais cette approche reste plus « globale » quant à l'identification du ou des facteurs impliqués dans l'adhésion et la transmigration.

D'autre part, nous avons pour l'instant limité notre investigation aux molécules d'adhésion exprimées par les leucocytes et déjà démontrées comme impliquées dans le phénomène de transmigration (Carreno et al., 2002; Parkos et al., 1991). Il serait judicieux d'élargir le panel de molécules investiguées, aussi bien du côté des leucocytes que du côté épithélial. Par exemple, les molécules ICAM-1, 2 et 3 constituent des pistes intéressantes puisqu'elles ont été démontrées comme nécessaires à la transmigration de monocytes à travers une couche de cellules épithéliales cervicales (Chancey et al., 2006). ICAM-1 en particulier, présent sur les monocytes et les macrophages, trouve son ligand Mac-1 exprimé sur les cellules épithéliales colorectales (Hussain et al., 1995). Une baisse dans le niveau d'expression d'ICAM-1 pourrait alors engendrer une diminution de l'adhésion. Une première expérience d'exposition des monocytes au LS n'a pas montré de modification dans les niveaux d'expression d'ICAM-1, que ce soit en termes de nombre de cellules positives pour le marqueur ou en termes de densité antigénique (résultats non présentés). Il faudrait maintenant, d'une part confirmer ces résultats et d'autre part évaluer s'il en est de même pour les macrophages. Afin de ne pas se limiter aux seules molécules les plus décrites, une approche bio-informatique visant à modéliser toutes les interactions possibles (ligand/récepteur) impliquant des molécules d'adhésion entre les cellules épithéliales colorectales et les monocytes et macrophages, a été initiée avec le logiciel Amen, développé au sein de l'équipe sur la base de données protéomiques de la littérature. Cette analyse pourrait nous permettre de dégager une liste plus ou moins conséquente de molécules candidates impliquées dans les phénomènes d'adhésion. Etant donné qu'on ne sait pas à l'heure actuelle si les mécanismes d'adhésion des monocytes et des macrophages sont similaires, on peut imaginer avec cette approche pouvoir identifier et se focaliser sur des molécules exprimées de façon spécifiques par chacun de ces types cellulaires.

Un autre moyen d'identifier les acteurs impliqués dans les effets observés serait une analyse comparative par PCR-array des différents types cellulaires exposés ou non au LS. Ce type d'analyse pourrait nous permettre de dégager des protéines candidates dont l'expression au niveau ARN est

modulée par le LS. Leur implication dans les phénomènes observés en présence de LS nécessitera ensuite une validation par test de neutralisation. Toutefois, la rapidité de l'inhibition, observée dès 1h d'exposition au LS, rend peu probable l'existence d'un mécanisme régulé uniquement au niveau transcriptionnel.

Une fois le ou les acteur(s) impliqué(s) dans l'adhésion et la transmigration mis en évidence dans notre modèle cellulaire CaCo2, une validation dans le modèle tissulaire sera nécessaire puisque des différences dans les molécules d'adhésion exprimées par ces deux modèles d'épithélium peuvent exister. Nous pensons par exemple à la molécule ICAM-1. Alors qu'elle est absente des cellules épithéliales colorectales primaires (Dippold et al., 1993; Vainer et al., 2003), elle est décrite comme exprimée par les CaCo2 (Kaiserlian et al., 1991). Cela soulève d'une part les limites du modèle cellulaire (comme évoqué au début de cette discussion) et d'autre part la nécessité de valider les molécules candidates en modèle tissulaire.

iii. Possibles mécanismes responsables de l'inhibition par le LS de l'adhésion et la transmigration des monocytes et macrophages

Outre l'identification des molécules d'adhésion impliquées, nous souhaitons mettre en évidence les mécanismes qui sous-tendent l'effet inhibiteur du LS sur la transmigration et l'adhésion des monocytes et des macrophages aux barrières épithéliales testées.

- Le LS pourrait engendrer l'internalisation de molécules d'adhésion impliquées dans les phénomènes de transmigration et d'adhésion. Afin de vérifier cette hypothèse, on pourrait traiter les cellules épithéliales ou bien les monocytes ou macrophages avec un inhibiteur de l'endocytose, tel que la cytochalasine D et évaluer si une exposition au LS engendre toujours un effet.

- le LS pourrait induire un changement dans les signaux d'adressage à la membrane de molécules impliquées dans l'adhésion. Un traitement des cellules avec un inhibiteur du transport intracellulaire tel que la Brefeldine A pourrait donc être envisagé préalablement à l'exposition au LS.
Ces deux premiers points ont fait l'objet d'expériences préliminaires qu'il faudra répéter et auxquelles des contrôles supplémentaires devront être ajoutés afin de pouvoir conclure.

- La présence de nombreuses métalloprotéines (MMP) dans le sperme pourrait avoir un impact sur des protéines d'adhésion et les dégrader. Une déplétion du LS de ces MMP nous renseignera sur leur rôle éventuel dans les effets observés.

- Le LS étant un fluide très riche, certains de ses composants pourraient activer des molécules dites anti-adhésives. Ces molécules anti-adhésives sont bien décrites dans les phénomènes de transmigration de polynucléaires du côté basal vers le côté apical d'un épithélium ou d'un endothélium lors d'une réaction inflammatoire (diapédèse). Elles sont exprimées du côté luminal (donc apical) des épithéliums et permettent le relargage des cellules transmigrantes. Des études ont par exemple montré que des anticorps bloquants dirigés contre CD55, ou CD44 exprimés sur l'épithélium colorectal (Brazil et al., 2010; Lawrence et al., 2012) (pour revue (Reglero-Real et al., 2016)) bloquaient le relargage dans la lumière colorectale des polynucléaires transmigrants. Nous pourrions procéder de la même manière, c'est à dire avec des anticorps neutralisants, et vérifier si la présence de LS induit malgré tout une diminution de l'adhésion. Nous pourrions également vérifier en cytométrie de flux si l'expression de molécules anti-adhésives telles que CD55 ou CD44 sont surexprimées en présence de LS.

D'autre part, certains des composants du LS peuvent agir directement comme agent anti-adhésif. C'est le cas de l'oxyde nitrique (NO). Ce dernier a été principalement étudié au niveau endothélial puisqu'il est constitutivement produit par ces cellules. Une inhibition de sa production est associée à une augmentation du rolling et de l'adhésion des leucocytes à la barrière endothéliale (pour revue (Kanwar and Kubes, 1995). Dans notre cas, le NO produit par les cellules du sperme (leucocytes, spermatozoides…) pourrait exercer un rôle inhibiteur sur l'adhésion des monocytes et des macrophages à la barrière épithéliale (Sabeti et al., 2016).

Afin d'écarter ou au contraire de valider cette hypothèse, des inhibiteurs des synthétases d'oxyde nitrique (NOS) pourraient être ajoutés au LS afin de le dépléter en NO.

- Une autre hypothèse serait une saturation ou une compétition des récepteurs que sont les molécules d'adhésion par un ou plusieurs composants présents dans le LS. Le LS contient plusieurs milliers de protéines, mais aussi des lipides, des sucres etc… Une première approche visant à dégrader de façon spécifique les lipides (par cycles de congélation/décongélation), ou les sucres (par chauffage) ou les protéines (par un traitement à la trypsine ou à la pronase) (Rennemeier et al., 2011; Sabatte et al., 2007) permettrait de renseigner sur la nature de la molécule recherchée. Nos premiers essais ne nous permettent pas de dégager un type de composé principal impliqué, d'autant que des contrôles supplémentaires sont requis pour valider et certifier nos observations.

- Enfin, une étude récente a isolé des « vésicules extracellulaires » présentes dans le sperme et qui inhibent la liaison du virus Zika à la barrière épithéliale colorectale (Müller et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs n'ont cependant pas identifié le mécanisme exact par lequel ces vésicules inhibent

l'adhésion des virus, mais on peut imaginer que le même type de composé vésiculaire soit à l'origine de nos effets.

L'analyse bio-informatique initiée mentionnée plus haut vise à modéliser les différentes combinaisons de ligand/récepteur possibles entre les molécules exprimées sur les cellules épithéliales ou sur les monocytes et/ou sur les macrophages, mais également présentes sous forme soluble dans le LS. Cette analyse permettra de rechercher des molécules solubles du sperme qui pourraient être des ligands des molécules d'adhésion en jeu et agir ainsi par compétition. Afin de valider ou exclure les molécules sélectionnées, l'étape suivante consistera à enrichir le milieu de culture avec cette molécule et vérifier si l'on reproduit les effets observés avec le LS. Nous pourrons également dépléter le LS de la/des molécules suspectée(s) et mesurer s'il garde son effet inhibiteur.

B. Caractérisation des leucocytes séminaux

Le deuxième volet de ce travail correspondant au second article présenté dans ce manuscrit a porté sur la caractérisation des leucocytes séminaux, en particulier les monocytes/macrophages et les lymphocytes T CD4, qui sont les cellules cibles du VIH présentes dans le sperme. Les analyses déjà réalisées nous ont permis de mettre en évidence des différences phénotypiques entre les différents types cellulaires comparés. Toutefois cette analyse devra impérativement être complétée par : (i) l'inclusion de donneurs supplémentaires ; (ii) l'analyse des médianes d'intensité de fluorescence, en partie manquantes à ce jour ; (iii) une étude à large échelle au niveau transcriptomique des caractéristiques propres aux populations de cellules séminales et de leur hétérogénéité.

i. Détermination de l'origine des leucocytes du sperme

Bien que plusieurs hypothèses coexistent, l'origine des leucocytes du sperme n'est aujourd'hui pas clairement établie. Les monocytes/macrophages séminaux semblent présenter un phénotype plutôt M2 avec une majorité des cellules exprimant les marqueurs CD206, CD163. Nous avons également noté que la très grande majorité des monocytes/macrophages séminaux exprimaient aussi le marqueur CD86 et peu le marqueur CD80. Les lymphocytes eux, présentent en majorité un phénotype mémoire et leur proportion est très différente entre les patients concernant le marqueur muqueux CD103. Nous discuterons dans cette partie du phénotype des leucocytes présents dans les différents organes du TGM afin de les comparer au phénotype des macrophages et lymphocytes séminaux que nous observons.

D'après les données bibliographiques (cf introduction partie II.B.iii), l'épididyme constitue la source la plus probable et la plus importante des leucocytes séminaux (Anderson et al., 1991; Houzet

et al., 2018; Wallach and Wolff, 1995). Bien que la majorité des études décrivant les cellules immunes des organes du TGM s'intéressent à la localisation de ces cellules plus qu'à leur phénotype, il est décrit que les macrophages intraépithéliaux de l'épididyme représentent la population immunitaire prédominante dans cet organe (pour revue (Hedger et al., 2015)). Il est communément admis que les macrophages expriment les marqueurs CD14 et HLA-DR. Toutefois, deux études se contredisent quant à l'expression de l'HLA-DR par ces macrophages intraépithéliaux. La première, réalisée chez la souris, décrit ces macrophages comme dépourvus de l'expression de l'HLA-DR (Nashan et al., 1989). Une seconde étude plus récente, réalisée chez l'homme, décrit la population de macrophages comme exprimant les marqueurs CD68, iNOS et HLA-DR et présentant un profil M1 donc plutôt pro-inflammatoire (Zheng et al., 2017). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par la différence d'espèce souris/homme, mais dans le même temps ils nous questionnent sur notre stratégie de gating. En effet, nous nous sommes basés sur la co-expression de CD14 et de l'HLA-DR pour sélectionner la population de macrophages séminaux. Toutefois, la totalité des cellules CD14+ expriment HLA-DR chez tous nos patients (données non montrées). D'autres études s'intéressant aux autres organes du TGM décrivent la présence de macrophages CD14+ présentant une forte expression de CD163 dans le tissu interstitiel testiculaire (Ponte et al., 2018; Wang et al., 2017). Cela est associé à un phénotype plutôt M2 de ces macrophages. A l'inverse très peu de macrophages exprimant CD80 et CD86 sont retrouvés au sein de ce tissus interstitiel (Wang et al., 2017). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence la présence de deux populations de macrophages au sein du testicule avec des origines distinctes : une population de macrophages péritubulaires dérivant de la moelle osseuse, et une population de macrophages interstitiels avec une origine embryonnaire (Mossadegh-Keller et al., 2017). Il est aujourd'hui décrit que les macrophages tissulaires ont pour origine un progéniteur embryonnaire. Après la naissance, les progéniteurs embryonnaires ne se renouvellent pas, la population macrophagique tissulaire est donc progressivement et plus ou moins rapidement (selon les organes) remplacée par les macrophages dérivés de monocytes issus de la moelle osseuse (Murray, 2017). Aujourd'hui le rôle de ces macrophages embryonnaires dans la persistance du VIH et la formation de réservoirs est au cœur des recherches (Clayton et al., 2017).

Concernant la seconde population de leucocytes qui nous intéresse, dans l'urètre il est décrit que la majorité des lymphocytes T intraépithéliaux présente un phénotype mémoire et exprime le marqueur CD103 (Nguyen et al., 2014). Au vu de nos résultats et de l'hétérogénéité des proportions de cellules positives pour les divers marqueurs, il apparait que les monocytes/macrophages et les lymphocytes T CD4 retrouvés dans le sperme ne représentent pas des populations avec une origine unique. Dans ce sens, une étude récente du laboratoire a mis en évidence que les populations de virus libre et de cellules infectées retrouvées dans le sperme de macaques avaient des origines

variables selon les individus (Houzet et al., 2018). Si l'on souhaite effectivement déterminer avec précision l'origine des leucocytes séminaux, il serait nécessaire de caractériser pour chaque patient les populations de leucocytes séminaux en parallèle des leucocytes des organes du TGM, ce qui ne serait possible que chez le modèle simien.

ii. Stratégies expérimentales permettant une caractérisation plus globale et plus fine du phénotype des leucocytes séminaux

La démarche d'analyse par cytométrie de flux que nous avons utilisée pour caractériser les leucocytes du sperme nous a permis de mettre en exergue des différences entre les leucocytes du sperme et ceux du sang et d'apporter de nouvelles données quant à l'équipement protéique des cellules séminales. Pour autant, la limite de cette technologie demeure le nombre limité de marqueurs qu'elle permet d'étudier simultanément. Plusieurs technologies pourraient permettre une caractérisation plus complète des cellules. La technologie CyTOF, qui est en plein essor est une technologie qui allie cytométrie et spectrométrie de masse. Comme la cytométrie, l'analyse se fait à l'échelle de la cellule unique. Elle permet l'analyse de 40 dimensions simultanément (correspondant aux paramètres tels que la taille, la granulosité, les fluorochromes en cytométrie classique, mais ici utilisant des isotopes ce qui évite les problèmes de débordement spectral de la cytométrie). De plus, la technologie CyTOF a l'avantage de rendre possible la détection simultanée de protéines, d'ARNm, la synthèse d'ADN, des activités enzymatiques (pour revue (Spitzer and Nolan, 2016)). Grace à cette technique, nous pourrions par exemple nous concentrer sur les cellules infectées spécifiquement. Chose que nous n'avons pas pu mettre en place dans nos panels actuels du fait de contraintes techniques (nécessité de perméabiliser les cellules pour un marquage de la protéine virale p24, ce qui n'était pas possible dans nos conditions de marquage). Cette approche ouvre ainsi de nouvelles possibilités dans le domaine des biosciences en fournissant un outil capable de capturer différents aspects du comportement cellulaire simultanément dans des millions de cellules individuelles. A titre d'exemple, le CyTOF a permis de montrer de façon intéressante qu'une sous-population de lymphocytes T CD4 mémoires exprimant fortement le marqueur CD127 pouvait être infectée par le VIH mais de façon non-productive (Cavrois et al., 2017). Elle a également permis de confirmer qu'une sous-population de lymphocytes T CD4 exprimant les marqueurs CD32a, LILRA2, CD57 et NKG2C était plus sujette à l'infection persistante par le VIH, la caractérisation fine de ces cellules latentes étant un enjeu majeur à la guérison complète des patients infectés (Coindre et al., 2018).

Une autre approche que nous projetons d'utiliser afin de compléter notre étude est la technologie « Digital Gene Expression », plus couramment appelé « DGE-Seq ». Il s'agit d'une

technique s'apparentant au « RNA-seq » visant à rechercher des différences dans les niveaux d'expression de gènes entre différents échantillons (pour revue (McDermaid et al., 2018)). Dans le cas du « DGE-Seq », le séquençage des gènes se fait en 3', ce qui nécessite une couverture de séquençage moins importante qu'un « RNA-Seq » classique. D'autre part, chaque séquence est couplée à un code barre, ce qui permet le multiplexage de plusieurs échantillons et donc une économie certaine. Cela permet d'envisager le criblage d'un nombre de patients plus important. Dans notre cas, nous comparerons les profils transcriptomiques des monocytes/macrophages du sperme de patients séronégatifs et de patients VIH+ avec ceux du sang. Cette analyse transcriptomique nécessite un isolement en amont des cellules d'intérêt que nous réaliserons par FACS sur la base des marqueurs choisis pour discriminer la population de monocytes/macrophages. La limite principale de cette approche réside dans cette étape de tri, puisque les cellules séminales restent peu nombreuses. De ce fait, il ne sera pas possible d'isoler les cellules infectées, trop rares, afin d'étudier de façon spécifique leur profil.

Ces deux approches, CyTOF et DGE nous obligent à travailler avec *a priori,* ce qui signifie qu'on travaille sur des populations cellulaires que l'on sélectionne sur la base d'expression de marqueurs choisis et que l'on considère comme homogènes. A ce titre, l'idéal serait d'utiliser des approches totalement non biaisées, telle que le single-cell RNA-Seq (scRNA-Seq), qui bien que couteux, pourrait permettre de déterminer si le profil transcriptionnel de monocytes, macrophages ou lymphocytes séminaux infectés diffère de ceux non-infectés, et si oui sur la base quel(s) marqueur(s). En effet, une étude très récente a par exemple démontré par une approche de scRNA-Seq que la réactivation du VIH dans ces cellules latentes s'accompagne d'un changement de programme transcriptionnel (signature de 134 gènes), illustrant ainsi l'hétérogénéité existante entre cellules infectées et non infectées en terme d'expression génique (Golumbeanu et al., 2018).

Enfin, et d'un point de vu plus global, notre étude portant sur la caractérisation des leucocytes séminaux sera complétée par des analyses des spermes de patients infectés ou non, du contenu en cytokines via des approches de dosages multiplex (type Luminex) et par la recherche de co-infections qui peuvent avoir un impact sur le phénotype des cellules séminales en modifiant potentiellement l'environnement inflammatoire local.

CONCLUSION

Mon travail de thèse fournit de nouvelles données concernant la transmission du VIH-1 au niveau colorectal par les cellules infectées du sperme et concernant l'effet de ce fluide sur cette transmission. Les résultats obtenus démontrent, pour la première fois, la capacité de transmigration des cellules séminales à travers la barrière colorectale humaine. Ces cellules représentent donc des acteurs importants dans la transmission du VIH-1 au niveau de cette muqueuse. D'autre part, nos données sont en faveur d'un rôle « inhibiteur » du liquide séminal sur le passage par transmigration des cellules infectées. Bien que nous ayons identifié une expression diminuée des sous-unités composant la molécule d'adhésion LFA-1 lors de l'exposition des macrophages au LS, l'ensemble de mon travail ne permet pas d'identifier clairement les molécules mises en jeu dans ces phénomènes. Une caractérisation fine des cellules séminales et un approfondissement des connaissances sur les mécanismes d'adhésion en jeu sont une priorité afin de dégager de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Il apparait évident aujourd'hui que dans le cadre de nouvelles stratégies vaccinales, l'inhibition de la transmigration de cellules infectées sera à prendre en compte afin de prévenir la transmission muqueuse du VIH-1.

ANNEXES

Liste des publications et communications

PUBLICATIONS

- Tcherniuk S, Cenac N, Comte M, **Frouard J**, Errazuriz-Cerda E, Galabov A, Morange PE, Vergnolle N, Si-Tahar M, Alessi MC, Riteau B.(2016) Formyl Peptide Receptor 2 Plays a Deleterious Role During Influenza A Virus Infections.J Infect Dis.214:237–47

- Giulia Matusali, Laurent Houzet, Anne-Pascale Satie, Dominique Mahé, Florence Aubry, Thérèse Couderc, **Julie Frouard**, Salomé Bourgeau, Karim Bensalah, Sylvain Lavoué, Guillaume Joguet, Louis Bujan, André Cabié, Gleide Avelar, Marc Lecuit, Anna Le Tortorec, and Nathalie Dejucq-Rainsford (2018) Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. J Clin Invest. 128(10):4697–4710

Revue :

- **Julie Frouard**, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford (2017) In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. Virology 515:1-10

- **Frouard J**, Le Tortorec A, Dejucq-Rainsford N (2017) Comprendre les mécanismes de transmission sexuelle des virus apports et limites des modèles in vitro. Virologie 22(1):9-26

COMMUNICATIONS ORALES

- **Julie Frouard**, Giulia Matusali, Anne-Pascale Satie, Roxane Valentin, Laurent Sulpice, Célia Ravel, Nathalie Rioux-Leclercq, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford. *HIV cell-associated transmission in the colo-rectal mucosa ex vivo and its modulation by seminal plasma* **6ème Journée des Jeunes Chercheurs de l'Irset, Rennes,** 11 Janvier 2017

- **Julie Frouard**, Giulia Matusali, Anne-Pascale Satie, Roxane Valentin, Laurent Sulpice, Célia Ravel, Nathalie Rioux-Leclercq, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford. *Transmission du VIH associée aux cellules à travers la muqueuse colorectale ex vivo et modulation par le liquide séminal* **4ème Journée Scientifique Sidaction, Paris,** 9 Février 2017

- **Julie Frouard**, Giulia Matusali, Anne-Pascale Satie, Roxane Valentin, Laurent Sulpice, Célia Ravel, Nathalie Rioux-Leclercq, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford. *Transmission du VIH associée aux cellules à travers la muqueuse colorectale ex vivo et modulation par le liquide séminal* **XXe Journées Francophones de Virologie, Paris,** 9 Février 2017

POSTERS

- **Frouard J**, Le Tortorec A, Satie A-P, Matusali G, Rioux-Leclercq N,Jégou B, Dejucq-Rainsford N. Transmission colo-rectale du VIH par les cellules infectées du sperme et effet du liquide séminal ex vivo. **Université des Jeunes Chercheurs 2015** organisée par Sidaction à **Carry-le-Rouet**, du 10 au 16 octobre 2015.

- **Julie Frouard**, Giulia Matusali, Anne-Pascale Satie, Nathalie Rioux-Leclercq, Laurent Sulpice, Célia Ravel, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford. HIV cell-associated transmission in the colo-rectal mucosa ex vivo and its modulation by seminal plasma. **9th IAS Conference on HIV Science, Paris**, 24 Juin 2017

- **Julie Frouard**, Giulia Matusali, Anne-Pascale Satie, Nathalie Rioux-Leclercq, Laurent Sulpice, Célia Ravel, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford. Transmission du VIH associée aux cellules à travers la muqueuse colorectale ex vivo et modulation par le liquide séminal. **XIXe Journées Francophones de Virologie, Paris**, 30-31 mars 2017

Virology 515 (2018) 1–10

Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virology

In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level

Julie Frouard, Anna Le Tortorec, Nathalie Dejucq-Rainsford*

Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset – Inserm UMR 1085), F-35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Genital mucosa
Sexually transmitted viruses
in vitro models

ABSTRACT

Sexually transmitted viruses infect the genital and colorectal mucosa of the partner exposed to contaminated genital secretions through a wide range of mechanisms, dictated in part by the organization of the mucosa. Because understanding the modes of entry into the organism of viruses transmitted through sexual intercourse is a necessary prerequisite to the design of treatments to block those infections, *in vitro* modeling of the transmission is essential. The aim of this review is to present the models and methodologies available for the *in vitro* study of the interactions between viruses and mucosal tissue and for the preclinical evaluation of antiviral compounds, and to point out their advantages and limitations according to the question being studied.

1. Introduction

The objective of this review is to present the methodologies available for the *in vitro* study of how sexually transmissible viruses enter the human organism and to describe their advantages and limitations according to the question to be studied. *In vitro* approaches are essential to the study of the sexual transmission of pathogens for several reasons: (i) through the use of human primary cells and human tissues, they bring us closer to the physiology and specificity of humans, thus differing from animal models, especially rodents, which cannot be directly extrapolated to humans and require cross-validation studies; (ii) *in vitro* analysis enables sequential dissection of the events leading to mucosal infection, from the mechanisms of crossing the epithelial barrier to host recognition of pathogens, induction of the local immune response, and finally infection of the target cells; iii) modeling this transmission at the mucosal level is an essential tool for developing and testing compounds aimed at preventing it; (iv) the use of human cells and tissue responds to societal ethical concerns about animal experimentation. Optimal use of these models nonetheless requires a careful determination of their advantages and their limitations.

After briefly describing the mucosal sites likely to be exposed to viruses present in genital secretions and the different mechanisms of infection, we will present a panorama of the *in vitro* study models available. Finally, we will delineate in more detail the studies conducted until now and the relevance of each model according to the event sequence under study.

2. Mucosa exposed to viruses present in genital secretions

As a general rule, the organization and specific cell composition of mucosa dictate the mechanisms of viral transmission. The types of mucosa likely to be exposed to a sexually transmissible virus are single or multiple layers of epithelial cells, more or less keratinized, that lie on a lamina propria made up of fibroblasts, immune cells, and scattered blood vessels bordered by endothelium and a deeper layer of muscle cells. A thick mucus covers mucosal epithelial cells and thus represents the first physical barrier to the exterior environment. The effectiveness of the epithelial cell barrier varies according to its thickness and organization. By secreting cytokines, chemokines, and antimicrobial compounds, epithelial cells also constitute a chemical barrier and thus play a critical role in the organism's defense against pathogens (for review (Nguyen et al., 2014)). These cells play a dual role, both responding directly to pathogens and signaling this aggression to the cells of the innate and adaptive immune systems. Specifically, mucosal

Abbreviations: BSA, Bovin Serum Albumin; CCL5, Chemokine Ligand 5; CCR7, Chemokine Receptor Type 7; CD, Cluster of Differentiation; CMV, Cytomegalovirus; DC-SIGN, Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin; DNA, Deoxyribonucleic Acid; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; GFP, Green Fluorescent Protein; HIV, Human Immunodeficiency Virus; HPV, Papillomaviruses; HSV, Herpes Simplex Virus; HTLV-1, human T-cell lymphotrophicviruse 1; IFNβ, Interferon Beta; IL, Interleukin; IRF3, Interferon Regulatory Factor 3; LDH, Lactate Dehydrogenase; MIP-1α, Macrophage Inflammatory Protein; MTT, dimethylthiazol diphenyl tetrazolium; NFκB, nuclear factor-kappa B; NK, Natural killer; PCR, Polymerase Chain Reaction; PHA, Phytohemagglutinin; PRRs, pattern recognition receptors; RNA, Ribonucleic Acid; SDF-1, Stromal cell-Derived Factor 1; SEVI, Semen-derived enhancer of Virus Infection; Th17, T Helper 17; TNFα, Tumor Necrosis Factor; VZV, Varicella-Zoster Virus; ZO-1, Zonula Occludens

* Corresponding author.
E-mail addresses: julie.frouard@univ-rennes1.fr (J. Frouard), anna.letortorec@univ-rennes1.fr (A. Le Tortorec), nathalie.dejucq-rainsford@univ-rennes1.fr (N. Dejucq-Rainsford).

https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.023
Received 2 October 2017; Received in revised form 13 November 2017; Accepted 28 November 2017
Available online 06 December 2017
0042-6822/ © 2017 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/BY/4.0/).

epithelial cells express, depending on their tissue origin, a repertoire of pattern recognition receptors (PRRs) that enable them to recognize the different antigenic stimuli to which they are exposed. Generally, PRR recognition of a viral or bacterial antigen leads to the secretion of a panel of proinflammatory cytokines (such as IL-6, IL-8, TNFα, and SDF-1), of β-chemokines (MIP-1α and −1β) but also of IFNβ, which plays a major role in the development of antiviral immunity (for review (Nguyen et al., 2014)).

2.1. Female genital mucosal tissue

The vagina, ectocervix, and endocervix are the principal gateways in women for viruses transmitted by semen. A stratified squamous epithelium coats the mucosa of the vagina and of the ectocervix; its thickness ranges from 15 to 30 cell layers and, for the vagina, varies during the menstrual cycle. Memory T lymphocytes, mostly CD8+, and Langerhans cells embedded in these epithelia play an important role in viral transmission, especially of the human immunodeficiency virus (HIV) (for review (Shattock and Moore, 2003)). The lamina propria of these epithelia contains resident and recirculating (CD4 + CCR7 + CD69-) memory T cells, monocyte-derived macrophages and dendritic cells, while B lymphocytes and NK cells are rarer there (Shen et al., 2009; Swaims-Kohlmeier et al., 2016; Trifonova et al., 2014). Dendritic cells are mostly myeloid, with a CD11b + CD14 + mucosal phenotype that differentiates them from conventional dendritic cells (Duluc et al., 2013; Rodriguez-Garcia et al., 2017; Shen et al., 2014a, b) and express a particular C-type lectin, DC-SIGN, which plays a primordial role in the capture and transmission of several infectious agents, including HIV and cytomegalovirus (CMV) (Trifonova et al., 2014). Typically, the mucosal concentration of immune cells is clearly lower in the vagina and the ectocervix than in the endocervix or endometrium.

A simple columnar epithelium coats the mucosa of the endocervix and the endometrium; underneath are present numerous lymphoid clusters composed of B lymphocytes surrounded by CD8+ T lymphocytes, a halo of macrophages and scattered CD4+ T lymphocytes, preferentially Th17, dendritic cells, and numerous NK cells (Nguyen et al., 2014; Rodriguez-Garcia et al., 2014, 2017). The specific expression of CD103 by dendritic cells of the endometrium may play a critical role in maintaining immune tolerance in the uterus (Rodriguez-Garcia et al., 2017; Stary et al., 2015). Unless an embryo is implanted, the endometrial mucosa is eliminated at the end of each menstrual cycle, thereby transiently enabling the deepest layers of the endometrium to be exposed to pathogenic agents.

Between the ectocervix and the endocervix lies the transformation zone, expressed histologically by an abrupt change in the epithelial surface, from stratified to simple. The mucosa of the transformation zone contains the most immune cells of any site in the female genital tract and is therefore considered to be most sensitive to infection by HIV and papillomaviruses (HPV) (Pudney et al., 2005).

2.2. Male genital mucosal tissue

The foreskin and the penile urethra are the two entryways for sexually transmitted infections in men (Pudney and Anderson, 2011). The foreskin is coated by a stratified keratinized epithelium, least keratinized on the internal face in contact with the glans (Ganor et al., 2010), in which Langerhans cells and numerous memory CD8 + T lymphocytes are embedded. The immune cells in the lamina propria are mostly macrophages and memory T cells, essentially CD8 + (Anderson et al., 2011). The penile urethra, coated by a columnar, nonkeratinized, pseudostratified epithelium, evolves toward a nonkeratinized and then keratinized stratified epithelium at the distal urethral meatus. Macrophages, memory CD8+ T lymphocytes, and Langerhans cells are embedded in the stratified epithelium. NK cells, memory CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and naive T lymphocytes are present in the lamina propria of the pseudostratified epithelium (Nguyen et al., 2014). Most T lymphocytes in the lamina propria or infiltrating the urethral epithelium have a memory phenotype and express CD103 (αEβ7 integrin) an adhesion molecule that enables lymphocytes to adhere to epithelial cells (Pudney and Anderson, 2011). Dendritic cells are not found in the urethral mucosa.

2.3. Anal and colorectal mucosal tissue

The anal mucosa is formed by a stratified keratinized epithelium. The colorectal mucosa, located just above the anal mucosa, is formed by a simple columnar epithelium. Numerous immune cells are sparsely distributed in the lamina propria of this epithelium: CD4+ and CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes, NK, dendritic and Langerhans cells, as well as numerous CD14+ CD68+ CD163+ DC-SIGN+ macrophages with an M2 (anti-inflammatory) phenotype. T lymphocytes population is particularly dense in area of lymphoid aggregate. T lymphocytes essentially CD8+ are additionally located sparsely intraepithelially. These numerous immune cells make this mucosa a privileged site for the entry of viruses targeting immune cells, such as HIV (Cerf-Bensussan and Guy-Grand, 1991; Isidro and Appleyard, 2016; Preza et al., 2014). Between the mucosa of the anus and that of the colon, the epithelium of the transformation zone or anorectal junction is stratified and nonkeratinized.

2.4. Modes of infection of mucosa exposed to genital secretions (Fig. 1)

Sexually transmissible viruses, such herpes simplex viruses (HSV) or papillomaviruses, can productively infect the epithelial cells that cover mucosal tissues. To propagate the infection to subepithelial targets, viruses that do not productively infect epithelial cells (*e.g.,* HIV or the human T-cell lymphotrophic viruses HTLV-1 and 2) require either impairment of the integrity of the epithelial barrier or establishment of a mechanism of infection that will override this barrier. Accordingly, the virus may reach the subepithelial target cells by: i) simple diffusion across breaches that result from micro-abrasions of the epithelial barrier during sexual intercourses or the presence of inflammation associated with a prerequisite infection of the mucosa; ii) capture of viral particles by extensions of submucosal dendritic cells, which thus participate in both submucosal and systemic viral dissemination; iii) active passage of infected cells between epithelial cells by transmigration, without impairment of the integrity of the epithelial barrier; iv) transcytosis across the epithelial barrier of viral particles, either free or from infected cells, that is, the polarized, vesicular transport of viral particles inside epithelial cells, from the apical towards the basal pole, without productive infection of the cell being crossed (for review, (Anderson et al., 2010; Shen et al., 2014a, b)).

Despite the expression of tight junctions between epithelial cells, simple epithelia are thinner and more fragile than stratified epithelia and thus more susceptible to breach formation. Inversely, fainter junctions are observed in stratified epithelia; these promote epithelial infiltration by immune cells, which may be the targets of viruses such as HIV and thus contribute to the propagation of viral infection.

The effect of hormones on mucosal tissues, their microbiota, and their exposure to genital fluids during sexual relations are all factors that can influence their infectivity (Burgener et al., 2015). For example, semen stimulates proinflammatory cytokine production by female epithelial cells and thus promotes the activation and recruitment of immune cells, which are potential targets of pathogens (Doncel et al., 2014, 2010). Mucosal exposure to genital fluids may also modulate expression of adhesion molecules expressed by epithelial cells, including the tight junction proteins such as ZO-1 and claudins (Lawrence et al., 2012; Mullin et al., 2017). Several cationic peptides present in semen increase the infectivity of HIV and CMV *in vitro* by promoting viral attachment to cells through electrostatic interactions (Munch et al., 2007; Roan et al., 2014). However, in HIV infection this effect is counteracted by CCL5, a chemokine increased in the semen of HIV-

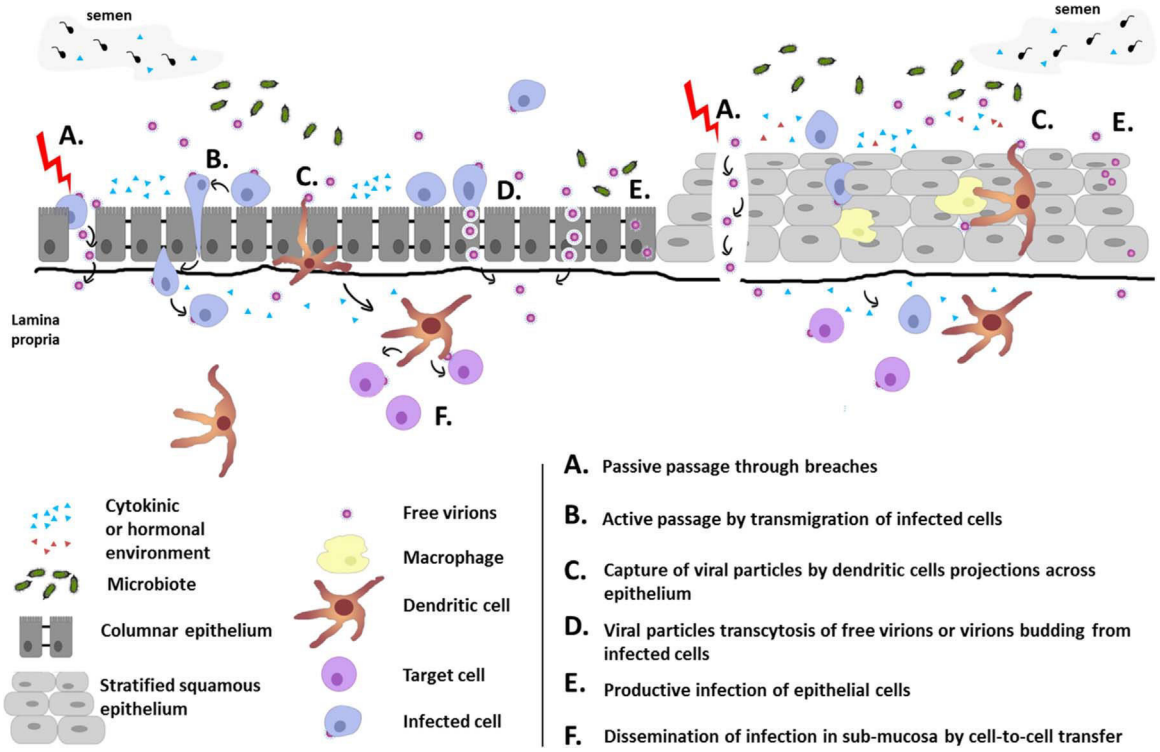


Fig. 1. Mechanisms underlying mucosal transmission of sexually transmitted virus. (A) Infected cells or viral particles may cross the epithelial barrier through breaches; (B) Infected cells may migrate between epithelial cells to infect susceptible host cells in the lamina propria (transmigration) without disrupting the barrier; (C) Sub-mucosal dendritic cells in columnar epithelia or dendritic cells embedded in stratified epithelia may capture luminal virions through their projections across the epithelia and transmit them to target subepithelial cells. (D) Viral particles transcytosis of free virions or virions budding from infected cells to infect target cells in the sub-mucosa. (E) Productive infection of epithelial cells. (F) Sub-mucosa infection dissemination by cell-to-cell transfer.

infected men and that inhibits viral entry into CD4+CCR5+ T lymphocytes (Camus et al., 2016). Moreover, other substances in semen such as clusterin and mucin 6 inhibit the HIV binding to dendritic cells mediated by DC-SIGN (Sabatte et al., 2011; Stax et al., 2009). Thus genital secretions, *via* their effects on pathogens, epithelial cells, and mucosal immune cells, can influence infection.

3. Panorama of different types of *in vitro* study models

We present below a general description of the different models that have been developed for the *in vitro* study of mechanisms of mucosal infection by sexually transmissible viruses (Fig. 2).

3.1. Cultures of immortalized epithelial cells

The cell lines used to study the infection of mucosal tissue are either epithelial cells isolated from an adenocarcinoma (*e.g.,* HeLa cervical cells) or cell lines immortalized by transduction with a retroviral vector, such as endometrial HEC-1, endocervical End1/E6E7, colorectal Caco-2. The advantage of these cell lines is that they are well characterized, standardized, and, unlike all primary models, an easily accessible biological material. Moreover, it is simpler to experiment gene silencing by siRNA or gene overexpression in cell lines than in primary cells, although the new gene editing technology CRISP/Cas9 has now greatly eased gene manipulation in primary cell culture.

Some epithelial cell lines allow the formation of a monolayer of fully

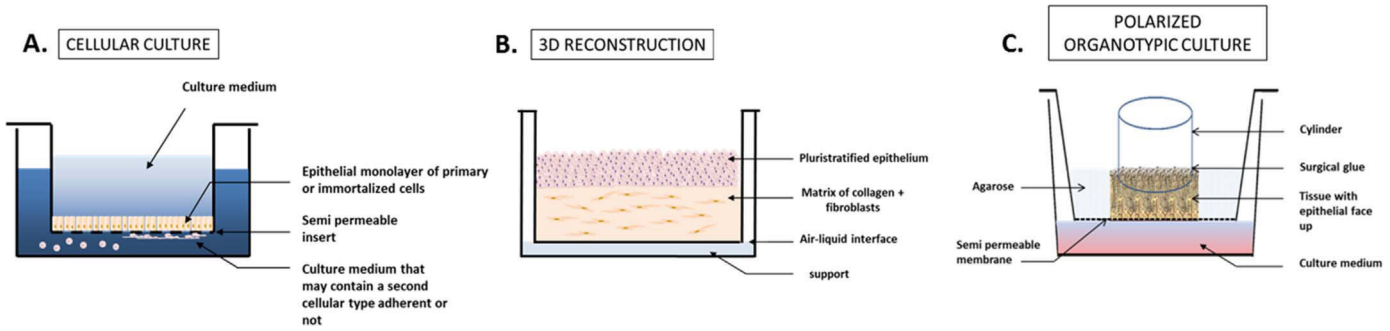


Fig. 2. *In vitro* culture systems of columnar and stratified mucosal epithelia. (A) Cellular culture system: Primary or immortalized cells are plated on a semi permeable insert. When seeded in specific conditions, they may allow the formation of a monolayer of fully differentiated and polarized epithelial cells. Primary or immortalized cells, adherent or not, can be added in basal supernatant. (B) 3D reconstructed system: Primary or immortalized cells are cultured several days on a matrix of collagen and fibroblasts feeder cells intending to mimic the mucosal lamina propria. The matrix/epithelial cell assemblage is then placed at the air-liquid interface or is submerged. The epithelial cells then stratify and differentiate into an epithelium mimicking that of the tissue of origin. Improved models integrate the immune cells physiologically embedded among these epithelial cells. (C) Polarized organotypic culture system: Tissue fragment is placed, apical face up, on porous membrane (or gelfoam) in a two-chamber system and cultured at the air-liquid interface. The explant is surrounded by 3% agarose and/or a cylinder fixed by surgical glue on epithelial face allowing the polarized deposit of compounds/virus.

differentiated and polarized epithelial cells. This generally requires culture for 8–10 days at confluence on semi-permeable inserts, coated or not by a matrigel-type protein support. When the cells reach confluence, they begin to differentiate and become polarized. The polarization of the epithelial cell culture is verified by measuring transepithelial resistance with an ohmmeter, visualizing tight junction expression, or testing the extracellular passage of high molecular weight compounds, such as dextran.

3.2. Primary cultures of epithelial cells

The use of primary cells, isolated from fresh tissues, eliminate potential artefacts associated with the use of immortalized cultures. Epithelial cells are isolated by enzymatic digestion of the tissue, sometimes associated with mechanical digestion (for review (Kaushic et al., 2011)). Some isolated epithelial cells can be cultivated in polarized monolayers and kept in culture for around two weeks. This polarization can be more difficult to obtain than in cell lines (Bomsel and Alfsen, 2003), since the purification of primary cells can compromise the function of the epithelial barrier and prevent the reformation of the tight junctions necessary for polarization.

3.3. Co-culture of epithelial cells with cells from genital secretions or from the lamina propria

Classically, in a two-chamber culture system, a second cell type is added to a confluent culture of primary epithelial cells or an epithelial line (polarized or not) grown on a semipermeable insert. Co-culture systems for epithelial cells and leukocytes (either primary cells or cell lines) added apically in the insert, have thus been developed to mimic the contacts between the epithelial cells and the cells present in the donor's secretions (Lawrence et al., 2012). There are also systems where the two types of co-cultured cells are adherent, *e.g.* epithelial and dendritic cells to study interaction with submucosal immune cells (Cavarelli et al., 2013). In the latter case, after polarization of the epithelial cells on the insert, the culture chamber is turned over and the dendritic cells deposited on the opposite side of the insert. After several hours, when the dendritic cells have adhered to the insert, the system is returned to its initial position, with the epithelial cells resting on the basal face of the insert and the adherent dendritic cells under the insert and thus under the basal face of epithelial cells.

3.4. 3D reconstructed stratified mucosa

3D reconstructions aim to mimic the characteristics of the stratified mucosal epithelia of the vagina, ectocervix, foreskin, or urethra. These models involve culturing primary or immortalized epithelial cells for several days on a matrix of collagen and fibroblast feeder cells, before placing at the air-liquid interface or submerged. The epithelial cells then stratify and differentiate into an epithelium mimicking that of the tissue of origin (for review (Andrei, 2006)). Improved models integrate the immune cells physiologically embedded among these epithelial cells, such as dendritic cells, Langerhans cells, or macrophages, which are added at the moment of the matrix/epithelial cell co-culture (Bouschbacher et al., 2008; Ganor et al., 2013, 2010; Sivard et al., 2004). It generally takes 5–8 weeks to obtain a complete reconstruction with a polarized stratified epithelium. Compared with organotypic cultures (see next paragraph), these 3D reconstructed models have homogeneous epithelial barriers, and the tissue architecture can be maintained intact long enough to study their infection. Nonetheless, they lack the physiological value of organotypic cultures because they are composed of a mixture of primary and immortalized cell populations, often derived from different sources.

3.5. Organotypic cultures

Organotypic cultures are the most integrative and physiological model available today for researchers to study the mechanisms of the sexual transmission of viruses *in vitro*. Organotypic culture models exist for foreskin, ectocervix, endocervix, vagina, and colorectal tissue. Fragments of tissue containing both epithelium and submucosa are obtained after surgery and cut into small blocks of several mm^2 each to avoid anoxia at the center. The tissue is cultured most often at the air-liquid interface on porous membranes of polycarbonate or collagen in two-chamber systems or on gelatin sponges (gelfoam). To mimic the mechanisms of viral dissemination most accurately the tissue can be oriented with the epithelial face up and the submucosal face in contact with the membrane or gelfoam and the explant surrounded by agarose (Collins et al., 2000; Kolodkin-Gal et al., 2013; Maher et al., 2005; Tugizov et al., 2011) or by a cylinder attached with surgical glue to the epithelial face of the tissue (Cavarelli et al., 2013; Ganor et al., 2013, 2010; Shen et al., 2010, 2009; Tsilingiri and Rescigno, 2012), so that only the epithelial face is exposed to the virus.

The major advantage of organotypic cultures is that they preserve the original tissue architecture. Nonetheless, the maintenance of this architecture may be very short, due to limited survival of some cell types which are less well "fed" than in the 2D culture system, either because of more restricted access to nutrients, or because the culture medium used must be a compromise between the needs of the different cell types. The period that the explant's epithelial barrier integrity remains intact therefore varies quite substantially according to tissue origin and culture medium enrichment. As a general rule, the most superficial strata of stratified epithelia are lost by 24–48 h after the culture starts (Collins et al., 2000; Maher et al., 2005). Moreover, the immune cells embedded in these epithelia begin to emigrate outside the tissue almost immediately. Concerning the mucosa with simple epithelium, it exists a hide heterogeneity depending on tissue: endocervical epithelia remain intact in the culture for 4–6 days (Maher et al., 2005), but colon epithelia are much more fragile, remaining intact for no more than 6 h of culture in standard conditions (conventional incubator) (Cavarelli et al., 2013; Fletcher et al., 2006; Kolodkin-Gal et al., 2013) and 24 h in an O_2 enriched atmosphere (Dezzutti et al., 2014). In all cases, the integrity of the tissue depends on extremely rapid culturing after the surgical excision. Finally, an important limitation to the use of all primary models is the supply of human tissue, which can be rare or irregular, and submitted to agreement by ethic committees.

4. Choice of models according to the questions to be studied

Through examples illustrating results obtained from various models, this section seeks to highlight the advantages and limitations of each of these models for studying the different stages of mucosal transmission of pathogens.

4.1. Study of the viral source in genital secretions

Contamination of genital secretions by viral particles and/or infected cells is responsible for the transmission of the virus to the mucosa of the sexual partner. One unresolved question under study, however, is how the virus reaches the genital secretions. This question is particularly pregnant for semen, which is an important vector for many viruses. It was long thought that the viruses present in the semen come from the passive distribution of viral particles and infected cells from the circulating blood, but it has now been established that this is not the only source. Phylogenetic analyses in men with HIV have showed that around 60% of them have viral populations in the semen that are distinct from those in their blood (Houzet et al., 2014). Another issue concerns viral persistence in semen despite negative or undetectable viremia. HIV persists in the semen of some patients receiving effective

antiretroviral treatment, and the Ebola and Zika viruses can last for several months in the semen of men who have recovered. These facts indicate the existence of local sources, which must be elucidated to determine the origin of these viruses in semen. *Ex vivo* models of human tissue are extremely useful for testing semen-producing organs permissiveness to viruses, given that it is impossible to study the organs of the genital tract of infected men. We thus demonstrated *ex vivo* infection by HIV with explants of the human testes, prostate, and seminal vesicles in organotypic culture models and identified the types of cells infected (Deleage et al., 2011; Le Tortorec et al., 2008; Roulet et al., 2006). It is nonetheless important to validate results obtained *ex vivo* by *in vivo* approaches in animals, which also enable the simultaneous study of the infection of local sources and of the semen (Matusali et al., 2015).

4.2. Study of the mechanisms of infection of the epithelial barrier

A polarized primary culture of epithelial cells is an interesting model for studying infection of simple epithelia. MacDonald *et al.* and Nazli *et al.* developed polarized primary cultures of endometrial and endocervical epithelial cells to study their infection by HSV-2 (MacDonald et al., 2007; Nazli et al., 2009). A polarized monolayer was exposed to the virus, and the cells' permissiveness to infection assessed by measuring viral release in the basal supernatant and microscopic observation of infected cells. This simplified model allowed them to study the direct effect of a variety of factors that might modify epithelial cell susceptibility to infection, such as variations in sex hormone levels (progesterone) or antiviral compounds (MacDonald et al., 2007; Nazli et al., 2009).

Nonetheless, the use of genital epithelial cells in primary cultures or from cell lines has produced divergent results for HIV infection (Greenhead et al., 2000; Howell et al., 1997). Based on *in vivo* studies of simian models, the current consensus is that HIV does not productively infect the epithelial cells of either vaginal or rectal mucosa (Hu et al., 2000; Miller and Hu, 1999; Ribeiro Dos Santos et al., 2011; Salle et al., 2010). The discordant results about the productivity of infection for the same primary cell or cell line cultures may be associated with variations in the infection protocol (viral strain, quantity of inoculated virus, and time of exposure), primary cell isolation process (loss of membrane receptors for virus needed for virus entry during the tissue dissociation), and the degree of cell polarization. More broadly, it must be borne in mind that immortalized cells do not preserve all the morphologic and biochemical characteristics of the tissue's primary cells. Transformed cell lines differ greatly from primary cells in their lipid and protein composition and their glycosylation profile (Bomsel and Alfsen, 2003). These differences can influence or even modify the mechanisms of viral entry and cell infection, compared with the situation *in vivo*. Accordingly, although essential to the study of the mechanisms of infection and the passage of different viruses, the simplified models of isolated culture of primary epithelial cells or of cell lines require validations in more integrated models.

3D reconstructed culture models have improved our understanding of the early phases of HSV infections in stratified genital epithelia (Meyers et al., 2003; Visalli et al., 1997), where the expression program of the epithelial cells differs according to the position of their stratum. For example, using a 3D culture model of primary epithelial cells of the foreskin and cervix on a matrix of collagen containing a murine fibroblast cell line, Visalli *et al.* showed that productive HSV-1 infection occurred exclusively in the most basal layers of the epithelium. 3D culture models of genital epithelial cells also enabled considerable progress in the study of HPV infections, whose replication cycle depends strongly on the differentiation of the host epithelial tissue. Epithelial cell infection is reproduced by seeding epithelial cells from biopsies of infected patients, or by transfection of epithelial cells with the HPV genomic DNA, or finally with HPV immortalized epithelial cell lines (for review (Bodily et al., 2006)). In the latter case, differentiation of the epithelium leads to the formation of different grades of neoplasms, similar to that observed *in vivo,* and can thus be used to study cancer progression (*e.g.,* by studying the capacity of mononuclear allogenic blood cells to migrate in a preneoplastic or neoplastic epithelium). This model also makes it possible to reproduce the different stages of the HPV life cycle, including episomal maintenance of the viral genome, genome amplification, and differentiation, which depends on the expression of viral genes. It thus enabled the first *in vitro* production of HPV virions (Dollard et al., 1992; Meyers et al., 1992). Several studies have thus used this model to test the effectiveness of compounds for treating HPV infection (for review (Andrei, 2006)). Thanks to a more integrative model of organotypic cultures of ecto- and endocervical explants, Horbul *et al.* demonstrated that HSV-2 infection of genital epithelial cells is cytolytic, induces inflammation of the mucosal tissue, and thereby promotes infection of the genital mucosa by HIV-1 (Horbul et al., 2011). A considerable limitation of this type of model for studying infection of a stratified epithelium is the loss of the stratification after a few days (*e.g.,* < 6 days for the ectocervical epithelium in the study by Horbul et al.).

4.3. Analysis of mechanisms for crossing the epithelial barrier in the absence of productive infection of epithelial cells

Numerous sexually transmissible viruses can cross the epithelial barrier without infecting it productively. As pointed out above (Section 2.4 on the mode of infection of mucosa exposed to genital secretions), these viruses use diverse strategies to reach submucosal target cells. In this section, we will look at the *in vitro* models developed to study these different mechanisms for crossing the epithelial barrier.

4.3.1. Analysis of the formation of epithelial breaches

The most common and easiest access for a virus or infected cells to subepithelial target cells is the infiltration through breaches in the epithelium. These can be induced mechanically by sexual intercourses, or may result from a pre-existing genital infection, or be generated by the virus itself. Inflammation of the mucosa induced by a bacterial or viral infection results in an influx of immune cells and proinflammatory cytokines, which can impair the epithelial barrier and thereby render the subepithelial mucosal cells accessible to other pathogenic agents. Some viruses, such as herpesvirus, directly affect epithelial cells by inducing herpetic ulcerations. Nazli *et al.*, studied the capacity of HIV to engender breaches (Nazli et al., 2010, 2013), using a model of polarized primary epithelial cells from the endometrium and cervix, cultured on matrigel, and polarized T84 cells (intestinal cell line). They showed that exposure to HIV particles impaired the integrity of these epithelial monolayers, as demonstrated by a decrease in transepithelial resistance, a loss of junction protein expression, and greater permeability of the epithelial barrier to dextran. These simplified models of the epithelial barrier made it possible to understand the mechanism of this impairment, and neutralization experiments demonstrated that the virus envelope protein (gp120) generates impairment of the epithelial barrier by inducing epithelial cells to secrete TNFα (Nazli et al., 2010). As in all *in vitro* studies, it is also important to consider the dose and strain of virus used in interpreting the results, to determine if they correspond to a realistic exposure.

4.3.2. Analysis of the capture of viral particles by mucosal immune cells

Another means for pathogens to gain access to subepithelial target cells is to be captured by the dendritic cells or Langerhans cells embedded in the stratified epithelia or simply present at the basal pole of the simple epithelia.

To study this phenomenon in columnar epithelium, Cavarelli et al. (2013) developed two models. The first model consisted of a co-culture on a semipermeable insert of a polarized colorectal epithelial cell line, Caco-2, and dendritic cells cultured under the insert, at the basal pole of the epithelial cells (Fig. 2 describes the set-up of such a system). The virus is then deposited at the apical surface of the epithelial cells. After

several hours of exposure, the epithelial barrier is observed by confocal microscopy, which allows in-depth visualization of the cell layer. This model made it possible to show that HIV induces dendritic cells to migrate towards the apical side of the epithelium. Given that the migrating dendritic cells were isolated from blood rather than a tissue, the physiological relevance of this simplified model may be questionable. Nonetheless, these observations were validated with a more integrative model of a colorectal tissue explant culture, in which the polarized exposure of the colorectal epithelium to HIV particles also induced mucosal antigen-presenting cells to be attracted toward the apical pole of the epithelial cells and to capture viral particles (Cavarelli et al., 2013).

To analyze how dendritic cells embedded in the stratified epithelia are involved in viral transmission, Ganor et al. (2010) developed an organotypic foreskin mucosal culture. It enabled the authors to observe with fluorescence microscopy that polarized exposure of the internal epithelial mucosa of the foreskin to blood leukocytes strongly infected by an HIV-1 strain induced rapid modification of the spatial distribution of intraepithelial Langerhans cells, which moved closer to the epithelial surface; it also induced the formation of Langerhans cell–T-cell conjugates at the level where the viral particles were observed. Nonetheless, the major limitation of stratified organotypic explant models is their rapid loss of the tissue's structural and morphologic integrity, together with the migration of the intraepithelial immune cells outside the explant several hours later. It then becomes impossible to distinguish between the migrant cells of intraepithelial origin and the immune cells of the stroma. The observation of later infection events therefore requires the development of other models, more stable but less close to *in vivo* conditions. 3D reconstructed models of stratified mucosal tissue of the vagina (Bouschbacher et al., 2008; Sivard et al., 2004) and the foreskin (Ganor et al., 2010) into which Langerhans cells were integrated are particularly appropriate for this purpose and allow a longer-term view of the role of dendritic cells in the establishment of this infection in these mucosal tissues. For example, Sivard *et al.* integrated into their 3D reconstructed model of vaginal mucosa some Langerhans cells, differentiated from CD34+ hematopoietic progenitor cells isolated from umbilical cord (Sivard et al., 2004). In this system, the authors were able to show, 48 h post-infection, the presence of viral DNA in the Langerhans cells as well as the complete inhibition of their infection in the presence of a reverse transcriptase inhibitor.

Hladik et al. (2007) developed an original model of culture of vaginal epithelial sheets (Ballweber et al., 2011), by separating the epithelial strata from the lamina propria by microdissection and EDTA treatment. The major interest of this model is that it enables the targeted study of the infection of intraepithelial immune cells without having to deal with the problem of immune cell emigration out of the tissue, since in the absent of submucosa, the only cells to emigrate come from the epithelial layer. Hladik et al. (2007) were thus able to observe by confocal microscopy the attachment and entry of viral particles into the CD4+ T lymphocytes and intraepithelial Langerhans cells of the vaginal mucosa. Several years later, this team improved the system by polarizing the infection to the apical face of the epithelial sheet. By showing that the proviral DNA was not integrated, they demonstrated that the intraepithelial Langerhans cells are not capable of productive infection by HIV, but do play a role in viral dissemination, as shown by the infection tests in a co-culture of CD4+ T lymphocytes (Ballweber et al., 2011).

4.3.3. Analysis of viral passage by transcytosis

Transcytosis is the polarized transport of virus into the interior of epithelial cells, from the apical to the basal pole, without productive infection of the host cell. The virus endocytosed by the epithelial cells can come from a free virus source or be viral particles released by infected cells that form virological synapses at the apical pole of epithelial cells. This mechanism of viral transmission in the genital or colorectal mucosa was described for HIV *in vitro* for the first time by Bomsel (1997). These authors, and other teams, have confirmed passage through the epithelium by transcytosis for HIV and other retroviruses in other *in vitro* or *ex vivo* models, but it has never been demonstrated *in vivo* (Alfsen et al., 2005; Bobardt et al., 2007; Bomsel et al., 1998, 2007; Hocini et al., 2001; Martin-Latil et al., 2012; Shen et al., 2010; Stoddard et al., 2009). HIV transcytosis has thus been shown in polarized cultures of immortalized epithelial cell monolayers derived from the intestines (I407), colon (HT29, Caco-2), and endometrium (HEC1) as well as in polarized cultures of primary vaginal and endocervical cells in monolayers, exposed either to HIV viral particles or to HIV-infected leukocytes during a period too short for the productive infection of epithelial cells. The passage of the virus through the epithelial barrier was demonstrated as early as 30 min after exposure, by measuring p24 viral proteins in the supernatant of the basal culture, by infectivity tests of reporter cells, and by observation of cell infection by electron microscopy. The viral particle internalization kinetics was assessed by measuring the p24 viral proteins in the lysed epithelial cells. Viral passage was inhibited at 4 °C and by irreversible microtubule depolymerization. Demonstration of the transcytosis of viral particles imperatively requires ensuring that the epithelial layer is sealed tight, by verifying the maintenance of transepithelial resistance, the absence of paracellular passage of extracellular markers (*e.g.,* [^{14}C]inulin or FITC-BSA) and the continued expression of tight junction proteins such as ZO-1, to prevent the passage of viral particles by a paracellular mechanism. Despite several discordances linked to the use of different infection protocols (virus concentration and time of viral exposure), these studies allow two conclusions: 1) the effectiveness of transcytosis is greatest when the epithelial cells are exposed to infected cells rather than to free viral particles, and 2) virological synapses form between infected leukocytes and epithelial cells (Alfsen et al., 2005; Bomsel, 1997; Hocini et al., 2001). Although this viral transmission mechanism has been clearly shown *in vitro* in monostratified cell culture models, its existence *in vivo,* or at the very least, in more physiological *ex vivo* models, remains to be demonstrated.

The confirmation of transcytosis in more integrative model of mucosal explants, as suggested by the results of Shen et al. (2010, 2009) in cultures of rectal or vaginal explants, is complicated by the possibility of viral transport by "Trojan horse" cells, either present in the mucosa or embedded between the epithelial cells, such as macrophages or dendritic cells. This bias can be avoided by the use of integrative models less close to the *in vivo* model but better controlled, such as 3D reconstruction models, where the cell types present can be selected according to the study question. Bouschbacher et al. (2008) thus showed that HIV particles do not pass through the stratified vaginal epithelium in a 3D reconstructed model, with or without Langerhans cells embedded in the epithelium. Using a 3D culture model of an ectocervical epithelial sheet exposed in a polarized manner either to free HIV particles or to infected cells, Greenhead et al. (2000) did not detect infection event in either the culture supernatant or the epithelial cells. These 2 studies therefore suggest the absence of HIV transcytosis across the stratified genital epithelia. Nonetheless, we cannot rule out the possibility that the stages of enzymatic digestion necessary to establish these models might engender the loss of expression of some membrane markers necessary for the attachment and internalization of viral particles.

4.3.4. Analysis of the transmigration of infected cells across the epithelial barrier

Transmigration is the active passage of infected cells between the epithelial cells without the barrier rupturing. The simplest models, which are also the fastest to set up for a study, are simple polarized epithelial cell lines (Carreno et al., 2002; Chancey et al., 2006; Lawrence et al., 2012). Accordingly, Lawrence et al. (2012) demonstrated on a polarized monolayer of immortalized endometrial cells (HEC-1) that monocytes and, to a lesser extent, CD4+ T lymphocytes, are capable of transmigration. They deposited monocytes or

lymphocytes isolated from blood, infected *in vitro* and labeled, on polarized epithelial monolayers and assessed transmigration 24 h later by scoring the number of labeled cells recovered in the system's basal supernatant or by measuring the fluorescence intensity of this supernatant. The major advantage of this simplified model of polarized immortalized epithelial cells is that it allows easy apprehension of the molecular mechanisms and environmental factors involved in the adhesion of transmigrant cells to epithelial cells and their passage to the subepithelial mucosa. Thus Lawrence *et al.* showed in their polarized HEC-1 model that seminal fluid inhibits leukocyte transmigration across the epithelial barrier. This effect is associated with increased expression of ZO-1 junction proteins between epithelial cells and greater leukocyte capacity to adhere to epithelial cells (Lawrence et al., 2012). Nonetheless, although this simplified model is both a good approach and a useful method of molecular validation, it remains somewhat distant from the *in vivo* situation and glosses over the influence of the tissue context on epithelial cell expression of adhesion molecules.

In the more physiological explant model, the transmigrating cells labeled by a fluorochrome and deposited on the epithelial apical surface, can be pursued in the tissue by fluorescent microscopy or flow cytometry after enzymatic tissue dissociation (Kolodkin-Gal et al., 2013; Maher et al., 2005). Its principal limitation is that it can keep the epithelial barrier intact for only a short period, which varies by tissue origin: around 24 h for colorectal, 48 h for ectocervical, and 4–6 days for endocervical tissue, depending on the study and culture conditions. The use of this model to observe transmigration events therefore requires that the researcher rigorously ensure that the integrity of the epithelial barrier is preserved for the time necessary for transmigration (*e.g.,* verification that labeled extracellular molecules have not passed through). Accordingly, in 3D models of human ectocervical and endocervical explant cultures, Maher et al. (2005) used confocal microscopy to observe the infiltration of seminal leukocytes into the most external layers of the stratified ectocervical epithelium, but no infiltration into the endocervical epithelium; instead the seminal cells were retained in the mucosal secretions, which thus seem to play a protective role against infection in this model.

4.4. Study of the infection of subepithelial target cells and of response to mucosal infection

Beyond the mechanisms for crossing the epithelial barrier, it is primordial for developing prevention strategies to understand how the infection settles into the mucosa (analysis of its target cells, their proportion, location in the tissue, and susceptibility to infection) and the consequences of this infection (cytopathic effect, establishment of a local immune response).

The explant model, polarized or not, is a model of choice for studying mucosal cells' susceptibility to the infection, to the extent that the original tissue context and cytokine environment present *in vivo* can be preserved for the time necessary to observe this infection. We cite here, non-exhaustively, several explant models developed to analyze the permissiveness to infection of mucosal cells of the female genital tract (Collins et al., 2000; Fox-Canale et al., 2007; Greenhead et al., 2000; Maher et al., 2005; Patterson et al., 2002; Shen et al., 2009), the male genital tract (Fischetti et al., 2009; Ganor et al., 2013; Patterson et al., 2002), or the colorectum (Fletcher et al., 2006; Kolodkin-Gal et al., 2013). In these studies, tissue infection is determined by quantitative PCR measurement of the viral genome copies number in the tissue (Fletcher et al., 2006; Patterson et al., 2002; Shen et al., 2009) or the measurement of viral proteins released into the culture supernatant (*e.g.,* p24 for HIV) (Fischetti et al., 2009; Fletcher et al., 2006; Ganor et al., 2013; Greenhead et al., 2000). The infected cell types can be identified by flow cytometric analysis after enzymatic dissociation of the tissue (Fox-Canale et al., 2007; Kolodkin-Gal et al., 2013), immunohistochemical co-labeling of cellular and viral protein markers (Fox-Canale et al., 2007; Greenhead et al., 2000; Maher et al., 2005; Shen et al., 2009), or detection of the viral genome in the mucosa cells by *in situ* hybridization combined with immunohistochemical labeling to identify infected cells (Patterson et al., 2002; Collins et al., 2000; Deleage et al., 2011; Ganor et al., 2013, 2010; Le Tortorec et al., 2008). Their identification can also be facilitated by inoculating the tissue with a modified virus expressing a green fluorescent protein (*e.g.,* CMV-GFP (Fox-Canale et al., 2007)). In this model, it is possible to mimic immune activation of the mucosal immune cells by adding PHA and IL-2 to the culture medium for the entire culture period (Fischetti et al., 2009; Greenhead et al., 2000), thereby increasing the infectivity of the mucosal cells according to the tropism of the viral strain (Greenhead et al., 2000). The analysis of the mucosal cells' permissiveness to infection in the explant model mandates verification that the virus's potential target cells are adequately maintained along the culture. Observation of tissue infection by some viruses, such as CMV, requires maintaining the culture up to 2 weeks (Fox-Canale et al., 2007). Moreover, some cell types, especially Langerhans and dendritic cells, tend to migrate outside the explant (Fischetti et al., 2009); it can thus be necessary to collect these cells to analyze their infection.

In nonpolarized explant models (Fischetti et al., 2009; Fletcher et al., 2006; Fox-Canale et al., 2007; Greenhead et al., 2000), infection of subepithelial mucosal cells is facilitated by viral inoculation of the explants during immersion and is not limited to the epithelial face of the tissue. The major advantage of these nonpolarized explant models is that they allow researchers to focus on early mucosal infection events in an integrative model; they can bypass the stage of epithelial barrier passage that requires more complex models to maintain the barrier integrity. Recently, these models were used to assess the effect of hormones in the female genital tract on its permissiveness to HIV infection (Rollenhagen and Asin, 2011; Saba et al., 2010, 2013). These models also make it possible to analyze the infection-induced immune activation, by measuring the cytokines produced by the tissue and released in the culture supernatant or by determining mucosal immune cell phenotypes by flow cytometry or immunohistochemistry, and to test the cytopathic effect of the virus on the mucosa (Fischetti et al., 2009). As long as they are used within the limits of their validity, the models of polarized explants, in which viral inoculation is limited to their epithelial surfaces, provide a more physiological response about capacity to transmit infection to mucosal cells (Ganor et al., 2010; Collins et al., 2000; Kolodkin-Gal et al., 2013; Maher et al., 2005; Patterson et al., 2002; Shen et al., 2009). For example, Shen *et al.* used polarized explant models of vaginal and intestinal mucosal tissue to study the permissiveness to HIV of mucosal macrophages. While intestinal macrophages remained insensitive to the infection, it was detected in the vaginal macrophages after as little as 30 min of exposure to an R5 strain, and this difference in permissiveness was linked to a phenotypic difference between these cells in these two different tissues (Shen et al., 2009). Nonetheless, as we mentioned above, the integrity of the epithelium can only be maintained for a limited time, especially that of the simple epithelia of the colon and must therefore be systematically validated.

The reproducibility of results obtained by the explant model is often complicated by interdonor variability of tissues in terms, for example, of hormonal and inflammatory status, history of sexually transmitted diseases, or differences of proportions in the target cell populations between the different tissue fragments.

4.5. In vitro testing of antiviral strategies

In vitro and *ex vivo* models of mucosa exposed to sexually transmissible viruses are an indispensable tool for preclinical evaluation of the safety, efficacy, and formulation of local antiviral strategies. It is essential to ensure that the substances tested do not induce tissue toxicity that might weaken the epithelial barrier or induce mucosal inflammation. It is also important to test the effectiveness of antiviral agents in models that can mimic the physiological conditions during which the risk of infection is greatest, that is, when the epithelial

barrier is compromised or in inflammatory situations.

Most of the studies thus far conducted have tested HIV compounds in culture models of primary epithelial cells or cell lines or of reconstructed 3D mucosal epithelium or tissue explants. The limitations and advantages of these different models remain the same as they are for analyzing viral transmission or mucosal cells' permissiveness to an infection. Three D reconstructed epithelial mucosa culture models are particularly appropriate for testing antiviral compounds against viruses, such as alpha-herpesviruses or HPV, that infect epithelial cells (for review (Andrei, 2006)) and for which no animal model are available.

Explants of cervical, vaginal, colorectal, and penile tissue are models of choice for testing the anti-HIV activity of microbicides (references in review (Dezzutti, 2015)). These models allowed researchers to show that the prevention of HIV-1 infection in the mucosa by different viral entry inhibitors and non-nucleoside inhibitors requires a dose several log10 higher than the doses required in traditional *in vitro* tests with reporter cells (Fischetti et al., 2009; Fletcher et al., 2009; Herrera et al., 2009, 2011).

Polarized explants present the clear advantage of enabling an assessment of the efficacy of compounds, formulated most often in gel, with an epithelial application that thus mimics the natural entry route of the substances tested (Abner et al., 2005; Cummins et al., 2007). They also allow testing the effect of genital fluids (semen and vaginal secretions) on the distribution and effectiveness of drugs to be tested.

In recent years, another original mucosa culture model has been developed and used in clinical trials. This *ex vivo* challenge model consists in putting into culture colorectal, cervical, or vaginal biopsy samples from participants who assiduously used an antiviral gel or vaginal ring over a given period. The biopsy sample was then infected *ex vivo* by HIV to assess the effectiveness of the microbicide treatment (for reference, see (Dezzutti, 2015)). Setting up these trials demands good logistic coordination between the clinic and the laboratory, but enables a more physiological evaluation of microbicide effectiveness.

5. Conclusion

The numerous *in vitro* models of genital or colorectal mucosa have provided vital information about the mechanisms by which sexually transmissible viruses infect these mucosal tissues. This variety of models is justified by the multiple mechanisms that can lead to mucosal infection, each model being most appropriate for the study of one mechanism in particular. By their simplicity and flexibility of construction (*e.g.,* variety of cell types involved, control of strains and viral dose, and inclusion of environmental factors), these models have made it possible apprehend the role of each cell type in viral transmission and to dissect the innate immune response to the infection as well as the influence of genital fluids (vaginal secretions and semen) and hormonal status on its establishment. Today they are also indissociable from *in vivo* studies for the elaboration of new strategies for local prevention. These *in vitro* models deserve greater use, especially to assess the impact of local microbiota on the infectivity of mucosal tissue. Several clinical studies indicate that modification of the vaginal or rectal microbiota, called dysbiosis, influences the risk of transmission of sexually transmitted diseases, with in particular an increase of more than 60% in the risk of transmission in the presence of a microbiota characteristic of bacterial vaginosis (for review (Burgener et al., 2015)). Recently, a 3D reconstructed epithelial model was developed that simultaneously enabled colonization by bacteria of the vaginal microbiota and study of the transmission of sexually transmissible pathogens (Pyles et al., 2014).

Most recently, methods of 3D bioprinting have attracted the attention of interest by researchers in tissue engineering. This bioprinting uses the technologies of computer-assisted printing to place — layer by layer or point by point — cells, components of the extracellular matrix, growth factors, *etc.,* thus enabling the arrangement and assembly of live biological structures in 2D or 3D with high reproducibility and repeatability. This new technology, which is a major opportunity for regenerative and reparative medicine, may also allow the manufacture of tissue models, such as highly controllable and reproducible genital and colorectal mucosa for pharmacological testing of the activity of antiviral compounds (for review (Fricain et al., 2017)). Although the bioprinting tissue models thus far developed do not yet satisfactorily reproduce tissue complexity (Fricain et al., 2017), it is probable that the development of bioprinting may in time supplant most existing *in vitro* models.

Acknowledgements

not applicable.

DeclarationsEthics approval and consent to participate

Not applicable.Consent for publication

Not applicable.

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

The authors declare that they have no competing interests.

No funding.

NDR conceived and supervised the review. JF, ALT and NDR wrote the review.

References

Abner, S.R., Guenthner, P.C., Guarner, J., Hancock, K.A., Cummins Jr., J.E., Fink, A., Gilmore, G.T., Staley, C., Ward, A., Ali, O., Binderow, S., Cohen, S., Grohskopf, L.A., Paxton, L., Hart, C.E., Dezzutti, C.S., 2005. A human colorectal explant culture to evaluate topical microbicides for the prevention of HIV infection. J. Infect. Dis. 192 (9), 1545–1556.

Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A., Bomsel, M., 2005. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. Mol. Biol. Cell 16 (9), 4267–4279.

Anderson, D., Politch, J.A., Pudney, J., 2011. HIV infection and immune defense of the penis. Am. J. Reprod. Immunol. 65 (3), 220–229.

Anderson, D.J., Politch, J.A., Nadolski, A.M., Blaskewicz, C.D., Pudney, J., Mayer, K.H., 2010. Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. AIDS 24 (2), 163–187.

Andrei, G., 2006. Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development. Antivir. Res. 71 (2–3), 96–107.

Ballweber, L., Robinson, B., Kreger, A., Fialkow, M., Lentz, G., McElrath, M.J., Hladik, F., 2011. Vaginal langerhans cells nonproductively transporting HIV-1 mediate infection of T cells. J. Virol. 85 (24), 13443–13447.

Bobardt, M.D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B., Gallay, P.A., 2007. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. J. Virol. 81 (1), 395–405.

Bodily, J.M., Alam, S., Chen, H., Meyers, C., 2006. Organotypic raft cultures and the study of the natural history of papillomavirus. In: Campo, M.S. (Ed.), Papillomavirus research: from natural history to vaccines and beyond. Caister Academic Press, pp. 145–173.

Bomsel, M., 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. Nat. Med. 3 (1), 42–47.

Bomsel, M., Alfsen, A., 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 (1), 57–68.

Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., Desgranges, C., 1998. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. Immunity 9 (2), 277–287.

Bomsel, M., Pastori, C., Tudor, D., Alberti, C., Garcia, S., Ferrari, D., Lazzarin, A., Lopalco, L., 2007. Natural mucosal antibodies reactive with first extracellular loop of CCR5 inhibit HIV-1 transport across human epithelial cells. AIDS 21 (1), 13–22.

Bouschbacher, M., Bomsel, M., Verronese, E., Gofflo, S., Ganor, Y., Dezutter-Dambuyant, C., Valladeau, J., 2008. Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. AIDS 22 (11), 1257–1266.

Burgener, A., McGowan, I., Klatt, N.R., 2015. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. Curr. Opin. Immunol. 36, 22–30.

Camus, C., Matusali, G., Bourry, O., Mahe, D., Aubry, F., Bujan, L., Pasquier, C., Massip, P., Ravel, C., Zirafi, O., Munch, J., Roan, N.R., Pineau, C., Dejucq-Rainsford, N., 2016. Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4 + T-cell infection. AIDS 30 (8), 1197–1208.

Carreno, M.P., Chomont, N., Kazatchkine, M.D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A.S., Andreoletti, L., Matta, M., Belec, L., 2002. Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. J. Virol. 76 (1), 32–40.

Cavarelli, M., Foglieni, C., Rescigno, M., Scarlatti, G., 2013. R5 HIV-1 envelope attracts

dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5. EMBO Mol. Med. 5 (5), 776–794.
Cerf-Bensussan, N., Guy-Grand, D., 1991. Intestinal intraepithelial lymphocytes. Gastroenterol. Clin. North Am. 20 (3), 549–576.
Chancey, C.J., Khanna, K.V., Seegers, J.F., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., Markham, R.B., 2006. Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. J. Immunol. 176 (9), 5627–5636.
Collins, K.B., Patterson, B.K., Naus, G.J., Landers, D.V., Gupta, P., 2000. Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. Nat. Med. 6 (4), 475–479.
Cummins Jr., J.E., Guarner, J., Flowers, L., Guenthner, P.C., Bartlett, J., Morken, T., Grohskopf, L.A., Paxton, L., Dezzutti, C.S., 2007. Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (5), 1770–1779.
Deleage, C., Moreau, M., Rioux-Leclercq, N., Ruffault, A., Jegou, B., Dejucq-Rainsford, N., 2011. Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. Am. J. Pathol. 179 (5), 2397–2408.
Dezzutti, C.S., 2015. Animal and human mucosal tissue models to study HIV biomedical interventions: can we predict success? J. Int. AIDS Soc. 18, 20301.
Dezzutti, C.S., Russo, J., Wang, L., Abebe, K.Z., Li, J., Friend, D.R., McGowan, I.M., Rohan, L.C., 2014. Development of HIV-1 rectal-specific microbicides and colonic tissue evaluation. PLoS One 9 (7), e102585.
Dollard, S.C., Wilson, J.L., Demeter, L.M., Bonnez, W., Reichman, R.C., Broker, T.R., Chow, L.T., 1992. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. Off. Genes Dev. 6 (7), 1131–1142.
Doncel, G.F., Anderson, S., Zalenskaya, I., 2014. Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment–implications for HIV transmission. Am. J. Reprod. Immunol. 71 (6), 564–574.
Doncel, G.F., Joseph, T., Thurman, A.R., 2010. Role of semen in HIV-1 transmission: inhibitor or facilitator? Am. J. Reprod. Immunol. 65 (3), 292–301.
Duluc, D., Gannevat, J., Anguiano, E., Zurawski, S., Carley, M., Boreham, M., Stecher, J., Dullaers, M., Banchereau, J., Oh, S., 2013. Functional diversity of human vaginal APC subsets in directing T-cell responses. Mucosal Immunol. 6 (3), 626–638.
Fischetti, L., Barry, S.M., Hope, T.J., Shattock, R.J., 2009. HIV-1 infection of human penile explant tissue and protection by candidate microbicides. AIDS 23 (3), 319–328.
Fletcher, P., Harman, S., Azijn, H., Armanasco, N., Manlow, P., Perumal, D., de Bethune, M.P., Nuttall, J., Romano, J., Shattock, R., 2009. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by the candidate microbicide dapivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. Antimicrob. Agents Chemother. 53 (2), 487–495.
Fletcher, P.S., Elliott, J., Grivel, J.C., Margolis, L., Anton, P., McGowan, I., Shattock, R.J., 2006. Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides. AIDS 20 (9), 1237–1245.
Fox-Canale, A.M., Hope, T.J., Martinson, J., Lurain, J.R., Rademaker, A.W., Bremer, J.W., Landay, A., Spear, G.T., Lurain, N.S., 2007. Human cytomegalovirus and human immunodeficiency virus type-1 co-infection in human cervical tissue. Virology 369 (1), 55–68.
Fricain, J.C., De Olivera, H., Devillard, R., Kalisky, J., Remy, M., Keriquel, V., Le Nihounen, D., Gremare, A., Guduric, V., Plaud, A., L'Heureux, N., Amedee, J., Catros, S., 2017. 3D bioprinting in regenerative medicine and tissue engineering. Med. Sci. (Paris) 33 (1), 52–59.
Ganor, Y., Zhou, Z., Bodo, J., Tudor, D., Leibowitch, J., Mathez, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Revol, M., Bomsel, M., 2013. The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages. Mucosal Immunol. 6 (4), 776–786.
Ganor, Y., Zhou, Z., Tudor, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Gibault, L., Thiounn, N., Tomasini, J., Wolf, J.P., Bomsel, M., 2010. Within 1h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. Mucosal Immunol. 3 (5), 506–522.
Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P.S., Laing, K.G., Griffin, G.E., Shattock, R.J., 2000. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. J. Virol. 74 (12), 5577–5586.
Herrera, C., Cranage, M., McGowan, I., Anton, P., Shattock, R.J., 2009. Reverse transcriptase inhibitors as potential colorectal microbicides. Antimicrob. Agents Chemother. 53 (5), 1797–1807.
Herrera, C., Cranage, M., McGowan, I., Anton, P., Shattock, R.J., 2011. Colorectal microbicide design: triple combinations of reverse transcriptase inhibitors are optimal against HIV-1 in tissue explants. AIDS 25 (16), 1971–1979.
Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., McElrath, M.J., 2007. Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. Immunity 26 (2), 257–270.
Hocini, H., Becquart, P., Bouhlal, H., Chomont, N., Ancuta, P., Kazatchkine, M.D., Belec, L., 2001. Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. J. Virol. 75 (11), 5370–5374.
Horbul, J.E., Schmechel, S.C., Miller, B.R., Rice, S.A., Southern, P.J., 2011. Herpes simplex virus-induced epithelial damage and susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in human cervical organ culture. PLoS One 6 (7), e22638.
Houzet, L., Matusali, G., Dejucq-Rainsford, N., 2014. Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. J. Infect. Dis. 210 (Suppl 3), S622–S630.
Howell, A.L., Edkins, R.D., Rier, S.E., Yeaman, G.R., Stern, J.E., Fanger, M.W., Wira, C.R., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract. J. Virol. 71 (5), 3498–3506.
Hu, J., Gardner, M.B., Miller, C.J., 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. J. Virol. 74 (13), 6087–6095.
Isidro, R.A., Appleyard, C.B., 2016. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 311 (1), G59–G73.
Kaushic, C., Nazli, A., Ferreira, V.H., Kafka, J.K., 2011. Primary human epithelial cell culture system for studying interactions between female upper genital tract and sexually transmitted viruses, HSV-2 and HIV-1. Methods 55 (2), 114–121.
Kolodkin-Gal, D., Hulot, S.L., Korioth-Schmitz, B., Gombos, R.B., Zheng, Y., Owuor, J., Lifton, M.A., Ayeni, C., Najarian, R.M., Yeh, W.W., Asmal, M., Zamir, G., Letvin, N.L., 2013. Efficiency of cell-free and cell-associated virus in mucosal transmission of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. J. Virol. 87 (24), 13589–13597.
Lawrence, P., Portran, D., Terrasse, R., Palle, S., Olivier, T., Fantini, J., Bourlet, T., Pozzetto, B., Delezay, O., 2012. Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. AIDS 26 (7), 785–796.
Le Tortorec, A., Satie, A.P., Denis, H., Rioux-Leclercq, N., Havard, L., Ruffault, A., Jegou, B., Dejucq-Rainsford, N., 2008. Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo. Retrovirology 5 (1), 119.
MacDonald, E.M., Savoy, A., Gillgrass, A., Fernandez, S., Smieja, M., Rosenthal, K.L., Ashkar, A.A., Kaushic, C., 2007. Susceptibility of human female primary genital epithelial cells to herpes simplex virus, type-2 and the effect of TLR3 ligand and sex hormones on infection. Biol. Reprod. 77 (6), 1049–1059.
Maher, D., Wu, X., Schacker, T., Horbul, J., Southern, P., 2005. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (32), 11504–11509.
Martin-Latil, S., Gnadig, N.F., Mallet, A., Desdouits, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M.C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S., Ceccaldi, P.E., 2012. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. Blood 120 (3), 572–580.
Matusali, G., Dereuddre-Bosquet, N., Le Tortorec, A., Moreau, M., Satie, A.P., Mahe, D., Roumaud, P., Bourry, O., Sylla, N., Bernard-Stoecklin, S., Pruvost, A., Le Grand, R., Dejucq-Rainsford, N., 2015. Detection of simian immunodeficiency virus in semen, urethra, and male reproductive organs during efficient highly active antiretroviral therapy. J. Virol. 89 (11), 5772–5787.
Meyers, C., Andreansky, S.S., Courtney, R.J., 2003. Replication and interaction of herpes simplex virus and human papillomavirus in differentiating host epithelial tissue. Virology 315 (1), 43–55.
Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B., Laimins, L.A., 1992. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. Science 257 (5072), 971–973.
Miller, C.J., Hu, J., 1999. T cell-tropic simian immunodeficiency virus (SIV) and simian-human immunodeficiency viruses are readily transmitted by vaginal inoculation of rhesus macaques, and Langerhans' cells of the female genital tract are infected with SIV. J. Infect. Dis. 179 (Suppl 3), S413–S417.
Mullin, J.M., Diguilio, K.M., Valenzano, M.C., Deis, R., Thomas, S., Zurbach, E.P., Abdulhaqq, S., Montaner, L.J., 2017. Zinc reduces epithelial barrier compromise induced by human seminal plasma. PLoS One 12 (3), e0170306.
Munch, J., Rucker, E., Standker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., Gimenez-Gallego, G., Sanchez, P.C., Fowler, D.M., Koulov, A., Kelly, J.W., Mothes, W., Grivel, J.C., Margolis, L., Keppler, O.T., Forssmann, W.G., Kirchhoff, F., 2007. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. Cell 131 (6), 1059–1071.
Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., Kaushic, C., 2010. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. PLoS Pathog. 6 (4), e1000852.
Nazli, A., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B.J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M.F., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Mossman, K.L., Ashkar, A.A., Kovacs, C., Bowdish, D.M., Snider, D.P., Kaul, R., Kaushic, C., 2013. HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. J. Immunol. 191 (8), 4246–4258.
Nazli, A., Yao, X.D., Smieja, M., Rosenthal, K.L., Ashkar, A.A., Kaushic, C., 2009. Differential induction of innate anti-viral responses by TLR ligands against Herpes simplex virus, type 2, infection in primary genital epithelium of women. Antivir. Res. 81 (2), 103–112.
Nguyen, P.V., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Roth, K., Kaushic, C., 2014. Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. Cell. Mol. Immunol. 11 (5), 410–427.
Patterson, B.K., Landay, A., Siegel, J.N., Flener, Z., Pessis, D., Chaviano, A., Bailey, R.C., 2002. Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture. Am. J. Pathol. 161 (3), 867–873.
Preza, G.C., Tanner, K., Elliott, J., Yang, O.O., Anton, P.A., Ochoa, M.T., 2014. Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. AIDS Res. Hum. Retrovir. 30 (3), 241–249.
Pudney, J., Anderson, D., 2011. Innate and acquired immunity in the human penile urethra. J. Reprod. Immunol. 88 (2), 219–227.
Pudney, J., Quayle, A.J., Anderson, D.J., 2005. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. Biol. Reprod. 73 (6), 1253–1263.
Pyles, R.B., Vincent, K.L., Baum, M.M., Elsom, B., Miller, A.L., Maxwell, C., Eaves-Pyles, T.D., Li, G., Popov, V.L., Nusbaum, R.J., Ferguson, M.R., 2014. Cultivated vaginal microbiomes alter HIV-1 infection and antiretroviral efficacy in colonized epithelial

multilayer cultures. PLoS One 9 (3), e93419.
Ribeiro Dos Santos, P., Rancez, M., Pretet, J.L., Michel-Salzat, A., Messent, V., Bogdanova, A., Couedel-Courteille, A., Souil, E., Cheynier, R., Butor, C., 2011. Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation. PLoS One 6 (5), e19493.
Roan, N.R., Liu, H., Usmani, S.M., Neidleman, J., Muller, J.A., Avila-Herrera, A., Gawanbacht, A., Zirafi, O., Chu, S., Dong, M., Kumar, S.T., Smith, J.F., Pollard, K.S., Fandrich, M., Kirchhoff, F., Munch, J., Witkowska, H.E., Greene, W.C., 2014. Liquefaction of semen generates and later degrades a conserved semenogelin peptide that enhances HIV infection. J. Virol. 88 (13), 7221–7234.
Rodriguez-Garcia, M., Barr, F.D., Crist, S.G., Fahey, J.V., Wira, C.R., 2014. Phenotype and susceptibility to HIV infection of CD4+ Th17 cells in the human female reproductive tract. Mucosal Immunol. 7 (6), 1375–1385.
Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., Barr, F.D., Boesch, A.W., Ackerman, M.E., Kappes, J.C., Ochsenbauer, C., Wira, C.R., 2017. Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV. Mucosal Immunol. 10 (2), 531–544.
Rollenhagen, C., Asin, S.N., 2011. Enhanced HIV-1 replication in ex vivo ectocervical tissues from post-menopausal women correlates with increased inflammatory responses. Mucosal Immunol. 4 (6), 671–681.
Roulet, V., Satie, A.P., Ruffault, A., Le Tortorec, A., Denis, H., Guist'hau, O., Patard, J.J., Rioux-Leclerq, N., Gicquel, J., Jegou, B., Dejucq-Rainsford, N., 2006. Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro. Am. J. Pathol. 169 (6), 2094–2103.
Saba, E., Grivel, J.C., Vanpouille, C., Brichacek, B., Fitzgerald, W., Margolis, L., Lisco, A., 2010. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervicovaginal tissue in an optimized ex vivo model. Mucosal Immunol. 3 (3), 280–290.
Saba, E., Origoni, M., Taccagni, G., Ferrari, D., Doglioni, C., Nava, A., Lisco, A., Grivel, J.C., Margolis, L., Poli, G., 2013. Productive HIV-1 infection of human cervical tissue ex vivo is associated with the secretory phase of the menstrual cycle. Mucosal Immunol. 6 (6), 1081–1090.
Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodrigues, C.R., Lenicov, F.R., Thepaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernandez, M., Arenzana-Seisdedos, F., Lortat-Jacob, H., Michalski, J.C., Geffner, J., Amigorena, S., 2011. Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. J. Immunol. 187 (10), 5299–5309.
Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., Manniou, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejucq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., Le Grand, R., 2010. Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. J. Infect. Dis. 202 (3), 337–344.
Shattock, R.J., Moore, J.P., 2003. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. Nat. Rev. Microbiol. 1 (1), 25–34.
Shen, R., Drelichman, E.R., Bimczok, D., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Cannon, J.A., Tudor, D., Bomsel, M., Smythies, L.E., Smith, P.D., 2010. GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. J. Immunol. 184 (7), 3648–3655.
Shen, R., Kappes, J.C., Smythies, L.E., Richter, H.E., Novak, L., Smith, P.D., 2014a. Vaginal myeloid dendritic cells transmit founder HIV-1. J. Virol. 88 (13), 7683–7688.
Shen, R., Richter, H.E., Smith, P.D., 2014b. Interactions between HIV-1 and mucosal cells in the female reproductive tract. Am. J. Reprod. Immunol. 71 (6), 608–617.
Shen, R., Richter, H.E., Clements, R.H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P.R., Smythies, L.E., Smith, P.D., 2009. Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. J. Virol. 83 (7), 3258–3267.
Sivard, P., Berlier, W., Picard, B., Sabido, O., Genin, C., Misery, L., 2004. HIV-1 infection of Langerhans cells in a reconstructed vaginal mucosa. J. Infect. Dis. 190 (2), 227–235.
Stary, G., Olive, A., Radovic-Moreno, A.F., Gondek, D., Alvarez, D., Basto, P.A., Perro, M., Vrbanac, V.D., Tager, A.M., Shi, J., Yethon, J.A., Farokhzad, O.C., Langer, R., Starnbach, M.N., von Andrian, U.H., 2015. VACCINES. A mucosal vaccine against Chlamydia trachomatis generates two waves of protective memory T cells. Science 348 (6241), aaa8205.
Stax, M.J., van Montfort, T., Sprenger, R.R., Melchers, M., Sanders, R.W., van Leeuwen, E., Repping, S., Pollakis, G., Speijer, D., Paxton, W.A., 2009. Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4(+) T-lymphocytes. Virology 391 (2), 203–211.
Stoddard, E., Ni, H., Cannon, G., Zhou, C., Kallenbach, N., Malamud, D., Weissman, D., 2009. gp340 promotes transcytosis of human immunodeficiency virus type 1 in genital tract-derived cell lines and primary endocervical tissue. J. Virol. 83 (17), 8596–8603.
Swaims-Kohlmeier, A., Haaland, R.E., Haddad, L.B., Sheth, A.N., Evans-Strickfaden, T., Lupo, L.D., Cordes, S., Aguirre, A.J., Lupoli, K.A., Chen, C.Y., Ofotukun, I., Hart, C.E., Kohlmeier, J.E., 2016. Progesterone levels associate with a novel population of CCR5 + CD38 + CD4 T cells resident in the genital mucosa with lymphoid trafficking potential. J. Immunol. 197 (1), 368–376.
Trifonova, R.T., Lieberman, J., van Baarle, D., 2014. Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission. Am. J. Reprod. Immunol. 71 (3), 252–264.
Tsilingiri, K., Rescigno, M., 2012. Should probiotics be tested on ex vivo organ culture models? Gut Microbes 3 (5), 442–448.
Tugizov, S.M., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W.C., Levy, J.A., Palefsky, J.M., 2011. Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia. J. Virol. 86 (5), 2556–2570.
Visalli, R.J., Courtney, R.J., Meyers, C., 1997. Infection and replication of herpes simplex virus type 1 in an organotypic epithelial culture system. Virology 230 (2), 236–243.

Références bibliographiques

Aalberts, M., Stout, T.A.E., and Stoorvogel, W. (2014). Prostasomes: extracellular vesicles from the prostate. REPRODUCTION *147*, R1–R14.

Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S.S., Frohlich, J.A., Grobler, A.C., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B., Sibeko, S., Mlisana, K.P., Omar, Z., et al. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. Science (80-.). *329*, 1168–1174.

Abdool Karim, Q., Abdool Karim, S.S., Frohlich, J.A., Grobler, A.C., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B.M., Sibeko, S., Mlisana, K.P., Omar, Z., et al. (2010). Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. Science (80-.). *329*, 1168–1174.

Abela, I.A., Berlinger, L., Schanz, M., Reynell, L., Günthard, H.F., Rusert, P., and Trkola, A. (2012). Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. PLoS Pathog. *8*, e1002634.

Abner, S.R., Guenthner, P.C., Guarner, J., Hancock, K.A., Cummins Jr., J.E., Fink, A., Gilmore, G.T., Staley, C., Ward, A., Ali, O., et al. (2005). A human colorectal explant culture to evaluate topical microbicides for the prevention of HIV infection. J Infect Dis *192*, 1545–1556.

Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function.

Agarwal, A., and Prabakaran, S.A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Indian J. Exp. Biol. *43*, 963–974.

Agosto, L.M., Zhong, P., Munro, J., and Mothes, W. (2014). Highly Active Antiretroviral Therapies Are Effective against HIV-1 Cell-to-Cell Transmission. PLoS Pathog. *10*, e1003982.

Alfsen, A., Yu, H., Magerus-Chatinet, A., Schmitt, A., and Bomsel, M. (2005). HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. Mol Biol Cell *16*, 4267–4279.

Anderson, D.J., and Le Grand, R. (2014). Cell-associated HIV mucosal transmission: the neglected pathway. J Infect Dis *210 Suppl*, S606-8.

Anderson, D.J., Politch, J.A., Martinez, A., Van Voorhis, B.J., Padian, N.S., and O'Brien, T.R. (1991). White blood cells and HIV-1 in semen from vasectomised seropositive men . Lancet *338*, 573–574.

Anderson, D.J., Politch, J.A., Nadolski, A.M., Blaskewicz, C.D., Pudney, J., and Mayer, K.H. (2010a). Targeting Trojan Horse leukocytes for HIV prevention. AIDS *24*, 163–187.

Anderson, J.A., Ping, L.-H., Dibben, O., Jabara, C.B., Arney, L., Kincer, L., Tang, Y., Hobbs, M., Hoffman, I., Kazembe, P., et al. (2010b). HIV-1 Populations in Semen Arise through Multiple Mechanisms. PLoS Pathog. *6*, e1001053.

Andrews, C., McLean, M.H., and Durum, S.K. (2018). Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. Front. Immunol. *9*, 1270.

Anton, P.A., Saunders, T., Elliott, J., Khanukhova, E., Dennis, R., Adler, A., Cortina, G., Tanner, K., Boscardin, J., Cumberland, W.G., et al. (2011). First phase 1 double-blind, placebo-controlled,

randomized rectal microbicide trial using UC781 gel with a novel index of ex vivo efficacy. PLoS One *6*, e23243.

Antoni, L., Nuding, S., Weller, D., Gersemann, M., Ott, G., Wehkamp, J., and Stange, E.F. (2013). Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides ☆.

Arien, K.K., Kyongo, J.K., and Vanham, G. (2012). Ex vivo models of HIV sexual transmission and microbicide development. Curr HIV Res *10*, 73–78.

Azevedo-Pereira, J.M., and Santos-Costa, Q. HIV Interaction With Human Host: HIV-2 As a Model of a Less Virulent Infection. AIDS Rev. *18*, 44–53.

Baccetti, B., Benedetto, A., Burrini, A.G., Collodel, G., Elia, C., Piomboni, P., Renieri, T., Sensini, C., and Zaccarelli, M. (1991). HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. J Submicrosc Cytol Pathol *23*, 339–345.

Baeten, J.M., Palanee-Phillips, T., Brown, E.R., Schwartz, K., Soto-Torres, L.E., Govender, V., Mgodi, N.M., Matovu Kiweewa, F., Nair, G., Mhlanga, F., et al. (2016). Use of a Vaginal Ring Containing Dapivirine for HIV-1 Prevention in Women. N. Engl. J. Med. *375*, 2121–2132.

Bagasra, O., Farzadegan, H., Seshamma, T., Oakes, J.W., Saah, A., and Pomerantz, R.J. (1994). Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. AIDS *8*, 1669–1674.

Baird, T.M., South Clinical, M., Salam, A.P., and Horby, P.W. The Breadth of Viruses in Human Semen.

Balandya, E., Sheth, S., Sanders, K., Wieland-Alter, W., and Lahey, T. (2010). Semen protects CD4+ target cells from HIV infection but promotes the preferential transmission of R5 tropic HIV. J. Immunol. *185*, 7596–7604.

Ball, J.K., Curran, R., Irving, W.L., and Dearden, A.A. (1999). HIV-1 in semen: determination of proviral and viral titres compared to blood, and quantification of semen leukocyte populations. J Med Virol *59*, 356–363.

Ballweber, L., Robinson, B., Kreger, A., Fialkow, M., Lentz, G., McElrath, M.J., and Hladik, F. (2011). Vaginal langerhans cells nonproductively transporting HIV-1 mediate infection of T cells. J Virol *85*, 13443–13447.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science (80-.). *220*, 868–871.

Barreto-de-Souza, V., Arakelyan, A., Margolis, L., and Vanpouille, C. (2014). HIV-1 vaginal transmission: cell-free or cell-associated virus? Am J Reprod Immunol *71*, 589–599.

Barros, M.H.M., Hauck, F., Dreyer, J.H., Kempkes, B., and Niedobitek, G. (2013). Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. PLoS One *8*, e80908.

Basu, S., Lynne, C.M., Ruiz, P., Aballa, T.C., Ferrell, S.M., and Brackett, N.L. Cytofluorographic identification of activated T-cell subpopulations in the semen of men with spinal cord injuries. J. Androl. *23*, 551–556.

Behbahani, M., Nosrati, M., and Mohabatkar, H. (2018). Inhibition of Human Immunodeficiency Type 1 Virus (HIV-1) Life Cycle by Different Egg White Lysozymes. Appl. Biochem. Biotechnol. *185*, 786–

798.

Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease.

Bergman, P., Roan, N.R., Römling, U., Bevins, C.L., and Münch, J. (2016). Amyloid formation: functional friend or fearful foe? J. Intern. Med. *280*, 139–152.

Berlier, W., Bourlet, T., Levy, R., Lucht, F., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2006a). Amount of seminal IL-1beta positively correlates to HIV-1 load in the semen of infected patients. J Clin Virol *36*, 204–207.

Berlier, W., Cremel, M., Hamzeh, H., Levy, R., Lucht, F., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2006b). Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. Hum Reprod *21*, 1135–1142.

Bernard-Stoecklin, S., Gommet, C., Corneau, A.B., Guenounou, S., Torres, C., Dejucq-Rainsford, N., Cosma, A., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2013). Semen CD4(+) T Cells and Macrophages Are Productively Infected at All Stages of SIV infection in Macaques. PLoS Pathog *9*, e1003810.

Bernard-Stoecklin, S., Gommet, C., Cavarelli, M., and Le Grand, R. (2014). Nonhuman primate models for cell-associated simian immunodeficiency virus transmission: the need to better understand the complexity of HIV mucosal transmission. J Infect Dis *210 Suppl*, S660-6.

Bhat, S., Spitalnik, S.L., Gonzalez-Scarano, F., and Silberberg, D.H. (1991). Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 7131–7134.

Bobardt, M.D., Chatterji, U., Selvarajah, S., Van der Schueren, B., David, G., Kahn, B., and Gallay, P.A. (2007). Cell-free human immunodeficiency virus type 1 transcytosis through primary genital epithelial cells. J Virol *81*, 395–405.

Boeras, D.I., Hraber, P.T., Hurlston, M., Evans-Strickfaden, T., Bhattacharya, T., Giorgi, E.E., Mulenga, J., Karita, E., Korber, B.T., Allen, S., et al. (2011). Role of donor genital tract HIV-1 diversity in the transmission bottleneck. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, E1156-63.

Bomsel, M. (1997). Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. Nat Med *3*, 42–47.

Bomsel, M., and Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 57–68.

Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., Belec, L., Dupont, C., and Desgranges, C. (1998). Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. Immunity *9*, 277–287.

Bomsel, M., Pastori, C., Tudor, D., Alberti, C., Garcia, S., Ferrari, D., Lazzarin, A., and Lopalco, L. (2007). Natural mucosal antibodies reactive with first extracellular loop of CCR5 inhibit HIV-1 transport across human epithelial cells. AIDS *21*, 13–22.

Bouhlal, H., Chomont, N., Haeffner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M.D., Belec, L., and Hocini, H. (2002). Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. J Immunol *169*, 3301–3306.

Bouhlal, H., Chomont, N., Réquena, M., Nasreddine, N., Saidi, H., Legoff, J., Kazatchkine, M.D., Bélec,

L., and Hocini, H. (2007). Opsonization of HIV with complement enhances infection of dendritic cells and viral transfer to CD4 T cells in a CR3 and DC-SIGN-dependent manner. J. Immunol. *178*, 1086–1095.

Bouschbacher, M., Bomsel, M., Verronese, E., Gofflo, S., Ganor, Y., Dezutter-Dambuyant, C., and Valladeau, J. (2008). Early events in HIV transmission through a human reconstructed vaginal mucosa. AIDS *22*, 1257–1266.

Bouvet, J.-P., Grésenguet, G., and Bélec, L. (1997). Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. Clin. Microbiol. Infect. *3*, 19–23.

Brazil, J.C., Lee, W.Y., Kolegraff, K.N., Nusrat, A., Parkos, C.A., and Louis, N.A. (2010). Neutrophil migration across intestinal epithelium: evidence for a role of CD44 in regulating detachment of migrating cells from the luminal surface. J. Immunol. *185*, 7026–7036.

Bromfield, J.J. (2014). Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. J. Assist. Reprod. Genet. *31*, 627–636.

Bujan, L., Pasquier, C., Labeyrie, E., Lanusse-Crousse, P., Morucci, M., and Daudin, M. (2004). Insemination with isolated and virologically tested spermatozoa is a safe way for human immunodeficiency type 1 virus-serodiscordant couples with an infected male partner to have a child. Fertil Steril *82*, 857–862.

Bujan, L., Sergerie, M., Moinard, N., Martinet, S., Porte, L., Massip, P., Pasquier, C., and Daudin, M. (2007). Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1 infected patients under antiretroviral treatment. J Androl *28*, 444–452.

Butler, D.M., Delport, W., Kosakovsky Pond, S.L., Lakdawala, M.K., Cheng, P.M., Little, S.J., Richman, D.D., and Smith, D.M. (2010). The origins of sexually transmitted HIV among men who have sex with men. Sci Transl Med *2*, 18re1.

Camus, C., Matusali, G., Bourry, O., Mahe, D., Aubry, F., Bujan, L., Pasquier, C., Massip, P., Ravel, C., Zirafi, O., et al. (2016). Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4+ T-cell infection. AIDS *30*, 1197–1208.

Lo Caputo, S., Trabattoni, D., Vichi, F., Piconi, S., Lopalco, L., Villa, M.L., Mazzotta, F., and Clerici, M. (2003). Mucosal and systemic HIV-1-specific immunity in HIV-1-exposed but uninfected heterosexual men. AIDS *17*, 531–539.

Carballo-Diéguez, A., Stein, Z., Sáez, H., Dolezal, C., Nieves-Rosa, L., and Díaz, F. (2000). Frequent use of lubricants for anal sex among men who have sex with men: the HIV prevention potential of a microbicidal gel. Am. J. Public Health *90*, 1117–1121.

Carballo-Diéguez, A., Giguere, R., Dolezal, C., Chen, B.A., Kahn, J., Zimet, G., Mabragaña, M., Leu, C.-S., and McGowan, I. (2012). "Tell Juliana": Acceptability of the Candidate Microbicide VivaGel® and Two Placebo Gels Among Ethnically Diverse, Sexually Active Young Women Participating in a Phase 1 Microbicide Study. AIDS Behav. *16*, 1761–1774.

Cardo, D.M., Culver, D.H., Ciesielski, C.A., Srivastava, P.U., Marcus, R., Abiteboul, D., Heptonstall, J., Ippolito, G., Lot, F., McKibben, P.S., et al. (1997). A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group. N. Engl. J. Med. *337*, 1485–1490.

Cardona-Maya, W., Velilla, P.A., Montoya, C.J., Cadavid, A., and Rugeles, M.T. (2011). In vitro human

immunodeficiency virus and sperm cell interaction mediated by the mannose receptor. J Reprod Immunol *92*, 1–7.

Carreno, M.P., Chomont, N., Kazatchkine, M.D., Irinopoulou, T., Krief, C., Mohamed, A.S., Andreoletti, L., Matta, M., and Belec, L. (2002). Binding of LFA-1 (CD11a) to intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3; CD50) and ICAM-2 (CD102) triggers transmigration of human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes through mucosal epithelial cells. J Virol *76*, 32–40.

Cassol, E., Cassetta, L., Alfano, M., and Poli, G. (2010). Macrophage polarization and HIV-1 infection. J. Leukoc. Biol. *87*, 599–608.

Cavarelli, M., Foglieni, C., Rescigno, M., and Scarlatti, G. (2013). R5 HIV-1 envelope attracts dendritic cells to cross the human intestinal epithelium and sample luminal virions via engagement of the CCR5. EMBO Mol Med *5*, 776–794.

Cavrois, M., Banerjee, T., Mukherjee, G., Raman, N., Hussien, R., Rodriguez, B.A., Vasquez, J., Spitzer, M.H., Lazarus, N.H., Jones, J.J., et al. (2017). Mass Cytometric Analysis of HIV Entry, Replication, and Remodeling in Tissue CD4+ T Cells. Cell Rep. *20*, 984–998.

Ceballos, A., Remes Lenicov, F., Sabatte, J., Rodriguez Rodrigues, C., Cabrini, M., Jancic, C., Raiden, S., Donaldson, M., Agustin Pasqualini Jr., R., Marin-Briggiler, C., et al. (2009). Spermatozoa capture HIV-1 through heparan sulfate and efficiently transmit the virus to dendritic cells. J Exp Med *206*, 2717–2733.

Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. Nature *372*, 190–193.

Chancey, C.J., Khanna, K. V, Seegers, J.F., Zhang, G.W., Hildreth, J., Langan, A., and Markham, R.B. (2006). Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. J Immunol *176*, 5627–5636.

Chen, B.A., Panther, L., Marzinke, M.A., Hendrix, C.W., Hoesley, C.J., van der Straten, A., Husnik, M.J., Soto-Torres, L., Nel, A., Johnson, S., et al. (2015). Phase 1 Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Dapivirine and Maraviroc Vaginal Rings: A Double-Blind Randomized Trial. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *70*, 242–249.

Chen, P., Hubner, W., Spinelli, M.A., and Chen, B.K. (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. J Virol *81*, 12582–12595.

Chitre, A.S., Kattah, M.G., Rosli, Y.Y., Pao, M., Deswal, M., Deeks, S.G., Hunt, P.W., Abdel-Mohsen, M., Montaner, L.J., Kim, C.C., et al. (2018). A20 upregulation during treated HIV disease is associated with intestinal epithelial cell recovery and function. PLoS Pathog. *14*, e1006806.

Cicala, C., Martinelli, E., McNally, J.P., Goode, D.J., Gopaul, R., Hiatt, J., Jelicic, K., Kottilil, S., Macleod, K., O'Shea, A., et al. (2009). The integrin 4 7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *106*, 20877–20882.

Clayton, K.L., Garcia, J.V., Clements, J.E., and Walker, B.D. (2017). HIV Infection of Macrophages: Implications for Pathogenesis and Cure. Pathog. Immun. *2*, 179–192.

Coindre, S., Tchitchek, N., Alaoui, L., Vaslin, B., Bourgeois, C., Goujard, C., Avettand-Fenoel, V.,

Lecuroux, C., Bruhns, P., Le Grand, R., et al. (2018). Mass Cytometry Analysis Reveals the Landscape and Dynamics of CD32a+ CD4+ T Cells From Early HIV Infection to Effective cART. Front. Immunol. *9*, 1217.

Cole, A.M., and Lehrer, R.I. (2003). Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1. Curr. Pharm. Des. *9*, 1463–1473.

Collins, K.B., Patterson, B.K., Naus, G.J., Landers, D. V, and Gupta, P. (2000). Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. Nat Med *6*, 475–479.

Cone, R.A. (2014). Vaginal Microbiota and Sexually Transmitted Infections That May Influence Transmission of Cell-Associated HIV. J. Infect. Dis. *210*, S616–S621.

Corazziari, E.S. (2009). Intestinal Mucus Barrier in Normal and Inflamed Colon.

Cremel, M., Berlier, W., Hamzeh, H., Cognasse, F., Lawrence, P., Genin, C., Bernengo, J.C., Lambert, C., Dieu-Nosjean, M.C., and Delezay, O. (2005). Characterization of CCL20 secretion by human epithelial vaginal cells: involvement in Langerhans cell precursor attraction. J Leukoc Biol *78*, 158–166.

Cummins Jr., J.E., Guarner, J., Flowers, L., Guenthner, P.C., Bartlett, J., Morken, T., Grohskopf, L.A., Paxton, L., and Dezzutti, C.S. (2007). Preclinical testing of candidate topical microbicides for anti-human immunodeficiency virus type 1 activity and tissue toxicity in a human cervical explant culture. Antimicrob Agents Chemother *51*, 1770–1779.

Dalton, J.E., Cruickshank, S.M., Egan, C.E., Mears, R., Newton, D.J., Andrew, E.M., Lawrence, B., Howell, G., Else, K.J., Gubbels, M.-J., et al. (2006). Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. Gastroenterology *131*, 818–829.

Davidson, J.B., and Douglas, G.C. (1998). Modulation of integrin function inhibits HIV transmission to epithelial cells and fertilization. J. Reprod. Immunol. *41*, 271–290.

Dejucq, N., and Jegou, B. (2001). Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. Microbiol Mol Biol Rev *65*, 208–231.

Deleage, C., Moreau, M., Rioux-Leclercq, N., Ruffault, A., Jegou, B., and Dejucq-Rainsford, N. (2011). Human immunodeficiency virus infects human seminal vesicles in vitro and in vivo. Am J Pathol *179*, 2397–2408.

Denny, T.N., Scolpino, A., Garcia, A., Polyak, A., Weiss, S.N., Skurnick, J.H., Passannante, M.R., and Colon, J. (1995). Evaluation of T-lymphocyte subsets present in semen and peripheral blood of healthy donors: A report from the heterosexual transmission study. Cytometry *20*, 349–355.

Dezzutti, C.S. (2015). Animal and human mucosal tissue models to study HIV biomedical interventions: can we predict success? J Int AIDS Soc *18*, 20301.

Dezzutti, C.S., Rohan, L.C., Wang, L., Uranker, K., Shetler, C., Cost, M., Lynam, J.D., and Friend, D. (2012). Reformulated tenofovir gel for use as a dual compartment microbicide. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 2139–2142.

Dezzutti, C.S., Russo, J., Wang, L., Abebe, K.Z., Li, J., Friend, D.R., McGowan, I.M., and Rohan, L.C. (2014). Development of HIV-1 rectal-specific microbicides and colonic tissue evaluation. PLoS One *9*,

e102585.

Dippold, W., Wittig, B., Schwaeble, W., Mayet, W., and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (1993). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. Gut *34*, 1593–1597.

Doncel, G.F., Anderson, S., and Zalenskaya, I. (2014). Role of semen in modulating the female genital tract microenvironment--implications for HIV transmission. Am J Reprod Immunol *71*, 564–574.

Driessens, M.H., van Hulten, P., Zuurbier, A., La Rivière, G., and Roos, E. (1996). Inhibition and stimulation of LFA-1 and Mac-1 functions by antibodies against murine CD18. Evidence that the LFA-1 binding sites for ICAM-1, -2, and -3 are distinct. J. Leukoc. Biol. *60*, 758–765.

Druart, X., and de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. Anim. Reprod. Sci. *194*, 33–40.

Duan, Y.G., Zhang, Q., Liu, Y., Mou, L., Li, G., Gui, Y., and Cai, Z. (2014). Dendritic cells in semen of infertile men: association with sperm quality and inflammatory status of the epididymis. Fertil Steril *101*, 70–77 e3.

Dulioust, E., Du, A. Le, Costagliola, D., Guibert, J., Kunstmann, J.-M., Heard, I., Juillard, J.-C., Salmon, D., Leruez-Ville, M., Mandelbrot, L., et al. (2002). Semen alterations in HIV-1 infected men. Hum. Reprod. *17*, 2112–2118.

Duncan, C.J.A., Russell, R.A., and Sattentau, Q.J. (2013). High multiplicity HIV-1 cell-to-cell transmission from macrophages to CD4+ T cells limits antiretroviral efficacy. AIDS *27*, 2201–2206.

Durand, S., and Cimarelli, A. (2011). The Inside Out of Lentiviral Vectors. Viruses *3*, 132–159.

Dussaix, E., Guetard, D., Dauguet, C., D'Almeida, M., Auer, J., Ellrodt, A., Montagnier, L., and Auroux, M. (1993). Spermatozoa as potential carriers of HIV. Res Virol *144*, 487–495.

Dwinell, M.B., Eckmann, L., Leopard, J.D., Varki, N.M., and Kagnoff, M.F. (1999). Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. Gastroenterology *117*, 359–367.

Elliott, J., Fulcher, J.A., Ibarrondo, F.J., Tanner, K., Mcgowan, I., and Anton, P.A. Comparative Assessment of Small and Large Intestine Biopsies for Ex Vivo HIV-1 Pathogenesis Studies.

Fanibunda, S.E., Velhal, S.M., Raghavan, V.P., and Bandivdekar, A.H. (2008). CD4 independent binding of HIV gp120 to mannose receptor on human spermatozoa. J Acquir Immune Defic Syndr *48*, 389–397.

Fantini, J., Cook, D.G., NATHANSONt, N., Spitalnik, S.L., and Gonzalez-scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gpl20 receptor.

Fennessey, C.M., and Keele, B.F. (2013). Using nonhuman primates to model HIV transmission. Curr. Opin. HIV AIDS *8*, 280–287.

Ferreira, V.H., Kafka, J.K., and Kaushic, C. (2014). Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. Am. J. Reprod. Immunol. *71*, 543–554.

Fischetti, L., Barry, S.M., Hope, T.J., and Shattock, R.J. (2009). HIV-1 infection of human penile explant tissue and protection by candidate microbicides. AIDS *23*, 319–328.

Fletcher, P., Harman, S., Azijn, H., Armanasco, N., Manlow, P., Perumal, D., de Bethune, M.P., Nuttall, J., Romano, J., and Shattock, R. (2009). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by the candidate microbicide dapivirine, a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother *53*, 487–495.

Fletcher, P.S., Elliott, J., Grivel, J.C., Margolis, L., Anton, P., McGowan, I., and Shattock, R.J. (2006). Ex vivo culture of human colorectal tissue for the evaluation of candidate microbicides. AIDS *20*, 1237–1245.

Fox, C.A., Meldrum, S.J., and Watson, B.W. (1973). Continuous measurement by radio-telemetry of vaginal pH during human coitus. J. Reprod. Fertil. *33*, 69–75.

Frouard, J., Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2018). In vitro models for deciphering the mechanisms underlying the sexual transmission of viruses at the mucosal level. Virology *515*, 1–10.

Fuchs, E.J., Lee, L.A., Torbenson, M.S., Parsons, T.L., Bakshi, R.P., Guidos, A.M., Wahl, R.L., and Hendrix, C.W. (2007). Hyperosmolar Sexual Lubricant Causes Epithelial Damage in the Distal Colon: Potential Implication for HIV Transmission. J. Infect. Dis. *195*, 703–710.

Fuchs, E.J., Grohskopf, L.A., Lee, L.A., Bakshi, R.P., and Hendrix, C.W. (2013). Quantitative assessment of altered rectal mucosal permeability due to rectally applied nonoxynol-9, biopsy, and simulated intercourse. J Infect Dis *207*, 1389–1396.

Furci, L., Tolazzi, M., Sironi, F., Vassena, L., and Lusso, P. (2012). Inhibition of HIV-1 infection by human alpha-defensin-5, a natural antimicrobial peptide expressed in the genital and intestinal mucosae. PLoS One *7*, e45208.

Ganor, Y., and Bomsel, M. (2010). HIV-1 transmission in the male genital tract. Am J Reprod Immunol *65*, 284–291.

Ganor, Y., Zhou, Z., Tudor, D., Schmitt, A., Vacher-Lavenu, M.C., Gibault, L., Thiounn, N., Tomasini, J., Wolf, J.P., and Bomsel, M. (2010). Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans-T cell conjugates. Mucosal Immunol *3*, 506–522.

Gaudier, E., and Hoebler, C. (2006). Rôles physiologiques des mucines dans la barrière colique.

Ghosh, M., Shen, Z., Fahey, J. V., Cu-Uvin, S., Mayer, K., and Wira, C.R. (2010). Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female reproductive tract. Immunology *129*, 207–219.

Ghosn, J., Viard, J.-P., Katlama, C., de Almeida, M., Tubiana, R., Letourneur, F., Aaron, L., Goujard, C., Salmon, D., Leruez-Ville, M., et al. (2004). Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. AIDS *18*, 447–457.

Golumbeanu, M., Cristinelli, S., Rato, S., Munoz, M., Cavassini, M., Beerenwinkel, N., and Ciuffi, A. (2018). Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptional Heterogeneity in Latent and Reactivated HIV-Infected Cells. Cell Rep. *23*, 942–950.

Gorbach, P.M., Weiss, R.E., Fuchs, E., Jeffries, R.A., Hezerah, M., Brown, S., Voskanian, A., Robbie, E., Anton, P., and Cranston, R.D. (2012). The Slippery Slope: Lubricant Use and Rectal Sexually Transmitted Infections: A Newly Identified Risk.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. *3*, 23–35.

Gorodeski, G.I., and Goldfarb, J. (1998). Seminal fluid factor increases the resistance of the tight junctional complex of cultured human cervical epithelium CaSki cells. Fertil. Steril. *69*, 309–317.

Greenhead, P., Hayes, P., Watts, P.S., Laing, K.G., Griffin, G.E., and Shattock, R.J. (2000). Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. J Virol *74*, 5577–86.

Grivel, J.C., Penn, M.L., Eckstein, D.A., Schramm, B., Speck, R.F., Abbey, N.W., Herndier, B., Margolis, L., and Goldsmith, M.A. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor preferences determine target T-cell depletion and cellular tropism in human lymphoid tissue. J Virol *74*, 5347–5351.

Grizard, G., and Jimenez, C. (1997). [The examination of sperm in the study of male fertility]. Prog. Urol. *7*, 496–504.

Groot, F., van Capel, T.M., Schuitemaker, J.H., Berkhout, B., and de Jong, E.C. (2006). Differential susceptibility of naïve, central memory and effector memory T cells to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission. Retrovirology *3*, 52.

Groschwitz, K.R., and Hogan, S.P. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. J. Allergy Clin. Immunol. *124*, 3–20.

Guedon, J.T., Luo, K., Zhang, H., and Markham, R.B. (2015). Monoclonal and Single Domain Antibodies Targeting β-Integrin Subunits Block Sexual Transmission of HIV-1 in In Vitro and In Vivo Model Systems. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *69*, 278–285.

Gupta, S., Gach, J.S., Becerra, J.C., Phan, T.B., Pudney, J., Moldoveanu, Z., Joseph, S.B., Landucci, G., Supnet, M.J., Ping, L.H., et al. (2013). The Neonatal Fc receptor (FcRn) enhances human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transcytosis across epithelial cells. PLoS Pathog *9*, e1003776.

Gurney, K.B., Elliott, J., Nassanian, H., Song, C., Soilleux, E., McGowan, I., Anton, P.A., and Lee, B. (2005). Binding and transfer of human immunodeficiency virus by DC-SIGN+ cells in human rectal mucosa. J. Virol. *79*, 5762–5773.

Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature *326*, 662–669.

HALPERIN, D.T. (1999). Heterosexual Anal Intercourse: Prevalence, Cultural Factors, and HIV Infection and Other Health Risks, Part I. AIDS Patient Care STDS *13*, 717–730.

Ham, A.S., Nugent, S.T., Peters, J.J., Katz, D.F., Shelter, C.M., Dezzutti, C.S., Boczar, A.D., Buckheit, K.W., and Buckheit, R.W. (2015). The rational design and development of a dual chamber vaginal/rectal microbicide gel formulation for HIV prevention. Antiviral Res. *120*, 153–164.

Hansasuta, P., and Rowland-Jones, S.L. (2001). HIV-1 transmission and acute HIV-1 infection. Br. Med. Bull. *58*, 109–127.

Harizi, H., and Gualde, N. (2005). The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. Tissue Antigens *65*, 507–514.

Hayes, P.J., Miao, Y.M., Gotch, F.M., and Gazzard, B.G. (1999). Alterations in blood leucocyte adhesion molecule profiles in HIV-1 infection. Clin. Exp. Immunol. *117*, 331–334.

Hedger, M.P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis.

J Androl *32*, 625–640.

Hedger, M., Meinhardt, A., Michel, V., and Pilatz, A. (2015). Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. Asian J. Androl.

Herrera, C., Cranage, M., McGowan, I., Anton, P., and Shattock, R.J. (2009). Reverse transcriptase inhibitors as potential colorectal microbicides. Antimicrob Agents Chemother *53*, 1797–1807.

Herrera, C., Cranage, M., McGowan, I., Anton, P., and Shattock, R.J. (2011). Colorectal microbicide design: triple combinations of reverse transcriptase inhibitors are optimal against HIV-1 in tissue explants. AIDS *25*, 1971–1979.

Van Herrewege, Y., Michiels, J., Waeytens, A., De Boeck, G., Salden, E., Heyndrickx, L., van den Mooter, G., de Bethune, M.P., Andries, K., Lewi, P., et al. (2007). A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. Antivir. Res *74*, 111–124.

Hladik, F., Sakchalathorn, P., Ballweber, L., Lentz, G., Fialkow, M., Eschenbach, D., and McElrath, M.J. (2007). Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. Immunity *26*, 257–270.

Hocini, H., and Bomsel, M. (1999). Infectious Human Immunodeficiency Virus Can Rapidly Penetrate a Tight Human Epithelial Barrier by Transcytosis in a Process Impaired by Mucosal Immunoglobulins.

Hocini, H., Becquart, P., Bouhlal, H., Chomont, N., Ancuta, P., Kazatchkine, M.D., and Belec, L. (2001). Active and selective transcytosis of cell-free human immunodeficiency virus through a tight polarized monolayer of human endometrial cells. J Virol *75*, 5370–5374.

Hoffman, J.C., Anton, P.A., Baldwin, G.C., Elliott, J., Anisman-Posner, D., Tanner, K., Grogan, T., Elashoff, D., Sugar, C., Yang, O.O., et al. (2014). Seminal Plasma HIV-1 RNA Concentration Is Strongly Associated with Altered Levels of Seminal Plasma Interferon-gamma, Interleukin-17, and Interleukin-5. AIDS Res Hum Retroviruses.

Houzet, L., Matusali, G., and Dejucq-Rainsford, N. (2014). Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. J Infect Dis In press.

Houzet, L., Pérez-Losada, M., Matusali, G., Deleage, C., Dereuddre-Bosquet, N., Satie, A.-P., Aubry, F., Becker, E., Jégou, B., Le Grand, R., et al. (2018). Seminal Simian Immunodeficiency Virus in Chronically Infected Cynomolgus Macaques Is Dominated by Virus Originating from Multiple Genital Organs. J. Virol. *92*.

Hussain, L.A., and Lehner, T. (1995). Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. Immunology *85*, 475–484.

Hussain, L.A., Kelly, C.G., Rodin, A., Jourdan, M., and Lehner, T. (1995). Investigation of the complement receptor 3 (CD11b/CD18) in human rectal epithelium. Clin Exp Immunol *102*, 384–388.

Huynh, K., and Gulick, P.G. (2018). HIV, Prevention.

Introini, A., Boström, S., Bradley, F., Gibbs, A., Glaessgen, A., Tjernlund, A., and Broliden, K. (2017). Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants. PLOS Pathog. *13*, e1006402.

Isidro, R.A., and Appleyard, C.B. (2016). Colonic macrophage polarization in homeostasis,

inflammation, and cancer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol *311*, G59-73.

Iwami, S., Takeuchi, J.S., Nakaoka, S., Mammano, F., Clavel, F., Inaba, H., Kobayashi, T., Misawa, N., Aihara, K., Koyanagi, Y., et al. (2015). Cell-to-cell infection by HIV contributes over half of virus infection. Elife *4*.

Iwasaki, A. (2010). Antiviral immune responses in the genital tract: clues for vaccines. Nat Rev Immunol *10*, 699–711.

J Hart Masato Kato, D.N., Cogger, V.C., Clark, G.J., Verma, D., Vu, P.A., Kupresanin, F., Adam, R., Lo, T.-H., Silveira, P.A., and Fromm, P.D. (2018). in Dendritic Cell Migration CD302 in Mice and Humans Reveals a Role Function of the C-Type Lectin Receptor Characterization of the Expression and.

Jäger, S., Stange, E.F., and Wehkamp, J. (2010). Antimicrobial Peptides in Gastrointestinal Inflammation. Res. Int. J. Inflamm. *2010*, 11.

Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. Cell. Immunol. *281*, 51–61.

Jolly, C., Mitar, I., and Sattentau, Q.J. (2007). Requirement for an Intact T-Cell Actin and Tubulin Cytoskeleton for Efficient Assembly and Spread of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J. Virol. *81*, 5547–5560.

Kader, M., Bixler, S., Roederer, M., Veazey, R., and Mattapallil, J.J. (2009). CD4 T cell subsets in the mucosa are CD28+Ki-67-HLA-DR-CD69+ but show differential infection based on alpha4beta7 receptor expression during acute SIV infection. J. Med. Primatol. *38 Suppl 1*, 24–31.

Kafka, J.K., Sheth, P.M., Nazli, A., Osborne, B.J., Kovacs, C., Kaul, R., and Kaushic, C. (2012). Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat. AIDS *26*, 27–36.

Kaiserlian, D., Rigal, D., Abello, J., and Revillard, J.-P. (1991). Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. Eur. J. Immunol. *21*, 2415–2421.

Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J Immunol *188*, 21–28.

Kanwar, S., and Kubes, P. (1995). Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes. New Horiz. *3*, 93–104.

Karecla, P.I., Bowden, S.J., Green, S.J., and Kilshaw, P.J. (1995). Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin αM290β7 (αEβ7). Eur. J. Immunol. *25*, 852–856.

Keele, B.F., and Estes, J.D. (2014). Barriers to mucosal transmission of immunodeficiency viruses. Blood *118*, 839–846.

Kelly, R.W., Carr, G.G., and Critchley, H.O. (1997). A cytokine switch induced by human seminal plasma: an immune modulation with implications for sexually transmitted disease. Hum Reprod *12*, 677–681.

Keogan, S., Siegert, K., Wigdahl, B., and Krebs, F.C. (2015). Critical Review: Immunomodulation by Seminal Factors and Implications for Male-to-Female HIV-1 Transmission. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *69*, 131–137.

Kim, K.-A., Yolamanova, M., Zirafi, O., Roan, N.R., Standker, L., Forssmann, W.-G., Burgener, A., Dejucq-Rainsford, N., Hahn, B.H., Shaw, G.M., et al. (2010a). Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. Retrovirology *7*, 55.

Kim, S.-S., Peer, D., Kumar, P., Subramanya, S., Wu, H., Asthana, D., Habiro, K., Yang, Y.-G., Manjunath, N., Shimaoka, M., et al. (2010b). RNAi-mediated CCR5 Silencing by LFA-1-targeted Nanoparticles Prevents HIV Infection in BLT Mice. Mol. Ther. *18*, 370–376.

Kinlock, B.L., Wang, Y., Turner, T.M., Wang, C., and Liu, B. (2014). Transcytosis of HIV-1 through vaginal epithelial cells is dependent on trafficking to the endocytic recycling pathway. PLoS One *9*, e96760.

Klatt, N.R., Cheu, R., Birse, K., Zevin, A.S., Perner, M., Noël-Romas, L., Grobler, A., Westmacott, G., Xie, I.Y., Butler, J., et al. (2017). Vaginal bacteria modify HIV tenofovir microbicide efficacy in African women. Science (80-.). *356*, 938–945.

Klebanoff, S.J., and Kazazi, F. (1995). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the amine oxidase-peroxidase system. J. Clin. Microbiol. *33*, 2054–2057.

Kolodkin-Gal, D., Hulot, S.L., Korioth-Schmitz, B., Gombos, R.B., Zheng, Y., Owuor, J., Lifton, M.A., Ayeni, C., Najarian, R.M., Yeh, W.W., et al. (2013). Efficiency of Cell-Free and Cell-Associated Virus in Mucosal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Simian Immunodeficiency Virus. J. Virol. *87*, 13589–13597.

Kordy, K., Elliott, J., Tanner, K., Johnson, E.J., McGowan, I.M., and Anton, P.A. (2018). Human Semen or Seminal Plasma Does Not Enhance HIV-1BaL Ex Vivo Infection of Human Colonic Explants. AIDS Res. Hum. Retroviruses *34*, 459–466.

Korin, B., Dubovik, T., and Rolls, A. (2018). Mass cytometry analysis of immune cells in the brain. Nat. Protoc. *13*, 377–391.

Kouyos, R.D., Rusert, P., Kadelka, C., Huber, M., Marzel, A., Ebner, H., Schanz, M., Liechti, T., Friedrich, N., Braun, D.L., et al. (2018). Tracing HIV-1 strains that imprint broadly neutralizing antibody responses. Nature *561*, 406–410.

Lagenaur, L.A., Swedek, I., Lee, P.P., and Parks, T.P. (2015). Robust vaginal colonization of macaques with a novel vaginally disintegrating tablet containing a live biotherapeutic product to prevent HIV infection in women. PLoS One *10*, e0122730.

Lai, S.K., Hida, K., Shukair, S., Wang, Y.-Y., Figueiredo, A., Cone, R., Hope, T.J., and Hanes, J. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. J. Virol. *83*, 11196–11200.

Lawrence, P., Portran, D., Terrasse, R., Palle, S., Olivier, T., Fantini, J., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2012). Selective transmigration of monocyte-associated HIV-1 across a human cervical monolayer and its modulation by seminal plasma. AIDS *26*, 785–796.

Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D., and Doms, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 5215–5220.

Lisco, A., Munawwar, A., Introini, A., Vanpouille, C., Saba, E., Feng, X., Grivel, J.C., Singh, S., and Margolis, L. (2011). Semen of HIV-1-Infected Individuals: Local Shedding of Herpesviruses and Reprogrammed Cytokine Network. J Infect Dis *205*, 97–105.

Lisco, A., Introini, A., Munawwar, A., Vanpouille, C., Grivel, J.C., Blank, P., Singh, S., and Margolis, L. (2012). HIV-1 imposes rigidity on blood and semen cytokine networks. Am J Reprod Immunol *68*, 515–521.

Louissaint, N.A., Fuchs, E.J., Bakshi, R.P., Nimmagadda, S., Du, Y., MacUra, K.J., King, K.E., Wahl, R., Goldsmith, A.J., Caffo, B., et al. (2012a). Distribution of cell-free and cell-associated HIV surrogates in the female genital tract after simulated vaginal intercourse. J. Infect. Dis.

Louissaint, N.A., Nimmagadda, S., Fuchs, E.J., Bakshi, R.P., Cao, Y.J., Lee, L.A., Goldsmith, J., Caffo, B.S., Du, Y., King, K.E., et al. (2012b). Distribution of cell-free and cell-associated HIV surrogates in the colon after simulated receptive anal intercourse in men who have sex with men. J Acquir Immune Defic Syndr *59*, 10–17.

Lourenço, A.G., Komesu, M.C., Machado, A.A., Quintana, S.M., Bourlet, T., Pozzetto, B., and Delézay, O. (2014). Semen lactoferrin promotes CCL20 production by epithelial cells: Involvement in HIV transmission. World J. Virol. *3*, 11–17.

Luis M. Agosto1, Pradeep D. Uchil, and and Walther Mothes (2015). HIV cell-to-cell transmission: effects on pathogenesis and antiretroviral therapy. Trends Microbiol. *23*.

Madison, M., and Okeoma, C. (2015). Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. Viruses *7*, 4093–4118.

Madison, M.N., Roller, R.J., and Okeoma, C.M. (2014). Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. Retrovirology *11*, 102.

Mahalingam, A., Jay, J.I., Langheinrich, K., Shukair, S., McRaven, M.D., Rohan, L.C., Herold, B.C., Hope, T.J., and Kiser, P.F. (2011). Inhibition of the transport of HIV in vitro using a pH-responsive synthetic mucin-like polymer system. Biomaterials *32*, 8343–8355.

Maher, D., Wu, X., Schacker, T., Horbul, J., and Southern, P. (2005). HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 11504–11509.

Makvandi-Nejad, S., and Rowland-Jones, S. (2015). How does the humoral response to HIV-2 infection differ from HIV-1 and can this explain the distinct natural history of infection with these two human retroviruses? Immunol. Lett. *163*, 69–75.

Malbec, M., Porrot, F., Rua, R., Horwitz, J., Klein, F., Halper-Stromberg, A., Scheid, J.F., Eden, C., Mouquet, H., Nussenzweig, M.C., et al. (2013). Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. J. Exp. Med. *210*, 2813–2821.

Margolis, L., and Shattock, R. (2006). Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved? Nat. Rev. Microbiol. *4*, 312–317.

Martellini, J.A., Cole, A.L., Venkataraman, N., Quinn, G.A., Svoboda, P., Gangrade, B.K., Pohl, J., Sorensen, O.E., and Cole, A.M. (2009). Cationic polypeptides contribute to the anti-HIV-1 activity of human seminal plasma. Faseb J *23*, 3609–3618.

Martin-Latil, S., Gnadig, N.F., Mallet, A., Desdouits, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M.C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S., et al. (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. Blood *120*, 572–580.

Martinelli, E., Veglia, F., Goode, D., Guerra-Perez, N., Aravantinou, M., Arthos, J., Piatak, M., Lifson, J.D., Blanchard, J., Gettie, A., et al. (2013). The Frequency of α4β7high Memory CD4+ T Cells

Correlates With Susceptibility to Rectal Simian Immunodeficiency Virus Infection. JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *64*, 325–331.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (1000). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment.

Mayumi K. Holly, Karina Diaz, and Jason G. Smith (2017). Defensins in Viral Infection and Pathogenesis. Annu. Rev. Virol. *4*, 69–91.

Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. PLoS Pathog. *6*, e1000788.

McConville, C., Boyd, P., and Major, I. (2014). Efficacy of Tenofovir 1% Vaginal Gel in Reducing the Risk of HIV-1 and HSV-2 Infection. Clin. Med. Insights. Women's Heal. *7*, 1–8.

McDermaid, A., Monier, B., Zhao, J., Liu, B., and Ma, Q. (2018). Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. Brief. Bioinform.

McElrath, M.J., Smythe, K., Randolph-Habecker, J., Melton, K.R., Goodpaster, T.A., Hughes, S.M., Mack, M., Sato, A., Diaz, G., Steinbach, G., et al. (2013). Comprehensive assessment of HIV target cells in the distal human gut suggests increasing HIV susceptibility toward the anus. J Acquir Immune Defic Syndr *63*, 263–271.

McGowan, I. (2014). The development of rectal microbicides for HIV prevention. Expert Opin Drug Deliv *11*, 69–82.

McGowan, I., and Dezzutti, C. (2014). Rectal microbicide development. Curr Top Microbiol Immunol *383*, 117–136.

Mendizabal, M. V, and Naftalin, R.J. (1992). Exposure of rat colonic mucosa to human semen in vivo induces mucosal cytolysis, abolishes fluid absorption and raises paracellular permeability. Clin. Sci. (Lond). *82*, 277–282.

Meng, G., Wei, X., Wu, X., Sellers, M.T., Decker, J.M., Moldoveanu, Z., Orenstein, J.M., Graham, M.F., Kappes, J.C., Mestecky, J., et al. (2002). Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. Nat Med *8*, 150–156.

Merbah, M., Introini, A., Fitzgerald, W., Grivel, J.C., Lisco, A., Vanpouille, C., and Margolis, L. (2011). Cervico-vaginal tissue ex vivo as a model to study early events in HIV-1 infection. Am J Reprod Immunol *65*, 268–278.

Mesquita, P.M., Cheshenko, N., Wilson, S.S., Mhatre, M., Guzman, E., Fakioglu, E., Keller, M.J., and Herold, B.C. (2009). Disruption of tight junctions by cellulose sulfate facilitates HIV infection: model of microbicide safety. J Infect Dis *200*, 599–608.

Mestecky, J. (2007). Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites. J. Reprod. Immunol. *73*, 86–97.

Mestecky, J., Alexander, R.C., Wei, Q., and Moldoveanu, Z. (2011). Methods for Evaluation of Humoral Immune Responses in Human Genital Tract Secretions. Am. J. Reprod. Immunol. *65*, 361–367.

Micsenyi, A.M., Zony, C., Alvarez, R.A., Durham, N.D., Chen, B.K., and Klotman, M.E. (2013).

Postintegration HIV-1 infection of cervical epithelial cells mediates contact-dependent productive infection of T cells. J. Infect. Dis. *208*, 1756–1767.

Miller, C.J., Alexander, N.J., Sutjipto, S., Lackner, A.A., Gettie, A., Hendrickx, A.G., Lowenstine, L.J., Jennings, M., and Marx, P.A. (1989). Genital mucosal transmission of simian immunodeficiency virus: animal model for heterosexual transmission of human immunodeficiency virus. J-Virol *63*, 4277–84 issn: 0022–538x.

Mori, A., Satsu, H., and Shimizu, M. (2003). New model for studying the migration of immune cells into intestinal epithelial cell monolayers. Cytotechnology *43*, 57–64.

Morris, G.C., Wiggins, R.C., Woodhall, S.C., Bland, J.M., Taylor, C.R., Jespers, V., Vcelar, B.A., and Lacey, C.J. (2014). MABGEL 1: First Phase 1 Trial of the Anti-HIV-1 Monoclonal Antibodies 2F5, 4E10 and 2G12 as a Vaginal Microbicide. PLoS One *9*, e116153.

Mossadegh-Keller, N., Gentek, R., Gimenez, G., Bigot, S., Mailfert, S., and Sieweke, M.H. (2017). Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. J. Exp. Med. *214*, 2829–2841.

Müller, J.A., Harms, M., Krüger, F., Groß, R., Joas, S., Hayn, M., Dietz, A.N., Lippold, S., von Einem, J., Schubert, A., et al. (2018). Semen inhibits Zika virus infection of cells and tissues from the anogenital region. Nat. Commun. *9*, 2207.

Mullin, J.M., Diguilio, K.M., Valenzano, M.C., Deis, R., Thomas, S., Zurbach, E.P., Abdulhaqq, S., and Montaner, L.J. (2017). Zinc reduces epithelial barrier compromise induced by human seminal plasma. PLoS One *12*, e0170306.

Munch, J., Sauermann, U., Yolamanova, M., Raue, K., Stahl-Hennig, C., and Kirchhoff, F. (2013). Effect of semen and seminal amyloid on vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. Retrovirology *10*, 148.

Münch, J., Rücker, E., Ständker, L., Adermann, K., Goffinet, C., Schindler, M., Wildum, S., Chinnadurai, R., Rajan, D., Specht, A., et al. (2007). Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection. Cell *131*, 1059–1071.

Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. Annu. Rev. Physiol. *79*, 541–566.

Naif, H.M. (2013). Pathogenesis of HIV Infection. Infect Dis Rep *5*, e6.

Nashan, D., Malorny, U., Sorg, C., Cooper, T., and Nieschlag, E. (1989). Immuno-competent cells in the murine epididymis. Int. J. Androl. *12*, 85–94.

Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., and Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. PLoS Pathog *6*, e1000852.

Nazli, A., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B.J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M.F., Ouellet, M., et al. (2013). HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. J Immunol *191*, 4246–4258.

Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Wong, J.H., and Chan, W.Y. (2015). Proteins, peptides, polysaccharides, and nucleotides with inhibitory activity on human immunodeficiency virus and its enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. *99*, 10399–10414.

Nguyen, P. V, Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Roth, K., and Kaushic, C. (2014). Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. Cell Mol Immunol *11*, 410–427.

Nicol, M.R., Fedoriw, Y., Mathews, M., Prince, H.M.A., Patterson, K.B., Geller, E., Mollan, K., Mathews, S., Kroetz, D.L., and Kashuba, A.D.M. (2014). Expression of six drug transporters in vaginal, cervical, and colorectal tissues: Implications for drug disposition in HIV prevention. J. Clin. Pharmacol. *54*, 574–583.

Nicopoullos, J.D., Almeida, P.A., Ramsay, J.W., and Gilling-Smith, C. (2004). The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. Hum Reprod *19*, 2289–2297.

O'Connor, T.J., Kinchington, D., Kangro, H.O., and Jeffries, D.J. (1995). The activity of candidate virucidal agents, low pH and genital secretions against HIV-1 in vitro. Int-J-STD-AIDS *6*, 267–4624.

Olinger, G.G., Saifuddin, M., and Spear, G.T. (2000). CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells. J. Virol. *74*, 8550–8557.

Olivier, A.J., Masson, L., Ronacher, K., Walzl, G., Coetzee, D., Lewis, D.A., Williamson, A.-L., Passmore, J.-A.S., and Burgers, W.A. (2014). Distinct Cytokine Patterns in Semen Influence Local HIV Shedding and HIV Target Cell Activation. J. Infect. Dis. *209*, 1174–1184.

Olsen, J.S., Brown, C., Capule, C.C., Rubinshtein, M., Doran, T.M., Srivastava, R.K., Feng, C., Nilsson, B.L., Yang, J., and Dewhurst, S. (2010). Amyloid-binding Small Molecules Efficiently Block SEVI (Semen-derived Enhancer of Virus Infection)- and Semen-mediated Enhancement of HIV-1 Infection. J. Biol. Chem. *285*, 35488–35496.

Omary, M.B., Brenner, D.A., de Grandpre, L.Y., Roebuck, K.A., Richman, D.D., and Kagnoff, M.F. (1991). HIV-1 infection and expression in human colonic cells: infection and expression in CD4+ and CD4- cell lines. AIDS *5*, 275–281.

Onyiah, J.C., and Colgan, S.P. (2016). Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. Cell. Mol. Life Sci. *73*, 4203–4212.

Owen, D.H., and Katz, D.F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. J Androl *26*, 459–469.

Paranjpe, S., Craigo, J., Patterson, B., Ding, M., Barroso, P., Harrison, L., Montelaro, R., and Gupta, P. (2002). Subcompartmentalization of HIV-1 Quasispecies between Seminal Cells and Seminal Plasma Indicates Their Origin in Distinct Genital Tissues. AIDS Res. Hum. Retroviruses *18*, 1271–1280.

Park, S.W., Royal, W., Semba, R.D., Wiegand, G.W., and Griffin, D.E. (1998). Expression of adhesion molecules and CD28 on T lymphocytes during human immunodeficiency virus infection. Clin. Diagn. Lab. Immunol. *5*, 583–587.

Parkos, C.A., Delp, C., Arnaout, M.A., and Madara, J.L. (1991). Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium. Dependence on a CD11b/CD18-mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. J. Clin. Invest. *88*, 1605–1612.

Parr, M.B., and Parr, E.L. (2000). Interferon-gamma up-regulates intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 and recruits lymphocytes into the vagina of immune mice challenged with herpes simplex virus-2. Immunology *99*, 540–545.

Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J., and Gotch, F. (2001). Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. J Virol *75*, 6710–6713.

Patton, D.L., Cosgrove Sweeney, Y.T., Rabe, L.K., and Hillier, S.L. (2002). Rectal applications of nonoxynol-9 cause tissue disruption in a monkey model. Sex. Transm. Dis. *29*, 581–587.

Patyka, M., Malamud, D., Weissman, D., Abrams, W.R., Kurago, Z., and Pöhlmann, S. (2015). Periluminal Distribution of HIV-Binding Target Cells and Gp340 in the Oral, Cervical and Sigmoid/Rectal Mucosae: A Mapping Study.

Pearce Pratt, R., and Phillips, D.M. (1993). Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. Biol-Reprod *48*, 431–3363.

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., et al. (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood *95*, 3289–3296.

Pereira, J.F.S., Awatade, N.T., Cláudia, •, Loureiro, A., Matos, P., Amaral, M.D., and Jordan, • Peter The third dimension: new developments in cell culture models for colorectal research.

Persico, T., Savasi, V., Ferrazzi, E., Oneta, M., Semprini, A.E., and Simoni, G. (2006). Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and in situ PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure. Hum. Reprod. *21*, 1525–1530.

Phillips, D.M., and Zacharopoulos, V.R. (1998). Nonoxynol-9 enhances rectal infection by herpes simplex virus in mice. Contraception *57*, 341–348.

Phillips, D.M., Taylor, C.L., Zacharopoulos, V.R., and Maguire, R.A. (2000). Nonoxynol-9 causes rapid exfoliation of sheets of rectal epithelium. Contraception *62*, 149–154.

Phillips, D.M., Sudol, K.M., Taylor, C.L., Guichard, L., Elsen, R., and Maguire, R.A. (2004). Lubricants containing N-9 may enhance rectal transmission of HIV and other STIs. Contraception *70*, 107–110.

Piomboni, P., and Baccetti, B. (2000). Spermatozoon as a vehicle for HIV-1 and other viruses: a review. Mol. Reprod. Dev. *56*, 238–242.

Pixley, F.J. (2012). Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. Int. J. Cell Biol. *2012*, 1–12.

Politch, J.A., Tucker, L., Bowman, F.P., and Anderson, D.J. (2007). Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod *22*, 2928–2935.

Politch, J.A., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (2009). Depletion of CD4 + T Cells in Semen During HIV Infection and Their Restoration Following Antiretroviral Therapy.

Politch, J.A., Marathe, J., and Anderson, D.J. (2014). Characteristics and quantities of HIV host cells in human genital tract secretions. J. Infect. Dis. *210 Suppl 3*, S609-15.

Pollakis, G., and Paxton, W.A. (2012). Use of (alternative) coreceptors for HIV entry. Curr Opin HIV AIDS *7*, 440–449.

Ponte, R., Dupuy, F.P., Brimo, F., Mehraj, V., Brassard, P., Belanger, M., Yurchenko, E., Jenabian, M.-A., Bernard, N.F., Routy, J.-P., et al. (2018). Characterization of myeloid cell populations in human

testes collected after sex reassignment surgery. J. Reprod. Immunol. *125*, 16–24.

Porcheray, F., Samah, B., Léone, C., Dereuddre-Bosquet, N., and Gras, G. (2006). Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production.

Preza, G.C., Tanner, K., Elliott, J., Yang, O.O., Anton, P.A., and Ochoa, M.T. (2014). Antigen-presenting cell candidates for HIV-1 transmission in human distal colonic mucosa defined by CD207 dendritic cells and CD209 macrophages. AIDS Res Hum Retroviruses *30*, 241–249.

Preza, G.C., Yang, O.O., Elliott, J., Anton, P.A., and Ochoa, M.T. (2015). T lymphocyte density and distribution in human colorectal mucosa, and inefficiency of current cell isolation protocols. PLoS One *10*, e0122723.

Pudney, J., Nguyen, H., Xu, C., and Anderson, D.J. (1999). Microscopic evidence against HIV-1 infection of germ cells or attachment to sperm. J Reprod Immunol *44*, 57–77.

Quayle, A.J., Xu, C., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (1997). T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. J Infect Dis *176*, 960–968.

Quayle, A.J., Coston, W.M., Trocha, A.K., Kalams, S.A., Mayer, K.H., and Anderson, D.J. (1998). Detection of HIV-1-specific CTLs in the semen of HIV-infected individuals. J Immunol *161*, 4406–4410.

Rametse, C.L., Olivier, A.J., Masson, L., Barnabas, S., McKinnon, L.R., Ngcapu, S., Liebenberg, L.J., Jaumdally, S.Z., Gray, C.M., Jaspan, H.B., et al. (2014). Role of Semen in Altering the Balance Between Inflammation and Tolerance in the Female Genital Tract: Does it Contribute to HIV Risk? Viral Immunol. *27*, 200–206.

Rebe, K.B., De Swardt, G., Berman, P.A., Struthers, H., and McIntyre, J.A. (2013). Sexual lubricants in South Africa may potentially disrupt mucosal surfaces and increase HIV transmission risk among men who have sex with men. South African Med. J. *104*, 49.

Reglero-Real, N., García-Weber, D., and Millán, J. (2016). Cellular Barriers after Extravasation: Leukocyte Interactions with Polarized Epithelia in the Inflamed Tissue. Mediators Inflamm. *2016*, 7650260.

Remes Lenicov, F., Varese, A., Merlotti, A., Geffner, J., and Ceballos, A. (2014). Prostaglandins in semen compromise the immune response against sexually transmitted pathogens. Med. Hypotheses *83*, 208–210.

Rennemeier, C., Schwab, M., Lermann, U., Albert, C., Kämmerer, U., Frambach, T., Morschhäuser, J., Dietl, J., and Staib, P. (2011). Seminal plasma protects human spermatozoa and pathogenic yeasts from capture by dendritic cells. Hum. Reprod. *26*, 987–999.

Rescigno, M., Rotta, G., Valzasina, B., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic Cells Shuttle Microbes Across Gut Epithelial Monolayers. Immunobiology *204*, 572–581.

Ribeiro Dos Santos, P., Rancez, M., Pretet, J.L., Michel-Salzat, A., Messent, V., Bogdanova, A., Couedel-Courteille, A., Souil, E., Cheynier, R., and Butor, C. (2011). Rapid dissemination of SIV follows multisite entry after rectal inoculation. PLoS One *6*, e19493.

Roan, N.R., and Greene, W.C. (2007). A Seminal Finding for Understanding HIV Transmission. Cell *131*,

1044–1046.

Roan, N.R., Munch, J., Arhel, N., Mothes, W., Neidleman, J., Kobayashi, A., Smith-McCune, K., Kirchhoff, F., and Greene, W.C. (2009). The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. J Virol *83*, 73–80.

Roan, N.R., Müller, J.A., Liu, H., Chu, S., Arnold, F., Stürzel, C.M., Walther, P., Dong, M., Witkowska, H.E., Kirchhoff, F., et al. (2011). Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection. Cell Host Microbe *10*, 541–550.

Roan, N.R., Chu, S., Liu, H., Neidleman, J., Witkowska, H.E., and Greene, W.C. (2014). Interaction of fibronectin with semen amyloids synergistically enhances HIV infection. J Infect Dis *210*, 1062–1066.

Robertson, S.A., and Sharkey, D.J. (2016). Seminal fluid and fertility in women. Fertil. Steril. *106*, 511–519.

Robertson, S.A., Ingman, W. V, O'Leary, S., Sharkey, D.J., and Tremellen, K.P. (2002). Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. J Reprod Immunol *57*, 109–128.

Robertson, S.A., Prins, J.R., Sharkey, D.J., and Moldenhauer, L.M. (2013). Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. Am J Reprod Immunol *69*, 315–330.

Röcker, A., Roan, N.R., Yadav, J.K., Fändrich, M., and Münch, J. (2018). Structure, function and antagonism of semen amyloids. Chem. Commun. (Camb). *54*, 7557–7569.

Rodriguez-Juan, C., Perez-Blas, M., Valeri, A.P., Aguilera, N., Arnaiz-Villena, A., Pacheco-Castro, A., and Martin-Villa, J.M. (2001). Cell surface phenotype and cytokine secretion in Caco-2 cell cultures: increased RANTES production and IL-2 transcription upon stimulation with IL-1beta. Tissue Cell *33*, 570–579.

Rodriguez-Martinez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., and Calvete, J.J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? Am J Reprod Immunol *66 Suppl 1*, 11–22.

Rolland, A.D., Lavigne, R., Dauly, C., Calvel, P., Kervarrec, C., Freour, T., Evrard, B., Rioux-Leclercq, N., Auger, J., and Pineau, C. (2013). Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. Hum. Reprod. *28*, 199–209.

Romas, L.M., Hasselrot, K., Aboud, L.G., Birse, K.D., Ball, T.B., Broliden, K., and Burgener, A.D. (2014). A comparative proteomic analysis of the soluble immune factor environment of rectal and oral mucosa. PLoS One *9*, e100820.

Ronen, K., Sharma, A., and Overbaugh, J. (2015). HIV transmission biology: translation for HIV prevention. AIDS *29*, 2219–2227.

Roulet, V., Satie, A.P., Ruffault, A., Le Tortorec, A., Denis, H., Guist'hau, O., Patard, J.J., Rioux-Leclerq, N., Gicquel, J., Jegou, B., et al. (2006). Susceptibility of human testis to human immunodeficiency virus-1 infection in situ and in vitro. Am J Pathol *169*, 2094–2103.

Sabatte, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomon, H., Amigorena, S., and Geffner, J. (2007). Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. J Virol *81*, 13723–13734.

Sabatte, J., Faigle, W., Ceballos, A., Morelle, W., Rodrigues, C.R., Lenicov, F.R., Thepaut, M., Fieschi, F., Malchiodi, E., Fernandez, M., et al. (2011). Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. J Immunol *187*, 5299–5309.

Sabatté, J., Ceballos, A., Raiden, S., Vermeulen, M., Nahmod, K., Maggini, J., Salamone, G., Salomón, H., Amigorena, S., and Geffner, J. (2007). Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. J. Virol. *81*, 13723–13734.

Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., and Talebi, A.R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd, Iran) *14*, 231–240.

Sagar, M., Akiyama, H., Etemad, B., Ramirez, N., Freitas, I., and Gummuluru, S. (2012). Transmembrane domain membrane proximal external region but not surface unit-directed broadly neutralizing HIV-1 antibodies can restrict dendritic cell-mediated HIV-1 trans-infection. J. Infect. Dis. *205*, 1248–1257.

La Sala, G.B., Pilotti, E., Nicoli, A., Pinelli, S., Villani, M.T., Ronzi, P., Zendri, E., Re, M.C., Magnani, G., and Casoli, C. (2007). Dynamics of HIV viral load in blood and semen of patients under HAART: impact of therapy in assisted reproduction procedures. AIDS *21*, 377–379.

Sales, K.J., Katz, A.A., Millar, R.P., and Jabbour, H.N. (2002). Seminal plasma activates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 receptor expression and signalling in cervical adenocarcinoma cells. Mol Hum Reprod *8*, 1065–1070.

Sales, K.J., Adefuye, A., Nicholson, L., and Katz, A.A. (2014). CCR5 expression is elevated in cervical cancer cells and is up-regulated by seminal plasma. MHR Basic Sci. Reprod. Med. *20*, 1144–1157.

Salle, B., Brochard, P., Bourry, O., Mannioui, A., Andrieu, T., Prevot, S., Dejucq-Rainsford, N., Dereuddre-Bosquet, N., and Le Grand, R. (2010). Infection of macaques after vaginal exposure to cell-associated simian immunodeficiency virus. J Infect Dis *202*, 337–344.

Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.

Savasi, V., Ferrazzi, E., Lanzani, C., Oneta, M., Parrilla, B., and Persico, T. (2007). Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. Hum. Reprod. *22*, 772–777.

Schieferdecker, H.L., Ullrich, R., Hirseland, H., and Zeitz, M. (1992). T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria. J. Immunol. *149*, 2816–2822.

Schnoor, M., Alcaide, P., Voisin, M.-B., and van Buul, J.D. (2015). Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. Mediators Inflamm. *2015*, 1–23.

Sellers, R.S., and Morton, D. (2014). The colon: from banal to brilliant. Toxicol. Pathol. *42*, 67–81.

Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., and Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. Mol Hum Reprod *13*, 491–501.

Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Jasper, M.J., Gemzell-Danielsson, K., and Robertson, S.A. (2012). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. J Immunol *188*, 2445–2454.

Sharma, S.C., Raison, N., Khan, S., Shabbir, M., Dasgupta, P., and Ahmed, K. (2018). Male circumcision for the prevention of human immunodeficiency virus (HIV) acquisition: a meta-analysis. BJU Int. *121*, 515–526.

Shen, R., Richter, H.E., Clements, R.H., Novak, L., Huff, K., Bimczok, D., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Clapham, P.R., Smythies, L.E., et al. (2009). Macrophages in vaginal but not intestinal mucosa are monocyte-like and permissive to human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol *83*, 3258–3267.

Shen, R., Richter, H.E., and Smith, P.D. (2010a). Early HIV-1 target cells in human vaginal and ectocervical mucosa. Am J Reprod Immunol *65*, 261–267.

Shen, R., Drelichman, E.R., Bimczok, D., Ochsenbauer, C., Kappes, J.C., Cannon, J.A., Tudor, D., Bomsel, M., Smythies, L.E., and Smith, P.D. (2010b). GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium. J Immunol *184*, 3648–3655.

Shen, R., Smythies, L.E., Clements, R.H., Novak, L., and Smith, P.D. (2010c). Dendritic cells transmit HIV-1 through human small intestinal mucosa. J. Leukoc. Biol. *87*, 663–670.

Shen, R., Richter, H.E., and Smith, P.D. (2014). Interactions between HIV-1 and Mucosal Cells in the Female Reproductive Tract.

Sheth, P.M., Danesh, A., Shahabi, K., Rebbapragada, A., Kovacs, C., Dimayuga, R., Halpenny, R., Macdonald, K.S., Mazzulli, T., Kelvin, D., et al. (2005). HIV-specific CD8+ lymphocytes in semen are not associated with reduced HIV shedding. J Immunol *175*, 4789–4796.

Sigal, A., Kim, J.T., Balazs, A.B., Dekel, E., Mayo, A., Milo, R., and Baltimore, D. (2011). Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. Nature *477*, 95–98.

Siguier, M., and Molina, J.-M. (2018). HIV preexposure prophylaxis: An essential, safe and effective prevention tool for sexual health.

Simbini, T., Umapathy, E., Jacobus, E., Tendaupenyu, G., and Mbizvo, M.T. (1998). Study on the origin of seminal leucocytes using split ejaculate technique and the effect of leucocytospermia on sperm characteristics. Urol Int *61*, 95–100.

Smith, D.C., Barratt, C.L., and Williams, M.A. (1989). The characterisation of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. Andrologia *21*, 319–333.

Smith, D.M., Kingery, J.D., Wong, J.K., Ignacio, C.C., Richman, D.D., and Little, S.J. (2004). The prostate as a reservoir for HIV-1. AIDS *18*, 1600–1602.

Söderlund, J., Hirbod, T., Goh, L., Andersson, J., and Broliden, K. (2004). Presence of HIV-1 Neutralizing IgA Antibodies in Primary HIV-1 Infected Patients. Scand. J. Infect. Dis. *36*, 663–669.

Spitzer, M.H., and Nolan, G.P. (2016). Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. Cell *165*, 780–791.

Stafford, M.K., Ward, H., Flanagan, A., Rosenstein, I.J., Taylor-Robinson, D., Smith, J.R., Weber, J., and Kitchen, V.S. (1998). Safety study of nonoxynol-9 as a vaginal microbicide: evidence of adverse effects. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. *17*, 327–331.

Stax, M.J., van Montfort, T., Sprenger, R.R., Melchers, M., Sanders, R.W., van Leeuwen, E., Repping,

S., Pollakis, G., Speijer, D., and Paxton, W.A. (2009). Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4+ T-lymphocytes. Virology *391*, 203–211.

Stax, M.J., Mouser, E.E.I.M., van Montfort, T., Sanders, R.W., de Vries, H.J.C., Dekker, H.L., Herrera, C., Speijer, D., Pollakis, G., and Paxton, W.A. (2015). Colorectal mucus binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 trans-infection of CD4+ T-lymphocytes. PLoS One *10*, e0122020.

Stief, T.W. (2003). Singlet oxygen (1O2)-oxidazable lipids in the HIV membrane, new targets for AIDS therapy? Med Hypotheses *60*, 575–577.

Stoddard, E., Cannon, G., Ni, H., Kariko, K., Capodici, J., Malamud, D., and Weissman, D. (2007). gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission. J Immunol *179*, 3126–3132.

Storey, D.F., Dolan, M.J., Anderson, S.A., Meier, P.A., and Walter, E.A. (1999). Seminal plasma RANTES levels positively correlate with seminal plasma HIV-1 RNA levels. AIDS *13*, 2169–2171.

Strugnell, R.A., and Wijburg, O.L.C. (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 656–667.

Sui, Y., Lee, E.M., Wang, Y., Hogg, A., Frey, B., Venzon, D., Pal, R., and Berzofsky, J.A. (2016). Early SIV Dissemination After Intrarectal SIVmac251 Challenge Was Associated With Proliferating Virus-Susceptible Cells in the Colorectum. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *71*, 353–358.

Sui, Y., Dzutsev, A., Venzon, D., Frey, B., Thovarai, V., Trinchieri, G., and Berzofsky, J.A. (2018). Influence of gut microbiome on mucosal immune activation and SHIV viral transmission in naive macaques. Mucosal Immunol. *11*, 1219–1229.

Tan, S., Lu, L., Li, L., Liu, J., Oksov, Y., Lu, H., Jiang, S., and Liu, S. (2013). Polyanionic Candidate Microbicides Accelerate the Formation of Semen-Derived Amyloid Fibrils to Enhance HIV-1 Infection. PLoS One *8*, e59777.

To, E.E., Hendrix, C.W., and Bumpus, N.N. (2013). Dissimilarities in the metabolism of antiretroviral drugs used in HIV pre-exposure prophylaxis in colon and vagina tissues. Biochem. Pharmacol. *86*, 979–990.

Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2010a). Infection of semen-producing organs by HIV and role in virus dissemination. Med Sci *26*, 861–868.

Le Tortorec, A., and Dejucq-Rainsford, N. (2010b). HIV infection of the male genital tract--consequences for sexual transmission and reproduction. Int J Androl *33*, e98-108.

Le Tortorec, A., Satie, A.P., Denis, H., Rioux-Leclercq, N., Havard, L., Ruffault, A., Jegou, B., and Dejucq-Rainsford, N. (2008a). Human prostate supports more efficient replication of HIV-1 R5 than X4 strains ex vivo. Retrovirology *5*, 119.

Le Tortorec, A., Le Grand, R., Denis, H., Satie, A.P., Mannioui, K., Roques, P., Maillard, A., Daniels, S., Jegou, B., and Dejucq-Rainsford, N. (2008b). Infection of semen-producing organs by SIV during the acute and chronic stages of the disease. PLoS One *3*, e1792.

Traore, Y.L., Chen, Y., and Ho, E.A. (2018). Current State of Microbicide Development. Clin. Pharmacol. Ther.

Tsilingiri, K., and Rescigno, M. (2012). Should probiotics be tested on ex vivo organ culture models? Gut Microbes *3*, 442–448.

Tugizov, S.M., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, D., Soros, V., Greene, W.C., Levy, J.A., and Palefsky, J.M. (2011). Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia. J Virol *86*, 2556–2570.

Ullrich, R., Schmidt, W., Zippel, T., Schneider, T., Zeitz, M., and Riecken, E.-O. (1998). Mucosal HIV Infection. Pathobiology *66*, 145–150.

UNAIDS (2013). report on the global AIDS epidemic .

Usmani, S.M., Zirafi, O., Müller, J.A., Sandi-Monroy, N.L., Yadav, J.K., Meier, C., Weil, T., Roan, N.R., Greene, W.C., Walther, P., et al. (2014). Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen. Nat. Commun. *5*, 3508.

Vainer, B., Sørensen, S., Seidelin, J., Nielsen, O.H., and Horn, T. (2003). Expression of ICAM-1 in colon epithelial cells: an ultrastructural study performed on in vivo and in vitro models. Virchows Arch. *443*, 774–781.

Vanpouille, C., Introini, A., Morris, S.R., Margolis, L., Daar, E.S., Dube, M.P., Little, S.J., Smith, D.M., Lisco, A., and Gianella, S. (2016). Distinct cytokine/chemokine network in semen and blood characterize different stages of HIV infection. AIDS *30*, 193–201.

Venkataraman, N., Cole, A.L., Svoboda, P., Pohl, J., and Cole, A.M. (2005). Cationic polypeptides are required for anti-HIV-1 activity of human vaginal fluid. J Immunol *175*, 7560–7567.

Wallach, E.E., and Wolff, H. (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil. Steril. *63*, 1143–1157.

Wang, M., Fijak, M., Hossain, H., Markmann, M., Nüsing, R.M., Lochnit, G., Hartmann, M.F., Wudy, S.A., Zhang, L., Gu, H., et al. (2017). Characterization of the Micro-Environment of the Testis that Shapes the Phenotype and Function of Testicular Macrophages. J. Immunol. *198*, 4327–4340.

Wei, H.-T., Guo, E.-N., Dong, B.-G., and Chen, L.-S. (2015). Prognostic and clinical significance of syndecan-1 in colorectal cancer: a meta-analysis.

Welch, J.L., Kaddour, H., Schlievert, P.M., Stapleton, J.T., and Okeoma, C.M. (2018). Semen Exosomes Promote Transcriptional Silencing of HIV-1 by Disrupting NF-κB/Sp1/Tat Circuitry. J. Virol. *92*.

Wheeler, L.A., Vrbanac, V., Trifonova, R., Brehm, M.A., Gilboa-Geffen, A., Tanno, S., Greiner, D.L., Luster, A.D., Tager, A.M., and Lieberman, J. (2013). Durable Knockdown and Protection From HIV Transmission in Humanized Mice Treated With Gel-formulated CD4 Aptamer-siRNA Chimeras. Mol. Ther. *21*, 1378–1389.

Wildenberg, M.E., and van den Brink, G.R. (2012). A major advance in ex vivo intestinal organ culture. Gut *61*, 961–962.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., W P de Jong, M.A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and H Geijtenbeek, T.B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells.

de Witte, L., Nabatov, A., and Geijtenbeek, T.B.H. (2008). Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. Trends Mol. Med. *14*, 12–19.

Wolff, H. (1995). The biologic significance of white blood cells in semen. Fertil Steril *63*, 1143–1157.

Wolff, H., and Anderson, D.J. (1988). Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril *49*, 497–504.

Wolters-Everhardt, E., Dony, J.M., Lemmens, W.A., Doesburg, W.H., and De Pont, J.J. (1986). Buffering capacity of human semen. Fertil Steril *46*, 114–119.

Wu, L., and KewalRamani, V.N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. Nat Rev Immunol *6*, 859–868.

Yahi, N., Baghdiguian, S., Moreau, H., and Fantini, J. (1992). Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. J Virol *66*, 4848–4854.

Zafer, M., Horvath, H., Mmeje, O., van der Poel, S., Semprini, A.E., Rutherford, G., and Brown, J. (2016). Effectiveness of semen washing to prevent human immunodeficiency virus (HIV) transmission and assist pregnancy in HIV-discordant couples: a systematic review and meta-analysis. Fertil. Steril. *105*, 645–655.e2.

Zaitseva, M., Blauvelt, A., Lee, S., Lapham, C.K., Klaus-Kovtun, V., Mostowski, H., Manischewitz, J., and Golding, H. (1997). Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. Nat Med *3*, 1369–1375.

Zheng, J., Xie, Y., Campbell, R., Song, J., Wang, R.Q., Chiu, R., Berenson, J., Razi, M., Massachi, S., Yang, O.O., et al. (2006). gp120-independent HIV infection of cells derived from the female reproductive tract, brain, and colon. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *43*, 127–136.

Zheng, W., Wang, Y., Chen, J., Zhu, Y., Li, M., Fan, L., and Li, X. (2017). Identification and function analysis of macrophages subsets in chronically inflamed human epididymis.

Zhi, Y., Gao, P., Xin, X., Li, W., Ji, L., Zhang, L., Zhang, X., and Zhang, J. (2017). Clinical significance of sCD163 and its possible role in asthma (Review). Mol. Med. Rep. *15*, 2931–2939.

Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S., and Yao, B. (2015). The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. PLoS One *10*, e0132974.

Zhou, Z., Xu, L., Sennepin, A., Federici, C., Ganor, Y., Tudor, D., Damotte, D., Barry Delongchamps, N., Zerbib, M., and Bomsel, M. The HIV-1 viral synapse signals human foreskin keratinocytes to secrete thymic stromal lymphopoietin facilitating HIV-1 foreskin entry. Mucosal Immunol *11*, 158–171.

Zhou, Z., Barry de Longchamps, N., Schmitt, A., Zerbib, M., Vacher-Lavenu, M.C., Bomsel, M., and Ganor, Y. (2011). HIV-1 efficient entry in inner foreskin is mediated by elevated CCL5/RANTES that recruits T cells and fuels conjugate formation with Langerhans cells. PLoS Pathog *7*, e1002100.

Zorn, B. (2009). Le sperme « inflammatoire »: ses relations avec la fertilité. Andrologie *19*, 35–44.

Le sperme est le principal vecteur de dissémination du VIH. La muqueuse colorectale exposée au sperme infecté lors de rapports anaux, aussi bien chez l'homme que chez la femme, représente le plus fort risque d'infection parmi toutes les voies de transmission sexuelle. Un nombre croissant d'études suggèrent que la transmission sexuelle du VIH via les cellules infectées présentes dans les sécrétions génitales du donneur serait plus efficace que par les particules virales libres.

A ce jour, le rôle et les mécanismes de transmission des cellules infectées du sperme et notamment des monocytes/macrophages, population de cellules cibles majoritaires dans ce fluide, ont été très peu étudiés. De plus, l'effet potentiel du liquide séminal (LS) sur cette transmission est mal connu. Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux axes :

(i) l'étude de la transmigration de monocytes et de macrophages dérivés du sang à travers l'épithélium colorectal et l'effet du LS sur cette transmigration et sur la barrière épithéliale elle-même. Nous avons ainsi montré la transmigration active et rapide de monocytes/macrophages à travers la barrière colorectale. Cependant, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du LS sur l'adhésion et la transmigration des monocytes et des macrophages à la barrière épithéliale colorectale, sans altération de cette dernière.

(ii) la caractérisation des leucocytes présents dans le sperme d'hommes non infectés et infectés par le VIH-1, et leur comparaison aux leucocytes sanguins. Nous avons révélé que les monocytes/macrophages et lymphocytes séminaux sont capables d'une transmigration active et rapide à travers la barrière colorectale, au même titre que leurs homologues sanguins. Grâce à des analyses par cytométrie de flux, nous avons détecté à la fois des particularités (marqueurs phénotypiques, expression de récepteurs de chimiokines, marqueurs d'activation…) et similitudes (e.g. molécules d'adhésion) par rapport aux leucocytes sanguins.

Ce travail fournit de nouvelles données sur la transmission du VIH-1 par les cellules infectées du sperme, et sur l'effet du liquide séminal sur l'adhésion et la transmigration des cellules de donneurs à travers la barrière colorectale. La démonstration de la transmigration de leucocytes séminaux suggère que ces cellules jouent un rôle dans la transmission du VIH-1 au niveau de la muqueuse colorectale qui nécessite d'être pris en compte dans les stratégies de prévention. Les mécanismes en jeu dans cette transmission et ceux responsables de l'effet inhibiteur du LS restent à élucider. La caractérisation fine des cellules séminales et des mécanismes d'adhésion devrait permettre à terme de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques.

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Titre : La transmission colorectale du VIH par les cellules infectées du sperme et effet du sperme sur cette transmission

Mots clés : VIH, transmission, muqueuse, sperme, colorectale

Résumé : Le sperme est le principal vecteur de dissémination du VIH. La muqueuse colorectale exposée au sperme infecté lors de rapports anaux, aussi bien chez l'homme que chez la femme, représente le plus fort risque d'infection parmi toutes les voies de transmission sexuelle. Un nombre croissant d'études suggèrent que la transmission sexuelle du VIH via les cellules infectées présentes dans les sécrétions génitales du donneur serait plus efficace que par les particules virales libres.

A ce jour, le rôle et les mécanismes de transmission des cellules infectées du sperme ont été peu étudiés. De plus, l'effet potentiel du liquide séminal (LS) sur cette transmission est mal connu. Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont permis de démontrer une transmigration active et rapide:

(i) de leucocytes sanguins à travers la barrière colorectale, et un effet inhibiteur du LS sur ce phénomène, sans altération de la barrière épithéliale.

(ii) de leucocytes séminaux. Des analyses par cytométrie de flux ont permis de mettre évidence à la fois des particularités et des similitudes quant à l'équipement protéique des cellules séminales et de leurs équivalents sanguins.

Ce travail fournit de nouvelles données sur la transmission du VIH par les cellules infectées du sperme, et sur l'effet du sperme sur la transmission colorectale. La démonstration de la transmigration de leucocytes séminaux suggère que ces cellules jouent un rôle dans la transmission du VIH au niveau colorectale qui nécessite d'être pris en compte dans les stratégies de prévention. Les mécanismes en jeu et ceux responsables de l'effet du LS restent à élucider et devrait permettre à terme de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques.

Title : HIV cell-associated transmission in the colorectal mucosa and its modulation by semen

Keywords : HIV, transmission, mucosa, semen, colorectal

Abstract: Semen is the main vector of HIV dissemination. The colorectal mucosa exposed to semen infected cells during anal intercourse, in both men and women, represents the highest risk of infection among all sexual transmission routes. An increasing number of studies suggest that sexual transmission of HIV via infected cells present in the donor's genital secretions would be more effective than free viral particles.

To date, the role and transmission mechanisms of infected sperm cells have been poorly studied. Moreover, the potential effect of seminal fluid (SF) on this transmission is poorly understood. In this context, my thesis work has demonstrated an active and rapid transmigration:

(i) of blood leukocytes across the colorectal barrier, and an inhibitory effect of SF on this phenomenon, without altering the epithelial barrier.

(ii) of seminal leucocytes. Flow cytometry analyzes have revealed both features and similarities in the protein equipment of seminal cells and their blood equivalents.

This work provides new data on HIV transmission by infected sperm cells, and on the effect of semen on colorectal transmission. Demonstration of transmigration of seminal leukocytes suggests that these cells play a role in colorectal HIV transmission that needs to be considered in prevention strategies. The mechanisms involved and those responsible for the effect of SF remain to be elucidated and should eventually lead to new therapeutic targets.